



Enología 2.015

Innovación vitivinícola

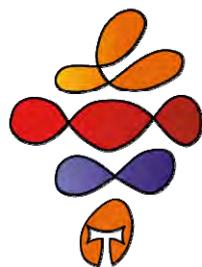


GIENOL
Grupos de
investigación
enológica

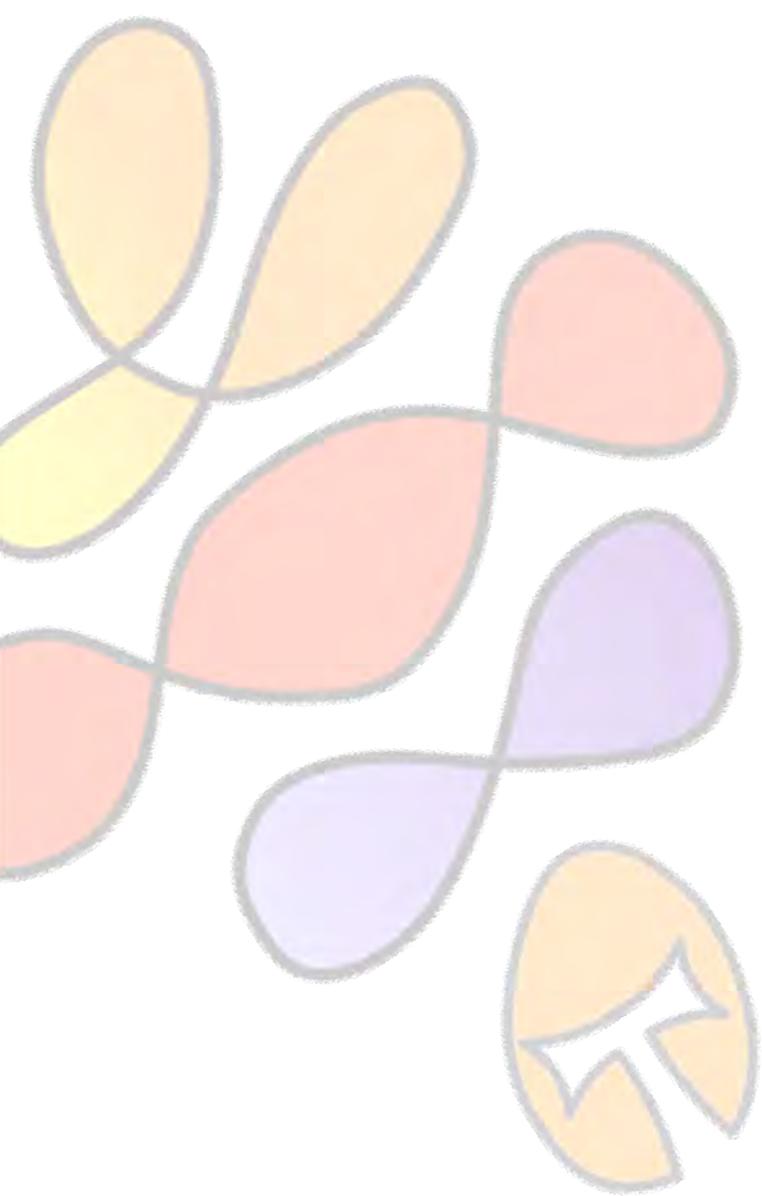


Enología2.015

Innovación vitivinícola



GIENOL2.015
Grupos de
investigación
enológica



EDITORES:

Josep Guasch i Torres
Olga Busto Busto
Montserrat Mestres i Solé
Laura Aceña Muñoz
Jaume Capdevila i Aranda

DISEÑO Y MAQUETACIÓN:

Alba Valls Trepas
Eva Borràs Iglesias
Sergi Fernández Pascual
Jaume Capdevila i Aranda

Segunda edición: septiembre 2015

ISBN: 978-84-8424-378-6

Servei de Publicacions de la URV
Campus Centre · Av. Catalunya, 35 · 43002 Tarragona
<http://www.publicacionsurv.cat/>



PRÓLOGO

Pocos frutos hay tan agradecidos como la uva. Pocos productos acompañados del misterioso encanto del vino al que da lugar. Cada proceso es original. Cada copa, la culminación del trabajo de un equipo de personas implicado en la consecución de un alimento clave para nuestro mediterráneo país.

De la cepa a la copa. Este libro recoge el amplio y significativo elenco de estudios recientemente realizados por los grupos de investigación de la red GIENOL. Estudios estratégicos en una coyuntura económica que ha conducido, necesariamente, a la optimización de los respectivos enfoques de viticultores, enólogos e investigadores, en aras de conseguir que los vinos españoles hagan gala de serlo en un mercado internacional cada vez más competitivo.

Confiamos en que el lector satisfaga su interés por conocer en qué trabajamos en la Red GIENOL para contribuir a la mejora de la calidad de uno de nuestros alimentos más emblemáticos, desde los tiempos de Noé.

Olga Busto Busto

ÍNDICE

V - VITICULTURA

V01 - LA APLICACIÓN FOLIAR DE METIL JASMONATO MEJORA LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE LA UVA Y DEL VINO	20
V02 - LA GLICOSIDACIÓN ES EL MECANISMO POR EL QUE LA VID ASIMILA LOS VOLÁTILES DEL MEDIOAMBIENTE Y LOS TRASMITE AL VINO	24
V03 - LOS EXTRACTOS DE SARMIENTO APLICADOS A HOJAS DE VID MODULAN EL AROMA DE LA UVA Y DEL VINO.....	28
V05 - INFLUENCIA DEL RIEGO Y EL ACLAREO DE RACIMOS EN LAS CARACTERÍSTICAS ENOLÓGICAS DEL MOSTO Y EL VINO DE LA VARIEDAD VERDEJO	32
V06 - TECNENOL (Grupo de Investigación en Tecnología Enológica): BASE DE DATOS DE SSR O MICROSTÉLITES DE <i>Vitis</i>	36
V07 - BODEGAS ALBET I NOYA: UNA APUESTA POR LA RECUPERACIÓN DE VARIEDADES CATALANAS ANTÍGUAS.....	40
V08 - UNIVERSALIDAD DE LAS METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA <i>Vitis vinifera</i> L. DE TECNENOL. APLICACIÓN EN OTRAS ESPECIES VEGETALES.....	44
V09 - INCIDENCIA DEL ESTADO HÍDRICO EN EL AROMA VARIETAL Y EN LOS PRECURSORES DE AROMAS DE FERMENTACIÓN EN EL cv. DOÑA BLANCA EN EXTREMADURA.....	48
V10 - INCIDENCIA DE LA ELEVACIÓN DE LA ALTURA DE VEGETACIÓN SOBRE LA CALIDAD DE VINOS CV. DOÑA BLANCA EN EXTREMADURA	52
V11 - EFECTO DEL TIPO DE SUELO Y DE LAS CONDICIONES CLIMÁTICAS EN LA COMPOSICIÓN AMINOACÍDICA DE LA UVA.....	56
V12 - ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD A MILDIU EN CULTIVARES DE VID POR INOCULACIÓN EN DISCO DE HOJA	60
V13 - EFECTO DEL DÉFICIT HÍDRICO SOBRE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE HOLLEJOS DEL CV. CABERNET SAUVIGNON DURANTE LA MADURACIÓN	64
V14 - ÍNDICE DE POTENCIAL AROMÁTICO VARIETAL EN EL CONTROL DE MADURACIÓN DE LA VARIEDAD ALBILLO EN LA D.O. "VINOS DE MADRID"	68
V15 - EFECTO ACUMULATIVO DE LA PRESIÓN DE TURGENCIA SOBRE EL CRECIMIENTO VEGETATIVO Y LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN <i>Vitis vinifera</i> CV. "ALBARIÑO" ...	72

V16 - INFLUENCIA DEL USO DE NUEVOS FERTILIZANTES EN LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE LOS VINOS CABERNET SAUVIGNON	76
V17 - EFECTO DEL ÁCIDO ABCSÍCO SOBRE LA FOTOSÍNTESIS Y CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES EN HOJAS Y BAYAS DE VID (<i>Vitis vinifera</i> L.) CV. CARMÉNÈRE	80
V18 - EFECTO DEL RIEGO ACIDIFICADO EN EL pH DEL SUELO, ABSORCIÓN DE NUTRIENTES Y CRECIMIENTO DE LA VID.	84
V19 - EFECTO DEL PORTAINJERTO EN LA VARIEDAD MARSELAN ADAPTADA AL CLIMA MEDITERRANEO.....	88
V20 - POTENCIAL ENOLÓGICO DE LA VARIEDAD CARABUÑENTA.....	92
V21 - ESTUDIOS PRELIMINARES DE LA SELECCIÓN DE CLONES DE LA VARIEDAD ESPADEIRO.....	96
M01 - VARIACIONES DEL PERFIL METABOLÓMICO EN LEVADURAS DURANTE EL PROCESO DE SECADO Y REHIDRATACIÓN	102
M02 - OBTENCIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA CEPA VÍNICA DE <i>CANDIDA ZEMPLININA</i> EN FORMA DE LSA.....	106
M03 - INCREMENTO DE LA TOLERANCIA AL SECADO DE CEPAS VÍNICAS DE <i>SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE</i>	110
M04 - FACTORES IMPLICADOS EN LA ALTERACIÓN DE LOS VINOS TINTOS POR LEVADURAS <i>Brettanomyces</i>	114
M05 - EFECTO DE LA ADICIÓN DE NUTRIENTES DE LEVADURA EN LA COMPOSICIÓN FINAL DE VINOS AIRÉN	118
M06 - CULTIVOS MIXTOS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : IMPLANTACIÓN Y CALIDAD DE LOS VINOS OBTENIDOS.....	122
M07 - LEVADURAS PRESENTES EN EL AIRE Y EN EL VINO DE UNA BODEGA DURANTE DOS VENDIMIAS CONSECUTIVAS	126
M08 - OBTENCIÓN DE CEPAS VÍNICAS HÍBRIDAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CON BUENAS APTITUDES TECNOLÓGICAS Y SENSORIALES.....	130
M09 - PROTEÍNAS DE PARED DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> DESPUÉS DE LA SEGUNDA FERMENTACIÓN EN BOTELLA.....	134
M10 - METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS DESPUÉS DE LA SEGUNDA FERMENTACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE CAVA	138
M11 - RUTAS METABÓLICAS IMPORTANTES EN LA FORMACIÓN DE VELO DE FLOR ..	142

M12 - EFECTO DE <i>Torulaspota delbrueckii</i> SOBRE LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA Y LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA DE VINOS BLANCOS	146
M13 - EFECTO DE <i>Torulaspota delbrueckii</i> SOBRE LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA Y LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA DE VINOS TINTOS	150
M14 - INOCULACIÓN DE CEPAS AUTÓCTONAS DE SACCHAROMYCES Y NO-SACCHAROMYCES EN VINOS DE LA D.O. "VINOS DE MADRID"	154
M15 - INFLUENCIA DE LA POBLACIÓN DE LEVADURAS EN FERMENTACIONES DE MOSTO ECOLÓGICO Y CONVENCIONAL DE LA VARIEDAD MENCÍA EN LA D.O. RIBEIRA SACRA (GALICIA)	158
M16 - DIVERSIDAD DE LEVADURAS EN BODEGAS QUE ELABORAN VINO ECOLÓGICO EN GALICIA	162
M17 - INCREMENTO DE LOS POLISACARIDOS Y PROTEINAS DEL CAVA UTILIZANDO LEVADURAS KILLER	166
M18 - MEJORA DE LA ESPUMA Y LA CALIDAD ORGANOLÉPTICA DEL CAVA UTILIZANDO LEVADURAS KILLER	170
M19 - ANÁLISIS DEL GENOMA DE LOS VIRUS DE LEVADURAS KILLER <i>Torulaspota delbrueckii</i> MEDIANTE NGS (NEW GENERATION SEQUENCING)	174
M20 - INFLUENCIA DE <i>Torulaspota delbrueckii</i> EN LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA Y LA CAPACIDAD ESPUMANTE DEL VINO BASE PARA CAVA	178
M21 - OPTIMIZACIÓN MULTIRRESPUESTA DE LAS CONDICIONES DE MICROENCAPSULACIÓN DE <i>O. oeni</i> EN SOPORTES DE SÍLICE-ALGINATO.....	182
M22 - SÍNTESIS Y APLICACIÓN DE NUEVAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA BIOCOMPATIBLES PARA EL CONTROL DEL CRECIMIENTO DE BACTERIAS LÁCTICAS Y ACÉTICAS EN VINOS.....	186
M23 - PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS VARIETALES POR CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS AUTÓCTONAS A PARTIR DE UN EXTRACTO DE PRECURSORES GLICOSILADOS DE UVA BLANCA.....	190
M24 - EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADICIÓN DE VELCORIN® SOBRE LA PARADA DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....	194
M25 - DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN RÁPIDA DE <i>Brettanomyces bruxellensis</i> EN VINO MEDIANTE LAMP	198
M26 - EFECTO DEL ANHÍDRIDO SULFUROSO, LA LISOZIMA Y EL DESCENSO DEL pH SOBRE LA MICROBIOTA LÁCTICA AUTÓCTONA EN VINOS DE RIBERA DEL DUERO	202

M27 - SELECCIÓN DE CEPAS DE <i>Lactobacillus</i> PARA LA INDUCCIÓN DE ACIDIFICACIÓN BIOLÓGICA EN VINOS DE PH ELEVADO	206
M28 - DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN RÁPIDAS DE <i>Brettanomyces bruxellensis</i> EN VINOS MEDIANTE qPCR y FISH-CF.....	210
M29 - SELECCIÓN DE CEPAS DE <i>Oenococcus oeni</i> PARA SU USO COMO CULTIVO INICIADOR MIXTO BIODINÁMICO	214
M30 - DESARROLLO DE ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA IMPLANTACIÓN DE UNA LEVADURA ECOLÓGICA SELECCIONADA.....	218
M31 - INMOVILIZACIÓN DE O. OENI EN GELES RECUBIERTOS CON SÍLICE PARA LA GESTIÓN DE LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA EN VINOS TINTOS.....	222
M32 - LEVADURAS COMO FUENTE DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS. ESTUDIO POBLACIONAL, ENZIMÁTICO Y APLICACIÓN EN FERMENTACIONES INDUSTRIALES ...	226
M33 - SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS AUTÓCTONAS DE UVAS Y VINOS DEL PRIORAT.....	230
M34 - EFECTO DE LA AERACIÓN Y TEMPERATURA SOBRE LA ACLIMATACIÓN DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> AL ETANOL PARA SU USO COMO INICIADOR DE LA SEGUNDA FERMENTACIÓN	234
M35 - INFLUENCIA DE LA INOCULACIÓN SECUENCIAL CON LEVADURAS <i>No-Saccharomyces (Torulaspora delbrueckii/Metschnikowia pulcherrima)</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SOBRE EL COLOR Y LA COMPOSICIÓN DEL VINO TINTO	238
M37 - CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INCORPORACIÓN DE GLUTATIÓN Y DE SU EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO EN CEPAS DE <i>OENOCOCCUS OENI</i>	242
M38 - USO DE LA ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE TRANSFORMADA DE FOURIER-REFLECTANCIA TOTAL ATENUADA COMBINADA CON ANALISIS MULTIVARIANTE PARA EL ESTUDIO DE LEVADURAS EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE VINO	246
M39 - LEVADURAS AUTÓCTONAS PARA PRODUCIR VINOS LIBRES DE DIÓXIDO DE AZUFRE	250
M40 - EFECTO DE LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS Y DERIVADOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE DIFERENTES LEVADURAS VÍNICAS.....	254
M41 - EMPLEO DE UN CONSORCIO DE LEVADURAS AUTÓCTONAS EN VINOS DE LA VARIEDAD CARIÑENA COMO HERRAMIENTA PARA REFLEJAR <i>TERROIR</i>	258
M42 - INTERACCIONES ENTRE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> Y <i>HANSENIASPORA UVARUM</i> EN FERMENTACIONES ALCOHÓLICAS	262

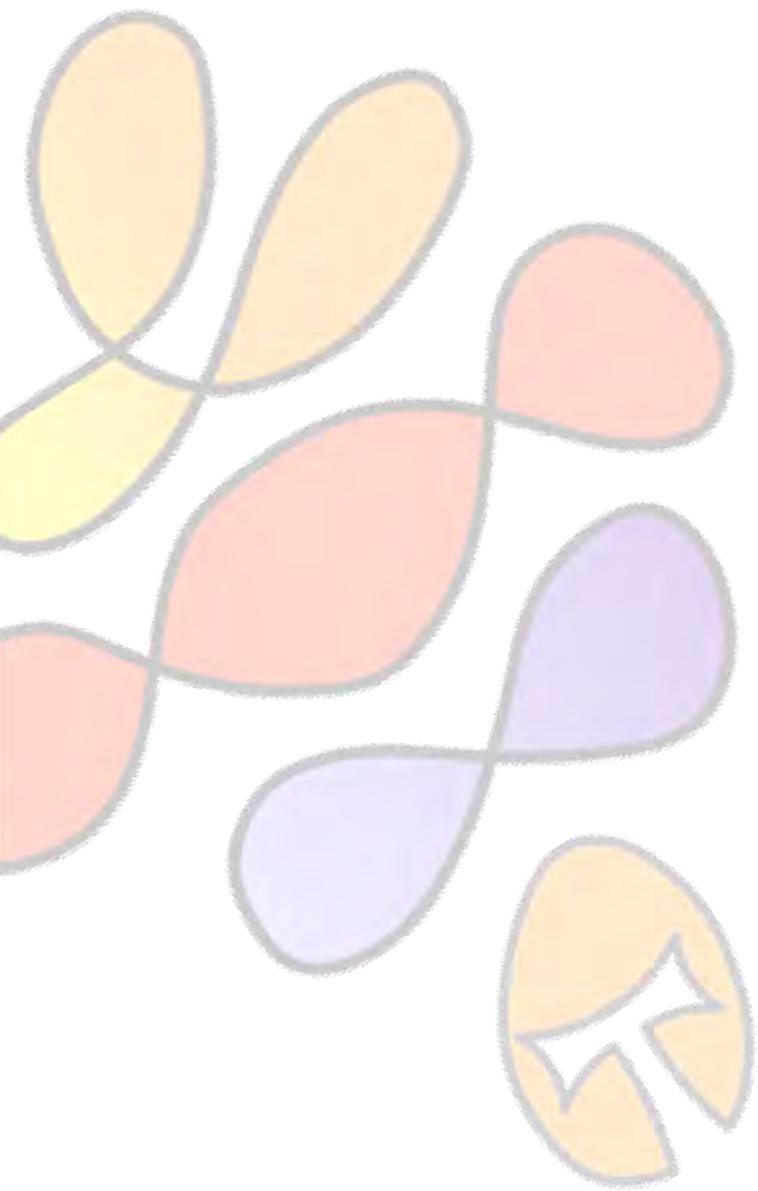
TE01 - INFLUENCIA DE LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA EN LA CONCENTRACIÓN DE MERCAPTANOS POLIFUNCIONALES EN VINOS DE LA VARIEDAD MERLOT -.....	268
TE02 - ALTERNATIVAS A LA ELABORACIÓN TRADICIONAL DE VINOS DULCES DE UVA PEDRO XIMÉNEZ PASIFICADA.....	272
TE03 - LA TRITURACIÓN DEL HOLLEJO COMO TÉCNICA PARA AUMENTAR LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DURANTE LA VINIFICACIÓN	276
TE04 - IMPACTO DEL POLIASPARTATO DE POTASIO EN LA ESTABILIDAD TARTÁRICA Y EL AROMA DE LOS VINOS.....	280
TE05 - INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y FORMATO DE LA LEVADURA SOBRE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES MAYORITARIOS EN LA SEGUNDA FERMENTACIÓN DEL CAVA	284
TE06 - ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE CAVAS ROSADOS ELABORADOS CON LEVADURAS INMOBILIZADAS EN BIOCÁPSULAS	288
TE07 - APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS DE VINIFICACIÓN PARA INCREMENTAR EL AROMA DE VINOS BLANCOS OBTENIDOS A PARTIR DE VARIEDADES DE UVA NEUTRAS	292
TE08 - RELACIÓN ENTRE EL PERFIL Y LA ESTABILIDAD PROTEICA DE VINOS PINOT GRIS	296
TE09 - BETA-GLUCOSIDASAS DE CEPAS DE LEVADURAS NATIVAS URUGUAYAS: ESTUDIO Y POTENCIAL APLICACIÓN EN LIBERACIÓN DE AROMAS EN VINOS.....	300
TE10 - INFLUENCIA DE LA FECHA DE VENDIMIA SOBRE EL PERFIL VOLÁTIL DE LOS VINOS DE ALBARELLO	304
TE11 - ELABORACIÓN DE VINOS ESPUMOSOS DE CALIDAD A PARTIR DE VARIEDADES TINTAS. EFECTO DE DIFERENTES TÉCNICAS VITIVINÍCOLAS EN LA COMPOSICIÓN POLIFENÓLICA.....	308
TE12 - MANEJO DE LA FERMENTACIÓN PRE FERMENTATIVA EN FRÍO CON LA LEVADURA SELECCIONADA <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	312
TE13 - EFECTO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE ELABORACIÓN EN EL AROMA Y SABOR DE VINOS BLANCOS DE TEMPRANILLO	316
TE14 - EFECTO DEL GRADO DE MADUREZ DE LA UVA Y TÉCNICAS ENOLÓGICAS EN LA COMPOSICIÓN VOLÁTIL DE VINOS TINTOS ESPUMOSOS	320
TE15 - INFLUENCIA DEL TIPO DE DEPÓSITO EN LA FERMENTACIÓN Y EVOLUCION DE LOS VINOS. COMPOSICIÓN AROMÁTICA.....	324

TE16 - EFECTO DEL TIPO DE DEPÓSITO SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS POLIFENÓLICOS DE VINO TINTO.....	328
TE17 - INNOVACIONES TECNOLÓGICAS EN LA ELABORACIÓN DE LOS VINOS VERDEJO DE CASTILLA-LA MANCHA.....	332
TE18 - MEJORA DEL AROMA DE LOS VINOS TINTOS DE LA VARIEDAD MORAVÍA DULCE MEDIANTE LA TÉCNICA CO-FERMENTACIÓN	336
TE19 - VIABILIDAD DEL EMPLEO DE QUITOSANO Y DE LEVADURAS SECAS INACTIVAS RICAS EN GLUTATIÓN COMO ALTERNATIVAS AL DIÓXIDO DE AZUFRE EN LA ELABORACIÓN DE VINO BLANCO	340
TE20 - EFECTOS DEL ENCOLADO CON PROTEÍNAS DE ORIGEN NO ANIMAL EN DIFERENTES CONDICIONES DE USO SOBRE LA CALIDAD DEL VINO	344
TE21- PRIMERAS EVIDENCIAS DE LA PRESENCIA DE PRODELFINIDINAS EN EL RASPÓN DEL RACIMO	348
TE22 - EMPLEO DE <i>TORULASPORA DELBRUECKII</i> EN LA ELABORACIÓN DE VINOS DULCES ANDALUCES. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y SENSORIAL	352
TE23 - UNA NUEVA LEVADURA ENOLÓGICA QUE PRODUCE MUY BAJOS NIVELES DE COMPUESTOS AZUFRADOS NEGATIVOS GRACIAS A UN ESTUDIO GENÉTICO E HIBRIDACIÓN	356
CE01 - METODOLOGÍAS ALTERNATIVAS EN EL ENVEJECIMIENTO DE VINOS TINTOS: EMPLEO DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS (APH) Y VIRUTAS DE ENCINA <i>QUERCUS ILEX</i> EN CV. TEMPRANILLO.	362
CE02 - IMPREGANCIÓN DE LÍAS DE LEVADURA CON AROMAS DE MADERA PARA SU UTILIZACIÓN DURANTE LA CRIANZA SOBRE LÍAS DE VINOS TINTOS	366
CE03 - INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE DUELAS DE ROBLE FRANCÉS DURANTE LA MICROOXIGENACIÓN Y DE LA CRIANZA EN BARRICAS DE DIFERENTE POTENCIAL EN ELAGITANINOS SOBRE EL COLOR Y LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DEL VINO TINTO	370
CE04 - VISUALIZACIÓN DE LA MODIFICACIÓN DE LA HUMEDAD DE LA MADERA DE LAS BARRICAS DE ROBLE DURANTE LA CRIANZA DE VINOS.....	374
CE05 - MODIFICACION DE LA ENTRADA DE OXÍGENO POR LA MADERA DE LAS BARRICAS DE ROBLE DURANTE LA CRIANZA DE VINOS. EFECTO DE LOS ELAGITANINOS	378
CE06 - APLICACIÓN DE LA MICROOXIGENACIÓN AL ENVEJECIMIENTO DEL VINAGRE DE JEREZ.....	382
CE07 - DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ENVEJECIMIENTO ACELERADO A ESCALA PLANTA PILOTO. APLICACIÓN AL ENVEJECIMIENTO DE VINOS OLOROSOS	386

CE08 - DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ENVEJECIMIENTO ACELERADO A ESCALA PLANTA PILOTO. APLICACIÓN AL ENVEJECIMIENTO DE DESTILADOS.....	390
CE09 - INFLUENCIA DEL ORIGEN Y DEL TOSTADO EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MADERA DE CASTAÑO Y LA MADERA DE ROBLE <i>Quercus pyrenaica</i>	394
CE10 - EVOLUCIÓN DE LA COMPOSICIÓN NO VOLÁTIL DE VINOS DE TINTOS DURANTE LA ETAPA DE ENVEJECIMIENTO EN BOTELLA. EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE OXÍGENO	398
AC01 - PERFIL AROMÁTICO DE VINOS BLANCOS ELABORADOS CON VARIEDADES MINORITARIAS DE LA D.O.Ca. RIOJA	405
AC02 - PERFIL AMINOACÍDICO DE MOSTOS BLANCOS DE VARIEDADES MINORITARIAS DE LA D.O.Ca. RIOJA	409
AC03 - ESTUDIO DEL CONTENIDO EN IONES METÁLICOS DE VINOS DE LA ISLA DE FOGO (CABO VERDE).....	413
AC04 - ANÁLISIS SECUENCIAL DEL ESPACIO DE CABEZA PARA EL ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DEL AROMA DEL VINO	417
AC05 - COMPARACIÓN DE TÉCNICAS DE ANÁLISIS SENSORIAL EN LA CATA DE VINOS UTILIZANDO CONSUMIDORES.....	421
AC06 - EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE FUNGICIDAS DE NUEVA GENERACIÓN EN VINOS INTERNACIONALES MEDIANTE INMUNOENSAYOS.....	425
AC07 - MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS DE ANÁLISIS SIMPLES Y RÁPIDOS PARA GARANTIZAR LA SEGURIDAD ALIMENTARIA	429
AC08 - PERFIL DE AMINOÁCIDOS Y ALCOHOLES SUPERIORES EN MOSTOS Y VINOS DE LA VARIEDAD BRANCELLAO.....	433
AC09 - ESTRATEGIAS PARA EL ESTUDIO DE LA FORMACIÓN “DE NOVO” DE ALDEHÍDOS DURANTE LA OXIDACIÓN DEL VINO	437
AC10 - POTENCIAL ENOLÓGICO DEL NUEVO GENOTIPO “TINTO FRAGOSO”	441
AC11 - POTENCIAL ENOLÓGICO DEL NUEVO GENOTIPO	445
AC12 - ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS FENÓLICOS Y ATRIBUTOS SENSORIALES DE LOS VINOS TINTOS DE BOBAL UTILIZANDO EL MÉTODO DE REGRESIÓN DE MÍNIMOS CUADRADOS (PLS)	449
AC13 - COMPARACIÓN ENTRE LA EFICACIA DE UN NUEVO BIOSENSOR PARA AL DETERMINACIÓN DE ÁCIDO L-MÁLICO CON EL MÉTODO ENZIMÁTICO.....	453

AC14 - ATRIBUTOS SENSORIALES CON CAPACIDAD PREDICTIVA EN EL AMARGOR DE VINOS TINTOS.....	457
AC15 - MODELADO DE DESCRIPTORES SENSORIALES DEL VINO CON FUSIÓN DE DATOS DE TÉCNICAS INSTRUMENTALES. SIMULACIÓN DE PANEL DE CATA ELECTRÓNICO....	461
AC16 - MODIFICACIÓN DEL PERFIL AROMÁTICO DE LA GARNACHA BLANCA MEDIANTE TRATAMIENTOS VITIVINÍCOLAS	465
AC17 - ANÁLISIS SENSORIAL A NIVEL GUSTATIVO Y OLFATIVO DE LAS BASES QUÍMICAS DEL DESCRIPTOR MINERALIDAD EN VINOS SINTÉTICOS MODIFICADOS	469
OT01 - COMPOSICIÓN FENÓLICA Y AROMÁTICA DE SARMIENTOS DE AIRÉN Y MOSCATEL	475
OT02 - BIODISPONIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE BOSCALID, KRESOXIM-METIL Y MEPANIPIRIN EN VINOS TINTOS (VAR. TEMPRANILLO Y GRACIANO).....	479
OT03 - ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL VINO. INFLUENCIA DE LA VARIEDAD Y LOS TRATAMIENTOS FITOSANITARIOS.	483
OT04 - BIODISPONIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN VINOS TINTOS.....	487
OT05 - EFECTO DE DIVERSOS FUNGICIDAS EN LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE VINOS TINTOS (VAR. TEMPRANILLO Y GRACIANO)	491
OT06 – EVALUACIÓN DE PARÁMETROS GEOQUÍMICOS EN SUELOS VITÍCOLAS DE DIFERENTES ISLAS DE LA MACARONESIA	495
OT07 - APLICACIÓN DE EXTRACTO DE TÉ VERDE PARA INCREMENTAR LA CONCENTRACIÓN POLIFENÓLICA DE LOS VINOS DE TEMPRANILLO DE UTIEL-REQUENA	499
OT08 - INEFLUENCIA DEL REFLUJO DE UNA COLUMNA DE DESTILACIÓN SOBRE LA COMPOSICIÓN DE COMPUESTOS TERPÉNICOS DE LOS AGUARDIENTES.....	503
OT09 - REVALORIZACIÓN DE LAS PEPITAS DE ORUJO DE MENCÍA MEDIANTE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS/GRAVEDAD.....	506
OT10 - LA EXPOSICIÓN DE LA CAVIDAD ORAL A VINOS DE DIFERENTE COMPOSICIÓN NO VOLÁTIL CAMBIA LA COMPOSICIÓN DE LA SALIVA Y AFECTA A LA LIBERACIÓN INTRAORAL DE AROMA EN CONDICIONES IN VIVO	511
OT11 - ESTUDIO DEL METABOLOMA FECAL TRAS EL CONSUMO MODERADO Y CONTINUADO DE VINO TINTO POR INDIVIDUOS SANOS.....	515
OT12 - ACEPTABILIDAD DE VINOS CABERNET SAUVIGNON Y MERLOT CHILENOS: ESTUDIO DE CONSUMIDORES	519

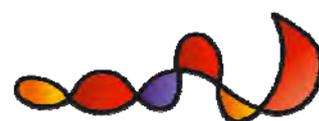
OT14 - INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN Y EXPERIENCIA DEL PANEL DE CATA SOBRE LA VALORACIÓN DE VINOS DE ALBARIÑO	523
OT15 - ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LA ACLIMATACIÓN DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AL ETANOL PARA LA PRODUCCIÓN DE VINOS ESPUMOSOS	527
OT16 - ESTUDIO DEL CONTENIDO EN ALFA-HIDROXIÁCIDOS EN EXTRACTOS FENÓLICOS DE SUBPRODUCTOS DE VINIFICACIÓN Y SU POTENCIAL USO COSMÉTICO	531
OT17 - MÉTODOS QUENCHER PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PRODUCTOS SÓLIDOS DERIVADOS DE LA UVA	535
OT18 - CARACTERÍSTICAS DE SAZONADORES DERIVADOS DE RESIDUOS DE VINIFICACIÓN.....	539
OT19 - EVALUACIÓN DEL METABOLISMO COLÓNICO DE UN VINO TINTO MEDIANTE EL EMPLEO DE UN NUEVO MODELO DE SIMULACIÓN GASTROINTESTINAL DINÁMICO (SIMGI).....	543
OT21 - ESTUDIO DEL PERFIL SENSORIAL DE LOS TAPONES DE CORCHO NATURAL PARA VINOS TRANQUILOS	547
OT22 - EL CONSUMO MODERADO DE VINO TINTO SE ASOCIA CON UNA BAJA PREVALENCIA DE SÍNDROME METABÓLICO EN UNA POBLACIÓN DE ALTO RIESGO CARDIVASCULAR. ESTUDIO PREDIMED	551



V

VITICULTURA

ENOLOGIA2.015
INNOVACIÓN VITIVINÍCOLA



V01 - LA APLICACIÓN FOLIAR DE METIL JASMONATO MEJORA LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE LA UVA Y DEL VINO

Javier Portu, Rosa López, Ana Rosa Gutiérrez, Lucía González-Arenzana, Patrocinio Garijo, Isabel López-Alfaro, Pilar Santamaría, Teresa Garde-Cerdán*

Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (Gobierno de La Rioja-CSIC-Universidad de La Rioja).
Ctra. Burgos, Km. 6. Finca La Grajera. 26007 Logroño, España

*Teresa.GardeCerdan@gmail.com; teresa.garde@icvv.es

RESUMEN:

Los compuestos fenólicos tienen gran importancia en la calidad del vino. La aplicación de elicitores sobre los racimos es una de las prácticas vitícolas más prometedoras en cuanto a la mejora de la composición fenólica. Sin embargo, esta técnica precisa de un deshojado previo, con el consecuente consumo de tiempo y dinero. En el presente trabajo se estudió el efecto de la aplicación foliar de metil jasmonato en la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad Tempranillo. El tratamiento dio lugar a un incremento del contenido de antocianos y estilbenos, tanto en la uva como en el vino, además de aumentar el contenido de flavonoles en el vino. Asimismo, se observó una mejora de los parámetros cromáticos del vino. Los resultados obtenidos sugieren que esta herramienta podría ser una práctica vitícola sencilla y de fácil aplicación para mejorar la calidad de la uva y del vino.

Palabras clave: elicitador, antocianos, estilbenos, tratamiento foliar

1. Introducción

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que se forman a través de la ruta fenilpropanoide a partir de la fenilalanina, pudiéndose clasificar en dos grandes grupos: no flavonoides (ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos y estilbenos) y flavonoides (antocianos, flavonoles y flavanoles). Dichos compuestos, además de poseer propiedades saludables, son responsables de las cualidades organolépticas del vino, como el color, la estructura o su potencial para ser envejecidos, por lo que en los últimos años se ha prestado una especial atención a aumentar su concentración.

Entre las prácticas estudiadas con este fin, la aplicación de elicitores ha despertado un gran interés [1]. Los elicitores son compuestos que, una vez aplicados sobre la planta, pueden activar su sistema defensivo. La planta puede responder al tratamiento con elicitores mediante la acumulación de compuestos fenólicos debido a la activación de la ruta fenilpropanoide. Estudios previos, realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, han mostrado que la aplicación de metil jasmonato (MeJ) mejora el contenido fenólico de uvas y vinos [2-4]. Los ensayos en campo realizados hasta el momento han evaluado el efecto de la aplicación de MeJ directamente sobre el racimo, siendo necesario un deshojado previo. Por todo ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de la aplicación foliar de MeJ en la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad Tempranillo.

2. Material y métodos

El estudio se realizó en el viñedo experimental de La Grajera, en la D.O.Ca. Rioja (España), en 2013, en la variedad Tempranillo (*Vitis vinifera* L.). En el momento del envero y una semana después, las plantas a tratar se pulverizaron con una disolución 10 mM de MeJ, empleando Tween 80 como agente humectante (0,1%, v/v), mientras que las plantas control fueron rociadas con agua que contenía únicamente Tween 80. El diseño experimental fue de bloques al azar con tres repeticiones por tratamiento y tres cepas por repetición.

Las uvas se vendimiaron y analizaron en el momento óptimo de madurez. Posteriormente, se llevaron a cabo microvinificaciones por triplicado empleando las mismas repeticiones que en el campo. Los análisis de los parámetros generales se realizaron mediante los métodos oficiales [5]. La composición fenólica de la uva y del vino se determinó de forma pormenorizada mediante extracción en fase sólida y posterior cromatografía líquida [6, 7].

Los resultados se analizaron estadísticamente usando el análisis de la varianza (ANOVA) empleando el programa estadístico SPSS versión 21.0 (Chicago, EE. UU.). Las diferencias entre las medidas se compararon mediante el test de Duncan con un nivel de significación de 0,05.

3. Resultados

Los resultados obtenidos para los parámetros generales de uvas y vinos mostraron que el tratamiento no modificó su composición en lo que se refiere al contenido de azúcar, o en su caso de alcohol, y a los parámetros relacionados con la acidez. Sin embargo, los vinos elaborados con las uvas procedentes de las plantas tratadas presentaron valores más altos de intensidad de color, porcentaje de antocianos ionizados y polimerizados e índice de Folin-Ciocalteu.

Asimismo, el tratamiento foliar con MeJ dio lugar a un incremento de la síntesis de antocianos. Como consecuencia, las uvas procedentes de las plantas tratadas mostraron contenidos mayores de los 3-*O*-glucósidos de petunidina y peonidina, y de los derivados *trans*-cumarilados de cianidina y peonidina, lo que provocó un aumento en el contenido total de estos compuestos (Figura 1a). La mejora de la composición antociánica de la uva se vio reflejada en los vinos. De esta forma, los vinos procedentes del tratamiento foliar con MeJ presentaron valores más altos de los 3-*O*-glucósidos de delfinidina, petunidina y peonidina, además de los derivados *trans*-cumarilados de cianidina y peonidina y de vitisina B. Por lo tanto, al igual que se observó en las muestras de uva, los vinos procedentes de las uvas tratadas también presentaron un contenido total de antocianos mayor que los vinos control (Figura 1b).

En cuanto a los flavonoles, en las uvas apenas hubo diferencias significativas entre el control y el tratamiento (Figura 1c), excepto para la isoramnetina-3-*O*-glucósido, presente en mayor cantidad en las uvas procedentes del tratamiento con MeJ. Sin embargo, en los vinos se detectaron mayores diferencias, ya que además de un contenido más alto de isoramnetina-3-*O*-glucósido, también presentaron mayor concentración de miricetina libre y quercetina-3-*O*-glucósido. Debido a que en los vinos ambos compuestos son mayoritarios, los elaborados a partir de las uvas de las cepas tratadas mostraron un contenido total de flavonoles superior al vino control (Figura 1d).

La aplicación foliar de MeJ también afectó al contenido de estilbenos. En este sentido, las uvas de las plantas tratadas con MeJ presentaron un contenido mayor de los isómeros *cis*- y *trans*-piceido, mientras que la concentración de resveratrol no se vio afectada. El *trans*-piceido también se encontró en niveles mayores en los vinos procedentes de la aplicación de MeJ. Además, el tratamiento con este elicitor dio lugar a aumentos importantes del contenido total de estilbenos, tanto en la uva como en el vino (Figuras 1e y 1f). Con respecto al resto de compuestos fenólicos, entre los que se incluyen los flavanoles y los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, no se observaron diferencias significativas entre el tratamiento con MeJ y el control.

Los resultados obtenidos en este trabajo están de acuerdo con los de trabajos previos en los que se había observado que la aplicación directa de MeJ sobre el racimo puede mejorar la composición fenólica de la uva y del vino, principalmente antocianos y estilbenos, además de mejorar las características cromáticas del vino [3, 4]. Es importante tener en cuenta que la aplicación foliar de elicitores no precisa de un deshojado previo, operación necesaria cuando el tratamiento se lleva a cabo directamente sobre los racimos.

4. Conclusiones

Este estudio muestra por primera vez el efecto de la aplicación foliar de MeJ en la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad Tempranillo. En general, la aplicación foliar de MeJ conllevó un aumento de la concentración de los compuestos fenólicos, especialmente antocianos y estilbenos. Además, también se vieron mejorados los parámetros relacionados con el color del vino, debido probablemente al aumento observado de los compuestos determinantes del color como son los antocianos y los flavonoles. Con respecto al resto de compuestos fenólicos, no hubo apenas diferencias entre el control y el tratamiento ni en la uva ni en el vino. Este estudio ha mostrado que las plantas pueden reaccionar a la aplicación foliar de MeJ mediante la acumulación de compuestos fenólicos, observándose este aumento tanto en la uva como en el vino. Por tanto, la aplicación de MeJ podría ser una práctica vitícola sencilla y de interés para incrementar la concentración de compuestos fenólicos de la uva y mejorar el color y el contenido fenólico del vino.

5. Bibliografía

1. Ruiz-García, Y., Gómez-Plaza, E. 2013. Elicitors: a tool for improving fruit phenolic content. *In: Agriculture*. 3, 33-52.
2. Belhadj, A., Saigne, C., Telef, N., Cluzet, S., Bouscalt, J., Corio-Costet, M.-F., Mérillon, J.-M. 2006. Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. *In: J. Agric. Food Chem.* 54, 9119-9125.
3. Ruiz-García, Y., Romero-Cascales, I., Gil-Muñoz, R., Fernández-Fernández, J. I., López-Roca, J. M., Gómez-Plaza, E. 2012. Improving grape phenolic content and wine chromatic characteristics through the use of two different elicitors: methyl jasmonate versus benzothiadiazole. *In: J. Agric. Food Chem.* 60, 1283-1290.
4. Ruiz-García, Y., Romero-Cascales, I., Bautista-Ortín, A. B., Gil-Muñoz, R., Martínez-Cutillas, A., Gómez-Plaza, E. 2013. Increasing bioactive phenolic compounds in grapes: response of six Monastrell grape clones to benzothiadiazole and methyl jasmonate treatments. *In: Am. J. Enol. Vitic.* 64, 459-465.

5. ECC.1990. Commission Regulation Vo 2676/90 concerning the establishment of common analytical methods in the sector of wine. *In: Off. J. Eur. Communities. L272, 1-192.*
6. Portu, J., Santamaría, P., López-Alfaro, I., López, R., Garde-Cerdán, T. 2015. Methyl jasmonate foliar application to Tempranillo vineyard improved grape and wine phenolic content. *In: J. Agric. Food Chem. 63, 2328-2337.*
7. Castillo-Muñoz, N., Fernández-González, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I. 2009. Red-color related phenolic composition of Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) grapes and red wines. *In: J. Agric. Food Chem. 57, 7883-7891.*

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado gracias al Gobierno de La Rioja a través del proyecto R-08-13. Además, J. P., L.G.-A., I. L.-A. y T. G.-C. agradecen al INIA-Gobierno de La Rioja sus contratos.

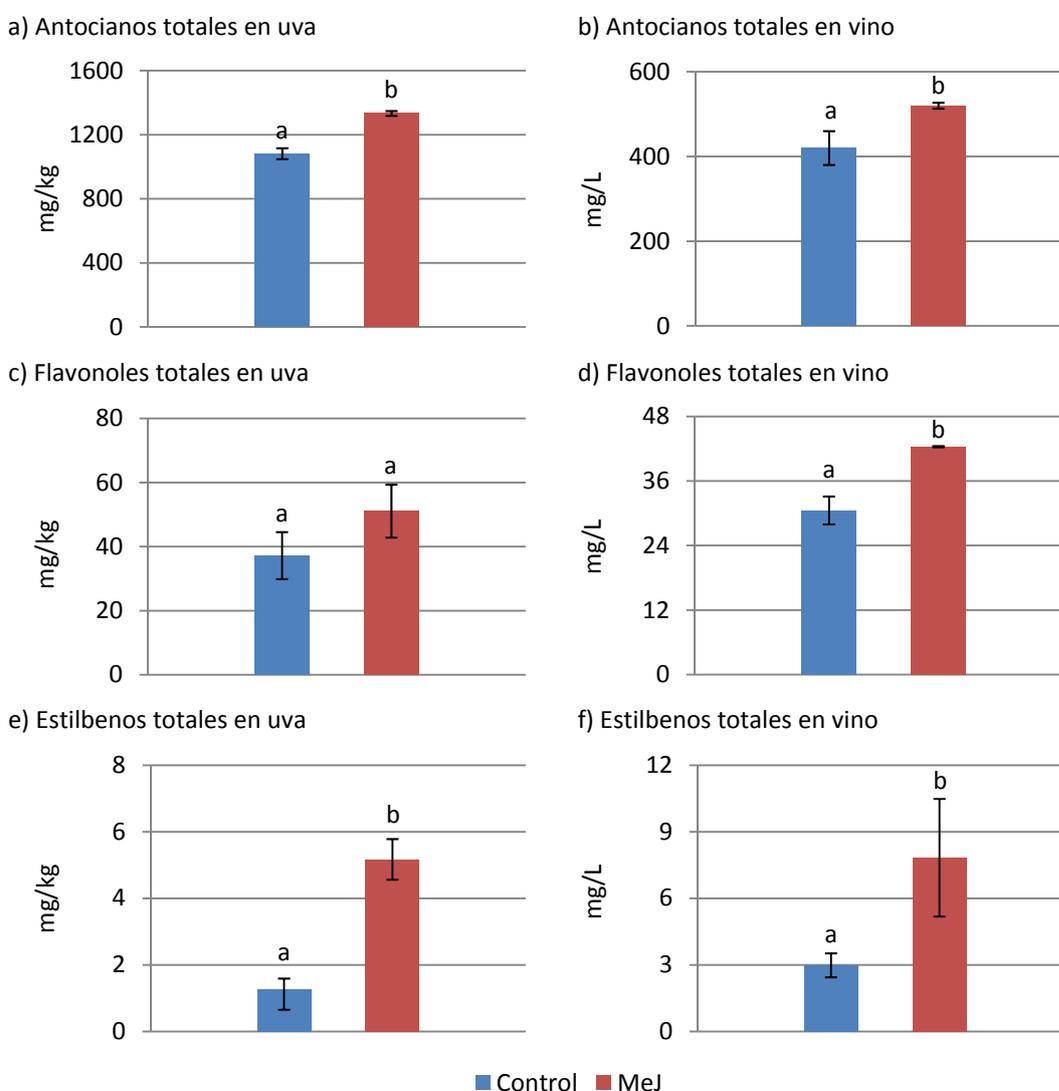


Figura 1: Composición fenólica de las uvas y de los vinos de plantas sin tratar (control) y tratadas con metil jasmonato (MeJ). Los tratamientos se realizaron por triplicado ($n = 3$) y los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0,05$).

V02 - LA GLICOSIDACIÓN ES EL MECANISMO POR EL QUE LA VID ASIMILA LOS VOLÁTILES DEL MEDIOAMBIENTE Y LOS TRASMITE AL VINO

Salinas, M.R.¹, Pardo-García, A.I.¹; Wilkinson, K.²; Culbert, J.A.²; Lloyd, N.³; Serrano de la Hoz, K.^{1,4}; Alonso, G.L.¹

¹Universidad de Castilla-La Mancha. E.T.S.I. Agrónomos y Montes. Cátedra de Química Agrícola. Avda. España s/n. 02071 Albacete, España

²School of Agriculture, Food and Wine, University of Adelaide, PMB 1, Glen Osmond SA 5064, Australia

³Metabolomics Australia, The Australian Wine Research Institute, PO Box 197, Glen Osmond SA 5064 Australia

⁴BETTERRID, Carretera de Las Peñas (CM-3203), Km 3,2, 02071, Albacete, España
rosario.salinas@uclm.es

RESUMEN:

El objetivo de este trabajo es conocer si el mecanismo de glicosilación es realizado por la vid cuando se hacen aplicaciones foliares de extractos acuosos de roble y de disoluciones modelo de guayacol y whiskylactonas, que son dos de los constituyentes de los extractos de roble. Para ello se analizaron los correspondientes glicósidos a lo largo de la maduración en las hojas, tallos y uvas de las vides tratadas. Los resultados obtenidos en relación con las whiskylactonas son sorprendentes ya que la molécula no posee el grupo hidroxilo necesario para la glicosilación, pero se ha demostrado que se produce un paso previo consistente en la apertura del anillo de la lactona para dar el ácido 3-metil-4-hidroxi-octanoico.

Palabras clave: glicosilación, volátiles, uvas, extracto de roble, guayacol, whiskylactonas

1. Introducción

Recientemente se ha observado que vides en las que se hicieron tratamientos foliares con extractos acuosos de roble, proporcionaron uvas y vinos con contenidos superiores al control de agliconas volátiles presentes en el extracto, tales como guayacol y whiskylactonas, y que sus vinos tenían un aroma a madera que recordaba a los vinos de crianza (1, 2); estos resultados fueron también corroborados con el empleo de disoluciones modelo (3).

Se sabe que muchos compuestos volátiles de la uva se encuentran en forma de precursores no olorosos, entre los que abundan los glicosilados, en donde la aglicona olorosa está unida a una o más moléculas de azúcar. También se sabe que la glicosilación es el mecanismo por el que las plantas limitan el efecto tóxico de muchas sustancias volátiles, ya que facilita su solubilidad, transporte y almacenamiento hacia lugares en donde pueden ser eliminadas. Por ello se sugirió que el efecto observado con los extractos de roble podría

deberse a que la vid glicosila estos compuestos exógenos y los almacena en la uva, para posteriormente ser liberados en el vino, al que le pueden comunicar su aroma. Este trabajo pretende avanzar en el conocimiento sobre la capacidad de la vid para producir glicósidos de guayacol y de whiskylactonas, para lo cual se han sintetizado los correspondientes glicósidos y se han cuantificado a lo largo de la maduración en hojas, tallos y uvas de vides tratadas con aplicaciones foliares de un extracto acuoso de roble y con disoluciones modelo de ambos compuestos.

2. Material y métodos

La experiencia se realizó durante la cosecha de 2012 en vides de Monastrell localizadas en la parcela experimental de la bodega BSI de Jumilla. Se realizaron los siguientes tres tratamientos foliares, que se aplicaron en una sola vez al inicio del envero a razón de 300 mL por cepa: disolución acuosa de extracto de roble tostado (Protea France S.A.S., Gensac la Pallue, France), disolución acuosa de guayacol (0,06%) y disolución acuosa de *cis* y *trans* whiskylactonas (0,06%). Cada tratamiento se aplicó a 16 cepas con racimos tapados por una bolsa de plástico, y a otras 16 cepas con los racimos sin tapar. Las filas de cepas de cada tratamiento se alternaron con otras filas similares no tratadas para impedir contaminaciones. Además se seleccionó otra fila de 16 cepas alejadas de los tratamientos para ser utilizadas como control. Las uvas, tallos y hojas fueron muestreadas en tres momentos: t1, 10 días después del tratamiento; t2, 20 días después del tratamiento, y t3, 36 días después del tratamiento coincidiendo con el día de vendimia. Por cada tratamiento se cogieron al azar 4 tallos entre las 16 cepas, 15-20 uvas de 4 racimos y 4 hojas por cepa.

La preparación de los extractos de hojas, tallos y uvas, así como la síntesis y el análisis de los glicósidos de guayacol se realizó según los métodos propuestos por Dungey et al. (2011) (4) y Hayasaka et al. (2010)(5). Para la síntesis y el análisis de los glicósidos de las whiskylactonas se siguió el método de Fudge et al. (2008)(6). Los glicósidos de guayacol determinados fueron: glucósido de guayacol (GuG), glucosil-glucósido de guayacol (GuGG), rutinósido (ramnosil-glucósido) de guayacol (GuRG) y pentosil-glucósido de guayacol (GuPG). El compuesto derivado de la whiskylactona sintetizado y analizado fue el glucósido del ácido 3-metil-4-hidroxiocetanoico (WLG), aunque también se analizaron otros glicósidos tales como el glucosil-galato y el glucosil-glucósido de dicho ácido, pero estos no fueron previamente sintetizados y se usó como referencia la calibración de WLG. El análisis cualitativo y cuantitativo de los glicoconjugados se realizó en un UHPLC Agilent 1290 Infinity UHPLC combinado con un 6490 QQQ LC/MS. La adquisición de datos y su procesamiento fue llevado a cabo con un software Mass Hunter versión B.06.00 (Agilent, Palo Alto, CA, USA) y el análisis espectrométrico se realizó en modo MRM en el caso del WLG, según se detalla en Pardo-García et al. (2015) (7).

3. Resultados

Respecto a los glicoconjugados de guayacol en las vides control, se observó que en las hojas predominó el glucosil-glucósido (GuGG) y en menor proporción el pentosil-glucósido (GuPG). En los tallos se cuantificaron GuGG y GuPG, pero este último llegó a ser cuatro veces superior al primero y aumentó con el tiempo de muestreo, mientras que GuGG se mantuvo constante. También estos dos glicósidos se encontraron en las uvas, en donde el contenido de GuGG fue aproximadamente el doble que el de GuPG y ambos se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo. Por tanto, la vid sintetiza estos glicoconjugados en las hojas, pero transporta

más rápidamente hasta las uvas el GuGG que el GuPG, en donde se almacena en mayor proporción GuGG que GuPG.

En la Figura 1 se muestra el contenido de los gliconjugados de guayacol en las distintas partes de las vides tratadas con extractos de roble y con disoluciones de guayacol. Los resultados obtenidos son similares a los del control en hojas y tallo, pero difiere en uvas, en donde predominó el GuPG y apareció un nuevo glicósido, el rutinósido de guayacol (ramnosil-glicósido de guayacol), con independencia de que el tratamiento se hiciera con racimos tapados o sin tapar, aunque fue más abundante en las uvas del primer caso. Según que los tratamientos se hicieran con racimos tapados o sin tapar, en las uvas se observó una diferente distribución de los glicósidos.

En las vides tratadas con la disolución de guayacol (Figura 1) el perfil glicosídico fue diferente en hojas y uvas al observado en las vides control y en las tratadas con extracto de roble. En las uvas el glicósido mayoritario fue GuPG seguido del rutinósido, siendo ambos más abundantes en las uvas de racimos tapados que sin tapar y disminuyeron a lo largo del tiempo de muestreo.

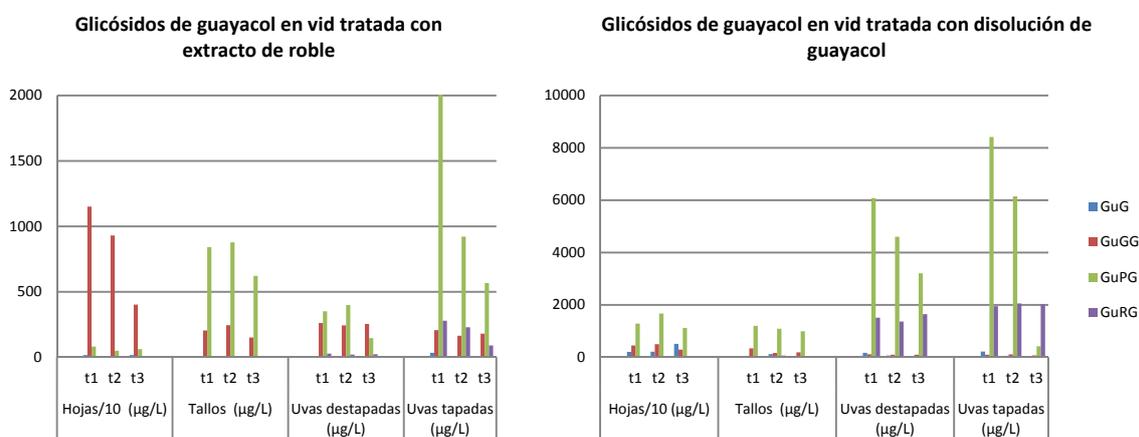


Figura 1. Glicósidos de guayacol en vides tratadas con extracto de roble y con disolución de guayacol. Tiempo de muestreo t1, t2, t3: 10, 20 y 36 días después del tratamiento.

Las whiskylactonas no poseen los grupos hidroxilo libres necesarios para su glicosilación; sin embargo, nuestros estudios previos sugieren que la vid puede realizar la mencionada glicosilación si antes es capaz de producir la apertura del anillo de la lactona para dar el ácido 3-metil-4-hidroxiocetanoico. En este trabajo se ha analizado el glucósido de dicho ácido (WLG) en las distintas partes de las vides tratadas (hojas, tallos y uvas) pero no se detectó en ninguna muestra control.

En el caso de los tratamientos con extracto de roble, en las hojas se alcanzaron concentraciones de más de 200 µg/kg de WLG, pero no se detectó en los tallos y sólo se encontró en pequeñas cantidades en uvas procedentes del tratamiento con los racimos destapados. Sin embargo, en todos los casos se encontró glicosil-glucosa del ácido 3-metil-4-hidroxiocetanoico (WLGG) en concentraciones mayores a WLG, que aumentaron con el tiempo de muestreo. Esto puede explicar la presencia de glicoconjugados de whiskylactonas en uvas de vides tratadas con extracto de roble y justificaría el aroma a madera de estos vinos. En los tratamientos con la disolución, los mayores contenidos de WLG se alcanzaron en las uvas de los racimos destapados, o en los tallos de las plantas con los racimos tapados, abundando WLGG frente a WLG.

4. Conclusiones

Se ha demostrado que la vid es capaz de absorber por vía foliar algunos de los compuestos presentes en extractos acuosos de roble, tales como guayacol y whiskylactonas. Como posible mecanismo de defensa, forma en las hojas los correspondientes gliconjugados que se distribuyen por la planta a distinta velocidad hasta llegar a las uvas, en donde se almacenan. En el caso de las whiskylactonas la vid realiza un paso previo de apertura del anillo de la lactona para disponer del grupo –OH requerido en la glicosilación. Como consecuencia la uva incrementa el contenido de glicoconjugados de ambos compuestos, que pasan al vino en donde pueden liberar las agliconas, con el consecuente impacto en el aroma.

5. Bibliografía

1. Martínez-Gil, A. M.; Garde-Cerdán, T.; Martínez, L.; Alonso, G. L.; Salinas, M. R. 2011. Effect of oak extract application to Verdejo grapevines on grape and wine aroma. *J. Agric. Food Chem.* 59, 3253–3263
2. Martínez-Gil, A. M.; Angenieux, M.; Pardo-García, A. I.; Alonso, G. L.; Ojeda, H.; Salinas, M.R. 2013. Glycosidic aroma precursors of Syrah and Chardonnay grapes after an oak extract application to the grapevines. *Food Chem.* 138, 956–965
3. Pardo-García, A. I.; De La Hoz, K. S.; Zalacain, A.; Alonso, G. L.; Salinas, M. R. Effect of vine foliar treatments on the varietal aroma of Monastrell wines. *Food Chem.* 2014, 163, 258–266.
4. Dungey, K. A.; Hayasaka, Y.; Wilkinson, K. L. 2011. Quantitative analysis of glycoconjugate precursors of guaiacol in smoke-affected grapes using liquid chromatography–tandem mass spectrometry based stable isotope dilution analysis. *Food Chem.* 126, 801–806.
5. Hayasaka, Y.; Baldock, G. A.; Pardon, K. H.; Jeffrey, D. W.; Herderich, M. J. 2010. Investigation into the formation of guaiacol conjugates in berries and leaves of grapevine *Vitis vinifera* L. Cv. Cabernet Sauvignon using stable isotope tracers combined with HPLC-MS and MS/MS analysis. *J. Agric. Food Chem.* 58, 2076–2081.
6. Fudge, A. L.; Elsey, G. M.; Hayasaka, Y.; Wilkinson, K. L. 2008. Quantitative analysis of O-D-glucopyranoside of 3-methyl-4-hydroxyoctanoic acid, a potential precursor to cis-oak lactone, in oak extracts using liquid chromatography-tandem mass spectrometry based stable isotope dilution analysis. *J. Chromatogr. A*, 1215, 51–56.
7. Pardo-García, A.I.; Wilkinson, K.L.; Culbert, J.A.; Lloyd, N.D.R.; Alonso, G.L.; Salinas, M.R. Accumulation of glycoconjugates of 3-methyl-4-hydroxyoctanoic acid in fruit, leaves and shoots of *Vitis vinifera* cv. Monastrell following foliar applications of oak Extract or oak Lactone. *J. Agric. Food Chem.* 2015. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b01043.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia e Innovación la financiación del proyecto AGL2009-08950), A.I.P-G agradece la beca (BES-2010-038613) y la ayuda para su estancia en la Universidad de Adelaida (Australia) (EEBB-I-13-06899).

V03 - LOS EXTRACTOS DE SARMIENTO APLICADOS A HOJAS DE VID MODULAN EL AROMA DE LA UVA Y DEL VINO

Sánchez-Gómez, R.¹, Serrano de la Hoz, K.², Zalacain, A.¹, Alonso, G.L.¹, Salinas, M.R.¹

¹Universidad de Castilla-La Mancha. E.T.S.I. Agrónomos y Montes. Cátedra de Química Agrícola. Avda. de España s/n, 02071 Albacete, España. Tel: 967 599310. Fax: 967 599238.

²BETERRID, Carretera de Las Peñas (CM-3203), Km 3,2, 02071, Albacete, España
Rosario.Salinas@uclm.es

RESUMEN:

En este trabajo se pretende comprobar el efecto de diferentes aplicaciones de extractos acuosos de sarmientos de las variedades Airén y Moscatel, sobre el potencial aromático de la uva y de sus vinos así como su impacto a nivel sensorial. Para ello se usaron extractos de sarmientos, tostados y sin tostar, los cuales se formularon y aplicaron a las hojas de cepas de la variedad blanca Airén. Se determinó la calidad aromática de las uvas el día de la vendimia mediante el Índice de Potencial Aromático varietal (IPAv), mientras que el análisis sensorial de los vinos se realizó cuatro meses después del final de la fermentación alcohólica. El IPAv fue significativamente mayor en las uvas tratadas con extractos de sarmiento respecto al control y sus vinos fueron de mayor complejidad aromática, en los que destacaron notas a madera y especiadas.

Palabras clave: sarmientos, Airén, Moscatel, potencial aromático de la uva, vino, análisis sensorial

1. Introducción

Estudios científicos realizados recientemente han demostrado que la vid es capaz de absorber compuestos volátiles de extractos acuosos de roble aplicados a sus hojas, lo cual influye en la composición aromática de las uvas y de sus vinos (1,2). Estos compuestos del extracto de roble pasan a la uva donde se almacenan en forma de precursores aromáticos no olorosos (3), y durante la vinificación y a lo largo del tiempo aumenta su concentración en el vino, pues las agliconas se liberan de sus precursores.

Los sarmientos de poda son residuos de la viña de naturaleza lignocelulósica, que tradicionalmente se abandonan o se queman en la misma, por lo que son una fuente de contaminación medioambiental y ecológica. La producción media de sarmientos por hectárea se estima en una tonelada, por ello en las zonas vitivinícolas, como es Castilla-La Mancha, es del mayor interés la explotación de este residuo para aumentar su valor. Recientemente, se ha demostrado que la composición de extractos acuosos de sarmiento es de la misma naturaleza química que los del roble (4), por lo que es lógico pensar en un efecto parecido al roble si son aplicados de forma similar. Además, en la actualidad existe una tendencia clara hacia una Viticultura Sostenible, en la que la conservación de los recursos naturales y la protección del medio ambiente es uno de los objetivos fundamentales, por lo que el aprovechamiento de los sarmientos podría ser de gran interés.

Este trabajo pretende abordar una nueva forma de aprovechamiento de estos subproductos, aportando de nuevo a la vid los componentes que los sarmientos han

almacenado y que puedan repercutir de manera positiva en la uva y en el aroma de sus vinos. De esta manera se cerraría su ciclo, modulando y potenciando el efecto *terroir*, abogando así por una “Viticultura Dirigida”.

Para ello, se han realizado 4 aplicaciones foliares de extractos acuosos de sarmiento (Airén y Moscatel, con y sin tostar) y se ha analizado su efecto sobre el potencial aromático de las uvas y su evolución durante el proceso de vinificación. Así mismo, los vinos obtenidos fueron sometidos a un análisis sensorial para comprobar su impacto aromático.

2. Material y métodos

Cuatro meses después de la vendimia de 2013, se seleccionaron sarmientos procedentes de vides cultivadas en espaldera de dos variedades diferentes: la neutra Airén, que es mayoritaria en Castilla-La Mancha, y la aromática Moscatel, que también es muy cultivada en la mayoría de las zonas vitivinícolas. Tras el secado de los sarmientos a temperatura ambiente, se trituraron hasta obtener un serrín con un tamaño de partícula inferior a ≤ 4 mm. Una parte de cada una de las muestras se mantuvo a temperatura ambiente hasta su uso y la otra se sometió a un tostado alto (180 °C durante 45 minutos). Con cada tipo de serrín (tostado y sin tostar) de cada variedad, se realizaron extracciones acuosas sólido-líquido según Sánchez-Gómez et al. (4), y se obtuvieron los siguientes tipos de extracto:

- **AST:** extracto de sarmientos sin tostar de la variedad Airén.
- **AT:** extracto de sarmientos tostados de la variedad Airén.
- **MST:** extracto de sarmientos sin tostar de la variedad Moscatel.
- **MT:** extracto de sarmientos tostados de la variedad Moscatel.

Una vez formulados adecuadamente se realizaron aplicaciones foliares durante el invierno, en una sola ocasión, sobre cepas de la variedad Airén. Para cada tratamiento se seleccionaron 7 cepas, distribuidas en una parcela situada en la D.O. Jumilla (Murcia), siendo necesario aplicar 300 ml de extracto para cubrir por completo la parte foliar de cada cepa. Otro grupo de 7 cepas se dejaron sin tratar para ser usadas como control.

El potencial aromático varietal de las uvas en el día de la vendimia se analizó empleando el Kit IPAv de Teknokroma (Barcelona) (5) el cual permite la determinación del contenido total de precursores aromáticos glicosídicos. Además, también se estudió la evolución del IPAv en los vinos al final de la fermentación alcohólica y cuatro meses después de la misma.

El proceso de vinificación se realizó según el sistema tradicional en blanco, empleando un sistema de vinificación multitubo con control de temperatura. Después del despalillado de la uva, se adicionó metabisulfito de amonio (80 mg/kg) y se dejó macerar a 11 °C durante 17 horas. Tras el prensado manual la fermentación alcohólica se realizó con la levadura UCLMS377, y trascurrió a 16 ± 1 °C. De cada tratamiento se obtuvieron en triplicado 1.25 litros de vino

Se realizó un análisis sensorial olfativo de los vinos cuatro meses después de la finalización de la fermentación alcohólica. En el mismo participaron ocho jueces expertos (4 hombres y 4 mujeres). Los atributos de aroma medidos en el análisis sensorial fueron intensidad de olor, notas frutales, florales, hierbas/verdes, madera/roble, dulce, especiadas y ahumadas.

3. Resultados

En la Figura 1, se muestran los valores de IPAv de las uvas en el día de la vendimia procedentes de los cuatro tratamientos con extractos acuosos de sarmiento. Se observó que los valores de las uvas tratadas con cualquiera de los extractos son significativamente superiores al control, por lo que la aplicación de extractos acuosos de sarmiento aumenta el contenido de precursores aromáticos glicosilados de las uvas. Comparando los tratamientos, los de AST y MT tuvieron los mayores valores de IPAv, lo que sugiere que estas uvas tendrán una mayor capacidad para producir vinos con mayor y mejor contenido aromático varietal, aunque todo ello estará condicionado por el proceso de vinificación. Los resultados obtenidos, también indican que el tostado o no de los sarmientos no tiene un comportamiento similar para Airén y Moscatel.

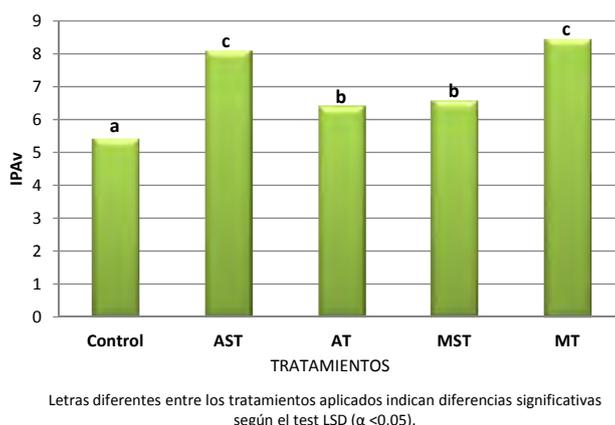


Figura 1. Índice de Potencial Aromático varietal (IPAv) de las uvas en el día de la vendimia: Airén (A) y Moscatel (M), tostados (T) y sin tostar (ST).

La Figura 2 recoge los porcentajes de liberación de aromas de sus precursores al final de la fermentación alcohólica y cuatro meses después de la misma. Se observa que los valores de los vinos procedentes de uvas tratadas con cualquiera de los extractos son significativamente superiores al control. Si atendemos al porcentaje de liberación al final de la fermentación, vemos que los vinos AST y MT liberaron la mayor parte de sus aromas durante este proceso, coincidiendo estos tratamientos con los que mayores valores de IPAv presentaron sus uvas (Figura 1). En el caso de los vinos AT y MST la liberación de los aromas fue similar en ambos momentos de muestreo.

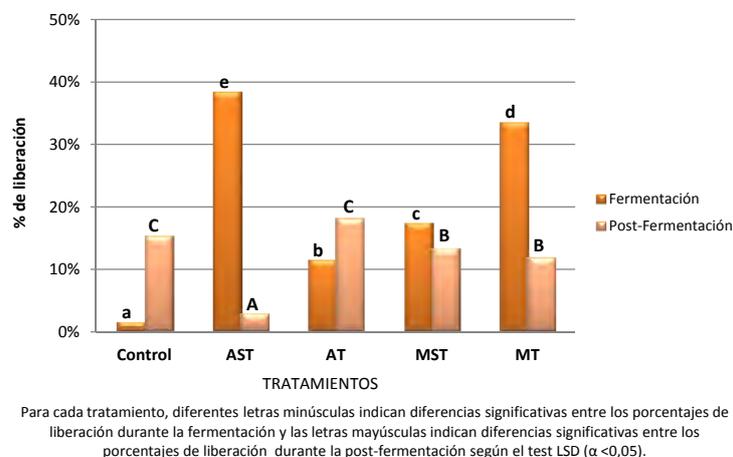


Figura 2. Porcentaje de liberación en los vinos al final de fermentación y al cabo de 4 meses, para los tratamientos Airén (A) y Moscatel (M), tostados (T) y sin tostar (ST).

Los resultados del análisis sensorial olfativo se muestran en la Figura 3. En general, los vinos resultantes de los tratamientos aplicados a la vid produjeron una mayor complejidad aromática en relación con los vinos control. Destacan los vinos procedentes de los tratamientos con extractos de sarmiento sin tostar, así el vino AST destacó por sus notas florales, frutales y ahumadas, mientras que el vino MST presentó mayores notas dulces y especiadas.

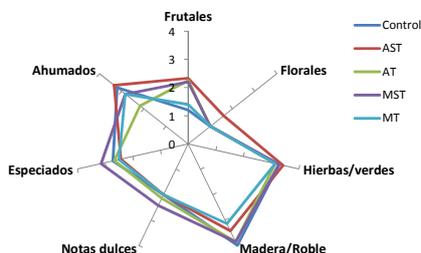


Figura 3. Análisis sensorial olfativo.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento foliar a vides con extractos acuosos de sarmientos influye en el potencial aromático de las uvas, siendo significativamente mayor el valor IPAv en las uvas procedentes de los tratamientos respecto al control, destacando los tratamientos AST y MT con los mayores valores. A nivel sensorial, estos vinos mostraron una mejor calidad aromática que los vinos control.

5. Bibliografía

1. Martínez-Gil, A.M., Angenieux, M., Pardo-García, A.I., Alonso, G.L., Ojeda, H., Salinas, M.R. 2013. Glycosidic aroma precursors of Syrah and Chardonnay grapes after an oak extract application to the grapevines. *In: Food Chemistry*. 138(2), 956–965.
2. Pardo-García, A.I., Martínez-Gil, A.M., Cadahia, E., Pardo, F., Alonso, G.L., Salinas, M.R. 2014a. Oak extract application to grapevines as a plant biostimulant to increase wine polyphenols. *In: Food Research International*. 55, 150-160.
3. Pardo-García, A.I., De La Hoz, K.S., Zalacain, A., Alonso, G.L., Salinas, M.R. 2014b. Effect of vine foliar treatments on the varietal aroma of Monastrell wines. *In: Food Chemistry*. 163, 258–266.
4. Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Alonso, G.L., Salinas, M.R. 2014. Vine-shoot waste aqueous extracts for re-use in agriculture obtained by different extraction techniques: Phenolic, volatile, and mineral compounds. *In: Journal Agricultural and Food Chemistry*. 62, 10861–10872.
5. Serrano de la Hoz, K., Carmona, M., Zalacain, A., Alonso, G.L., Salinas, M.R. The varietal aroma potential index (IPAv): a tool to evaluate the quality of grapes and wines, white and red. 37 th World Congress of Vine and Wine, 9-14 Noviembre 2014, Mendoza, Argentina.

6. Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento al Ministerio de Economía y Competitividad-FEDER por la concesión del proyecto AGL2012-33132 que ha permitido financiar este trabajo. R. S-G. también desea agradecer a la Universidad de Castilla-La Mancha el contrato predoctoral PREDUCLM17.

V05 - INFLUENCIA DEL RIEGO Y EL ACLAREO DE RACIMOS EN LAS CARACTERÍSTICAS ENOLÓGICAS DEL MOSTO Y EL VINO DE LA VARIEDAD VERDEJO

Josefina Vila-Crespo¹, José Manuel Rodríguez-Nogales², Encarnación Fernández-Fernández², Jesús Yuste³

¹Universidad de Valladolid, Área de Microbiología, Avda. Madrid 57, 34004 Palencia, España.

²Universidad de Valladolid, Dpto. Ing. Agrícola y Forestal, Avda. Madrid 57, 34004 Palencia, España.

³Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Ctra. Burgos km 119, 47071 Valladolid, España
jvila@pat.uva.es

RESUMEN:

Se ha evaluado el comportamiento enológico de la uva de la variedad Verdejo sometida a diferentes condiciones de riego (secano, riego del 25% de ETO y riego del 50% de ETO) y de aclareo durante las campañas 2012-2014. Las condiciones climáticas acaecidas en las tres añadas han permitido poner de manifiesto la influencia del riego y el aclareo en los distintos parámetros enológicos estudiados, que se han revelado en las gráficas comparativas y en el análisis de componentes principales realizado por años. Se ha observado que el mero hecho de regar discrimina todos los años, diferenciando a las muestras regadas de las testigo, mientras que la influencia del aclareo se ha puesto de manifiesto fundamentalmente el año más lluvioso, especialmente en las muestras con un marcado incremento del grado alcohólico obtenido. Se ha observado además la influencia de la cantidad de lluvia cada año en el comportamiento enológico de la uva en cuanto a madurez fenólica, pH, acidez total y grado alcohólico.

Palabras clave: riego, aclareo de racimos

1. Introducción

Los diferentes estudios llevados a cabo en España sobre el efecto del riego sobre el viñedo han mostrado cómo, dependiendo de las dosis de riego, la época de su aplicación y la zona geográfica del cultivo, se ha obtenido diferente incidencia sobre la composición de mosto y vino producidos. Así, el riego aumentó el grado alcohólico probable y final en algunos de ellos (Lissarrague, 1986; Bartolomé, 1993; Yuste, 1995; García-Escudero et al, 1997), mientras que en otros no se vieron diferencias significativas (Cuevas, 2011). El riego aumenta frecuentemente la acidez del mosto, mayormente debido al ácido málico (Yuste, 1995). En cuanto al pH, también hay autores que observaron un incremento (Sipiora y Gutiérrez, 1995) y quienes observaron una disminución (Lissarrague, 1986; Bartolomé, 1993; Yuste, 1995).

El aclareo de racimos puede ayudar al equilibrio de la producción de uva, además de mejorar su calidad, en años con condiciones climáticas benignas, aumentando generalmente la concentración de azúcares. El impacto del aclareo sobre la acidez total y el pH ha sido variable en diferentes estudios realizados, observándose reducciones de acidez (Fregoni y Corazzina, 1984), aumentos de acidez (Carbonneau et al, 1977), ligeros aumentos de pH (Cargnello et al, 1994) e importantes aumentos de pH (García de Luján, 1992; Rubio, 2002).

2. Material y métodos

La parcela experimental en la que se han realizado los ensayos se ubica en viñedos de la D.O. Rueda, utilizando cepas de Verdejo sobre 110, R plantadas en 2006 y conducidas en espaldera con poda corta mediante cordón Royat bilateral. El diseño experimental consta de bloques al azar con cuatro repeticiones y parcela elemental de 27 cepas, con un marco de 2,60 m x 1,25 m. El riego (R) se aplicó semanalmente al 25% y al 50% de la ETo, a partir de la parada de crecimiento vegetativo de pámpanos principales, mientras que el aclareo (A) se aplicó cortando con tijera, al inicio del envero, un 33% de los racimos de cada cepa. Se dispuso de tratamiento testigo (T), sin aclarar ni regar. El estudio se llevó a cabo en las campañas 2012, 2013 y 2014.

Tabla 1. Tratamientos experimentales de Verdejo.

Código	SO-T	SO-A	R25-T	R25-A	R50-T	R50-A
Riego	No	No	Sí	Sí	Sí	Sí
Aclareo	No	Sí	No	Sí	No	Sí

La uva fue procesada en la E.T.S.II.AA. de Palencia (Universidad de Valladolid) siguiendo un diagrama de flujo de vinificación en blanco tradicional y dividiendo en dos cada lote de tratamiento para realizar las vinificaciones por duplicado. Se procesó la vendimia con una despalladora de paletas y una estrujadora de rodillos de perfiles conjugados o estriados. A continuación se realizó el prensado con una prensa de husillo. Se encubaron los tratamientos por separado en depósitos de acero inoxidable y se realizaron los análisis físico-químicos del mosto: acidez total, pH, grado Brix, nitrógeno fácilmente asimilable, índice de polifenoles totales (IPT), familias fenólicas y color. Se sulfitó el mosto a 50 mg/l de SO₂ total y se sometió a desfangado estático por frío a 8°C durante 24 horas. Después de realizar un trasiego, se sembró el mosto con levaduras neutras comerciales, utilizando la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* LALVIN EC 1118 (Lallemant, Quebec, Canadá). Se controló la temperatura y la densidad de cada depósito durante la fermentación. Cuando las densidades se estabilizaron en torno a 0,990-0.995, se analizaron los azúcares reductores y cuando éstos dieron valores inferiores a 3 g/L se dieron por terminadas las fermentaciones.

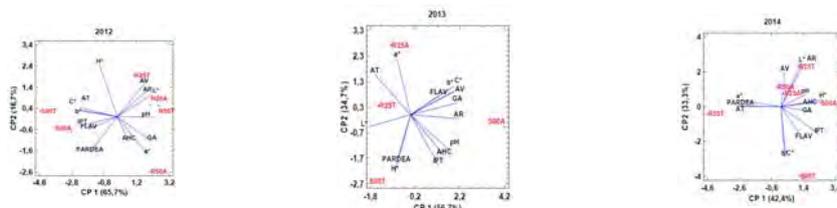
Se trasegó el vino y se añadió sulfuroso hasta llegar a 30 mg/L de SO₂ libre. Posteriormente se estabilizaron los vinos por frío en cámara de refrigeración y una semana más tarde se volvieron a trasegar y se corrigieron aquellos vinos por debajo de 30 mg/L de SO₂ libre. Se analizaron los siguientes parámetros en el vino final: acidez total, pH, acidez volátil, sulfuroso libre y total, extracto seco, azúcares reductores, grado alcohólico, IPT, familias fenólicas y color. Todos los análisis se realizaron por duplicado, utilizando los métodos oficiales de la OIV (2014). A partir de los datos de análisis de mosto y vino, se procedió a la realización de un análisis de varianza (ANOVA). Se utilizó el test de Tukey para elaborar los diferentes conjuntos homogéneos. Adicionalmente, con los datos analíticos de vino se llevó a cabo un análisis de componentes principales (ACP) utilizando el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 19.

3. Resultados

Las tres añadas objeto de estudio presentaron unos comportamientos climáticos muy diferentes en cuanto a régimen hídrico, siendo el año 2012 especialmente seco, el 2013 muy lluvioso y presentando el 2014 un régimen pluviométrico intermedio entre los dos anteriores. Este hecho se reflejó en los datos analíticos observados en mostos y vinos, de manera que en algunos parámetros el efecto añada pudo superar al riego o al aclareo de racimos.

De los análisis estadísticos comparativos de los tres años se puede observar que en el mosto el riego provoca un descenso del IPT y, en condiciones de sequía, conlleva un incremento del nitrógeno fácilmente asimilable (NFA).

Por lo que se refiere al vino, el aclareo conlleva incremento de pH y descenso de la acidez total en las tres añadas estudiadas, así como incremento del grado alcohólico en todas las condiciones, mientras que la incidencia del riego sobre este parámetro depende del régimen pluviométrico anual. También en vino se observa descenso del IPT con el riego independientemente de las lluvias caídas.



GA: grado alcohólico	IPT: índice polif. Totales	L*: luminosidad
AT: acidez total	FLAV: flavonoles	C*: saturación
AV: acidez volátil	AHC: á. Hidroxicinámicos	H*: tonalidad
AR: azúcares residuales	PARDEA: pardeamiento	

El análisis de componentes principales del vino realizado con las tres añadas muestra que el hecho de regar discrimina todos los años, diferenciando a las muestras de secano de los distintos tratamientos de regadío. La influencia del aclareo se pone de manifiesto fundamentalmente el año de mucha lluvia, especialmente en el secano, traduciéndose en un incremento del grado alcohólico obtenido. En el año 2012, caracterizado por la baja pluviometría, se observa un comportamiento opuesto de la madurez fenólica y la acidez total frente al pH y al grado alcohólico. Ese mismo año se ha observado que cuanto menor ha sido la aportación de agua de riego, mayores han sido el IPT y la acidez total, con más amarillo y mayor cromaticidad. Sin embargo, en 2013, año particularmente lluvioso, la madurez fenólica y el pH muestran un comportamiento opuesto al de la acidez total, igual que sucede en 2014 (de régimen pluviométrico intermedio). En 2013 se observó también que el grado alcohólico parece estar menos relacionado con el pH y que el aclareo supuso incremento del grado alcohólico.

El análisis de componentes principales del vino realizado con las tres añadas muestra que el hecho de regar discrimina todos los años, diferenciando a las muestras de secano de los distintos tratamientos de regadío. La influencia del aclareo se pone de manifiesto fundamentalmente el año de mucha lluvia, especialmente en el secano, traduciéndose en un incremento del grado alcohólico obtenido. En el año 2012, caracterizado por la baja pluviometría, se observa un comportamiento opuesto de la madurez fenólica y la acidez total frente al pH y al grado alcohólico. Ese mismo año se ha observado que cuanto menor ha sido la aportación de agua de riego, mayores han sido el IPT y la acidez total, con más amarillo y mayor cromaticidad. Sin embargo, en 2013, año particularmente lluvioso, la madurez fenólica y el pH muestran un comportamiento opuesto al de la acidez total, igual que sucede en 2014 (de régimen pluviométrico intermedio). En 2013 se observó también que el grado alcohólico parece estar menos relacionado con el pH y que el aclareo supuso incremento del grado alcohólico.

4. Conclusiones

De los ensayos y observaciones realizados, se deduce que el mero hecho de regar afecta considerablemente a los parámetros enológicos estudiados, independientemente de la dosis de riego aplicada y del régimen pluviométrico de la añada. Sin embargo, la influencia del aclareo en los parámetros analíticos objeto de estudio está influenciada por el régimen pluviométrico de la campaña, siendo más notable los años de menor cantidad de lluvia.

Por otro lado, el régimen de lluvia modifica el comportamiento de la madurez fenólica respecto al pH y la acidez total, de manera que en años con regímenes pluviométricos elevados y medios la madurez fenólica evoluciona paralelamente al pH y en años secos lo hace paralelamente a la acidez total.

5. Bibliografía

1. Bartolomé, M.C. 1993. Respuestas de la vid (*Vitis vinífera* L.) a condiciones de estrés hídrico: efectos sobre las relaciones agua-planta, el crecimiento, la producción y la calidad (cv. Tempranillo). Tesis doctoral, Departamento de Producción Vegetal: Fitotecnia. Universidad Politécnica de Madrid.
2. Carbonneau, A.; Leclair, P.H.; Dumartin, P.; Cordeau, J.; Roussel, C. 1977. Etude de l'influence chez la vigne du rapport « partie végétative/partie productrice » sur la production et la qualité des raisins. In: *Connaissance de la Vigne et du Vin*. 11 (2), 105-130.
3. Cargnello, G. 1994. Researches on the influence of the manipulation of canopy, of production and of grapes ripening on instrumental and sensory quality, on "economic quality" and on "quality economy" of production, in "new" models of integrated viticultures. In: *ISHS Acta Horticulturae*, 526: V International Symposium on Grapevine Physiology.
4. Cuevas, E. 2001. Estudio de mecanismos de adaptación ecofisiológica de la vid (*Vitis vinífera* L., cv. Tempranillo) al déficit hídrico. Evaluación del consumo de agua y de las respuestas agronómicas en diferentes regímenes hídricos. Tesis doctoral, Departamento de Producción vegetal. Universidad Politécnica de Madrid.
5. Fregoni, M.; Corazzina, E. 1984. Osservazioni triennali sul diradamento del grappoli di Garganega nel Soave. In: *Vignevisini*. 7-8, 11-14.
6. García de Luján, A. 1992. Ensayo de aclareo de racimos en la zona de Jerez. In: *Vitivinicultura*. 6, 44-46.
7. García-Escudero, E.; López, R.; Santamaría, P.; Zaballa, O. 1997. Ensayos de riego localizado en viñedos productivos de cv. Tempranillo. In: *Viticultura/Enología profesional*. 50, 35-47.
8. Lissarrague, J.R. 1986. Estudio de los efectos del riego en la producción, desarrollo vegetativo, calidad del mosto y nutrición mineral en la vid. Tesis doctoral, Departamento de Producción vegetal. Universidad Politécnica de Madrid.
9. OIV. 2014. Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts.
10. Rubio, J.A. 2002. Riego y aclareo de racimos: efecto en la actividad fisiológica, en el control del rendimiento y en la calidad de la uva del cv. Tempranillo (*Vitis vinífera* L.) Tesis doctoral. Departamento de Producción vegetal. Universidad Politécnica de Madrid.
11. Sipiora, M.; Gutiérrez, M.J. 1995. Respuesta a la sequía de viñas de "Riesling" y "Cabernet Sauvignon" sobre portainjertos SO4. In: *Viticultura/Enología profesional*. 38, 27-34.
12. Yuste, J. 1995. Comportamiento fisiológico y agronómico de la vid (*Vitis vinífera* L.) en diferentes sistemas de conducción en secano y regadío. Tesis doctoral, Departamento de Producción vegetal: Fitotecnia. Universidad Politécnica de Madrid.

6. Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado con fondos del INIA, Proyecto RTA2011-00100-C05-02.

Los autores agradecen a la empresa LALLEMAND Oenology Division el suministro de la cepa de levadura utilizada.

V06 - TECNENOL (Grupo de Investigación en Tecnología Enológica): BASE DE DATOS DE SSR O MICROSTÉLITES DE *Vitis* (Universidad Rovira i Virgili (URV))

G. Marsal, N. Boronat, J. Sabaté, L. Gómez, JM. Canals, F. Zamora, F.Fort

Universidad Rovira i Virgili, Departamento de Bioquímica i Biotecnología, Facultad de Enología de Tarragona, Campus Sescelades, C/ Marcel·lí Domingo nº1, 43007 Tarragona, España.
mariafrancesca.fort@urv.cat

RESUMEN:

La creación de colecciones de plantas “in vivo” es una de las estrategias más extendidas para la preservación de los recursos fitogenéticos “ex situ”, ya que permite además de la caracterización molecular, fenotípica y agronómica, el seguimiento evolutivo de los individuos en cuestión. Actualmente se han desarrollado diversas colecciones o germoplasmas de *Vitis* en todo el mundo que han generado una gran cantidad de datos. La utilización eficiente de esta información se canaliza en la creación de Bases de Datos ampelográficas y/o de SSR o Microsatélites (técnica molecular más ampliamente utilizada) de uso habitual para científicos, expertos del sector y público interesado. El Grupo de Investigación en Tecnología Enológica (TECNENOL) está desarrollando una Base de Datos de SSR para *Vitis*, propia que en breve (2016) se presentará para su utilización universal.

Palabras clave: Base de Datos, *Vitis vinifera*, SSR o Microsatélites, variedades, identificación

1. Introducción

La biodiversidad de *Vitis vinifera* L. se estima en unas 5000 variedades (This y col. 2006). Esta sería una de las estimaciones más fiables realizada a partir de datos procedentes del estudio directo del genoma, es decir, de la utilización de Marcadores Moleculares. La actual erosión genética de esta especie tiene diferentes orígenes, pero el denominador común de todos ellos, es el intento desmesurado por parte del hombre, de controlar la naturaleza y sacar el máximo provecho de ella. Esta actitud le ha conducido inexorablemente a alterar el equilibrio natural del ecosistema en este caso, vitícola (introducción de especies invasoras, como la filoxera; cambio en el encepamiento, como la introducción de variedades francesas....), y este cambio, ha causado la acusada pérdida de diversidad de la vid (Schneider and Raimondi, 2014). Ante esta problemática y en estos últimos tiempos, se ha reaccionado favoreciendo la recuperación de variedades locales o minoritarias. Pero además, esta estrategia pasa por la caracterización y conservación de las mismas en colecciones de plantas (“in vivo”). Tanto a nivel europeo como español, podemos hablar de diversas colecciones de vides (Figura 1). Las colecciones ampelográficas son la solución más extendida mundialmente, ya que permiten estudiar al individuo, a nivel molecular (genoma), ampelográfico, caracterizarlo agronómicamente, ver su adaptación y su evolución..., pero no debemos olvidar otras estrategias que aunque menos usadas, también tienen

su importancia, como puede ser la crioconservación o la conservación “in vitro” (Schneider and Raimondi, 2014).

RELACIÓN DE BANCOS DE GERMOPLASMA EUROPEOS DE VID	
Instituto	Número de accesiones
INRA-ENSA, Montpellier, France	7230
IMIA, El Encin, España	3207
ISV, Conegliano, Italia	2800
I.R. Geilweilerhof, Alemania	2559
I. V. Plevén, Bulgaria	1600
EVEX Rancho de la Merced, España	1579
I A di San Michele all'Adige, Italia	1250
DSZBK, Pecs, Hungría	1123
VI of Athens, Lycovrissi, Grèce	820
EVN, Dois Portos, Portugal	633
HBLA u BA Klosterneuburg, Austria	340

RELACIÓN DE BANCOS DE GERMOPLASMA ESPAÑOLES DE VID			
Comunidad Autónoma	Centro	Nº de acces.	Año de fundación
Comunidad de Madrid	IMA, Alcalá de Henares	3207	1896
Andalucía	EVEX, Jerez de la Frontera	1579	1940
Castilla-La Mancha	CEV, Tomelloso	639	1987
Aragón	CTA, Movera	381	1990
La Rioja	CIDA, Agoncillo	197	1982
Galicia	EVE, Leiro	166	1988
Castilla y León	SIA, Valladolid	162	1990
Murcia	OIDA, La Alberca	110	1980
Comunidad Valenciana	EVE, Requena	64	1983
Extremadura	SIDT, Guadajira	40	1984

Figura 1: Relación de colecciones “in vivo” de vides europeas y españolas (Félix Cabello Sáenz de Santamaría: Recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Santander.(2008))

Para optimizar y canalizar toda la información generada a partir del uso de estas estrategias de conservación, se han creado diferentes Bases de Datos, de las cuales la más importante es el VIVC (Vitis International Variety Catalogue) (Maül, 2015). Se trata de una Base de Datos que en sus inicios era ampelográfica (con más de 19.000 accesiones) y que, hace unos pocos años se ha incorporado en paralelo una Base de Datos Molecular (que actualmente está en construcción y que pretende incorporar más de 1500 perfiles genómicos basados en la técnica de los SSR (Simple Sequence Repeats) o Microsatélites). En esta Base de Datos participan 130 instituciones de 45 países. A parte de ella, existen actualmente otras Bases de Datos menores (Ampelográficas y/o de SSR), que visualizan información sobre variedades locales, por lo tanto, más específicas de una zona en concreto (Figura 2).

Figura 2: Página principal de la Base de Datos VIVC. Relación de otras Bases de Datos mundiales (“Important Links” (VIVC)).

Nuestro objetivo es generar una Base de Datos de perfiles genómicos obtenidos mediante la técnica más utilizada actualmente para caracterizar el género *Vitis*, se trata de los SSR o Microsatélites. Esta Base de Datos estaría especializada en variedades procedentes de las Islas Baleares, de las Islas Canarias, de Cataluña y de Italia.

2. Material y métodos

Se han analizado 1022 accesiones del género *Vitis* (variedades de vinífera, variedades e híbridos de especies americanas (patrones de vid e Híbridos Productores Directos) y variedades asiáticas) procedentes de 24 países. Se recogieron hojas o sarmientos y se almacenaron inmediatamente a -20°C. Se extrajo el ADN de acuerdo con uno de los dos métodos propios del Grupo de Investigación TECNENOL (Marsal y col. 2011 y 2013). Estos individuos se genotiparon con 20 marcadores SSR o Microsatélites. Las amplificaciones de microsatélites se realizaron por medio del análisis de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los productos de amplificación se separaron por electroforesis capilar mediante un secuenciador ABI PRISM 3730® Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los fragmentos amplificados fueron medidos mediante Pick Scanner software (Applied Biosystems, Nueva Jersey, EEUU). Cada cultivar se analizó dos veces para evitar posibles errores.

3. Resultados

A partir de más de un millar de entradas o accesiones pertenecientes tanto a vides europeas, americanas y asiáticas procedentes de 24 países (Figura 3), se han generado unos 700 perfiles genómicos.

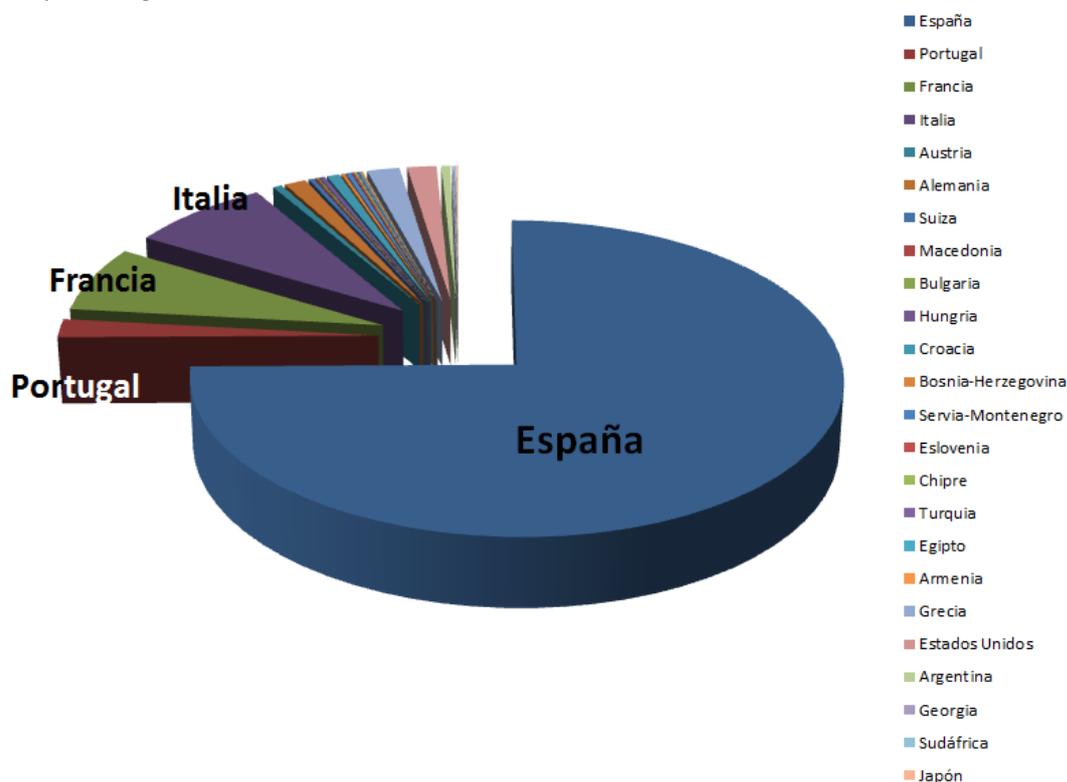


Figura 3: Acciones agrupadas por países de la Base de Datos de TECNENOL (URV).

La principal contribución a esta Base de Datos corresponde a España con un 75% aproximadamente de las accesiones, seguida de Italia con casi un 8% de las entradas. Por Comunidades Autónomas (CCAA), serían las Islas Canarias las que han aportado más entradas (un 56% aproximadamente), seguida de Cataluña (con 22% aproximadamente), y de las Islas Baleares (con un 15%). El 7% restante procede del resto de CCAA (Figura 4).

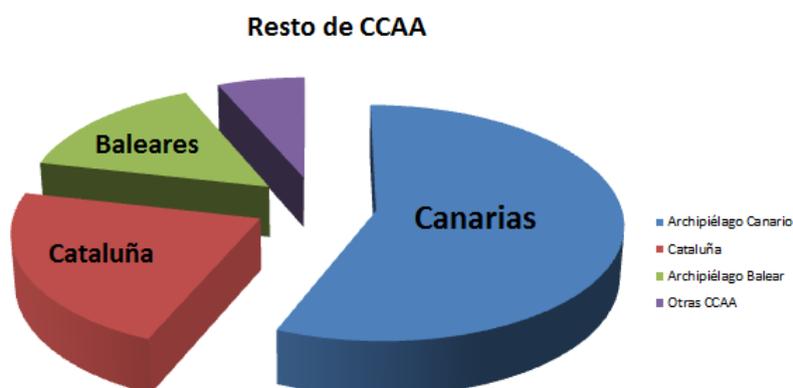


Figura 4: entradas agrupadas por CCAA españolas de la Base de Datos de TECNENOL (URV).

Esta Base de Datos se presentará a la comunidad científica y al sector vitivinícola el próximo año 2016. Además se confeccionará una página web adaptada a las necesidades de consulta de sus perfiles genómicos y que contendrá información adicional de interés general, esta se estrenará el mismo día de la presentación de la Base de Datos.

5. Bibliografía

1. Marsal, G., Baiges, I., Canals, J.M., Zamora, F., Fort F. (2011). A Fast, Efficient Method for Extracting DNA from Leaves, Stems, and Seeds of *Vitis vinifera* L. *Am. J. Enol. Vitic.*, 62, 376-381 (2011)
2. Marsal, G., Boronat, N., Canals, J.M., Zamora, F., Fort F. (2013). Comparison of the Efficiency of some of the most usual DNA Extraction Methods for Woody Plants in different tissues of *Vitis vinifera* L. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 47, 227-237
3. Maül, E., Töpfer, R., Eibach, R. (2015). VIVC: *Vitis* International Variety Catalogue. <http://www.vivc.de/>
4. Schneider, A. and Raimondi S. (2014). Preservation and characterization of *Vitis vinifera* cultivated germplasm. In: Exploitation of autochthonous and more common vine varieties. Genetic pedigree and phenotyping, tolerance and stress, diseases to control, rootstocks. 2nd International Symposium: OENOVITI INTERNATIONAL network, 3 - 5 November 2014 – Geisenheim (DEU)
5. This, P., Lacombe, T., Thomas MR. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *TRENDS in Genetics* 22 (9), 511-519

6. Agradecimientos

Esta Base de Datos ha contado con financiación procedente de Bodegas Sumarroca S.L. (proyecto CDTI) y los Cabildos de Lanzarote y La Gomera (aportaciones procedentes de la UE y propias). Nuestro más sincero agradecimiento a los Consejos Reguladores de los Vinos de Lanzarote, de La Gomera, a Bodegas Viñátigo, al Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera” (IRFAP) de Mallorca, Vinyes Binitord de Menorca S.L., a Bodegas Albet i Noya S.L. (DO Penedés), Celler Frisach (DO Terra Alta) y a todos los particulares, alumnos, amigos y conocidos que han aportado material vegetal.

V07 - BODEGAS ALBET I NOYA: UNA APUESTA POR LA RECUPERACIÓN DE VARIEDADES CATALANAS ANTÍGUAS

J. Sabaté, JM. Albet, G. Marsal, N. Boronat, L. Gómez, JM. Canals, F. Zamora, F.Fort

Universidad Rovira i Virgili, Departamento de Bioquímica i Biotecnología, Facultad de Enología de Tarragona, Campus Sescelades, C/ Marcel·lí Domingo nº1, 43007 Tarragona, España. mariafrancesca.fort@urv.cat

RESUMEN:

La recuperación de variedades locales, autóctonas o minoritarias es una de las prioridades de la viticultura actual como recurso para ampliar la oferta del mercado del vino y como estrategia para mantener la biodiversidad de *Vitis vinifera*. En este sentido las Bodegas Albet i Noya (DO Penedés) actualmente están conservando en su colección de vides, ejemplares recuperados de viñedos viejos y de bosques, además de apostar por la conservación y estudio de Híbridos Productores Directos. Once de estos individuos han sido analizados mediante la técnica de los SSR (Simple Sequence Repeats). De todos ellos se han identificado 8 perfiles genómicos, siendo las accesiones Maria Rion, Peu de rata / Bellesa y Garrut, desconocidas hasta este momento.

Palabras clave: *Vitis vinifera*, SSR o Microsatélites, Albet i Noya, variedades, identificación

1. Introducción

Desde tiempos inmemoriales el hombre ha actuado como seleccionador de la vid. Esta estrategia le ha servido para preservar los ejemplares que él valoraba, y así, los ha ido domesticando. Este hombre nómada y después sedentario, siempre actuaba de manera sostenible con la naturaleza (Forni, 2012). Actualmente el hombre actúa de manera muy discutible. A menudo rompe los equilibrios propios de la especie agredida. En el caso de la vid cultivada, se ha llegado al extremo de vinificar el 99% de los vinos comerciales del mundo, con solamente unas 50 variedades (Bouquet, 2014). Dado que la Biodiversidad de esta especie se calcula en unos 5000 ejemplares, la erosión genética actual es más que un hecho plausible (This y col. 2006). Impactos ecológicos como, las especies invasoras (mildiu, oídio o la filoxera ...), la introducción de variedades extranjeras, las modas y tendencias, la legislación Europea (PAC (Política Agrícola Común de la Unión Europea)), las políticas restrictivas de las DOP (Denominaciones de Origen Protegidas) y el Cambio Climático, agravan cada vez más esta situación (Schneider and Raimondi, 2014).

Desde hace unos años el sector ha comenzado a reaccionar ante este hecho. Actualmente la recuperación de variedades minoritarias, autóctonas e incluso asilvestradas es una práctica común entre viticultores y bodegueros. En este sentido la mentalidad abierta e innovadora de las nuevas generaciones, queda patente en la creación de grandes y pequeñas colecciones de plantas de *Vitis* que hay en la comarca del Penedès. Hablamos de la colección "La Viña del Mundo", la de la Escuela Mercé Rossell y Domènech - Escuela Espiells, y tal vez

con no tantos ejemplares, la recopilación de variedades que ha hecho las Bodegas Albet i Noya. En este sentido, presentamos un estudio de caracterización molecular de 11 entradas. Estas han sido recogidas desde el Penedés al Pirineo a partir de varios criterios, pero con el fin siempre innovador, de cubrir desde las problemáticas referentes a enfermedades de la vid, hasta el conocimiento de las aptitudes agronómicas de ejemplares asilvestrados o de vides prefiloxéricas.

2. Material y métodos

Se analizaron 11 accesiones de *Vitis vinifera* L. procedentes del germoplasma de la empresa Bodegues Albet i Noya S.L., ubicada en la D.O. Penedés. Se recogieron hojas en primavera y se almacenaron inmediatamente a -20°C. Se extrajo el ADN de acuerdo con un método propio del Grupo de Investigación TECNENOL (Marsal y col. 2013). Esta muestra se genotipó con 20 marcadores SSR o Microsatélites, que han sido seleccionados por su calidad y polimorfismo de acuerdo con estudios previos: VVS2, VVS3, VVS29, VVMD5, VVMD6, VVMD7; VVMD27, VVMD28, VVMD36, VrZAG21, VrZAG47, VrZAG62, VrZAG64, VrZAG79, VrZAG83, scu06vv, VvUCH11, VvUCH12, VvUCH19, VChr19a.

Las amplificaciones de microsatélites se realizaron por medio del análisis de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se llevó a cabo con 50 ng de ADN y 1 µM de cada cebador, utilizando el kit de ADN polimerasa AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis capilar mediante un secuenciador ABI PRISM 3730® Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los fragmentos amplificados fueron medidos mediante Pick Scanner software (Applied Biosystems, Nueva Jersey, EEUU). Cada cultivar se analizó dos veces para evitar posibles errores.

Para el análisis de sinonimias y la confección del gráfico de Coordenadas Principales se utilizó el programa GenAlEx 6.5.

3. Resultados

Se comprobaron los perfiles genómicos de las 11 accesiones analizadas, con diferentes Bases de Datos: TECNENOL (Grupo de Investigación en Tecnología Enológica. Universidad Rovira i Virgili), VIVC (Vitis International Variety Catalogue), ETSIA-UPM “Spanish Vitis Microsatellite Database”, y como resultados se obtuvieron los Nombres Principales que se presentan en la Tabla 1.

Se han confirmado 6 entradas: Chancellor, Chambourcin, Vidal blanc, Arinarnoa, Graciano y el accesoión Belat. Las cuatro primeras corresponden a ejemplares de Híbridos Productores Directos, todos ellos de origen francés. La quinta corresponde al vidueño riojano-navarrés Graciano y la última entrada corresponde a la variedad Belat, recientemente recuperada por las Bodegas Albet i Noya y que ya consta en el VIVC. Se han identificado 2 accesiones, la entrada correspondiente a Pirineo 1 como la variedad francesa Canari noir y la entrada denominada Peu de rata / Bellesa (Código 10 AN) ha resultado ser el cultivar centroeuropeo Chasselas blanc. Los 3 individuos restantes corresponden a perfiles genómicos sin identificar, estos son Marina Rion, Peu de rata / Bellesa (Código 8 AN) y Garrut, todas ellas

recuperadas por el Sr. Josep Maria Albet y de las que no se ha podido establecer una correspondencia con ningún perfil genómico hasta el momento.

Tabla 1: Relación de Nombres Principales (identificación) obtenidos después del análisis con SSR

Código	Nombre de Entrada	Nombre Principal	País	Color	Uso	Observaciones
1 AN	Chancellor	Chancellor	France	B	W	Híbrido Productor Directo (SEIBEL 5163 X SEIBEL 880)
3 AN	Chambourcin	Chambourcin	France	B	W	Híbrido Productor Directo (SEYVE VILLARD 12-417 X SEIBEL 7053)
4 AN	Vidal Blanc	Vidal blanc	France	W	W	Híbrido Productor Directo (TREBBIANO TOSCANO X SEIBEL 4986)
11 AN	Arinarnou	Arinarnoa	France	B	W	Híbrido Productor Directo (TANNAT X CABERNET SAUVIGNON)
10 AN	Peu De Rata / Bellesa	Chasselas Blanc	France	W	W/T	
7 AN	Pirineu 1	Canari noir	France	B	W/T	
2 AN	Belat	Belat	Spain	B	W	Variedad Autóctona Penedés
5 AN	Marina Rion	Unknown 2S	Spain	W	W	Desconocida
6 AN	Graciano	Graciano	Spain	B	W	
8 AN	Peu De Rata/Bellesa	Unknown 3S	Spain	W	W	Desconocida
9 AN	Garrut	Unknown 4S	Spain	B	W	Desconocida

La Figura 1 corresponde a la representación de Coordenadas Principales de esta población de 11 individuos procedente de las Bodegas Albet i Noya (de color verde), junto con la población de accesiones procedente de la Base de Datos de TECNENOL que consta de un millar de entradas (de color rojo). En ella se puede observar como prácticamente toda la población estudiada se ubica en el cuadrante superior derecho, donde se hallan la mayoría de variedades que corresponderían a la Prole Occidentalis de Negrul (1946).

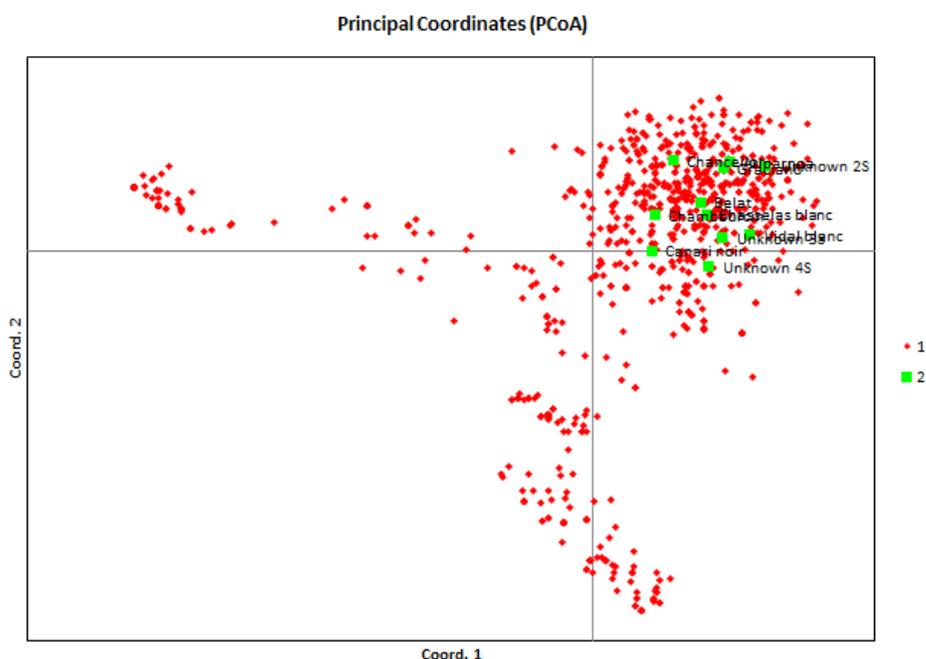


Figura 1: Ubicación de las muestras procedentes de Bodegas Albet i Noya, en el Banco de Datos de TECNENOL (Representación de Coordenadas Principales)

La excepción sería la muestra desconocida 4S que corresponde a la entrada denominada Garrut, que se ubica en la parte superior del cuadrante inferior derecho, junto con muchas variedades Insulares procedentes de Baleares y Canarias. Este cuadrante se caracteriza por albergar la mayoría de variedades de la familia de los Muscat, descritas por Negrul (1946) como pertenecientes a la Prole Orientalis (Figura 2).

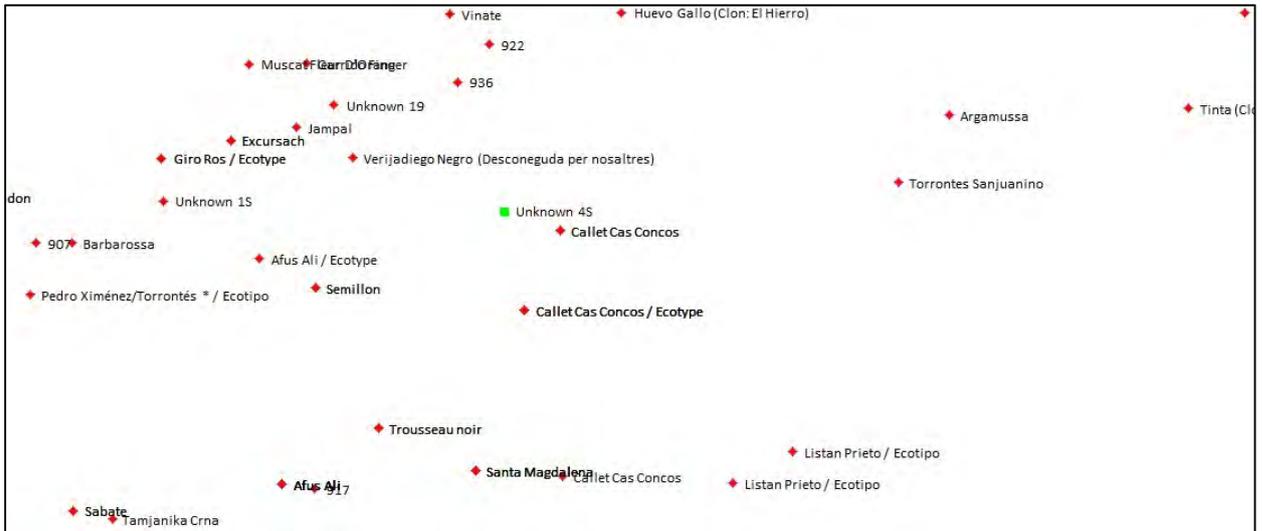


Figura 2: Ampliación de la zona donde se ubica la muestra 4S (en verde) en el cuadrante inferior derecho.

4. Conclusiones

1. Se han podido caracterizar 8 de las 11 accesiones
2. La entrada procedente del Pirineo resultó ser la variedad francesa Canari noir
3. Hay dos entradas con el mismo nombre que han resultado ser diferentes, una corresponde a la variedad Chasselas blanc y la otra (Desconocida 3S) no se ha podido identificar hasta ahora
4. A parte de la accesión Desconocida 3S, los individuos entrados con los nombres Marina Rion y Garrut, también son desconocidas hasta este momento
5. Solamente la muestra "Desconocida 4S" tiene un origen oriental, las demás se ubican con la mayoría de entradas europeas

5. Bibliografía

6. Bouquet A. (2014). Grapevines and Viticulture. In: Genetics, Genomics, and Breeding of Grapes. Boca Raton, FL, USA. ISBN 978-1-57808-117-4
7. Forni, G. (2012). The origin of "Old World" viticulture. In: Caucasus and Northern Black Sea Region Ampelography. Vitis, Special Issue, JKI - Julius Kuhn-Institut 27-38
8. Marsal, G., Boronat, N., Canals, J.M., Zamora, F., Fort F. (2013). Comparison of the Efficiency of some of the most usual DNA Extraction Methods for Woody Plants in different tissues of *Vitis vinifera* L. J. Int. Sci. Vigne Vin, 47, 227-237
9. Negrul, A.M. (1946) Origin and classification of cultured grape. The Ampelography of the USSR, (1):159-216. Moscow
10. Schneider, A. and Raimondi S. (2014). Preservation and characterization of *Vitis vinifera* cultivated germplasm. In: Exploitation of autochthonous and more common vine varieties. Genetic pedigree and phenotyping, tolerance and stress, diseases to control, rootstocks. 2nd International Symposium: OENOVITI INTERNATIONAL network, 3 - 5 November 2014 – Geisenheim (DEU)
11. This, P., Lacombe, T., Thomas MR. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. TRENDS in Genetics 22 (9), 511-519

V08 - UNIVERSALIDAD DE LAS METODOLOGÍAS DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA *Vitis vinifera* L. DE TECNENOL. APLICACIÓN EN OTRAS ESPECIES VEGETALES

L. Gómez, J. Sabaté, G. Marsal, N. Boronat, JM. Canals, F. Zamora, F.Fort

Universidad Rovira i Virgili, Departamento de Bioquímica i Biotecnología, Facultad de Enología de Tarragona, Campus Sescelades, C/ Marcel·lí Domingo nº1, 43007 Tarragona, España.
mariafrancesca.fort@urv.cat

RESUMEN:

TECNENOL posee dos metodologías para la obtención de ADN en óptimas condiciones diseñado para vides (*Vitis vinifera* L.). La gran rapidez (largo: 2h30'; corto: 1h30'), comodidad (todo el procesado en tubos Eppendorf), polivalencia (hoja, sarmiento, semilla, fruto) y bajo coste las convierte en protocolos muy interesantes para ser aplicados a otros tipos de muestras vegetales.

El objetivo de este estudio es demostrar su utilidad, eficacia y universalidad.

Palabras clave: ADN, Extracción, Purificación, Plantas, Vegetales

1. Introducción

El Grupo de Investigación en Tecnología Enológica (TECNENOL), en una de sus líneas de investigación dispone de dos métodos de extracción de ADN que, sin lugar a dudas, ofrecen a la comunidad científica claras ventajas respecto al resto protocolos tanto convencionales como comerciales (rapidez, comodidad y precio).

En la propuesta más polivalente encontramos el primer protocolo diseñado: Marsal y col. (2011). Este protocolo ofrece poder extraer ADN puro y casi intacto en unas 2h 30 minutos (temporización del mismo orden que un "kit" comercial pero en este caso sólo extrae a partir de tejido foliar). La polivalencia le viene atribuida porque puede obtener ADN tanto de muestras de hoja joven como adulta, tanto de sarmiento (madera) como de semilla. La propuesta de método de extracción y purificación más rápida tiene una duración de 1h 30 minutos, pero queda restringida al tejido foliar, tanto joven como adulto (Marsal y col. 2013). Esta es una reducción del anterior método, donde el rendimiento y la pureza del ADN extraído no son significativamente inferiores (Figura 1).

Ambos presentan la ventaja de trabajar, en todo momento, con pequeños volúmenes de muestra, lo que hace que todo el protocolo se ejecute utilizando tubos Eppendorf. Esta reducción de volumen de muestra, aparte de hacer más ágil la metodología, lleva implícita una reducción de volúmenes de los reactivos y soluciones utilizados, que junto con la ausencia de la digestión con ARNasa, hace que ambos protocolos resulten verdaderamente económicos. Respecto a los métodos que comparamos, el ahorro en euros va de 2 a 8 veces (Figura 2).

Method	Organ	A _{260/280}	Yield (µg/g tissue)	SSR					
				VVS2	VVMD5	VVMD7	VVMD27	VrZAG62	VrZAG79
Manen <i>et al.</i> (2003)	young leaf	1.8±0.1	411±31	+	+	+	+	+	+
	mature leaf	1.8±0.1	332±39	+	+	+	+	+	+
	wood	1.9±0.1	297±19	+	+	+	+	+	+
	seed	1.9±0.1	81±10	+	+	+	+	+	+
Marsal <i>et al.</i> (2011)	young leaf	2.0±0.05	547±39	+	+	+	+	+	+
	mature leaf	1.9±0.1	419±41	+	+	+	+	+	+
	wood	1.8±0.1	403±24	+	+	+	+	+	+
	seed	1.8±0.1	108±24	+	+	+	+	+	+
Modified method of Marsal <i>et al.</i> (2011)	young leaf	2.0±0.1	560 ± 32	+	+	+	+	+	+
	mature leaf	1.9±0.2	330± 9	+	+	+	+	+	+
	wood	1.3±0.1	160±24	-	-	-	-	-	-
	seed	1.1±0.1	60±11	-	-	-	-	-	-
DNeasy Plant Mini Kit	young leaf	1.9±0.1	405±51	+	+	+	+	+	+
	mature leaf	2.0±0.05	351±29	+	+	+	+	+	+
	wood	1.1±0.05	123±17	-	-	-	-	-	-
	seed	-	-	-	-	-	-	-	-
MasterPure Plant Kit	young leaf	1.5±0.1	25±03	-	-	-	-	-	-
	mature leaf	1.2±0.1	13±01	-	-	-	-	-	-
	wood	-	-	-	-	-	-	-	-
	seed	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 1: Fragmento de la Tabla publicada en Marsal y col. (2013): Table 2 - Comparison of results obtained by the different methods studied. Se resalta en rojo el método Marsal y col. (2011) y su modificación publicada en 2013. Ambas publicaciones se centran en la especie *Vitis vinifera* L., de hecho, se diseñaron estos protocolos para esta especie.

Table 3 - Main economic traits: Final cost for eight samples, cost per mg DNA extracted and estimation of number of samples processed per day.

Protocols or commercial kits	Cost of reagents (€)		Cost handling time per 8 samples (€)		Final cost per 8 samples	Final cost per mg (€) extracted per 8 samples ^(*)	Estimated DNA samples per day ^(*)
	A sample	8 samples	Estimated extraction time (h)	Cost hands-on-time ^(*)	Reagents and handling time	Cost per mg DNA	
Bowers <i>et al.</i> (1993)	20.38	163.02	8.00	64.00	227.02	659.94	8
Thomas <i>et al.</i> (1993)	3.17	25.37	3.00	24.00	49.37	47.84	36
Lodhi <i>et al.</i> (1994)	3.95	31.63	3.80	30.40	62.03	14.74	24
Steenkamp <i>et al.</i> (1994)	4.00	32.02	3.30	26.40	58.42	42.46	24
Wolf <i>et al.</i> (2001)	0.50	4.01	3.00	24.00	28.01	7.17	36
Manen <i>et al.</i> (2003)	0.29	2.36	3.50	28.00	30.36	9.23	24
Marsal <i>et al.</i> (2011)	0.63	5.08	2.50	20.00	25.08	5.73	48
Modified method of Marsal <i>et al.</i> (2011)	0.63	5.08	1.50	12.00	17.08	3.81	96
DNeasy Plant Mini Kit	4.10	32.80	2.50	20.00	52.80	16.30	48

^(*) 8€ / h (Tattersall *et al.* (2005)). (+) Samples: young leaves. (°) Calculated on the basis of the column of estimated extraction time

Figura 2: Tabla publicada en Marsal y col. (2013), en donde se compara el coste (€) (color rojo) y el tiempo estimado de duración del proceso (color verde) para diferentes metodologías (comerciales o no) de extracción y purificación de ADN diseñadas a partir de *Vitis vinifera* L.

El objetivo de este estudio es comprobar que ambos protocolos funcionan con las mismas ventajas cuando se utilizan otras familias del reino vegetal, demostrando de esta manera la versatilidad de ambas metodologías.

2. Material y métodos

Para la universalización de las metodologías diseñadas por TECNENOL (Marsal y col. 2011 y Marsal y col. 2013) usadas exclusivamente en muestras del género *Vitis*, se ha probado la extracción y purificación de ADN de 30 individuos pertenecientes a otras familias vegetales. El material de partida correspondía a hojas jóvenes, hojas adultas, madera (brotes lignificados) y fruto procesado (comercial).

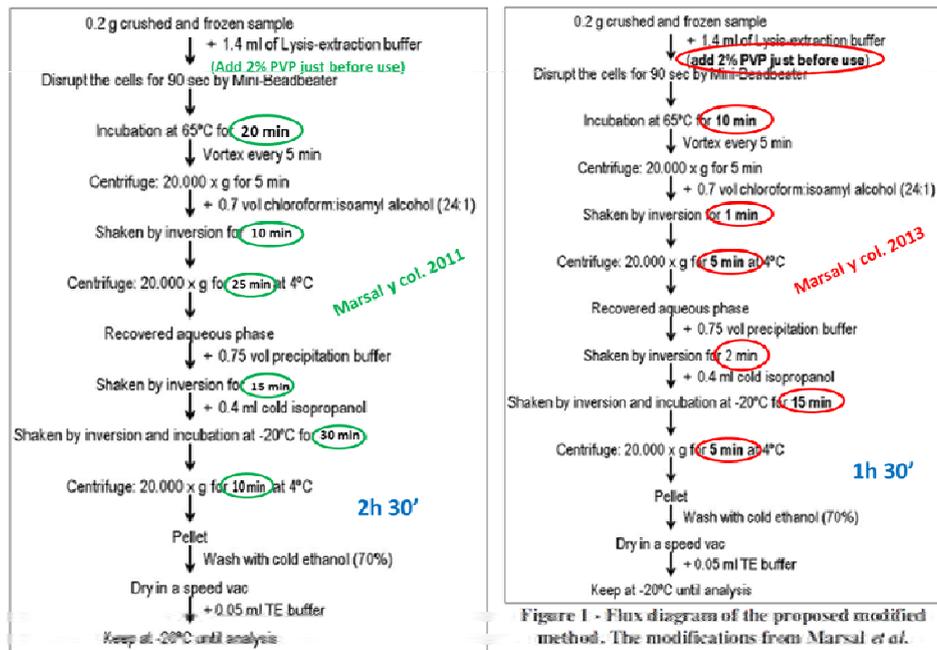


Figure 1 - Flux diagram of the proposed modified method. The modifications from Marsal et al. (2011) are shown in bold type.

Figura 3: Diagramas de flujo de los métodos de extracción de ADN diseñados para *Vitis vinifera* L., por TECNENOL. A la izquierda el protocolo Marsal y col. 2011, de 2h 30' de duración que actualmente utiliza siempre un 2% de PVP, y a la derecha el protocolo más corto (Marsal y col. 2013).

3. Resultados

En principio para hojas jóvenes y adultas se ha utilizado el protocolo Marsal y col. (2013) (Tabla 1). En caso de que en hojas adultas no se alcanzasen los índices de pureza deseados o bien, el ADN obtenido no reuniese las condiciones de integridad requeridos, se utilizó el protocolo Marsal y col. (2011) con la inclusión del PVP (que ya se usa siempre por defecto) (Tabla 1). Para muestras de madera (material lignificado) y otro tipo de material comercial, se ha usado el protocolo Marsal y col. (2011). En el caso de que el resultado obtenido no fuera satisfactorio, se ha añadido un lavado adicional de cloroformo.

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos para las diferentes especies usadas según el rendimiento (ng/μl) y los índices A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} que nos darán una idea de la efectividad y de la pureza de los protocolos testados. Las muestras entre L12 y L35 (ambas incluidas) corresponden a ejemplares foliares, y tal como hemos comentado anteriormente, se procesaron con el protocolo de Marsal y col. (2013). En cambio, para las muestras comprendidas entre la L1 hasta la L10, se ha utilizado el método de Marsal y col. (2011), ya que presumiblemente serían muestras complicadas por estar procesadas o ser tejidos difíciles (recalcitrantes). Por otro lado, las muestras con código "R", son repeticiones correspondientes a las muestras "L", se trata de tejido foliar que no han alcanzado los índices de pureza requeridos en primera estancia con Marsal y col. (2013) (marcadas en la Tabla 1 con un color grisáceo). Las vitáceas L1 y L27 se incluyeron en el estudio como ejemplares de referencia.

Los resultados son satisfactorios para la mayoría de las especies, siendo los valores óptimos de extracción para A_{260}/A_{280} y para A_{260}/A_{230} próximos a 2. Las especies en los que el protocolo no consiguió estos valores, están marcados en color gris en las columnas A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} . En la Figura 4 se presentan los resultados de la electroforesis para comprobar la integridad del ADN obtenido por ambos protocolos.

Tabla 1: Relación de índices de pureza y rendimiento obtenido para las 30 muestras objeto de estudio y las vitáceas utilizadas como patrón de referencia.

Código de Muestra	Género	Variedad	Nombre común	Tipo de muestra	Protocolo	ng/ul	A260/280	A260/230
L1	<i>Vitis Vinifera</i>	Moscatel de Alejandría	Viña	Sarmiento	Marsal y col. 2011	262,86	2,09	1,97
L4	<i>Solanum lycopersicum</i>	*	Tomate	Fruto Supermercado	Marsal y col. 2011	62,04	1,95	1,64
L5	<i>Olea europaea</i>	*	Aceitunas	Fruto Procesado	Marsal y col. 2011	71,84	1,62	0,17
L6	<i>Zea mays</i>	*	Corn flakes'	Fruto Procesado	Marsal y col. 2011	18,82	1,77	0,14
L7	<i>Eruca vesicaria</i>	*	Rúcula	Hoja Supermercado	Marsal y col. 2011	971,24	2,11	2,01
L8	<i>Lactuca</i>	*	Iceberg	Hoja Supermercado	Marsal y col. 2011	261,84	2,07	2,10
L9	<i>Phaseolus vulgaris</i>	*	Judía Verde	Hoja Supermercado	Marsal y col. 2011	319,74	2,08	1,95
L10	<i>Phynus/Musa</i>	*	Plátano desecado	Fruto Procesado	Marsal y col. 2011	230,33	2,03	0,66
L12	<i>Juglans regia</i>	Gales	Nogal	Hoja	Marsal y col. 2013	1651,07	2,08	2,20
L13	<i>Mentha spicata</i>	*	Hierba Buena	Hoja	Marsal y col. 2013	393,50	1,63	1,15
L14	<i>Cydonia oblonga</i>	Wranja	Membrillo	Hoja	Marsal y col. 2013	1451,92	2,08	2,10
L15	<i>Ficus carica</i>	Breva	Higuera	Hoja	Marsal y col. 2013	131,24	1,45	0,85
L16	<i>Malus domestica</i>	Verde Doncella	Manzano	Hoja	Marsal y col. 2013	411,68	2,03	2,13
L17	<i>Pyrus communis</i>	Ercolini	Peral	Hoja	Marsal y col. 2013	53,70	1,56	0,92
L18	<i>Malus domestica</i>	Golden Delicius	Manzano	Hoja	Marsal y col. 2013	219,47	1,71	1,00
L19	<i>Olea europaea</i>	Manzanilla Real	Olivo	Hoja	Marsal y col. 2013	68,44	1,36	0,55
L20	<i>Eriobotrya japonica</i>	Japón	Níspero	Hoja	Marsal y col. 2013	372,51	2,02	1,68
L21	<i>Magnolia gallisonensis</i>	*	Magnolia	Hoja	Marsal y col. 2013	415,95	2,54	0,84
L22	<i>Quercus robur</i>	*	Roble	Hoja	Marsal y col. 2013	262,20	1,82	0,75
L23	<i>Acacia comun</i>	*	Acacia	Hoja	Marsal y col. 2013	708,73	1,94	1,74
L24	<i>Eucaliptus gumi</i>	*	Eucalipto	Hoja	Marsal y col. 2013	1624,93	2,09	2,24
L25	<i>Corylus</i>	*	Avellano	Hoja	Marsal y col. 2013	1861,69	2,04	2,18
L26	<i>Prunus armeniaca</i>	Moniqui	Albaricoquero	Hoja	Marsal y col. 2013	811,74	1,88	1,86
L28	<i>Prunus arium</i>	Burlat	Cerezo	Hoja	Marsal y col. 2013	706,77	2,11	1,99
L27	<i>Vitis vinifera</i>	*	Viña	Hoja	Marsal y col. 2013	243,68	2,01	1,52
L29	<i>Prunus dulcis</i>	Marcona	Almendra	Hoja	Marsal y col. 2013	702,43	2,05	2,09
L30	<i>Prunus dulcis</i>	Vairo	Almendra	Hoja	Marsal y col. 2013	691,58	2,07	1,95
L31	<i>Allium sativum</i>	*	Ajera	Hoja	Marsal y col. 2013	376,03	1,68	1,02
L32	<i>Rosa</i>	*	Rosal	Hoja	Marsal y col. 2013	579,44	1,90	1,73
L33	<i>Solanum lycopersicum</i>	*	Tomatera	Hoja	Marsal y col. 2013	1829,68	2,09	2,13
L34	<i>Solanum tuberosum</i>	*	Patata	Hoja	Marsal y col. 2013	4566,78	1,88	1,97
L35	<i>Citrus limon</i>	*	Limonero	Hoja	Marsal y col. 2013	2329,18	1,51	1,33
R13	<i>Mentha spicata</i>	*	Hierba Buena	Hoja	Marsal y col. 2011	558,51	2,08	1,64
R15	<i>Ficus carica</i>	*	Higuera	Hoja	Marsal y col. 2011	413,15	1,74	1,12
R17	<i>Pyrus communis</i>	Ercolini	Peral	Hoja	Marsal y col. 2011	74,89	1,77	2,13
R19	<i>Olea europaea</i>	Manzanilla Real	Oliva	Hoja	Marsal y col. 2011	353,24	2,04	2,21
R18	<i>Malus domestica</i>	Golden Delicius	Manzano	Hoja	Marsal y col. 2011	652,11	2,06	2,17
R21	<i>Magnolia gallisonensis</i>	*	Magnolia	Hoja	Marsal y col. 2011	663,10	1,96	1,87
R22	<i>Quercus robur</i>	*	Roble	Hoja	Marsal y col. 2011	2012,28	2,03	2,23

* No se dispone de esos datos.

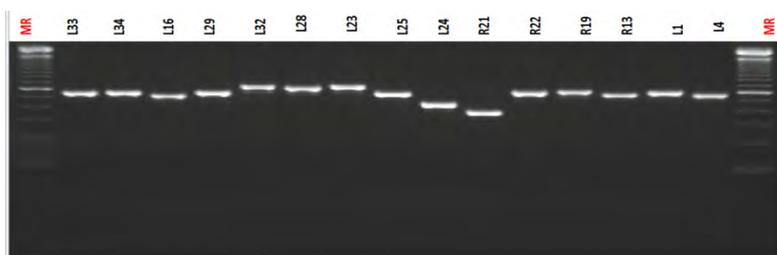


Figura 4: Gel de electroforesis donde se presenta la integridad del ADN extraído (solamente para algunas muestras).

4. Conclusiones

6. Ambos protocolos funcionan para todas las muestras objeto de estudio (universalidad)

5. Bibliografía

1. Marsal, G., Baiges, I., Canals, J.M., Zamora, F., Fort F. (2011). A Fast, Efficient Method for Extracting DNA from Leaves, Stems, and Seeds of *Vitis vinifera* L. *Am. J. Enol. Vitic.*, 62, 376-381 (2011)
2. Marsal, G., Boronat, N., Canals, J.M., Zamora, F., Fort F. (2013). Comparison of the Efficiency of some of the most usual DNA Extraction Methods for Woody Plants in different tissues of *Vitis vinifera* L. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 47, 227-237

V09 - INCIDENCIA DEL ESTADO HÍDRICO EN EL AROMA VARIETAL Y EN LOS PRECURSORES DE AROMAS DE FERMENTACIÓN EN EL cv. DOÑA BLANCA EN EXTREMADURA

M. Esperanza Valdés¹, J. R. Castel², M. Inmaculada Talaverano¹, Luis Mancha¹, Daniel Moreno¹, Esther Gamero¹, Samuel Frutos¹ y Mar Vilanova³

¹Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX). Av. Adolfo Suárez, s/n 06071 Badajoz, España

²Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada 46113 Valencia, España

³Misión Biológica de Galicia (CSIC), El Palacio-Salcedo. 36143. Pontevedra, España.

esperanza.valdes@gobex.es; mvilanova@mbg.csic.es

RESUMEN:

Este trabajo analiza el efecto del estado hídrico sobre las concentraciones de terpenos y los aminoácidos precursores de aromas de fermentación de uvas cv. Doña Blanca en el momento de la vendimia. El estudio se ha realizado durante las campañas 2012-2014 en Badajoz. Los manejos de riego aplicados han sido seco (S), riego deficitario en pre-verano y pos-verano (RD_{pre} y RD_{pos}) y riego no limitante durante todo el ciclo ($R_{máx}$). Los resultados muestran que la variedad Doña Blanca presenta en estas condiciones edafoclimatológicas bajos contenidos en terpenos. En los valores medios trianuales, el riego provocó aumentos de terpenos y NFA, que fueron significativos en R_C , y no afectó de forma significativa al conjunto global de aminoácidos. De manera individualizada, únicamente se observaron cambios significativos en Phe, Tyr, Ile, Asp, y Met, pero de diferente tendencia en función del aminoácido considerado. Se puede concluir que la aplicación de riego en esta variedad cultivada en espaldera en climas semiáridos, puede ser una buena técnica de cultivo, puesto que produce mejoras en la calidad del fruto reflejados en una bajada del pH y mayor calidad aromática del mosto.

Palabras clave: Nitrógeno, aroma varietal, precursor aromático,

1. Introducción

El aroma de un vino no sometido a procesos de crianza está constituido por el aroma varietal, integrado por compuestos que proceden directamente de la variedad, y por los aromas que se forman durante la fermentación alcohólica. Este último grupo de aromas, integrado fundamentalmente por alcoholes y ésteres y en menor medida por otros compuestos, es especialmente importante en los vinos procedentes de variedades neutras, en las que los aromas primarios apenas son perceptibles. Los niveles de Nitrógeno Fácilmente Asimilable por las levaduras (NFA), constituido por todos los aminoácidos existentes excepto la prolina (Pro), se han relacionado una buena cantidad de ésteres, responsables del aroma afrutado de los vinos. En concreto, los aminoácidos Tirosina (Tyr), Valina (Val), Leucina (Leu), Isoleucina (Ile), Fenilalanina (Phe) Treonina (Thr) y Aspartico (Asp) son en cierta medida los precursores de algunas de las propiedades organolépticas del vino al transformarse en alcoholes, aldehídos, ésteres, ácidos dicetónicos, etc. Se ha demostrado que esos tres últimos (Thr, Phe y Asp) modelan 8 de los 16 compuestos más importantes del aroma siendo Thr el de mayor influencia [1]. Por otra parte el contenido en metionina (Met) también puede repercutir en el aroma de los vinos. Junto con las técnicas de cultivo, la variedad tiene un importante

efecto tanto en la cantidad como en la distribución de aminoácidos y terpenos. La cantidad de aminoácidos y sustancias volátiles presentes en la uva puede ser afectada por el estado hídrico de la cepa habiéndose demostrado que tanto la cantidad total como el perfil aminoacídico y terpénico de las diferentes variedades responden de diferente manera ante los distintos estados hídricos [2, 3].

Este trabajo tiene por objeto evaluar la incidencia del estado hídrico en las concentraciones de terpenos y los aminoácidos precursores de los aromas fermentativos.

2. Material y métodos

El estudio se ha llevado a cabo durante las campañas 2012, 2013 y 2014 en una parcela comercial de *Vitis vinifera*, L. cv. Cigüente (sinónimo Doña Blanca). La descripción detallada del viñedo queda reflejada en Uriarte et al. [4]. Las variables climáticas se midieron en una estación agrometeorológica automática ubicada en el viñedo. La evapotranspiración del cultivo (ETc) se estimó como producto de ET₀ y del coeficiente de cultivo (Kc) [5]. El riego se aplicó por goteo con 1-2 emisores auto-compensados por cepa. Los tratamientos de riego impuestos han sido: 1) **Secano**, 2) **Déficit pre-verno (DPre)**, regado al 25% ETc hasta enero y al 75% ETc después del mismo hasta post-vendimia, 3) **Déficit post-verno (DPost)**, regado al 75% ETc hasta enero y al 25% ETc después del mismo hasta post-vendimia, 4) **Riego Máximo (RMáx)**, regado al 100% ETc durante todo el ciclo de cultivo. El estado hídrico de las plantas se evaluó mediante la medida del potencial hídrico de tallo (Ψ_s) con cámara de presión. Las mediciones se realizaron a mediodía (11:30 a 12:30 horas solares) a intervalos semanales o bisemanales entre Mayo y Octubre. A partir del enero se efectuó el seguimiento de sólidos solubles totales (SST, °Brix) de las uvas refractométricamente. En cada año, la vendimia de los distintos tratamientos se efectuó en diferentes fechas con la finalidad de que todas las bayas presentaran un contenido en SST similar. El perfil aminoacídico y terpénico de las bayas vendimiadas se evaluó individualizadamente para los diferentes bloques de cada tratamiento según Vilanova et al. [6].

3. Resultados

En la Tabla 1 aparecen los valores medios trianuales de la cantidad de agua aplicada en los diferentes tratamientos de riego y el efecto del estado hídrico de las cepas en la producción, peso, SST (°Brix) y pH, observándose el esperado aumento de peso de baya, junto con la disminución de SST y pH debido a la aplicación del riego. Los volúmenes de riego medios aplicados en el conjunto de los años fueron 358, 186 y 181 mm para el RMáx, DPre y Dpost respectivamente. Esto representó ahorros de agua del 48 y 49% en el DPre y Dpost (Tabla 1). El secano recibió un riego de supervivencia tras la vendimia de 2013 con el fin de no deteriorar las cepas, dado el elevado estrés alcanzado en ese año. Los valores de peso de baya producción y como consecuencia la EUA (Eficiencia en el Uso del Agua) corroboran la importancia del periodo pre-verno en lo que se refiere a términos de producción.

En lo que respecta al contenido en aromas varietales (sumatorio de terpenos) mostrado en la Figura 1ª y en concordancia con [7], la aplicación del riego aumentó el contenido de estos compuestos debido probablemente a que el mayor área foliar de las cepas regadas (datos no mostrados) evitó la mayor degradación de estas sustancias observada en las cepas de secano. Asimismo, en esta figura también se aprecia que el riego aumentó el contenido de NFA de DPre, DPost y Rmáx. Anteriores investigaciones de nuestro grupo de investigación han demostrado que los aminoácidos mayoritarios en esta variedad son arginina (Arg) uno de los principales contribuyentes al NFA, y prolina (Pro) observándose aumentos del

primero y disminuciones del segundo en los tratamientos regados [2]. Al final del período de maduración se produce una transformación de Arg en Pro, por lo que el resultado obtenido podría estar directamente relacionado con el retraso en la maduración observado en esos tratamientos. Analizados de manera individualizada, (Figura 1b), la aplicación de agua, únicamente provocó descensos significativos en Phe, Ile, y no tuvo efectos en los valores de Thr, aminoácido mayoritario de entre los considerados precursores aromáticos. El descenso de Met, al ser precursor del metionol, y ser este un compuesto que aporta aromas desagradables a los vinos, puede ser beneficioso para la calidad aromática del vino. Considerados los tratamientos de riego de modo conjunto, el aporte hídrico no afectó al valor de la suma global de aminoácidos precursores aromáticos. De modo general, los resultados de este trabajo están en línea con los hallados por [8]. Estos autores, tampoco hallaron grandes diferencias debidas a la aplicación del riego en el cv. Verdejo en el momento de madurez óptima. Por último cuando representamos gráficamente los datos obtenidos de este trabajo mediante un análisis de componentes principales (ACP) observamos una clara separación del tratamiento de secano frente a los regados (Figura 2). Terpenos totales y Asp se agrupan en los tratamientos regados mientras que Phe, Ile, Met y Leu se agrupan en el tratamiento de secano.

4. Conclusiones

La aplicación de riego en el cv D^a Blanca dispuesta en espaldera en climas semiáridos puede ser una buena técnica de cultivo, puesto que, produce mejoras en la calidad del fruto reflejados en una bajada del pH y aumentos en la concentración de terpenos, lo que supone una mayor calidad aromática del mosto. A nivel aminoacídico, solo se observó efecto significativo para algunos de los compuestos precursores de aromas de fermentación.

5. Bibliografía

1. Hernández –Orte, P.; Cacho, J. and Ferreira, V. 2002. Relationship between Varietal Amino Acid Profile of Grapes and Wine Aromatic Composition . Experiments with Model Solutions and Chemometric Study. In: J. Agric Food Chem., 50, 2891-2899
2. Valdés, M.E., Moreno, D., Vilanova, M., Yuste, J., Montoro, A., Talaverano, M.I., Gamero, E., Uriarte, D., Mancha L.A. y Castel J.R. 2014. Composición nitrogenada de las variedades blancas Airén, Cigüente, Moscatel de Alejandría y Verdejo, cultivadas en España. Incidencia del régimen hídrico. I Jornadas Grupo de Viticultura y Enología de SECH. Logroño, 19 y 20 Noviembre 2014. Actas Horticultura 70: 290-296
3. Vilanova, M., Valdés, M.E., Uriarte, D., Yuste, J., Vicente, A., Pérez, D. y Castel, J.R. 2014. On the aromatic composition of three white grapevine varieties (Doña Blanca, Muscat of Alexandria, Verdejo) as affected by irrigation in Spain. Proceedings of X Congress International des Terroris vitivnicoles, Tokaj, 2:227-233.
4. Uriarte, D.; Mancha, L.A.; Moreno, D.; Gamero, E.; Talaverano, M.I.; Valdés, M.E.; Prieto, M.H. 2014. Efecto de la elevación de la altura de vegetación en un viñedo en espaldera del cv. Cigüente en Extremadura. In: I Jornadas del Grupo de Viticultura y Enología de la SECH Logroño, 19 y 20 Noviembre 2014. Actas Horticultura. 70,218-224.
5. Picon-Toro, J.; Gonzalez-Dugo, V.; Uriarte, D., Mancha, L. A.; Testi, L. 2012. Effects of canopy size and water stress over the crop coefficient of a "Tempranillo" vineyard in south-western Spain. In: Irrigation Science. 30(5), 419-432.
6. Vilanova, M.; Rodríguez, I.; Canosa, P.; Otero, I.; Gamero, E.; Moreno, D.; Talaverano, I. y Valdés, M. E. 2015. Variability in chemical composition of *Vitis vinifera* cv Mencía from different geographic areas and vintages in Ribeira Sacra (NW Spain). In: Food Chemistry, 169, 187-196.
7. Willwerth, J.J.; Reynolds, A.G.; Lesschaeve, I. 2010. Vine water status and its influence on sensory characteristics of Riesling wines. In: Am. J. Enol. Vitic. 61: 566-567.
8. Ortega-Heras, M.; Pérez-Magariño, S.; Del-Villar-Garrachón, V.; González- Huerta, C.; Moro, L.; Guadarrama, A.; Villanueva, S.; Gallo, R y Martín de la Helguera, S. 2013. Study of the effect of vintage,

maturity degree, and irrigation on the amino acid and biogenic amine content of a white wine from the Verdejo variety *In: J Sci Food Agric DOI 10.1002/jsfa.6526*

6. Agradecimientos

Este trabajo forma parte del proyecto INIA RTA 2011 **RTA2011-00100-C05-03**. Los autores agradecen a Bodegas Periane su colaboración y al G.I HORTOFRUENOL la ayuda económica prestada. D. Moreno agradece a FEDER su contrato, y S. Frutos al Gobierno de Extremadura por la beca de formación de Tecnólogo.

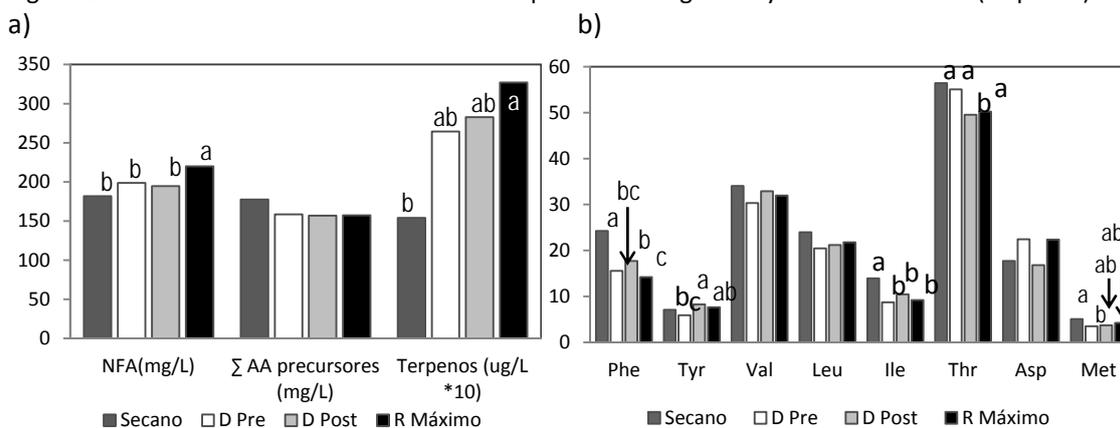
Tablas y figuras

Tabla 1. Incidencia del estado hídrico en parámetros de producción y características físico químicas de las uvas.

Tratamiento	Cantidad de agua aplicada (mm)	Producción (t/ha)	P baya (g)	EUA (kg/m ³)	SST °Brix	pH
Secano	3	9,9 ^c	1,9 ^d	12,4 ^a	22,4 ^a	3,72 ^a
DefPRE	186	14,1 ^b	2,4 ^c	5,2 ^b	21,2 ^b	3,71 ^{ab}
DefPOST	181	15,6 ^{ab}	2,9 ^b	6,0 ^b	21,4 ^b	3,65 ^b
Rmax	358	16,9 ^a	3,0 ^a	4,0 ^b	21,1 ^b	3,65 ^{ab}

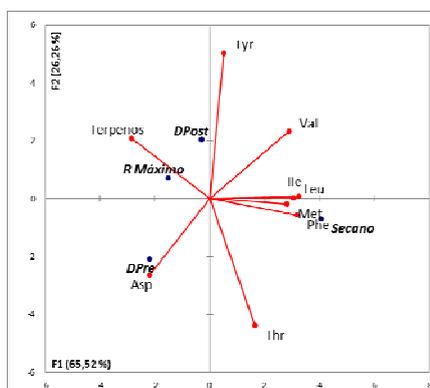
Diferentes letras indican diferencias significativas para el Test de Tukey y $p < 0,5\%$.

Figura 1. Incidencia del estado hídrico en la composición nitrogenada y aromas varietales (terpenos)



Diferentes letras indican diferencias significativas para el Test de Tukey y $p < 0,5\%$.

Figura 2. Representación gráfica del análisis de componentes principales (ACP) aplicado a los tratamientos en función de su composición nitrogenada y terpenos



V10 - INCIDENCIA DE LA ELEVACIÓN DE LA ALTURA DE VEGETACIÓN SOBRE LA CALIDAD DE VINOS CV. DOÑA BLANCA EN EXTREMADURA

Daniel Moreno¹, Mar Vilanova², David Uriarte¹, Esther Gamero, Samuel Frutos¹, M. Inmaculada Talaverano¹, M. Henar Prieto¹ y M. Esperanza Valdés¹.

¹Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX). Av. Adolfo Suárez, s/n 06071 Badajoz, España

²Misión Biológica de Galicia (CSIC), El Palacio-Salcedo. 36143. Pontevedra, España.
daniel.moreno@gpex.es

RESUMEN:

En este trabajo se ha evaluado la incidencia de la altura de vegetación en un viñedo cv. Doña Blanca sobre la composición físico-química, aromática y sensorial de los vinos durante la campaña 2012. Cepas control (C) (1,5 m de altura de vegetación) fueron comparadas con cepas de altura de vegetación elevada (AE) (2,0 m). Las uvas fueron sometidas a un proceso de criomaceración prefermentativa y posteriormente se vinificaron según el esquema de elaboración de una vinificación tradicional en blanco. La elevación de altura de espaldera provocó un ligero incremento del grado alcohólico y descensos de la acidez titulable. Los parámetros fenólicos y cromáticos no se vieron afectados significativamente. Los vinos AE mostraron contenidos superiores de aromas varietales, alcoholes superiores, ésteres y ácidos grasos, lo que se tradujo en una mayor intensidad aromática, destacando sensorialmente los aromas frutales y mayor equilibrio en boca.

Palabras clave: Manejo vegetación, Composición volátil, Análisis sensorial descriptivo.

1. Introducción

El manejo del dosel vegetal influye en la correcta relación entre el área foliar y la producción de fruta, necesaria para una adecuada maduración de las uvas [1]. En climas calurosos la incidencia directa de la luz solar sobre los racimos, puede afectar a los atributos sensoriales, debido a una excesiva degradación de ácidos orgánicos y precursores aromáticos, causando efectos negativos sobre la calidad del vino [2]. Por otro lado, el manejo de la vegetación no va a afectar únicamente a la intercepción de la luz solar y procesos fotosintéticos, sino que también modificará el microclima de los racimos, provocando un gran impacto sobre la composición de la fruta y la calidad de los vinos elaborados [3]. Estudios previos [4] mostraron que el aumento de la relación fuente-sumidero, mediante la elevación de la altura de la vegetación en un viñedo cv. Doña Blanca, provocó un aumento de la concentración de azúcares, y un ligero descenso de la acidez de las uvas. El objetivo del presente trabajo es evaluar la incidencia de la elevación de la altura de vegetación, sobre la composición físico-química, aromática y sensorial de vinos cv. Doña Blanca en Extremadura.

2. Material y métodos

El trabajo se ha desarrollado durante la campaña 2012. La descripción completa del viñedo experimental queda reflejada en Uriarte et al. [4]. El diseño experimental fue de bloques al azar con cuatro repeticiones; Los tratamientos fueron: **Control (C):** Espaldera

original del viñedo (1,5 m de altura de vegetación); **Altura elevada (AE)**: Altura de vegetación hasta 2 m. mediante un segundo alambre de vegetación. Ambos tratamientos fueron regados por goteo, aplicando el 100% de la evapotranspiración del cultivo (ETc) referida al tratamiento Control según [5]. La vendimia se realizó manualmente cuando las uvas alcanzaron una concentración de azúcares en torno a los 22 ° Brix. De cada bloque experimental se efectuó una elaboración según el siguiente esquema. Las uvas se sometieron a un proceso de criomaceración prefermentativa (4°C durante 24h) tras el que se prensaron y los mostos yema fermentaron en depósitos de acero inoxidable de 5 L, con dosis de 50 mg/L de anhídrido sulfuroso e inoculando con levaduras seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae* (EC1118, Lallemant) en dosis de 20g/hL. Los vinos se estabilizaron mediante frío (4°C durante 15 días) y fueron sulfitados (35 mg/L de anhídrido sulfuroso libre) y embotellados. Tras seis meses en botella se realizó un análisis sensorial descriptivo cuantitativo (QDA) de los vinos por el panel de cata del CICYTEX, según la Norma UNE 87027:1998. Los resultados obtenidos en este trabajo fueron analizados utilizando una comparación de medias mediante una prueba t de Student con el paquete estadístico SPSS 15.0

En los mostos y vinos se determinaron los parámetros generales (Sólidos solubles totales (SST); pH; acidez titulable (AT); grado alcohólico probable (GAP); grado alcohólico (GA) según [6], ácido tartárico (TH₂) [7]; ácido málico (MH₂) [8]), parámetros fenólicos (Fenoles totales (CPT); Catequinas (CAT) [9]), características cromáticas (Parámetros cromáticos CIELab [10] y únicamente en vinos, la composición aromática (Compuestos C₆, alcoholes superiores (AS), ésteres etílicos y acetatos (EEA), ácidos grasos volátiles (AGV) y α -terpineol (α T) [11][12]).

3. Resultados

La diferencia de altura de vegetación no afectó prácticamente ninguno de los parámetros básicos de los mostos obtenidos tras el proceso de criomaceración (Tabla 1). Los bajos valores de ácido tartárico obtenidos en ambos tratamientos pueden deberse a precipitaciones de tartratos producidas durante dicho proceso. El pH en el tratamiento AE se ha visto incrementado, aunque sin relevancia desde el punto de vista enológico. Se han observado una tendencia a mayores cantidades de CPT en AE, posiblemente por una mayor exposición de los racimos, ya que la síntesis de estas sustancias está íntimamente relacionada con el microclima del racimo, sin embargo, al igual que en el caso de los parámetros cromáticos, las diferencias no fueron significativas en ninguno de los casos.

Con respecto a C, los vinos AE presentaron mayor GA, menor AT y contenido en TH₂ (Tabla 1), observándose en esos últimos mayor concentración de CAT y no se apreciaron diferencias significativas en las características cromáticas. En función de los valores CIELab, los vinos de ambos tratamientos presentaron tonalidades amarillo-doradas, claras y poco intensas. El valor de la diferencia de color CIELab (ΔE^*ab) entre tratamientos, indicó que en el momento del análisis dicha diferencia no era detectable por el ojo humano (<3 unid.).

En el aspecto aromático, se observó una tendencia en los vinos AE a una mayor concentración para todos los grupos de compuestos estudiados (Tabla 1). Los AS fueron los compuestos mayoritarios en ambos tratamientos. Las concentraciones fueron superiores en AE, lo cual incrementa su calidad organoléptica, ya que se le atribuyen agradables aromas florales, sobre todo debido al 2-feniletanol [13]. Los valores ligeramente superiores de compuestos en C₆ en el vino AE pueden provocar aumentos de notas herbáceas [14]. Los vinos AE tuvieron concentraciones superiores de EEA, relacionados con la calidad organoléptica de los vinos, ya que aportan aromas frutales [15]. En lo que respecta a AGV, se encuentran en

niveles mayores en AE, aportando notas agradables al aroma, resultado importante, ya que son considerados como los ácidos que contribuyen en mayor medida al aroma de los vinos [16]. Es de destacar como el α T únicamente aparece en los vinos AE.

Los resultados del QDA se muestran en la Figura 1. La fase visual indicó que ambos vinos presentaron un color amarillo con matices dorados, aunque las tonalidades pálidas únicamente aparecieron en los vinos Control, mientras que las pajizas aparecieron con mayor intensidad en los AE. En nariz, los vinos AE se caracterizaron por una mayor intensidad aromática. A nivel de calidad aromática los descriptores “floral”, “cítrico” y “plátano” fueron citados por los catadores en ambos vinos pero con mayor intensidad en los vinos AE que en el Control. Los descriptores “pera” y “piña” únicamente fueron hallados en los vinos AE. En la fase gustativa, se observa que los vinos Control son más ácidos y amargos pero de baja astringencia en comparación con los vinos AE, además de tener menor persistencia en boca.

4. Conclusiones

Aunque el aumento de la altura de vegetación no incidió significativamente sobre la composición físico-química de los vinos elaborados, sensorialmente fueron los mejor evaluados. Los resultados de la composición aromática pueden ser relevantes, ya que actualmente no se dispone de datos sobre la caracterización aromática de vinos de esta variedad procedentes de Extremadura, aunque son datos que deben ser analizados con cautela al tratarse de un único año de experimentación.

5. Bibliografía

1. Kliewer, M.; Dokoozlian, N. 2005. Leaf area/crop weight ratios of grapevines: influence on fruit composition and wine quality. In: *Am J Enol Vitic.* 56, 170-181.
2. Toda, F. M. *Biología de la vid: fundamentos biológicos de la viticultura.* Madrid: Ed. Mundi-Prensa. 1991. 346 p.
3. Reynolds, A. G.; Wardle, D. A.; Cliff, M. A.; King, M. 2004. Impact of training system and vine spacing on vine performance, berry composition, and wine sensory attributes of Seyval and Chancellor. In: *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 55, n. 1, p. 84-95, 2004.
4. Uriarte, D.; Mancha, L.A.; Moreno, D.; Gamero, E.; Talaverano, M.I.; Valdés, M.E.; Prieto, M.H. 2014. Efecto de la elevación de la altura de vegetación en un viñedo en espaldera del cv. Cigüente en Extremadura. In: *I Jornadas del Grupo de Viticultura y Enología de la SECH Logroño*, 19 y 20 Noviembre 2014. *Actas Horticultura.* 70,218-224.
5. Picon-Toro, J.; Gonzalez-Dugo, V.; Uriarte, D., Mancha, L. A.; Testi, L. 2012. Effects of canopy size and water stress over the crop coefficient of a "Tempranillo" vineyard in south-western Spain. In: *Irrigation Science.* 30(5), 419-432.
6. O.I.V. 1990. *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts.* Office International de la Vigne et du Vin, Paris.
7. Reglamento (CEE) nº 2676/90, de 17 de septiembre de 1990.
8. Blouin, J. 1992. *Técnicas d'analyses des moûtes et des vins.* Ed. Dujardin-Salleron, Paris, France.
9. Di Stéfano, R.; Cravero, M. 1991. Metodi per lo studio dei polifenoli dell' uva. In: *Riv. Vitic. Enol.* 2, 37-45.
10. MSCV, Método Simplificado para el Color de Vinos de la Universidad de La Rioja.
11. Torrens, J.; Riu-Aumatell, M.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. 2004. Volatile compounds of red and white wines by headspace-solid-phase microextraction using different fibers. In: *J. of Chromatographic Science.* 42, 310-316.
12. Carrillo, J.D.; Garrido-López, A.; Tena, M.T. 2006. Determination of volatile oak compounds in wine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. In: *J. of Chromatographic A*, 1102, 25-36.

13. Simpson, R.F.. 1979. Some important aroma components of white wine. *In: Food Technol. Aust.* 31, 516-522.
14. Berna, A.Z.; Trowell, S.; Clifford, D.; Cynkar, W.; Cozzolino, D. 2009. Geographical origin of Sauvignon blanc wines predicted by mass spectrometry and metal oxide based electronic nose. *In: Anal. Chem. Acta.* 648, 146-152.
15. Mesías, J.L. 1981. Contribución al estudio de la composición aromática y mostos en fermentación de Tierra de Barros (Badajoz). *In: Tesis Doctoral.* Facultad de Ciencias. Universidad De Extremadura.
16. Etievant, P.X. 1991. Volatile compounds of food and beverages. *In: Maarse, H. (ed).* Dekker, New York. pp. 483-546.

6. Agradecimientos

Este trabajo forma parte de un proyecto cofinanciado por el Gobierno de Extremadura y fondos FEDER. Los autores agradecen a Bodegas Periane su colaboración y al grupo de investigación HORTOFRUENOL la ayuda económica prestada. Daniel Moreno Cardona agradece a FEDER su contrato.

Tablas y figuras

Tabla 1. Parámetros generales (Sólidos solubles totales (SST, °Brix); pH; acidez titulable (AT, g/L); grado alcohólico probable (GAP, %); grado alcohólico (GA, % v/v), ácido tartárico (TH₂, g/L); ácido málico (MH₂, g/L), parámetros fenólicos (Fenoles totales (CPT, mg/L); Catequinas (CAT, mg/L), características cromáticas (Parámetros cromáticos CIELab) y aromáticas (Compuestos C6, alcoholes superiores (AS), ésteres etílicos y acetatos (EEA), ácidos grasos volátiles (AGV) y α-Terpineol (αT) en µg/L) de los mostos y vinos elaborados.

		Parámetro															
Trat.	SST	GAP	pH	AT	TH ₂	MH ₂	CFT	CAT	IC	TC	L	a*	b*	c*	h*	S	ΔE*ab
Mosto	C	21,4	12,0	3,8	4,6	1,9	3,9	226,9	53,4	2,9	2,9	95,5	0,3	13,3	13,3	88,6	0,1
	AE	21,8	12,2	3,9*	4,4	1,9	3,7	256,5	63,4	2,9	3,0	95,6	0,2	14,0	14,0	89,0	0,1
		0,7															
Trat.	ES	GA	pH	AT	TH ₂	MH ₂	CFT	CAT	IC	TC	L	a*	b*	c*	h*	S	ΔE*ab
Vino	C	24,5	12,4	3,7	6,7	1,9	3,1	215,2	24,8	2,3	2,7	95,7	-1,1	8,9	8,9	97,1	0,1
	AE	23,2	12,9*	3,8	6,0*	1,7*	3,0	191,1	29,6*	2,2	2,9	96,2	-1,1	9,1	9,2	97,1	0,1
		0,59															
Trat.	C6		AS		EEA		AGV		αT								
Vino	C	156,1		20560,8		7174,8		4881,1		0							
	AE	188,6		34035,3		9700,2		5550,9		14,7							

*indica diferencias significativas al 0,5%.



Figura 1. Análisis sensorial: Fase visual, olfativa y gustativa

V11 - EFECTO DEL TIPO DE SUELO Y DE LAS CONDICIONES CLIMÁTICAS EN LA COMPOSICIÓN AMINOACÍDICA DE LA UVA

E.P. Pérez-Álvarez, T. Garde-Cerdán, E. García-Escudero, J.M. Martínez-Vidaurre
Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (Gobierno de La Rioja-CSIC-Universidad de La Rioja).
Ctra. Burgos, Km. 6. Finca La Grajera. 26007 Logroño, España
*jm.martinez-vidaurre@icvv.es

RESUMEN: El clima, el suelo y el material vegetal son los factores principales que, junto con las prácticas vitícolas y enológicas, definen las características de un vino. Los compuestos nitrogenados son necesarios para el desarrollo de las levaduras y determinan de forma importante la calidad del vino. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del suelo y del clima sobre el contenido aminoacídico de las uvas. Para ello, se seleccionaron tres parcelas de cv. Tempranillo (D.O.Ca. Rioja), con suelos clasificados como *Fluventic Haploxerepts* (FH), *Typic Calcixerepts* (TC) y *Petrocalcic Palexerolls* (PP). Las dos campañas estudiadas, 2013 y 2014, presentaron condiciones climáticas diferentes. Los resultados mostraron que tanto el suelo como el clima y la interacción de ambos factores influyeron de forma significativa en el contenido de todos los aminoácidos presentes en las uvas. Por tanto, el tipo de suelo y las condiciones climáticas son dos factores clave que determinan la composición nitrogenada de las uvas, afectando al desarrollo de la fermentación y a la calidad del vino final.

Palabras clave: clima, suelo, terroir, aminoácidos, NFA, mosto, uva

1. Introducción

El clima, el suelo y el material vegetal son los factores principales que, junto con las prácticas vitícolas y enológicas, definen las características de un vino. El estado hídrico y nutricional (principalmente de nitrógeno) que presenten las cepas a lo largo del ciclo condicionará su crecimiento, rendimiento y la composición y sanidad de las bayas, afectando al correcto desarrollo de la fermentación alcohólica. El nitrógeno absorbido por las raíces depende de las propiedades del suelo, especialmente del contenido en materia orgánica y de su velocidad de mineralización, siendo la forma nítrica ($N-NO_3^-$) la fuente principal de nitrógeno para las cepas. Los aminoácidos, junto con el amonio, son la principal fuente nitrogenada para el desarrollo de las levaduras durante la fermentación alcohólica, además de ser compuestos determinantes en la calidad del vino [1, 2].

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del suelo y del clima sobre el contenido aminoacídico de las uvas.

2. Material y métodos

El experimento se desarrolló durante las campañas 2013 y 2014 en tres parcelas de cv. Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) injertadas sobre R-110, en el área vitícola del valle del Najerilla (D.O.Ca. Rioja) que presenta un clima semiárido mediterráneo. Durante estas dos campañas no se aplicó fertilizante nitrogenado a los viñedos. Cada parcela representaba un tipo de suelo distinto (clasificadas según la Soil Taxonomy del USDA [3]): *Fluventic Haploxerepts* (FH), *Typic*

Calcixerepts (TC) y *Petrocalcic Palexerolls* (PP). En cada parcela se marcaron tres filas adyacentes con 50 cepas cada una a modo de repeticiones. En ellas se muestreó el suelo, en floración, cogiendo muestras a 0-15, 15-30 y 30-45 cm de profundidad. Sobre las muestras secas y tamizadas a 2 mm se determinó el N-NO_3^- , realizando una extracción con KCl 2M y posterior determinación colorimétrica a 550 nm (Seal Analytical 3HR, Hamburgo, Alemania). Se determinó la densidad aparente, en seco, por el método del anillo [4] y el porcentaje de elementos gruesos (> 2mm) para cada muestra.

Por otro lado, en el momento óptimo de madurez se cogieron 600 bayas por repetición en cada parcela. Tras contarlas, pesarlas y triturarlas, en los mostos resultantes se determinaron los parámetros fisicoquímicos, los aminoácidos y el nitrógeno fácilmente asimilable NFA. El análisis de los aminoácidos se realizó de acuerdo al método descrito por Garde-Cerdán et al. [5]. El NFA se determinó según el método descrito por Aerny [6].

Estadísticamente los datos se trataron con la versión 21.0 del programa SPSS para Windows (Chicago, EE. UU.). El efecto del suelo sobre la concentración de aminoácidos de los mostos se determinó usando un análisis de la varianza (ANOVA) y las diferencias de los aminoácidos entre los tipos de suelo y las campañas se determinaron por separación de medias utilizando el test de Tukey calculado a $p < 0,05$.

3. Resultados

El clima y las distintas propiedades edáficas de los suelos determinan el nivel de nitrógeno disponible en el suelo. De acuerdo al bajo contenido en materia orgánica, < 1% que presentaban los suelos, el nivel disponible de este elemento fue bajo, siendo similares a los obtenidos por Smith et al. [7], Steenwerth y Belina [8] y Pérez-Álvarez et al. [9] en condiciones mediterráneas. Parámetros como la profundidad efectiva, pH, textura y carbonatos cálcicos en profundidad (30-45 cm) así como la capa de agua disponible eran similares entre los suelos TC y PP [10]. Sin embargo, el suelo PP presentaba una limitación física para el desarrollo de las raíces en profundidad, debido a la presencia de un horizonte petrocálcico. El suelo FH disponía de mayor profundidad efectiva y capa de agua, menor porcentaje de elementos gruesos y valores de carbonatos cálcicos en profundidad del 10%, respecto a los 60% de los suelos TC y PP.

El N-NO_3^- disponible en el perfil analizado de los suelos (0-45 cm) fue mayor, en las dos campañas estudiadas, 2013 y 2014, en la parcela con el suelo FH, respecto a las otras parcelas, que alternaron el menor contenido nítrico según la campaña.

Los mostos procedentes de las viñas de los suelos FH son los que significativamente mayor concentración de arginina, alanina, treonina, asparragina, citrulina, metionina, aminoácidos totales sin prolina y NFA mostraron en ambas campañas estudiadas (Tabla 1). Sin embargo, en el año 2014 la concentración de aminoácidos como Gaba, glutamina, ácido glutámico, histidina, cisteína, fenilalanina, leucina, tirosina, glicina, lisina y aminoácidos totales fue significativamente mayor en los mostos procedentes del suelo TC, a pesar de que en el año 2013 esas concentraciones fueron mayores en los mostos del suelo FH, el que mayor disponibilidad de nitrógeno presentó.

4. Conclusiones

La composición aminoacídica de las uvas se relacionó con las características edafoclimáticas del viñedo. No obstante, el factor clima por sí solo no afectó al contenido de algunos aminoácidos en las uvas (prolina, Gaba, valina, isoleucina, metionina y lisina). Por lo general, suelos con mayor disponibilidad de agua y nitrógeno propiciarán cepas con un mejor estado nutricional y mayor concentración de aminoácidos en baya que asegurarán el correcto desarrollo de la fermentación y la calidad del vino final. Todo ello destaca la importancia de conocer las características edafoclimáticas de la parcela como herramienta para estimar la composición nitrogenada de la uva, pudiendo además tener información sobre la necesidad de aportar fertilizantes al viñedo.

5. Bibliografía

1. Bell, S.-J., Henschke, P.A. 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *In: Australian Journal of Grape and Wine Research*. 11, 242-295.
2. Garde-Cerdán, T., Ancín-Azpilicueta, C. 2008. Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. *In: LWT-Food Science and Technology*. 41, 501-510.
3. SSS, (Soil Survey Staff). 2006. Keys to soil taxonomy (10th edition). Pocahontas Press, Blacksburg, Virginia.
4. Grossman, R.B., Reinsch, T.G. 2002. Bulk density and linear extensibility. *In: Methods of soil analysis, part 4, physical methods*. Eds. J.H Dale y G.C. Topp, Madison. 208-228.
5. Garde-Cerdán, T., López, R., Portu, J., González-Arenzana, L., López-Alfaro, I., Santamaría, P. 2014. Study of the effects of proline, phenylalanine, and urea foliar application to Tempranillo vineyards on grape amino acid content. Comparison with commercial nitrogen fertilisers *In: Food Chemistry*. 163, 136-141.
6. Aerny, J. 1996. Compostes azotes des mouts et des vins. *In: Revue Suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture*. 28, 161-165.
7. Smith, R., Bettiga, L., Cahn, M., Baumgartner, K., Jackson, L.E. Bensen. T. 2008. Vineyard floor management affects soil, plant nutrition, and grape yield and quality. *In: California Agriculturae*. 62, 184-190.
8. Steenwerth, K., Belina, K.M. 2008. Cover crops and cultivation: Impacts on soil N dynamics and microbiological function in a Mediterranean vineyard agroecosystem. *In: Applied Soil Ecology*. 40, 370-380.
9. Pérez-Álvarez, E.P., Martínez-Vidaurre, J.M., Martín, I., García-Escudero, E., Peregrina, F. 2013. Relationships among soil nitrate nitrogen and nitrogen nutritional status, yield components, and must quality in semi-arid vineyards from Rioja AOC (Spain). *In: Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 44, 232-242.
10. Pérez-Álvarez, E.P., Garde-Cerdán, T., García-Escudero, E., Martínez-Vidaurre, J.M. 2014. Amino acid content in Tempranillo must from three soil types. *In: Book of Abstracts, 37th World Congress of Vine and Wine, Mendoza, Argentina* (pp. 473-474).

6. Agradecimientos

Los autores agradecen a Bodegas Patrocinio (Uruñuela, La Rioja) por permitir trabajar en sus viñedos y al Gobierno de La Rioja por financiar el proyecto del que forma parte este trabajo. E.P.P-A. y T.G-C. agradecen al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) por sus contratos pre-doctoral y post-doctoral.

Tabla 1. Concentración de aminoácidos (mg/kg) y NFA (mg N/kg) en los mostos de las tres parcelas experimentales (FH: *Fluentic Haploxerepts*, TC: *Typic Calcixerepts*, PP: *Petrocalcic Palexerolls*) en las dos campañas estudiadas (2013 y 2014).

	2013			2014		
	FH	TC	PP	FH	TC	PP
Pro	288,23 b, B	231,85 b, A	132,18 a, A	135,81 a, A	290,48 b, A	203,89 ab, A
Arg	249,13 c, B	128,22 b, B	13,47 a, A	112,53 b, A	65,56 ab, A	20,15 a, A
Gaba	99,44 c, B	60,13 b, A	27,34 a, A	56,11 b, A	75,82 c, B	38,11 a, B
Gln	87,09 b, B	81,01 b, B	27,06 a, A	49,62 a, A	47,07 a, A	46,53 a, B
Glu	52,95 b, B	46,90 b, B	28,91 a, A	28,87 a, A	32,92 a, A	32,08 a, A
Ala	36,99 c, B	26,23 b, A	11,02 a, A	27,97 b, A	19,34 a, A	15,29 a, B
His	34,78 c, B	16,51 b, B	2,17 a, A	8,59 ab, A	9,33 b, A	4,88 a, B
Trp	28,33 b, B	31,41 b, B	13,11 a, A	15,46 a, A	21,16 b, A	10,39 a, A
Thr	25,28 b, B	22,34 b, B	9,88 a, A	16,82 b, A	16,05 b, A	10,76 a, A
Ser	23,55 b, B	20,67 b, A	10,44 a, A	14,94 a, A	17,34 a, A	14,12 a, B
Asp	16,28 ab, B	19,09 b, B	12,69 a, B	12,54 b, A	9,08 ab, A	6,60 a, A
Cys	14,79 c, B	6,69 b, B	1,26 a, A	2,68 b, A	2,98 b, A	0,78 a, A
Phe	9,79 c, B	6,69 b, A	3,00 a, A	4,44 ab, A	5,72 b, A	3,52 a, A
Val	8,67 b, B	7,29 b, A	3,08 a, A	4,80 a, A	7,07 a, A	4,97 a, B
Leu	7,56 b, B	6,09 b, A	2,58 a, A	3,42 ab, A	5,31 b, A	3,14 a, A
Tyr	5,64 c, B	3,02 b, A	0,33 a, A	2,66 b, A	3,00 b, A	1,22 a, B
Asn	5,18 c, B	3,76 b, A	0,82 a, B	1,25 b, A	1,07 ab, A	0,40 a, A
Cit	4,67 b, B	4,21 b, A	0,72 a, B	1,77 b, A	1,72 b, A	n,d, a, A
Gly	4,12 c, B	2,01 b, A	0,12 a, A	1,13 ab, A	1,72 b, A	0,67 a, B
Ile	3,44 b, A	3,20 b, A	1,56 a, A	2,30 a, A	3,88 a, A	2,69 a, B
Met	2,82 c, B	0,74 b, A	0,03 a, A	1,27 b, A	1,03 ab, A	0,62 a, B
Lys	1,67 c, B	1,00 b, A	0,35 a, A	0,90 ab, A	0,50 a, A	1,17 b, B
Taa	1010,40 c, B	729,04 b, A	302,14 a, A	505,88 ab, A	638,14 b, A	421,99 a, A
Taa sin Pro	722,18 c, B	497,19 b, B	169,96 a, A	370,06 b, A	347,66 b, A	218,10 a, A
NFA	117,88 c, B	69,42 b, A	32,09 a, A	86,81 b, A	80,10 ab, A	66,79 a, B

Para cada año, letras minúsculas diferentes indican diferencias entre los tres tipos de suelos ($p < 0,05$). Para cada tipo de suelo, letras mayúsculas diferentes indican diferencias entre las dos campañas ($p < 0,05$). Taa = aminoácidos totales, NFA = nitrógeno fácilmente asimilable.

V12 - ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD A MILDIU EN CULTIVARES DE VID POR INOCULACIÓN EN DISCO DE HOJA

Emilia Díaz Losada, Pilar Blanco Camba, Andrea Ramilo-Álvarez, M. Jesús Prado Castro

Estación de Viticultura e Enología de Galicia (EVEGA-INGACAL), Ponte San Clodio s/n, 32427-Leiro, Ourense
emilia.diaz.losada@xunta.es

RESUMEN:

Las limitaciones en la utilización de fungicidas para el control de enfermedades de la vid causadas por hongos son cada vez más exigentes. La selección de variedades o clones de vid con menor sensibilidad a estas enfermedades, parece ser una de las posibles alternativas a tener en cuenta en la base de la viticultura sostenible.

En este trabajo se estudia el grado de susceptibilidad a mildiu en 50 cultivares de *Vitis vinífera* cultivados en Galicia. Se han encontrado diferencias significativas entre variedades tanto en la severidad como en la incidencia de la infección, de los dos aislados de mildiu utilizados. La mayoría de las variedades presentaron valores medios o altos tanto para la incidencia como para la severidad de la infección. Entre las variedades menos sensibles destaca Caíño bravo, variedad considerada como una de las más antiguas de la región gallega.

Palabras clave: *Plasmophora vitícola*, cultivares de vid, Galicia

1. Introducción

El mildiu es una enfermedad devastadora de los viñedos cultivados en zonas de clima húmedo. Los viticultores dependen de múltiples aplicaciones de fungicidas para la gestión de la enfermedad conllevando una importante contaminación del medio ambiente. Con el fin de reducir la utilización de fungicidas y dada la importancia económica que supone para los viticultores, se están desarrollando variedades más resistentes y haciendo selecciones en el material vid conservado (Boso *et al.*, 2014; Calon nec *et al.* 2013). *Vitis vinífera* es altamente susceptible a mildiu, sin embargo la susceptibilidad de esta especie depende de la variedad.

Con la finalidad de determinar que variedades son menos susceptibles a mildiu para su cultivo en la región gallega, en este trabajo, se ha evaluado la susceptibilidad de 50 cultivares de *Vitis vinífera* conservados en el Banco de Germoplasma de la Estación de Viticultura y Enología de Galicia, frente a dos inóculo de mildiu obtenidos directamente de parcelas cultivadas pero no tratadas.

2. Material y métodos

Las variedades de vid objeto de este estudio se encuentran conservadas en el Banco de Germoplasma de la Estación de Viticultura y Enología de Galicia. Para poder realizar el ensayo de sensibilidad a mildiu sin que el estado sanitario del viñedo se viese afectado se optó por utilizar la técnica de disco de hoja (Brown *et al.*, 1999).

Se prepararon estaquillas de las diferentes variedades y se plantaron en condiciones de invernadero. Cuando las plantas presentaban entre 10 o 12 hojas se seleccionaron, una media de 8 hojas de cada variedad, entre las hojas 4ª a la 6ª de cada planta, contando desde la hoja terminal. De ellas se extrajeron cortaron discos de 1,5cm de diámetro, que se inocularon con *Plasmopara viticola* (Berk & M.A. Curtis) Berl & De Toni). El inóculo se recogió en dos fechas distintas del mes de julio, de cepas infectadas de modo natural y que no fueron tratadas con fungicidas.

La cara adaxial de los discos se inoculó con 50 µL de una disolución de esporangios con una concentración de $11 \cdot 10^3$ esporangios mL⁻¹. Se mantuvieron en condiciones controladas de humedad (95%), temperatura (24°C) y fotoperiodo (16 horas de luz, 8 de oscuridad), durante 6 días para provocar la esporulación. Se obtuvieron imágenes de cada uno de los discos que posteriormente fueron analizadas con el software NIS-Elements. Se cuantificó el área afectada y se determinó el grado de esporulación y la densidad de esporas.

Para la determinación del grado de esporulación y de la densidad de esporangios se establecieron 5 niveles en función del % de discos afectados y del área afectada y la población de esporangios, respectivamente (tabla 1)

Tabla1. Escala de utilizada para el análisis del grado y densidad de esporulación.

Niveles	Grado esporulación		Densidad de esporulación
	% disco	Área (mm ²)	
0	0	0	Sin esporangios
1	< 25	< 44,18	Densidad baja (pocos esporangios salteadas)
2	25-50	44,18-88,34	Densidad moderada (esporangios formando grupos dispersos)
3	50%-75	88,35-132,53	Alta (Esporangios que ocupan gran parte de la superficie)
4	75-100	> 132,53	Muy alta (elevado césped de esporangios)

Para determinar la existencia de diferencias significativas en las variables utilizadas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) ($p < 0,05$). La diferente susceptibilidad de las variedades se realizó por comparaciones múltiples mediante el método de Tukey.

3. Resultados

A partir de los niveles establecidos para el grado y la densidad de esporulación se encontraron diferencias significativas entre los dos inóculos utilizados y entre las variedades estudiadas (tabla 2). En el efecto del inóculo 2 se observa en general un menor grado y densidad de esporas.

En relación al grado de esporulación, con el inóculo 2 presentaron una susceptibilidad menor que la media un mayor número de variedades, (46% con el inóculo 2 frente a 26 con el inóculo 1)

Tabla 1. Media y diferencias significativas para el grado y densidad de esporulación de mildium (inóculo 1 y 2). *Medias con la misma letra no son significativamente diferentes para $p < 0,05$*

Variedad	(1)Grado esporulación	(1)Densidad esporulación	(2)Grado esporulación	(2)Densidad esporulación
Malvasía	0,48 a	1,14 abc	0,50 ab	0,93 abcd
Treixadura F	0,54 a	0,89 a	0,93 de	1,89 ghijklmno
Blanca de Monterrei	0,61 ab	1,00 ab	1,00 de	2,29 klmnop
Tinta da Zorra	0,71 abc	1,18 abcd	1,00 de	2,46 nop
Caiño Bravo	0,82 bcd	1,54 abcde	0,89 cde	1,46 bcdefghij
Albarín Tinto	0,86 bcde	2,07 efghijklm	0,96 de	1,93 hijklmno
Italia	0,86 bcde	1,71 bcdefgh	0,93 de	2,07 ijklmno
Ferrón	0,89 cdef	2,00 efghijkl	0,71 abcde	1,14 abcdefgh
Godello	0,89 cdef	2,07 efghijklm	0,57 abc	0,64 a
Corbillón	0,93 cdef	1,93 defghijkl	0,86 cde	1,79 fghijklmn
Dona Branca	0,93 cdef	2,00 efghijkl	0,93 de	1,61 cdefghijklm
Moscatel	0,93 cdef	2,18 efghijklm	0,93 de	2,07 ijklmno
Torrontés I	0,93 cdef	2,07 efghijklm	0,93 de	1,61 cdefghijklm
Caiño Redondo 1	0,96 cdef	2,36 fghijklm	1,00 de	2,21 jklmnop
Caiño Redondo 2	0,96 cdef	2,21 efghijklm	0,96 de	2,46 nop
Evega 4	0,96 cdef	1,79 cdefghi	0,86 cde	1,57 bcdefghijkl
Garrido Fino	0,96 cdef	1,68 bcdefg	1,04 e	2,68 op
Gold	0,96 cdef	2,14 efghijklm	0,96 de	1,89 ghijklmno
Planta Fina	0,96 cdef	2,21 efghijklm	0,96 de	2,07 ijklmno
Picapoll Negro	0,96 cdef	2,18 efghijklm	0,96 de	2,07 ijklmno
Promisión	0,96 cdef	1,71 bcdefgh	0,86 cde	1,29 abcdefghi
Torrontés II	0,96 cdef	2,18 efghijklm	0,57 abc	0,96 abcde
Traminer	0,96 cdef	1,89 cdefghijk	0,75 abcde	1,04 abcdef
Albilla	1,00 def	2,11 efghijklm	1,00 de	2,39 mnop
Aramón	1,00 def	2,36 fghijklm	0,96 de	2,00 ijklmno
Blanco Lexítimo	1,00 def	1,89 cdefghijk	0,75 abcde	1,11 abcdefg
Brancellao	1,00 def	2,11 efghijklm	0,93 de	1,93 hijklmno
Brancellao Blanco	1,00 def	2,18 efghijklm	1,00 de	2,14 jklmnop
Caiño da Terra	1,00 def	2,29 efghijklm	0,93 de	1,75 efghijklmno
Caiño Longo 2	1,00 def	1,14 abc	0,86 cde	1,11 abcdefg
Carrasquín	1,00 def	2,18 efghijklm	0,82 bcde	1,54 bcdefghijk
Espadeiro	1,00 def	2,36 fghijklm	0,86 cde	1,71 defghijklmno
Evega 1	1,00 def	2,11 efghijklm	1,00 de	2,93 p
Evega 5	1,00 def	2,18 efghijklm	0,93 de	2,36 lmnop
Evega 6	1,00 def	1,86 cdefghij	0,68 abcd	1,14 abcdefgh
Loureira	1,00 def	1,86 cdefghij	0,79 abcde	1,29 abcdefghi
MBM Blanco	1,00 def	2,39 ghijklm	0,79 abcde	1,54 bcdefghijk
Merenzao	1,00 def	2,07 efghijklm	1,00 de	1,79 fghijklmn
Moscatel H	1,00 def	2,46 hijklm	1,00 de	2,18 jklmnop
Palomino	1,00 def	2,68 lm	0,82 bcde	1,32 abcdefghi
Pirixileira	1,00 def	2,50 ijklm	0,86 cde	1,43 abcdefghij
Silveiriña	1,00 def	1,61 abcdef	0,46 a	0,79 ab
Sousón	1,00 def	1,93 defghijkl	0,96 de	1,75 efghijklmno
Mandón	1,04 def	2,64 klm	0,93 de	2,21 jklmnop
Mouratón	1,04 def	1,82 cdefghij	1,04 e	2,36 lmnop
Caiño Blanco	1,07 def	2,36 fghijklm	0,82 bcde	0,89 abc
Evega 2	1,11 ef	2,50 ijklm	0,79 abcde	0,79 ab
MBM tinto	1,11 ef	2,82 m	0,82 bcde	1,50 bcdefghijk
Náparo	1,11 ef	2,57 jklm	0,71 abcde	1,32 abcdefghi
Negrón de Aldán	1,14 f	2,57 jklm	1,00 de	2,00 ijklmno
Media	0,95 a	2,03 a	0,87 b	1,71 b

Aunque la interacción entre inóculos y variedades ha tenido diferente efecto sobre la susceptibilidad, el 32% de las variedades mostraron el mismo comportamiento. Malvasía, Caíño Bravo, Ferrón y Corbillón, mantienen un nivel de susceptibilidad inferior a la media independientemente del inóculo utilizado. Caíño Redondo1, Caíño redondo2, Garrido Fino, Albilla, Brancellao, Brancellao Blanco, Caíño da Terra, EVEGA1, Merenzao, Moscatel de Hamburgo, Sousón y Mouratón mantienen un nivel de susceptibilidad superior a la media.

En relación a la densidad de esporas también se observa en general una menor densidad en el efecto del inóculo 2 que del 1, aunque no tan marcada como en el caso del grado de esporulación. El 20% de las variedades presentaron un grado de susceptibilidad inferior a la media en el inóculo 1 y el 23% en el inóculo 2.

Independientemente del inóculo las variedades Malvasía, Caíño Longo, Caíño Bravo, Silveiriña, EVEGA4, EVEGA6, Loureira, Traminer, Blanco Lexítimo, Ferrón, y Dona Blanca presentaron densidad de esporas inferior a la media, y Albarín Tinto, Merenzao, Albilla, Brancellao, EVEGA1, Gold, Moscatel, Picapoll Negro, Brancellao Blanco, EVEGA5, Caíño Redondo2, Planta Fina, Caíño da Terra, Caíño Redondo1, Aramón, Espadeiro, Moscatel de Hamburgo, Negrón de Aldán Mandón presentaron valores para la densidad de esporas superior a la media

Teniendo en cuenta las dos variables estudiadas (grado de esporulación y densidad de esporulación), y con independencia del tipo de inóculo, las variedades Caíño y Ferrón presentaron los menores niveles de susceptibilidad. Por el contrario, Caíño Redondo 1 y 2, Albilla, Brancellao, Brancellao Blanco, Caíño da Terra, EVEGA1, Merenzao, y Moscatel de Hamburgo presentaron niveles de susceptibilidad superiores a la media.

4. Conclusiones

El genotipo de las variedades de vid es uno de los factores fundamentales en la sensibilidad a mildium, si bien a través del estudio del grado y densidad de esporulación del inóculo se observa que la diferente efectividad del inóculo parece influir, en algunas variedades, en su grado de susceptibilidad.

5. Bibliografía

1. Boso, S., Alonso-Villaverde, V., Gago, P., Santiago, J.L., Martínez, M. 2014. Susceptibility to downy mildew (*Plasmopara viticola*) of diferente *Vitis* varieties. *Crop Protection*: 26-35.
2. Brown, M.V., Moore, J.N., Fem, P., McNew, RW. 1999. Comparison of leaf disk, greethouse and field screening procedures for evaluation of grape seedling for downy mildew resistance. *Horscience*, 34 :331-333
3. Calonnec, A., Wiedemann-Merdinoglu, S., Deliére, L., Cartolaro, P., Schneider, C., Delmotte, F. 2013. *Plant Pathology*,62:533-544

6. Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado en el marco del "Programa de Desenvolvimento Rural, acción E001-2014-2015" y del proyecto RTA2012-00021-C03-01 financiado por el INIA y fondos FEDER.

V13 - EFECTO DEL DÉFICIT HÍDRICO SOBRE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE HOLLEJOS DEL CV. CABERNET SAUVIGNON DURANTE LA MADURACIÓN

Alejandro Cáceres-Mella¹, Luis Villalobos González¹, Claudio Pastenes Villarreal¹

¹Laboratorio de Fisiología del Estrés en Plantas, Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile (Av. Santa Rosa 11315, La Pintana, casilla 1004, Santiago, Chile)

alecaceres@uchile.cl

RESUMEN:

El déficit hídrico afecta el desarrollo, metabolismo y composición química de las bayas de vid, de acuerdo a su tiempo e intensidad. Por esta razón, se estudió la composición fenólica y concentración y proporción de proantocianidinas en pieles del cultivar Cabernet Sauvignon sometidas a diferentes regímenes de riego durante la maduración. El ensayo se llevó a cabo en un viñedo comercial localizado en el Valle del Maipo (Chile central) durante la temporada 2014. Se establecieron tres tratamientos (T) de irrigación mediante una combinación de goteros con diferente gasto, comenzando algunos días antes de envero y manteniendo los siguientes potenciales xilemáticos de mediodía, durante la temporada: T1, $\Psi = -0,8$ MPa; T2, $\Psi = -0,9$ MPa y T3, $\Psi = -1,0$ MPa. Los resultados mostraron que las proantocianidinas disminuyeron durante la maduración, aunque se observó un aumento aproximadamente 25 días después de envero. Se obtuvo una mayor concentración de proantocianidinas en los hollejos de bayas provenientes del tratamiento más restrictivo de riego (T3). La separación de proantocianidinas mediante cartuchos Sep-Pak tC₁₈ mostró solo cambios en la concentración pero no en la proporción de las diferentes fracciones durante la maduración. La fracción monomérica disminuyó desde pinta a cosecha, sin diferencias entre tratamientos, mientras el tratamiento menos regado (T3) mostró una mayor concentración de polímeros en la cosecha de la uva.

Palabras clave: Déficit hídrico, proantocianidinas, Cabernet Sauvignon

1. Introducción

El déficit hídrico puede afectar el desarrollo de la baya, su metabolismo y su composición final de acuerdo al tiempo e intensidad de éste. Esta restricción afecta la calidad de la fruta, debido principalmente a que produce bayas más pequeñas, aumentando la relación piel/pulpa, además de tener un efecto sobre la composición fenólica. (1) Las proantocianidinas son compuestos fenólicos que presentan importantes propiedades para los vinos, participando en las sensaciones de astringencia y amargor y actuando como copigmentos para la estabilización del color del vino. Kennedy et al. (1) reportó cambios en la composición de proantocianidinas y la unión entre antocianos y taninos, en cambio en Downey et al. (2) se observó que el déficit hídrico tiene un efecto débil sobre el contenido de estos compuestos. Por su parte, otras investigaciones reportaron un efecto positivo en el contenido de taninos y antocianinas en las pieles de Cabernet Sauvignon (3). Por esta razón, el objetivo fue estudiar la concentración de compuestos fenólicos y fracciones de proantocianidinas en las

pieles de uvas del cultivar Cabernet Sauvignon sometidas a diferentes regímenes de riego durante la maduración.

2. Material y métodos

El ensayo se realizó con vides del cv. Cabernet Sauvignon en un viñedo comercial localizado en el Valle del Maipo, Chile central. Se establecieron tres tratamientos de irrigación utilizando una combinación de goteros de distinto gasto, comenzando unos días antes de envero y manteniendo los siguientes potenciales xilemáticos: T1, $\Psi = -0,8$ MPa; T2, $\Psi = -0,9$ MPa y T3, $\Psi = -1,0$ MPa, durante la temporada 2014, sin lluvias durante este período. El estado hídrico fue controlado semanalmente mediante una cámara de presión de tipo Scholander. Se usaron 6 hileras (repeticiones), donde se encontraban los tres tratamientos de riego. De cada unidad experimental, consistente en un grupo de 7 plantas, se obtuvo una muestra compuesta de 50 bayas de diferentes partes de los racimos. Se determinaron 5 fechas de muestreo desde envero hasta la cosecha comercial de la uva.

La determinación de los compuestos fenólicos desde las pieles de las uvas se realizó mediante dos extracciones sucesivas, la primera con una solución metanol:agua (80:20 v/v) y la segunda con una solución acetona: agua (80:20 v/v) con agitación por 1 hora en ambas oportunidades y posteriormente se realizaron los análisis fenólicos de fenoles totales mediante absorbancia a 280 nm usando ácido gálico como estándar (4); taninos totales mediante precipitación con metilcelulosa (5); antocianos totales usando el método de Ribéreau-Gayon y Stonestreet (6) y fraccionamiento de proantocianidinas por extracción en fase sólida mediante cartuchos Sep-Pak Plus tC₁₈ (7). Se analizó el peso de 50 bayas, peso de pieles, acidez titulable (g ác. tartárico/L), pH y sólidos solubles (°Brix).

3. Resultados

El peso de 50 bayas varió entre 48,9 a 59,0 gramos, mientras el peso de las pieles presentó un rango entre 4,6 y 7,1 gramos, aumentando durante la maduración de la uva. Se observó un aumento del pH durante la maduración (2,6 a 3,6) y una disminución de la acidez titulable (3,0 a 15,4 g ác. tartárico/L), además de un aumento en el contenido de sólidos solubles con rangos entre 12,9 a 21,6 °Brix, sin observar diferencias en ninguno de los parámetros mencionados.

El contenido de fenoles totales aumentó durante la maduración de la uva con un rango entre $14,03 \pm 0,15$ a $21,09 \pm 0,63$ mg EAG/ g pieles (EAG: equivalente ácido gálico). Se observa una mayor concentración en tratamientos más restrictivos en algunas fechas de muestreo, aunque no en la cosecha.

Por otra parte, el contenido de antocianos totales mostró un aumento durante la maduración con rangos entre los $2,93 \pm 0,23$ a $12,72 \pm 0,54$ mg malvidina/g pieles, sin diferencias.

El contenido de taninos totales (Figura 1) disminuye durante la temporada, aunque con un leve aumento 25 días después de envero hasta la cosecha, donde el tratamiento menos regado (T3) presentó un mayor contenido de taninos totales en las pieles de las bayas.

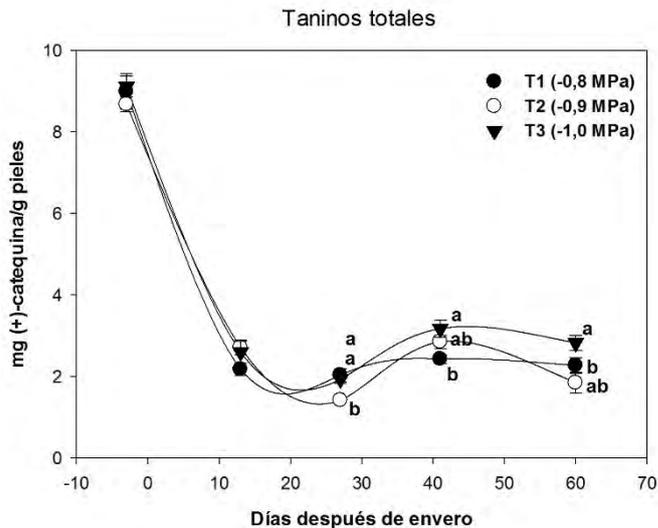


Figura 1. Contenido de taninos totales en las pieles de las bayas del cv. Cabernet Sauvignon durante la maduración. Letras distintas denotan diferencia significativa según Test de Tukey HSD ($p < 0,05$).

En el fraccionamiento de proantocianidinas, los resultados mostraron que durante la maduración disminuyeron los monómeros de flavanol, con concentraciones entre los $0,03 \pm 0,01$ a $0,41 \pm 0,01$ mg/g pieles, sin diferencias entre tratamientos. En cuanto a la fracción oligomérica, hubo una disminución en T1 y T3 y un aumento en T2 durante la maduración, además T2 presentó la mayor concentración de oligómeros en la cosecha de la uva, donde las concentraciones variaron entre $0,22 \pm 0,05$ a $0,97 \pm 0,19$ mg/g pieles.

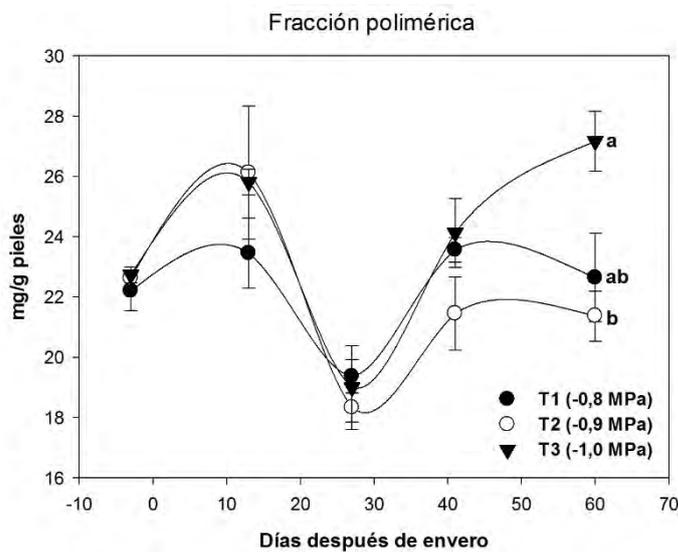


Figura 2. Contenido de polímeros de flavanol en las pieles de las bayas del cv. Cabernet Sauvignon durante la maduración. Letras distintas denotan diferencia significativa según Test de Tukey HSD ($p < 0,05$).

Finalmente, en la Figura 2 se puede apreciar el comportamiento durante la maduración en el contenido de polímeros de flavanol, observando que T3 presentó las mayores concentraciones de polímeros.

La proporción de las diferentes fracciones estudiadas fueron las siguientes: monómeros, 0,6%, oligómeros, 2,4% y polímeros 97,0%. Se pudo apreciar que hubo diferencias en concentración pero no en la proporción de las diferentes fracciones durante la maduración de las uvas.

4. Conclusiones

El déficit hídrico afectó la composición química de las pieles de las bayas de Cabernet Sauvignon, especialmente en lo que se refiere a la concentración de proantocianidinas, con más taninos totales y polímeros de flavanol en el tratamiento más restrictivo de riego. Estos resultados sugieren que el déficit hídrico aplicado podría tener impacto sobre la calidad del vino, debido a una mayor concentración en metabolitos, ya que las fracciones de flavanoles pueden producir diferencias en las propiedades sensoriales de los vinos, tales como la astringencia y amargor.

5. Bibliografía

1. Kennedy, J., Matthews, M., Waterhouse, A. 2002. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *In: American Journal of Enology and Viticulture*. ASEV. 53, 268-274.
2. Downey, M., Dokoozlian, N., Krstic, M. 2006. Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. *In: American journal of enology and viticulture*. ASEV. 57, 257-268.
3. Casassa, L., Keller, M., Harbertson, J. 2015. Regulated deficit irrigation alters anthocyanins, tannins and sensory properties of Cabernet Sauvignon grapes and wines. *In: Molecules*. MDPI AG. 20, 7820-7844.
4. Glories, Y. 1984. La couleur des vins rouges. 2e partie. Mesure, origine et interpretation. *In: Connaissance de la vigne et du vin*. Vigne et vin publications. 18, 253-271.
5. Sarneckis, C., Dambergs, R., Jones, P., Mercurio, M., Herderich, M., Smith, P. 2006. Quantification of condensed tannins by precipitation with methylcellulose: development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis. *In: Australian journal of grape and wine research*. Wiley. 12, 39-49.
6. Ribéreau-Gayon, J., Stonestreet, E. 1965. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *In: Bulletin de la société chimique de France*. Société Chimique France. 9, 2649-2652.
7. Sun, B., Leandro, C., Ricardo da Silva, J., Spranger, I. 1998. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *In: Journal of agricultural and food chemistry*. ACS Publications. 46, 1390-1396.

6. Agradecimientos

A la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT) a través del Proyecto Postdoctoral Fondecyt n° 3140269 por la financiación del presente estudio y a la Viña Haras de Pirque por su colaboración con el material vegetal y soporte en campo.

V14 - ÍNDICE DE POTENCIAL AROMÁTICO VARIETAL EN EL CONTROL DE MADURACIÓN DE LA VARIEDAD ALBILLO EN LA D.O. “VINOS DE MADRID”

Crespo J, Romero V, García M, Arroyo T, Cabellos JM¹

IMIDRA. Dpto. Investigación Agroalimentaria. Finca “El Encín”. Apto. Correos 127. Alcalá de Henares. 28800. Madrid. España. Tfno.: 91 887 94 98.

julia.crespo.garcía@madrid.org juan.cabellos@madrid.org

1. Introducción

La variedad Albillo es una uva blanca de cultivo tradicional en la subzona de San Martín de Valdeiglesias dentro de la D.O. “Vinos de Madrid”. Entre los años setenta y ochenta del siglo pasado comienza su disminución al desaparecer el mercado, como uva de mesa, al que iba destinada en su mayor parte a Madrid, llegándose hasta las 231 Has actuales registradas en la D.O. Así, en pocos años se ha pasado de una cosecha habitual de 200.000 Kg, a registrarse 70.414 Kg en 2014 y un total de vino calificado de 46.220 litros en las bodegas acogidas a la D.O. (CRDO “Vinos de Madrid”, 2015).

En los últimos años hay un mayor interés por potenciar variedades autóctonas y algunas bodegas del sector vinícola están apostando por su recuperación. Se pretende conocer mejor las características de la variedad y ensayar, a lo largo de la maduración, un método novedoso para evaluar el contenido global de aromas varietales a través del Índice del potencial aromático varietal (IPAv) que podría aplicarse en el control de cosecha en bodega.

La variedad Albillo fue considerada tradicionalmente bastante neutra aunque hay estudios que sugieren que tiene notas interesantes de flavor (Muñoz Organero y Ortiz, 1997; Jurado et al., 2002; Sánchez-Palomo et al., 2006, 2007a). Sánchez-Palomo et al., (2007b) encuentran incrementos notables en terpenos, norisoprenoides y derivados bencénicos al elaborar vinos con maceración prefermentativa y definen las características sensoriales de estos vinos con notas dulces, melocotón, albaricoque y manzana verde con mayor intensidad de frutuosidad y cuerpo que los vinos tradicionales.

El Índice de Potencial Aromático varietal (IPAv) (Salinas et al., 2012; Serrano et al., 2014) puede ser una herramienta adecuada para el seguimiento de la maduración de la uva y evaluar el aroma potencial de la variedad. Los precursores glicosilados del aroma están formados por una aglicona volátil unida a una molécula de glucosa por enlace glicosídico que se puede romper por hidrólisis ácida o enzimática ofreciendo la aglicona y la glicosil-glucosa (glucosa G-G). El potencial aromático de las uvas puede ser estimado mediante la medida de las agliconas volátiles o de la glucosa G-G, las cuales se encuentran en cantidades equimoleculares. La medida de las agliconas de muchos compuestos complica la determinación, por ello medir la glucosa G-G es la forma más rápida y fácil de evaluar el potencial aromático de la uva, lo que permite tomar decisiones a corto plazo en las bodegas. Es sabido que estas agliconas contribuyen de forma positiva al aroma (Serrano et al., 2014), donde la mayor parte de los volátiles liberados corresponden a terpenos, norisoprenoides y a derivados bencénicos especialmente en variedades aromáticas (Salinas et al., 2012).

El objetivo de este trabajo es el conocimiento de las características de la variedad a lo largo de la maduración, la posible influencia del medio y forma de cultivo en los valores

resultantes de la determinación del Índice del potencial aromático varietal (IPAv) y su posible aplicación al control de maduración de Albillo en bodegas comerciales.

2. Material y métodos

La uva Albillo procedía de cinco parcelas, tres de ellas en San Martín de Valdeiglesias y dos en Cadalso de los Vidrios. Se han buscado diferentes entornos, alturas (entre 656m y 842m) y modos de cultivo representativos para el estudio de la variedad. Así, hay parcelas tradicionales podadas en vaso, incluso asociadas a olivos e higueras, con cepas de 70 años, parcelas formadas en espaldera con 15 años y las hay sobre suelos en ladera, en cerro y también en vega sobre terreno más fértil.

Los muestreos fueron semanales según el método de RibereauGayon et al., (2003). Se determinó el °Brix con un refractómetro Atago PR-100 y se calculó mediante tablas el grado alcohólico probable (GAP). El pH y la acidez total se midieron según métodos de la OIV y se calculó el Índice de Madurez Tecnológica (IMT) como el cociente entre la cantidad de azúcar (g/L) y la acidez total (g/L de ácido tartárico). Los cationes se midieron por Absorción Atómica en un equipo Varian AA240 FS siguiendo los métodos de la OIV. El Índice de Potencial Aromático Varietal (IPAv) se determinó a partir del kit de reactivos IPAv de la firma Teknokroma, basado en los métodos desarrollados por Salinas et al. (2012) y Serrano et al. (2014). Se hicieron microvinificaciones, por triplicado, de tres de las parcelas estudiadas.

3. Resultados

La tabla 1 recoge datos de maduración de Albillo en 2014. Los valores de °Brix y GAP muestran su capacidad para lograr altos contenidos de azúcar y, especialmente, su carácter extra temprano en alcanzarlos en un año que ha resultado algo tardío, así, madura un mes antes que el resto de variedades tradicionales en la zona. Los niveles de pH son adecuados. Los valores de acidez total son insuficientes y se necesitará corregir los mostos. Los niveles medios de ácido málico medidos en mosto tras la vendimia, han sido de 1,3 g/L. Los valores de IMT confirman el carácter de una variedad con escasa acidez y altos niveles de azúcar. Los niveles de cationes podemos se consideran normales, si bien los niveles de potasio contribuyen a un pH superior al deseable en los mostos en bodega.

Las figuras 1A y 1B muestran la evolución del IPAv a lo largo de la maduración para las cinco parcelas estudiadas. Se muestra un incremento inicial seguido de una zona casi plana, de modo similar a lo indicado por Bayonove et al. (2003), y un nuevo aumento en la zona próxima a la vendimia, coincidiendo con Serrano et al.(2014). Se observa igualmente un cierto paralelismo entre el IPAv y el GAP. Se ha de comprobar si se repite este paralelismo en años sucesivos ya que sería de utilidad para el control en bodega de la vendimia de manera sencilla.

Los valores de IPAv son similares en las parcelas cultivadas en modo y entornos más tradicionales, mientras que en el paraje de Nava Redonda, sobre terreno de vega, más fértil, espaldera, menor insolación y mayor producción, la madurez y los valores de IPAv son inferiores.

Las parcelas cultivadas de forma tradicional y en las ubicaciones ancestrales muestran valores superiores de madurez y también de IPAv. Todas ellas en secano y podadas en vaso excepto la parcela de La Mina, formada con dos brazos en espaldera. En todos estos casos la orientación es S-SO sobre suelos ácidos, pobres, muy drenantes. Sin embargo en Nava Redonda, la parcela está sobre un suelo fértil, de vega, profundo, igualmente granítico y arenoso en un valle con orientación aproximada E-O, con menor insolación y las vides, formadas en espaldera con dos brazos, lo que contribuye a su mayor producción.

En el análisis sensorial de los vinos elaborados, un panel de ocho catadores encontró en catas descriptivas diferencias con significación estadística en intensidad de aroma global entre los vinos de Nava Redonda y La Mina, a favor de éste. Además, se apreciaron también entre Nava Redonda con La Mina y Camacha, en intensidad de color y en intensidad de fruta en boca. En ambos casos se puede pensar que responde a la menor madurez de los vinos de Nava Redonda, pero es posible que el mayor valor de IPAv en La Mina se haya reflejado en la superior intensidad de aroma global y en frutuosidad en boca, lo que requiere comprobación en sucesivas campañas.

Tabla 1.- Datos de maduración de Albillo de las cinco parcelas: Camacha, Nava Redonda y Peña Caballera (S. Martín de Valdeiglesias) y La Mina y Lancha de la Osa (Cadalso de los Vidrios) en 2014. °Brix, GAP (grado alcohólico probable); pH; Acidez total (g/L ácido tartárico); azúcar (g/L); IMT (Índice de Madurez Tecnológica); mg/L de Calcio, Magnesio y Potasio. (IMT: cociente entre la cantidad de azúcar (g/L) y la acidez total (g/L)).

PARCELA	Fecha	°Brix	GAP	pH	AT	AZ g/l	IMT	Ca	Mg	K
Camacha	07-07-14	21,8	12,6	3,48	4,8	233	44,7	38	59	1158
Camacha	11-03-14	21,2	12,2	3,30	4,7	207,0	45,5	39	55	1164
Camacha	18-05-14	25,1	14,8	3,40	4,9	250,8	51,5	40	59	1292
LA MINA	30-07-14	17,4	9,7	3,31	4,7	163,8	35,0	43	49	986
LA MINA	07-03-14	19,8	11,3	3,66	4,4	190,0	43,0	57	60	1217
LA MINA	11-03-14	20,2	11,3	3,46	4,3	193,3	42,7	40	38	1142
LA MINA	19-03-14	21,1	12,8	3,47	3,9	216,5	55,7	51	71	1107
LA MINA	25-03-14	23,1	13,4	3,48	3,7	227,3	62,0	53	70	1115
LANCHA de la Osa	30-07-14	17,8	9,9	3,20	6,8	167,0	24,7	50	45	904
LANCHA de la Osa	04-03-14	20,3	11,6	3,41	5,4	196,5	36,2	46	64	1218
LANCHA de la Osa	07-03-14	21,9	12,6	3,70	4,4	215,0	49,2	57	72	1354
LANCHA de la Osa	11-03-14	21,9	12,6	3,37	4,7	214,5	45,1	37	58	1216
NAVA REDONDA	30-07-14	10,6	5,4	2,83	18,6	167,0	9,0	-	-	-
NAVA REDONDA	19-03-14	15,1	8,2	3,29	5,9	138,5	23,4	43	55	1278
NAVA REDONDA	25-03-14	15,3	8,4	3,18	6,5	141,3	21,8	38	53	1198
NAVA REDONDA	01-03-14	16,3	8,9	3,36	4,9	150,7	30,9	34	59	1524
NAVA REDONDA	08-03-14	17,5	9,8	3,31	5,5	166,0	30,1	35	49	1578
NAVA REDONDA	15-03-14	18,7	10,5	3,57	4,3	177,7	41,2	44	57	1349
PEÑA CABALLERA	04-03-14	19,4	11,0	3,42	6,5	186,0	28,6	26	48	1200
PEÑA CABALLERA	07-03-14	20,9	12,0	3,46	6,2	202,5	32,8	42	59	1359
PEÑA CABALLERA	11-03-14	22,0	12,7	3,41	5,0	215,0	43,4	40	54	1350

Fig.1A.-

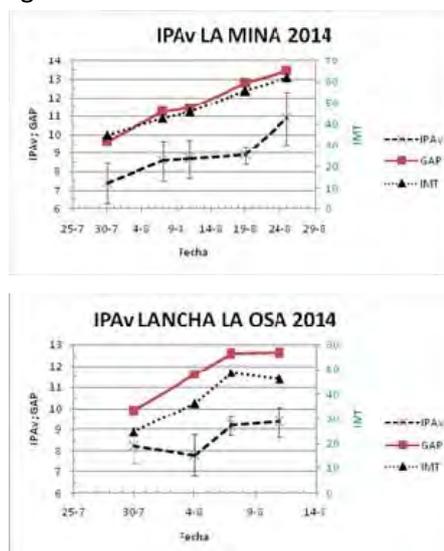


Fig. 1B-

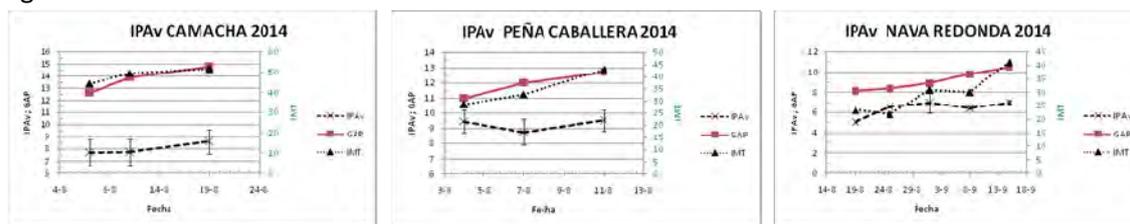


Figura 1.- Evolución a lo largo de la maduración de valores medios de IPAv (Índice de Potencial Aromático Varietal) y desviación estándar; GAP (Grado Alcohólico Probable) e IMT (Índice de Madurez Tecnológica) para la uva Albillo en 2014 procedente de Fig 1A, Cadalso de los Vidrios y Fig. 1B, de San Martín de Valdeiglesias.

4.- Conclusiones

- La variedad Albillo muestra un comportamiento muy temprano, por lo que es necesario controlar el ritmo de maduración para evitar que alcance niveles de azúcar demasiado altos con escasa acidez total.

- El IPAv (Índice de Potencial Aromático Varietal) ha mostrado un desigual pero continuado aumento a lo largo de la maduración, alcanzando el valor más alto en las fechas próximas a vendimia. Se observa, durante la maduración, un cierto paralelismo del IPAv con el GAP.
- Los modos de cultivo y entornos tradicionales de la variedad han ofrecido mayores niveles de madurez y de IPAv frente al desarrollado sobre suelo más fértil y con mayores producciones.
- El IPAv puede ser una herramienta útil en bodega para el control del potencial aromático varietal, permitiendo una mejor selección de las uvas y la designación de un adecuado momento de vendimia.

5. Bibliografía

- Bayonove, C.; Baumes, R.; Crouzet, J.; Günata, Z. 2003 in C. Flancy (Ed.), **Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos**, Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, 137-168. (2003). ISBN: 84-7114-859-5.
- CRDO "VINOS DE MADRID". 2015. Servicios Técnicos del CRDO "Vinos de Madrid". Comunicación personal.
- Jurado, J.F.; Pinilla, M.J.; Ballesteros, M.A.; Pérez Coello, M.S.; Cabezudo, M.D. 2002. **Características varietales de los vinos Moscatel de grano menudo y Albillo en comparación con los Moscateles de Alejandría y Chardonnay**. *Tecnología del vino* (Septiembre-Octubre), 57-64.
- Muñoz Organero; G.; Ortiz, J.M. 1997. **Aroma compounds in grapes from cultivars in the "Comunidad de Madrid" (Spain)**. *Rivista di Viticoltura. e di Enologia*, 3, 55-64.
- OIV. <http://www.oiv.int/oiv/info/esmethodesinternationalesvin>
- Ribéreau-Gayon, P.; Dubordieu, D.; Donèche, B.; Lonvaud, A. 2003. **Tratado de Enología. T1. Microbiología del vino. Vinificaciones**. Ed. Mundi-Prensa y Ed. Hemisferio Sur. Madrid-Buenos Aires. p. 335-337. ISBN: 950-504-572-7.
- Salinas, M.R.; Serrano de la Hoz, K.; Zalacain, A.; Lara, J.F.; Garde-Cerdan, T. **2012. Analysis of red grape glycosidic aroma precursors by glycosyl glucose quantification**. *Talanta* 89, p.396-400.
- Sánchez Palomo, E.; Díaz-Maroto, M.; González Viñas, M.; Soriano-Pérez, A.; Pérez-Coello, M.; 2007a. **Aroma profile of wines from Albillo and Muscat grape varieties at different stages of ripening**. *Food Control* 18: 398-403.
- Sánchez Palomo, E.; González Viñas, M.; Díaz-Maroto, M.; Soriano-Pérez, A.; Pérez-Coello, M. 2007b. **Aroma potential of Albillo wines and effect of skin-contact treatment**. *Food Chemistry* 103, 631-640.
- Sánchez Palomo, E.; Pérez-Coello, M.; Díaz-Maroto, M.; González Viñas, M.A.; Cabezudo, M.D. 2006. **Contribution of free and glycosidically-bound volatile compounds to the aroma of muscat "a petit grains" wines and effect of skin contact**. *Food Chemistry* 95, 279-289.
- Serrano de la Hoz, K.; Carmona, M.; Zalacain, A.; Alonso, G.; Salinas, M. R. 2014. **The varietal aroma potential index (IPAv): a tool to evaluate the quality of grape and wines, white and red**. 37º Congreso Mundial de la OIV. Mendoza. Argentina. 9-14 de Noviembre.

6. Agradecimientos

Agradecemos al INIA la financiación del Proyecto RTA 2011 0095 gracias al cual se ha podido desarrollar este trabajo. Agradecemos igualmente al CRDO "Vinos de Madrid", Bodegas Bernabeleva, Bodegas Luis Saavedra, Bodegas Marañones y a D. Juan Chorro y D. Ricardo Moreno, viticultores, su colaboración para llevar adelante este estudio.

V15 - EFECTO ACUMULATIVO DE LA PRESIÓN DE TURGENCIA SOBRE EL CRECIMIENTO VEGETATIVO Y LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN *Vitis vinifera* CV. "ALBARIÑO"

Martínez E.M.¹, Rey B.J.¹, Fandiño M.¹, Cancela J.J.¹

¹ GI1716. Univ. de Santiago de Comp./EPS, Dpto. Ing. Agroforestal (Campus Universitario s/n, 27002, Lugo, España)
emma.martnez@gmail.com

RESUMEN:

En el ensayo se evalúa el efecto acumulativo de la presión de turgencia a través de la integral de estrés hídrico (S_{ψ_p}) en *Vitis vinifera* (L.) cv. "Albariño" (2010-12) sobre el crecimiento vegetativo y los parámetros productivos. Se evaluaron tres tratamientos: secano (R), riego por goteo superficial (DI) y subsuperficial (SDI), en una parcela comercial en (Galicia-España). Se determinaron los potenciales: hídrico foliar y osmótico (midday), con un water activity meter (WP4), y la presión de turgencia; además de parámetros de crecimiento y productivos. Los resultados muestran diferente evolución de la S_{ψ_p} , presentándose más estresadas las cepas R, frente a las cepas regadas, especialmente para SDI. En floración se obtuvo una buena relación entre S_{ψ_p} vs. longitud del entrenudo ($r^2=0,88$). El empleo de S_{ψ_p} se presenta como una herramienta útil permitiendo englobar el efecto acumulativo conjunto del potencial hídrico foliar y el potencial osmótico.

Palabras clave: estrés hídrico, integral estrés hídrico, parámetros de crecimiento, producción, water activity meter

1. Introducción

Niveles de estrés más o menos severos pueden comprometer el estado del viñedo, tanto a nivel de microclima del canopy y crecimiento vegetativo como a nivel producción, en aspectos cualitativos y cuantitativos, y al metabolismo de los frutos (Acevedo-Opazo et al., 2010). Hardie y Martin (2000) destacan que mediciones directas del estado hídrico de la vid aportan información de referencia para la predicción de la respuesta fisiológica a la disponibilidad de agua, siendo necesario obtener parámetros complementarios para su uso como indicadores del estado hídrico, tales como: crecimiento de los sarmientos o elongación del entrenudo. Como parámetros productivos, Ferreira et al. (2002), Shellie (2006) o Fandiño et al. (2014) destacan la producción y el número de racimos por cepa, así como el peso del racimo como indicadores. El objetivo de esta investigación durante tres años (2010-12) es: la evaluación del efecto acumulativo de la presión de turgencia cuantificado a través de la integral de estrés hídrico en *Vitis vinifera* (L) cv. "Albariño", sobre el crecimiento vegetativo y los parámetros productivos; y el establecimiento de relaciones entre los parámetros.

2. Material y métodos

La investigación ha sido realizada en un viñedo comercial *Vitis vinifera* (L.) cv. "Albariño" perteneciente a la DO "Rías Baixas", situado en Salvaterra do Miño (Galicia, NO España) durante tres campañas (2010-2012). Las cepas de 25 años de edad, sobre portainjerto

"19617C", se encuentran dispuestas en bancales, en un marco de 1,5 x 3 m. Se consideraron 6 plantas de los tratamientos: secano (R) riego por goteo superficial (DI) y subsuperficial (SDI).

Durante el periodo de marzo a septiembre se midió el potencial hídrico foliar en condiciones de midday tomando hojas del tercio medio del pámpano, sanas, adultas, sin presencia de alteraciones y expuestas. Sobre las mismas hojas, se determinó el potencial osmótico mediante un proceso de congelación-descongelación en nitrógeno líquido, en ambos casos se empleó un water activity meter (WAM) (Martínez et al., 2011, 2013) modelo WP4 (Decagon Device, Inc.). Con ambos parámetros se determinó la presión de turgencia (Ψ_p).

La duración e intensidad del estrés hídrico foliar se determinó mediante el cálculo de la integral de estrés hídrico (S_Ψ), definida por Myers (1988):

$$S_\Psi = \left| \sum_{i=0}^{i=t} (\Psi(i, i+1 - c))n \right| \quad (1)$$

siendo $\Psi_{i, i+1}$ la media del potencial hídrico foliar para el intervalo $i, i+1$; c es el valor máximo del potencial en la campaña considerada y n es el número de días del periodo considerado (en los diferentes estados fenológicos). Dado que la Ψ_p se trata de un valor positivo, se realiza una reinterpretación sobre la definición de Myers, de modo que a menor valor de S_Ψ , menor valor de Ψ_p y, por tanto, mayor estrés tendrá la planta.

Durante los periodos de floración y cuajado, hasta el despunte, se determinaron los parámetros de crecimiento, longitud de sarmiento (S) y longitud de entrenudo (E), sobre uno de los sarmientos de cada cepa. En vendimia se procedió a la cuantificación de los parámetros productivos, número de racimos (N), peso por racimo (W) y producción por cepa (Y). El análisis estadístico de los diferentes tratamientos se realizó mediante un ANOVA (SPSS statistical package, SPSS, Chicago, IL, USA) utilizando el test de Duncan ($P < 0.05$), y regresiones lineales.

3. Resultados

La integral de estrés hídrico para la presión de turgencia (S_{Ψ_p}) muestra una disminución de la misma al evolucionar las campañas, con valores mínimos medios alcanzados en vendimia para los tres años considerados (Tabla 1), momento en que se presenta una menor hidratación a nivel foliar en las cepas. De los cuatro periodos considerados esta hidratación es mayor en floración, un 93,9 % en R, un 91,5% en DI y un 88,52% en SDI.

Tabla 1. Valores medios de la S_{Ψ_p} a mediodía según tratamiento y periodos. 2010-2012

ESTADOS FENOLÓGICOS	TRATAMIENTO		
	R	DI	SDI
Floración	12,30±2,12	13,48±2,07	15,16±1,00
Cuajado	2,83±1,76	3,06±2,22	4,58±2,74
Envero	1,41±1,09	2,25±1,19	3,24±1,04
Vendimia	0,75±0,16	1,15±0,97	1,74±0,79

R: sin riego, DI: riego por goteo superficial, SDI: riego por goteo subsuperficial

Los resultados son coincidentes con los aportados por Martínez et al. (2014) para la integral del estrés hídrico del potencial hídrico foliar de predawn y midday, en tratamientos de secano y regadío, con una mayor nivel de hidratación en SDI frente a DI.

La determinación de los parámetros de crecimiento de entrenudo medios (E) (Tabla 2) han mostrado un crecimiento más rápido en las cepas SDI al inicio de la campaña (7,50 cm),

respecto a DI y R, indicando la relevancia de una mayor disponibilidad de agua en el desarrollo del sarmiento. En cuajado, las cepas R se ven reducidas nuevamente (7,04 cm) frente a las cepas regadas. A nivel de crecimiento total de sarmiento (S), las cepas DI se presentan como las más vigorosas en crecimiento vegetativo medio tanto en floración como en cuajado (107,1 y 244,8 cm) respecto a las cepas R (87,1 y 146,0 cm). Destacar que las cepas SDI presentan la menor longitud total en ambos periodos, indicando, *a priori*, la presencia de un menor número de nudos en los sarmientos. Hardie y Martín (2000) registraron un mayor crecimiento de S en cepas regadas frente a cepas R en cv. "Gewürztraminer" y Acevedo-Opazo et al. (2010) en cv. "Cabernet Sauvignon" mostraron que a menor estrés se obtuvieron mayores S y E.

Tabla 2. Parámetros de crecimiento medios según tratamiento. 2010-2012

PARÁMETROS PRODUCTIVOS	ESTADO FENOLÓGICO	TRATAMIENTO		
		R	DI	SDI
E	Floración	5,06±0,62 ^a	6,12±1,94 ^a	7,50±1,06 ^a
	Cuajado	7,04±2,06 ^a	14,75±10,25 ^a	9,75±2,48 ^a
S	Floración	87,12±14,67 ^a	107,12±30,94 ^a	87,31±13,17 ^a
	Cuajado	145,97±25,14 ^{ab}	244,75±78,13 ^b	68,25±12,37 ^a

R: sin riego, DI: riego por goteo superficial, SDI: riego por goteo subsuperficial, E: longitud entrenado [cm], S: longitud sarmiento [cm]

* Valores seguidos de igual letra en fila no difieren estadísticamente según test de Duncan ($p < 0,05$)

Los parámetros productivos registrados en el momento de la vendimia (Tabla 3) muestran, para el periodo considerado, una mayor producción media (Y) en las cepas SDI y con racimos de peso (W) superior, respecto a DI y R. Por el contrario, las cepas en secano pese a presentar los racimos de menor W, son los más numerosos por cepa (N) con diferencias significativas con DI.

Tabla 3. Parámetros productivos medios según tratamiento. 2010-2012

PARÁMETROS PRODUCTIVOS	R	DI	SDI
N	84,83±13,65 ^b	52,50±13,81 ^a	77,33±17,18 ^{ab}
W	54,42±23,98 ^a	61,67±22,88 ^a	90,03±48,02 ^a
Y	4,89±2,39 ^a	3,44±1,70 ^a	7,53±4,95 ^a

R: sin riego, DI: riego por goteo superficial, SDI: riego por goteo subsuperficial, N: número de racimos [racimos], W: peso del racimo [g], Y: producción [kg]

* Valores seguidos de igual letra en fila no difieren estadísticamente según test de Duncan ($p < 0,05$)

Estos resultados concuerdan con los aportados por Ferreyra et al. (2002) en cv. "Cabernet Sauvignon", en donde al incrementar la dosis de riego se incrementaron N e Y; o Shellie (2006) en cv. "Merlot" en donde se incrementó tanto Y como W. Fandiño et al. (2014) en cv. "Mencía" obtuvieron una mayor Y, W y N en SDI frente a R o DI.

Tabla 4. Regresión lineal entre $S_{\psi p}$ y los parámetros productivos y crecimiento. 2010-2012

VARIABLE		ESTADO FENOLÓGICO	ECUACIÓN DE REGRESIÓN*	r^2
DEP	IND			
W	$S_{\psi p}$	Floración	W=17,98 (0,914-35,05) $S_{\psi p}$ -176,70 (-411,54-58,13)	0,68
Y			Y=1,52 (-0,57-3,62) $S_{\psi p}$ -15,93 (-44,80-12,93)	0,50
E			E=0,74 (0,37-1,11) $S_{\psi p}$ -3,92 (-9,00-1,16)	0,88
		Cuajado	E=2,09 (-1,63-5,81) $S_{\psi p}$ -0,66 (-17,86-19,18)	0,38

W: peso racimo [g], Y: producción [kg], E: longitud entrenado [cm]. * Intervalo de confianza al 95%

La tabla 4 muestra las relaciones significativas entre los parámetros de crecimiento y producción con $S_{\psi p}$. Destacar para los parámetros productivos la existencia de la relación en el

periodo de floración entre S_{ψ_p} vs. W ($r^2=0,68$) y entre S_{ψ_p} vs. Y ($r^2=0,50$). Por el contrario, únicamente con E se ha establecido relación con S_{ψ_p} en floración ($r^2=0,88$) de alta fiabilidad.

4. Conclusiones

El empleo de la integral del estrés hídrico medida a través de la presión de turgencia (S_{ψ_p}) se presenta como una herramienta útil en la determinación de la influencia del estrés acumulado en viñedos cv. "Albariño". Se han presentado diferencias significativas entre tratamientos tanto a nivel de parámetros de crecimiento como productivos, indicando un mayor confort hídrico en cepas regadas, especialmente en el tratamiento SDI. El empleo de la Ψ_p frente a la utilización del potencial hídrico foliar permite la evaluación de la influencia conjuntamente con el potencial osmótico, relevante a nivel de mantenimiento de la hidratación del cultivo en condiciones edafológica y ambientalmente desfavorables, mediante el "ajuste osmótico". La obtención de relaciones entre estos parámetros con la S_{ψ_p} facilita la evaluación del estado hídrico de un viñedo, así como predecir la producción en vendimia.

5. Bibliografía

1. Acevedo-Opazo, C., Ortega-Farias, S., Fuentes, S. 2010. Effects of grapevine (*Vitis vinifera* L.) water status on water consumption, vegetative growth and grape quality: an irrigation scheduling application to achieve regulated deficit irrigation. *In: Agr Water Manage.* 97: 956-964.
2. Hardie, W., Martin, S.R. 2000. Shoot growth on de-fruited grapevines: a physiological indicator for irrigation scheduling. *In: Aust J Grape Wine Res.* 6: 52-58.
3. Ferreyra, R., Selles, G., Peralta, J., Burgos, L., Valenzuela, J. 2002. Efectos de la restricción del riego en distintos periodos de desarrollo de la vid cv. Cabernet Sauvignon sobre producción y calidad del vino. *In: Agric Tec.* 62(3): 406-417.
4. Shellie, K.C. 2006. Vine and Berry response of Merlot (*Vitis vinifera* L.) to differential water stress. *In: Am J Enol Viticult* 57(4): 514-518
5. Fandiño, M., Martínez, E.M., Rey, B.J., Cancela, J.J. 2014. Valoración agronómica de la fertirrigación sobre *Vitis vinifera* cv. Mencía-DO Bierzo (España). *In: Actas Hort.* 70: 331-337.
6. Martínez, E.M., Cancela, J.J., Cuesta, T.S., Neira, X.X. 2011. Review. Use of psychrometers in field measurements of plant material: accuracy and handling difficulties. *In: Span J Agric Res.* 9(1): 313-328.
7. Martínez, E.M., Rey, B.J., Fandiño, M., Cancela, J.J. 2013. Comparison of two techniques for measuring leaf water potential in *Vitis vinifera* var. Albariño. *In: Cienc Tec Vitivinic* 28(1): 29-41.
8. Myers, B.J. 1988. Water stress integral-a link between short-term stress and long-term growth. *In: Tree Physiol* 4: 315-323.
9. Martínez, E.M., Cancela, J.J., Rey, B.J., Fandiño, M. 2014. Rigor del déficit hídrico en viñedos: efectos sobre los parámetros productivos del cultivar "Albariño". *In: Actas XXXII Congreso Nacional de Riegos*, A5.

6. Agradecimientos

Al CDTI y al personal técnico y administrativo de la bodega "Pazo San Mauro".

V16 - INFLUENCIA DEL USO DE NUEVOS FERTILIZANTES EN LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE LOS VINOS CABERNET SAUVIGNON

M^a Soledad Pérez-Coello , Rafael Schumacher , Isidro Herмосín, M^a Consuelo Díaz-Maroto , M^a Elena Alañón Pardo.

Universidad de Castilla la Mancha. Grupo de Enología y productos naturales. Avd. Camilo José Cela s/n 13071 Ciudad Real (Spain).
soledad.perez@uclm.es

RESUMEN:

El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia del abonado con subproductos del esquisto pirobituminoso, como alternativa a la fertilización tradicional de viñedos brasileños, en la composición fenólica de los vinos. La experiencia se realizó en 2 parcelas experimentales de Cabernet Sauvignon que fueron tratadas con dos tipos de subproductos de esquisto: los finos de esquisto y la caliza de esquisto. El análisis de los compuestos fenólicos (antocianicos, no antocianicos y piranoantocianos) se realizó mediante HPLC-Masas. Los vinos procedentes de los tratamientos con finos de esquisto tuvieron mayores concentraciones de antocianos. En general los vinos control en los que se utilizó un abonado tradicional tuvieron un menor contenido de antocianos y piranoantocianos que los vinos experimentales.

Palabras clave: Abonado, Cabernet Sauvignon, compuestos fenólicos

1. Introducción

En Brasil, la acidez de los suelos y los bajos niveles de fósforo son algunas de las principales limitaciones edáficas en la producción de uvas de calidad (Melo, 2006). Los suelos ácidos, en general, se manifiestan con eficiencias en la absorción de calcio y magnesio, lo que afecta al desarrollo de las raíces y la productividad de las plantas. El “encalado” de los suelos es una técnica comúnmente utilizada por los viticultores brasileños, mediante la aplicación enmiendas calcáreas, para neutralizar la acidez y mejorar las características químico-físicas del suelo.

El uso de los subproductos del esquisto pirobituminoso puede ser una alternativa para la agricultura brasileña, como sustituto parcial de los abonados tradicionales debido a que ellos contienen casi todos los macro y micro nutrientes esenciales para el desarrollo de las plantas. Con la utilización de una mezcla de subproductos de esquisto (50 % ER; 25 % FE y 25 % CE), denominada MBR, en el abonado de la vid, Malagi (2011), verificó una mayor disponibilidad de fósforo en los suelos de estos viñedos. Resultados semejantes a estos fueron encontrados por Chaves & Vasconcelos (2006), que apuntan que las aplicaciones de subproductos de esquistos pirobituminosos no modificaron el pH del suelo, pero incrementaron los niveles de silicio y azufre.

La concentración de los compuestos fenólicos (principalmente catequinas y epicatequinas) en las uvas están claramente afectados por algunos factores agroecológicos, tales como la variedad de uva; el grado de madurez de los racimos; el año de producción; el lugar de producción; la composición química y la fertilidad de los suelos (Revilla et al., 1997).

Los suministros moderados de nitrógeno antes de la floración favorecen la síntesis de polifenoles de la uva (Keller & Hrazdina, 1998). La nutrición adecuada de potasio ayuda a aumentar tanto el color como el contenido polifenólico en uvas (Delgado et al., 2004).

Sin embargo, se ha observado que el aumento del suministro de nitrógeno en viñas disminuye la concentración de antocianos en los mostos y vinos resultantes en algunas variedades de uva como Pinot Noir y Merlot (Hilbert et al., 2003). Por otro lado niveles moderados de nitrógeno favorecen la formación de flavonoides (Keller & Hrazdina, 1998).

La nutrición adecuada de potasio ayuda a aumentar tanto el color como el contenido de polifenoles en la uva. Estos hallazgos están de acuerdo con los resultados encontrados por Boonterm et al., (2010), que relacionan los tratamientos con altas tasas de nitrógeno y potasio en viñedos de la variedad Cabernet Sauvignon con altos niveles de compuestos polifenólicos en las uvas.

Dado que el uso de los subproductos del esquisto pirobituminoso, ha demostrado su eficacia en agricultura, el objetivo de este trabajo fue el empleo de los subproductos de esquisto en diferentes formulaciones para el abonado de viñedos de Cabernet Sauvignon y el estudio de su influencia en la composición fenólica de los vinos obtenidos a partir de las uvas de las parcelas experimentales. Este estudio se realizó durante dos vendimias consecutivas.

2. Material y métodos

El experimento fue realizado en 2 viñedos de Cabernet Sauvignon en el centro de investigación – EPAGRI (Brasil):

Viñedo I: fue evaluado el potencial de la Caliza de Esquisto (CE) como neutralizador de la acidez del suelo, utilizado solo, o en combinaciones con las Calizas Convencionales (CC). Dosis utilizada: 1CX= 0 + 0 Kg ha⁻¹ de CE + CC; 2CX= 1000 + 3000 Kg ha⁻¹ de CE + CC; 3CX = 2000 + 2000 Kg ha⁻¹ de CE + CC; 4CX = 3000 + 1000 Kg ha⁻¹ de CE + CC; 5CX= 4000 + 0 Kg ha⁻¹ de CE + CC; 6CX = 0 + 4000 Kg ha⁻¹ de CE + CC.

Viñedo II: fueron evaluados diferentes dosis de Finos de Esquisto (FE) en combinación con diferentes dosis de Caliza de Esquisto (CE). Dosis utilizada: 1MBR= 0 + 0 Kg ha⁻¹ de FE + CE; 2MBR = 120 + 120 Kg ha⁻¹ de FE + CE; 3MBR = 1680 + 120 Kg ha⁻¹ de FE + CE; 4MBR = 120 + 1680 Kg ha⁻¹ de FE + CE; 5MBR = 1680 + 1680 Kg ha⁻¹ de FE + CE; 6MBR = 900 + 900 Kg ha⁻¹ de FE + CE.

Las vinificaciones fueron llevadas a cabo en depósitos de polipropileno con capacidad para 50 L y con control de temperatura.

El análisis de compuestos fenólicos se realizó por cromatografía líquida de alta resolución utilizando un cromatógrafo HPLC modelo *Agilent 1100*, equipado con un detector de fotodiodos alineados - DAD (G1315B) y acoplado a un espectrómetro de masas con trampa iónica (G2445C) VL con sistema de ionización por electroespray (ESI-MSⁿ). La preparación de la muestra y condiciones cromatográficas para el análisis de compuestos antocianicos y no antocianicos fueron realizadas según el método de Castillo-Muñoz et al., (2007).

3. Resultados

En general las muestras de vino de la vendimia 2011 tuvieron mayor cantidad de compuestos fenólicos que las de la vendimia 2010, la cual se caracterizó por una mayor pluviosidad. Igualmente las muestras de vino correspondientes a la experiencia de abonado con mezclas de finos de esquistos con caliza de esquisto (muestras MBR) tuvieron mayores concentraciones de estos compuestos.

En la experiencia de abonado con caliza de esquistos frente a la caliza convencional (Muestras CX), se observó que los compuestos de tipos no antocianico (ácidos hidroxicinámicos, estilbenos y flavonoles) no presentaron muchas diferencias significativas entre las distintas muestras. El vino 2CX destacó por su mayor concentración de compuestos antocianicos y no antocianicos, mientras que el 5CX (procedente de parcelas abonadas con una mayor cantidad de caliza de esquistos) presentó una elevada concentración de antocianos. En la experiencia con mezclas de finos y caliza de esquistos (MBR) los controles fueron los que mostraron menor cantidad de estos compuestos en las dos vendimias, siendo las muestras 2MBR y 3MBR las que presentaron mayores cantidades de antocianos y piranoantocianos.

Diversos autores han observado que el adecuado abonado de las viñas con la aportación de nutrientes requeridos por la planta influye positivamente en la composición fenólica de los vinos, especialmente en la cantidad de antocianos (Delas et al., 1991, (Keller et al., 1999, Hilbert et al., 2003; Boonterm et al., 2010).

El análisis de componentes principales aplicado a los compuestos fenólicos de todas las muestras de la vendimia 2010, obtuvo una varianza explicada de un 78 % entre las tres primeras componentes. La proyección de las muestras en el plano formado por las dos primeras componentes principales (Figura 1) pone de manifiesto la diferenciación entre las muestras tratadas con caliza (CX) que se encuentran a la derecha del eje horizontal (componente principal 1) y las tratadas con matrices MBR, ubicadas a la izquierda de este eje. Los compuestos correlacionados con este eje son principalmente compuestos antocianicos, los cuales estuvieron presentes en mayores concentraciones en las muestras tratadas con matrices MBR.

La componente principal 2 separa las muestras dentro de cada tratamiento en base a dos flavonoles: la laricitrina y la Isorhamnetina, que al presentar coeficientes negativos se encontraran en mayores cantidades en las muestras situadas en la parte negativa del eje correspondiente a la componente principal 2 (muestra 1MBR y 6MBR). Un resultado semejante se observó cuando se aplicó el mismo análisis a los datos de compuestos fenólicos de la vendimia 2011, donde de nuevo los compuestos más correlacionados con este eje son los antocianos, pero en este caso las formas acetiladas.

4. Conclusiones

El efecto del abonado se ha puesto de manifiesto a través de las diferencias encontradas entre los vinos de la experiencia del abonado con caliza de esquisto (CX) y con matrices MBR, presentando esos últimos mayores concentraciones de antocianos. Por lo que el uso de los subproductos (finos de esquisto) puede ser muy interesante para la sustitución de los abonados tradicionales con caliza, siendo además de bajo coste al provenir de una industria de gran producción en Brasil y con alta cantidad de residuos.

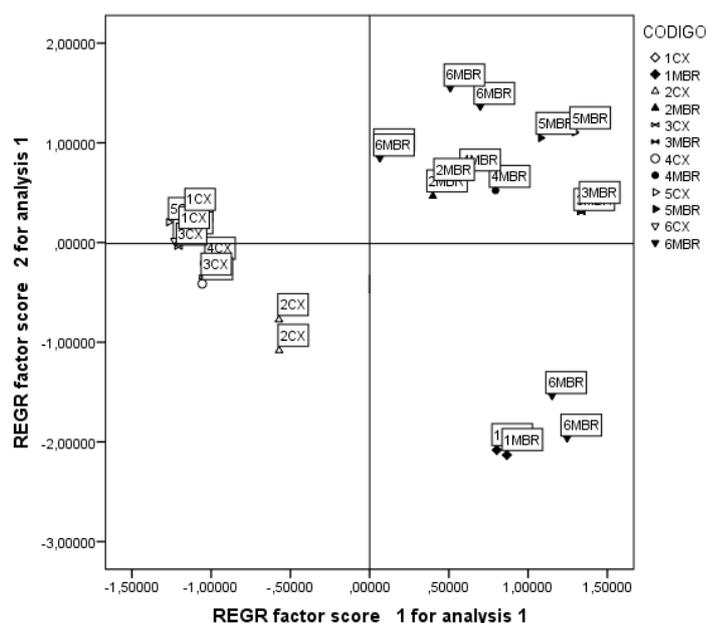


Figura 1: Análisis de Componentes Principales de los compuestos fenólicos de los vinos procedentes de la experiencia de abonado con caliza (CX1-6) y con finos de esquistos (MBR1-6). Vendimia 2010.

5. Bibliografía

- Boonterm, V., Silapapum, A., Boonkerd, N. (2010). Effects of nitrogen, potassium fertilizers and cluster per vine on yield and anthocyanin content in Cabernet Sauvignon grape. *Suranaree Journal Science Technology*, 17(2), 155-163.
- Chaves, L. H. G., Vasconcelos, A. C. F. (2006). Alterações de atributos químicos do solo e do crescimento de plantas de milho pela aplicação de xisto. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 10, (1), 84-88.
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 992-1002.
- Delgado, R., Martín, P., del Álamo, M., González, R. M. (2004). Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilization rates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 623-630.
- Hilbert, G., Soyer, J. P., Molot, C., Giraudon, J., Milin, S. Gaudillère, J. P. (2003). Effects of nitrogen supply on must quality and anthocyanin accumulation in berries of cv. Merlot. *Vitis* 42(2), 69-76.
- Keller, M., Hrazdina G. (1998). Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during veraison. II. Effects on anthocyanin and phenolic development during grape ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 341-349.
- Malagi, M. (2011). Repostas agronômicas e ecofisiológicas de videira, cultivar BRS Violeta, influenciadas por sistemas de adubação. Dissertação de Mestrado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, UTFPR, 176.
- Melo, L. M. R. (2010). Viticultura brasileira: panorama 2010. Embrapa Uva e Vinho. Disponible en: <http://www.cnpuv.embrapa.br>.

V17 - EFECTO DEL ÁCIDO ABSCÍSIKO SOBRE LA FOTOSÍNTESIS Y CONCENTRACIÓN DE AZÚCARES EN HOJAS Y BAYAS DE VID (*Vitis vinifera* L.) CV. CARMÉNÈRE

Camila Ribalta Pizarro¹, Luis Villalobos González¹, Claudio Pastenes Villarreal¹

¹Laboratorio de Fisiología del Estrés en Plantas, Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile (Av. Santa Rosa 11315, La Pintana, casilla 1004, Santiago, Chile)
camilaribalta@gmail.com

RESUMEN:

El Ácido Abscísico (ABA) es una fitohormona que aumenta su concentración bajo condiciones de estrés. En la vid, la descarga del floema en bayas cambia de pasiva a activa en el momento de envero, precedido por el aumento de ABA y la expresión de genes para proteínas de descarga de floema. En hojas, el ABA disminuye la conductancia estomática, pero nada se sabe de su modulación en la carga del floema en esta especie. Es por esta razón que el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto del ABA exógeno en hojas sobre la fotosíntesis, concentración de sólidos solubles y carbono no estructural, sobre bayas, en la concentración de azúcares solubles, y en hojas y frutos, la expresión de genes para proteínas de transporte de azúcares. Se utilizaron plantas del cv. Carménère, de un viñedo comercial del Valle del Maipo, zona central de Chile, con dos ensayos independientes: E1: se pulverizó una solución de ABA de 170 mg/L sobre hojas por ambos lados de la espaldera y en E2: se aplicó una concentración de 85 mg/L sobre bayas. Los resultados mostraron que en E1, disminuyó la fotosíntesis, transpiración y conductancia estomática a lo largo del día y durante la temporada, disminuyendo la concentración de almidón en hojas pero sin cambios en la abundancia de transcritos para transportadores de azúcares. En E2, en tanto, el ABA aceleró transitoriamente la descarga de azúcares en bayas, aumentando la expresión de genes de transporte de sacarosa y hexosas. No se observaron efectos a nivel de hojas en aplicaciones a la baya, ni en bayas en aplicaciones foliares de ABA. Nuestros resultados sugieren que el ABA actúa de manera tejido-específico, induciendo genes de transporte de azúcares solo en bayas.

Palabras clave: Partición de carbono, cierre estomático, fotosíntesis.

1. Introducción

Las vides de interés enológico usualmente se someten a manejos de estrés hídrico, ya que mejora la calidad de la baya (Van Leeuwen *et al.*, 2009). Esto induce la acumulación de Ácido Abscísico (ABA), el cual regula respuestas adaptativas al estrés en plantas, como el cierre estomático, evitando la pérdida de agua por transpiración pero mermando el crecimiento vegetal debido a la reducción en la capacidad de fijación de carbono en la planta (Flexas *et al.*, 2009). El carbono fijado puede ser cargado en el floema de manera simplástica, en que la sacarosa difunde a través de plasmodesmos por gradiente de concentración, o apoplástica, por medio de proteínas transportadoras acopladas a gasto energético. (Ainsworth y Bush, 2011).

A nivel de bayas, en vid se ha demostrado un cambio adaptativo, desde una descarga simplástica a la apoplástica en el momento de envero, a inicios de la maduración (Zhang *et al.*, 2006). Así mismo, se ha observado que aumentos en la concentración de ABA, ya sea por aplicaciones exógenas, o bien inducidas por estrés hídrico, aceleran la entrada de azúcares a la baya, asociado a un aumento y adelantamiento en la inducción de genes que codifican para proteínas de transporte (Giribaldi *et al.*, 2010; Pastenes *et al.*, 2014). Así mismo, se sabe que la capacidad fotosintética de las hojas está en parte asociada a la magnitud de la demanda de carbono a nivel de bayas y que, al mismo tiempo, la capacidad de las bayas de acumular azúcares está asociada a la capacidad fotosintética, especialmente en condiciones de estrés hídrico (Pastenes *et al.*, 2014). No es claro, sin embargo, si estas relaciones recíprocas fuente sumidero, en vides, son alteradas por efectos transitorios en la capacidad fotosintética o de acumulación de carbono no estructural en bayas, producto de aplicaciones exógenas de ABA.

2. Material y métodos

Se montaron dos ensayos independientes, con 10 plantas cada uno, a las que se aplicó una solución de ABA en dos concentraciones sobre hojas el día 3 después de pinta (E1): (T0) 0 $\mu\text{L/L}$, (T1) 170 $\mu\text{L/L}$ y sobre bayas 9 días antes de pinta (E2): (T0) 0 $\mu\text{L/L}$, (T1) 85 $\mu\text{L/L}$. En ambos casos, el tratamiento control consistió en agua destilada y Tween 20®. Se establecieron 5 fechas de muestreo por ensayo, correspondientes a los días 9, 11, 16, 19 y 52 después de envero (DDE) para E1 y 5 días antes, 1, 10, 18 y 66 DDE para E2. Los análisis en campo y la recolección de muestras de hoja fueron realizados a las 9:00, 11:00, 13:00, 15:00 y 17:00 horas de cada fecha y una vez al día se tomaron 20 bayas de diferentes racimos. Todas las muestras fueron inmediatamente congeladas con nitrógeno líquido y posteriormente almacenadas a -80°C .

Se determinó simultáneamente fotosíntesis, transpiración y conductancia estomática utilizando un analizador infrarrojo de gases portátil (CIRAS-2, PP-system, RU). Igualmente, se obtuvo el parámetro F_v/F_m con un fluorímetro portátil no modulado (Hansatech, RU), que indica el nivel de fotoinhibición de la planta (Van Kooten y Snel, 1990). La concentración de (S)-cis-ABA en hojas para E1 y bayas para E2, se determinó mediante un análisis de ELISA indirecto (Walker-Simmons, 1987).

Se analizó el peso, volumen, sólidos solubles ($^{\circ}\text{Brix}$), pH y acidez total en bayas (recopilado por Bordeau y Scarpa, 1998). Además, se realizó una extracción y cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa en hojas y bayas y almidón en hojas mediante HPLC.

Para determinar los niveles de expresión de los genes asociados a la síntesis de azúcares la síntesis del cDNA fue usando el kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System PCR (Invitrogen). Las reacciones de qPCR fueron realizadas con Ligthcycler 96 utilizando kits de sybr green de ROCHE.

3. Resultados

La concentración de ABA en las hojas asperjadas, disminuye en la temporada, siendo superior hasta 19 DDE comparado con el control. Esto disminuyó la conductancia estomática y por tanto la transpiración, así como la fotosíntesis durante la mañana por Este y en la tarde por

el Oeste (Figura 1), reduciendo la asimilación diaria neta en todas las fechas por el lado Este y los días 9 y 19 después de envero en el Oeste. Lo anterior no se tradujo en una fotoinhibición aparente en las hojas asperjadas, excepto de manera transitoria el día 9 DDE por Oeste después de mediodía solar y por el Este a los 19 DDE en la mañana (datos no mostrados).

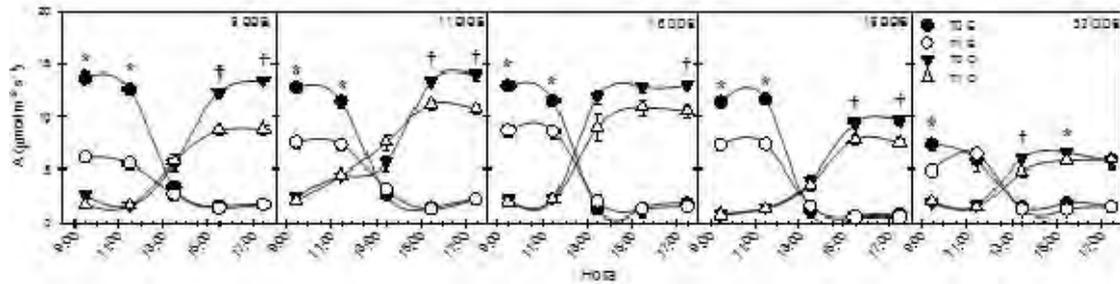


Figura 1: Asimilación de carbono (A) para T0: 0 µL/L y T1: 170 µL/L. Asteriscos y cruces indican diferencias significativas $p < 0,05$ por el Este (E) y Oeste (O), respectivamente.

Los análisis básicos de bayas en plantas con aspersión foliar de ABA (E1) no arrojaron diferencias significativas entre los tratamientos (datos no mostrados).

La concentración de azúcares solubles y almidón, en hojas tratadas con ABA (Figura 2), fueron menores al control, resultando en una menor exportación de carbono desde las hojas por ambos lados de la espaldera (Figura 3).

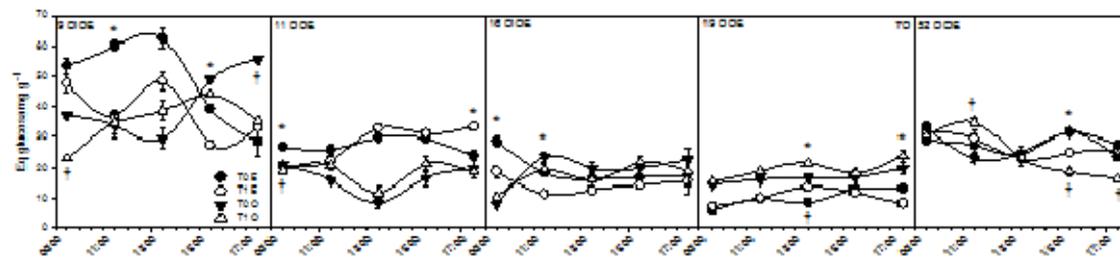


Figura 2: Concentración de sólidos solubles para T0: 0 µL/L y T1: 170 µL/L. Asteriscos y cruces indican diferencias significativas $p < 0,05$ por el Este (E) y Oeste (O), respectivamente.

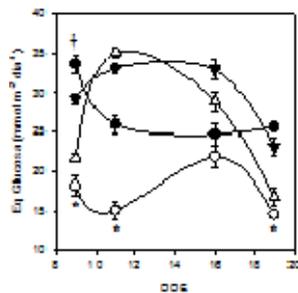


Figura 3: Exportación de carbono desde las hojas para T0: 0 µL/L y T1: 170 µL/L. Asteriscos y cruces indican diferencias significativas $p < 0,05$ por el Este (E) y Oeste (O), respectivamente.

La concentración de ABA en bayas aumenta hasta después de envero y luego se mantiene en la temporada, siendo superior en las bayas pulverizadas durante todas las fechas. El ABA asperjado en bayas no afectó la conductancia estomática de las hojas, la transpiración ni la fotosíntesis. En bayas, se observó una mayor acidez en el testigo a los 10 DDE, consecuente con lo observado esa fecha y la siguiente en el pH. La concentración de sólidos solubles fue mayor en las bayas tratadas con ABA respecto al control el 5 días antes de pinta. El contenido de azúcares solubles analizado por HPLC no presenta diferencias en la temporada,

sin embargo se observó un aumento en la expresión de los genes *VvHT3* y *VvHT5* para el transporte de hexosas y *VvSUC12* y *VvSUC27* para sacarosa en bayas. En las hojas asperjadas con ABA, no se observaron cambios en la abundancia de transcritos para proteínas de carga de floema.

4. Conclusiones

El ABA aplicado en hojas provocó una disminución en la conductancia estomática y consecuentemente, la pérdida de agua por transpiración fue menor, mermando la tasa fotosintética y con esto el total de carbono asimilado durante el día, siendo las hojas del lado Este las más afectadas. Asimismo, hubo una disminución en la concentración de azúcares solubles y almidón en hojas, resultando en una menor exportación de carbono desde las mismas. El ABA aplicado en bayas aumentó la expresión de genes para transportadores de hexosas y sacarosa, sin efecto alguno sobre las hojas. Lo anterior sugiere que el ABA actúa de manera tejido-específico.

5. Bibliografía

1. Ainsworth, E., Bush, D. 2011. Carbohydrate export from the leaf – A highly regulated process and target to enhance photosynthesis and productivity. *In: Plant Physiology. ASPV.* 155, 64-69.
2. Flexas, J., Barón, M., Bota, J., Ducruet, J.M., Gallé, A., Galmés, J., Jiménez, M., Pou, A., Ribas-Carbó, M., Sajnani, C., Tomás, M., Medrano, H. 2009. Photosynthesis limitations during water stress acclimation and recovery in the drought-adapted *Vitis* hybrid Richter-110 (*V.berlandierixV.rupestris*). *In: Journal of Experimental Botany. Oxford.* 60, 2361-2377.
3. Giribaldi, M., Hartung, W., Schubert, A. 2010. The effects of abscisic acid on grape berry ripening are affected by the timing of treatment. *In: International Journal of Vine and Wine Science. Vigne et Vin Publications. VOL,* 9-15.
4. Pastenes, C., Villalobos, L., Ríos, N., Reyes, F., Turgeon, R., Franck, N. 2014. Carbon partitioning to berries in water stressed grapevines: The role of active transport in leaves and fruits. *In: Environmental and Experimental Botany. Elsevier.* 107, 154-166.
5. Van Kooten, O., Snel, J.F.H. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *In: Photosynthesis Research. Springer.* 25, 147-150.
6. Van Leeuwen, C., Tregoat, O., Choné, X., Bois, B., Pernet, D., Gaudillère, J.P. 2009. Vine water status is a key factor in grape ripening and vintage quality for red Bordeaux wine. How can it be assessed for vineyard management purposes?. *In: International Journal of Vine and Wine Science. Vigne et Vin Publications.* 43, 121-134.
7. Walker-Simmons, M., 1987. ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. *In: Plant Physiology. ASPV.* 84, 61–66.
8. Zhang, M., Yuan, B., Leng, P. 2006. A shift of Phloem unloading from symplasmic to apoplasmic pathway is involved in developmental onset of ripening in grape berry. *In: Plant Physiology. ASPV.* 142, 220-232.

6. Agradecimientos

A CONICYT, a través del proyecto Fondecyt 110193 y a la Viña Haras de Pirque, por facilitar el material vegetal y trabajo en campo.

V18 - EFECTO DEL RIEGO ACIDIFICADO EN EL pH DEL SUELO, ABSORCIÓN DE NUTRIENTES Y CRECIMIENTO DE LA VID.

Lampreave, Miriam; Nadal, Montserrat; Mateos Sumpsta.

Facultat d'Enologia, URV; Dept. Bioquímica i Biotecnologia; C/ Marcel·lí Domingo, nº1, 43007 Tarragona, España. E-mail: miriam.lampreave@urv.cat

RESUMEN:

Un elevado número de suelos con gran tradición vitícola se caracterizan por tener importantes contenidos de carbonatos de calcio y pH entre 7.5 y 8.5 que provocan un bloqueo de la absorción de hierro, causando clorosis en la planta por inhibición de la síntesis de clorofila. Los mecanismos tradicionales de lucha contra la clorosis férrica en la vid han sido la utilización de pies resistentes y la adición de materia orgánica y quelatos de hierro. En algunos cultivos, sobretodo en invernadero, se ha observado un aumento del crecimiento de las plantas al regarlas con agua acidificada con CO₂. En el presente estudio se planteó la adición de agentes acidificantes en el agua de riego estableciendo 2 experimentos: en el primero se utilizaron diferentes soluciones ácidas preparadas a partir de ácido sulfúrico y CO₂ para regar macetas con un suelo moderadamente calizo y sin planta. En un segundo ensayo, cepas de Tempranillo *Vitis vinifera* injertadas en R110, se plantaron en macetas con 3 suelos de diferente contenido en calcio y se regaron con una solución acidificada de 400 ppm CO₂, que es la que aportó los mejores resultados en el primer estudio: niveles más elevados de nutrientes gracias a la disminución temporal del pH del suelo. En el segundo experimento se constató un aumento del crecimiento de la planta así como del contenido de la clorofila en hojas en plantas de suelo calizo, lo que apoya la tesis que el riego de la vid con agua acidificada, mejora el control de la clorosis férrica y se apunta como un posible mecanismo de lucha contra la clorosis férrica.

Palabras clave: riego acidificado, clorosis férrica, Vid

1. Introducción

Numerosos suelos de gran tradición vitícola se caracterizan por elevados contenidos de carbonatos de calcio y un pH entre 7.5 y 8.5. Las condiciones que se crean en estos suelos, disminución de la concentración de protones y el aumento de la concentración del anión bicarbonato provocan un bloqueo del hierro, que deja de ser asequible por la planta y en consecuencia, causa problemas de clorosis por inhibición de la síntesis de clorofila. Brancadoro *et. al.* (1996) han constatado un papel determinante del bicarbonato como causante de la clorosis y la respuesta adaptativa de los genotipos *Vitis* resistentes que incrementan la absorción de Fe por extrusión de protones al área radicular.

En algunos cultivos, sobre todo en invernadero, se observa un aumento del crecimiento de las plantas al regarlas con agua acidificada con CO₂. La irrigación de la viña con agua acidificada se apunta como un posible mecanismo de lucha contra la clorosis. Según diferentes autores, se sugieren dos posibles mecanismos de actuación: a) la absorción de CO₂ por las raíces, posterior fijación de la molécula a nivel de raíz, y movilización al resto de la planta en forma de ácidos orgánicos o azúcares incorporándose a diferentes rutas metabólicas de la planta (Berquist, 1964; Arteca *et. al.* 1979); b) el descenso transitorio del pH del suelo que facilitaría un aumento de la disponibilidad y absorción de nutrientes por la planta y un incremento de los rendimientos (Ibrahim,1992; De Andria *et. al.* 199; Arienzo *et. al.* 1995).

En el presente estudio se plantea la adición de agentes acidificantes en el agua de riego como un método eficaz para mejorar la absorción de micronutrientes, entre ellos el hierro.

2. Material y métodos

En un primer ensayo se dispusieron contenedores sin planta al aire libre, en un sustrato procedente de un suelo calizo con un pH 8.24 y textura franco-arcillosa. Se implantó la variable riego con agua acidificada y se comparó con el control sin acidificar. Las soluciones se realizaron con dióxido de carbono y ácido sulfúrico en diferentes dosis. Los contenedores se regaron tres veces por semana y el diseño experimental comprendía seis tratamientos con 3 réplicas por tratamiento: Riego control a pH=7.8, Riego con Ácido sulfúrico a pH=5.5, Riego con Ácido sulfúrico a pH=6, Riego con CO₂ 200 ppm a pH=7, Riego con CO₂ 400 ppm a pH=6.5, Riego con CO₂ 800 ppm a pH=6.

En un segundo ensayo, en macetas con plantas de cv Tempranillo, injertadas en R-110 y situadas al aire libre, se definieron dos variables: tipo de suelo y acidificación del agua de riego. Se utilizaron tres tipos de suelo: un suelo de llicorella (pizarra) pedregoso, no calizo y constituido por materiales de esquistos, y con una elevada capacidad de drenaje (LL); un segundo suelo moderadamente calizo con 10.4% de caliza activa (10.4Ca) y un tercer suelo de elevada caliza con un 12.8% de contenido (12.8Ca). Los suelos calizos se caracterizan por tener una textura más rica en elementos finos y menor drenaje. La acidificación del agua de riego se realizó con 400ppm de CO₂ que fue la dosis que dió el mejor resultado en el primer ensayo realizado (Lampreave, 2002). Los contenedores con los 3 tipos de suelo y por triplicado se regaron con el agua acidificada y los resultados se compararon con un control de riego con agua sin acidificar constituyendo un total de 6 tratamientos. El riego se realizó 3 veces por semana y las dosis se establecieron en un 35% de la evapotranspiración potencial calculada según el método de Penman-FAO modificado. El estudio se llevó a cabo durante tres años.

La medida de la concentración de CO₂ en el agua de riego se realizó mediante un electrodo Orion (ORION Research inc., MODELO. 95-02) y la del pH del suelo con un pHmetro. Para la determinación del Ca, Mg, K, Fe, Cu, Mn y Zn del suelo se realizó la extracción con acetato amónico. En el caso de las hojas, se digirió el material vegetal con ácido nítrico al 65% y agua oxigenada al 35%. Los elementos minerales Ca, Mg, K, Fe, Cu, Mn y Zn del suelo y de las hojas se analizaron por absorción atómica. Para la determinación del P del suelo se utilizó el método del fosfato-vanadato-molibdato. El carbonato de calcio se determinó con el calcímetro de Bernard. El análisis de la clorofila de las hojas se realizó según el método de Davies (1976). El crecimiento y vigor de la planta se evaluaron al final del ciclo vegetativo midiendo la longitud de los sarmientos, el peso de las raíces, de las hojas, de la madera de poda y el peso total de la masa vegetal.

El estudio estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante el análisis de la varianza y test de Fisher ($p \leq 0.05$).

3. Resultados

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la determinación de los elementos minerales del suelo. La adición de CO₂ tiene un efecto positivo en la solubilidad del calcio cuando se aplican las dosis de 800ppm (pH6). Las dosis de 400ppm (pH6.5) y de H₂SO₄ (pH6)

comportan una disminución del contenido en magnesio. El fósforo alcanza sus valores más elevados en el tratamiento de 400ppm de CO₂ y en los dos tratamientos con sulfúrico. La disponibilidad del hierro aumenta en los tratamientos de 400ppm de CO₂ (pH6.5) y de H₂SO₄ (pH6); el zinc, al regar con 400ppm (pH6.5) y de H₂SO₄ (pH5.5). La solubilidad del manganeso se ve favorecida en los tratamientos con sulfúrico

Parámetro	Control pH=7.8	CO ₂ 200 ppm pH=7	CO ₂ 400 ppm pH=6.5	CO ₂ 800 ppm pH=6	H ₂ SO ₄ pH= 6	H ₂ SO ₄ pH= 5.5
Ca (meq/100 g soil)	88.70 a	110.52 ab	108.83 ab	283.34 b	75.13 a	64,46 a
Mg (meq/100 g soil)	4.57 b	3.53 b	1.37 a	4.83 b	2.12 a	2,53 ab
P (ppm)	4.35 a	7.38 ab	9.92 b	6.56 a	8.88 b	10.33 b
Fe (ppm)	1.21 a	1.51 a	4.13 b	2.05 a	4.33 b	1,40 a
Mn (ppm)	2.16 a	2.31 a	2.30 a	1.77 a	5.67 b	4,41 b
Zn (ppm)	3.01 a	2.96 a	3.95 b	2.23 a	2.92 a	4,36 b

Tabla 1. Determinación de los nutrientes del suelo comparando tratamientos con diferentes concentraciones de CO₂ y de sulfúrico. Resultados correspondientes a la media y a la desviación estándar (Análisis de la varianza y test de Fisher p≤0.05): letras diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos

En la figura 1 se muestra la evolución del pH del suelo obtenida después del riego con agua acidificada con 400 ppm de CO₂ y con agua sin acidificar en los tres suelos utilizados en el ensayo con planta. En los tres suelos se observa una mayor disminución del pH al regar con CO₂: 0.7 puntos en el suelo no calizo y entre 0.3 y 0.4 en los suelos calizos.

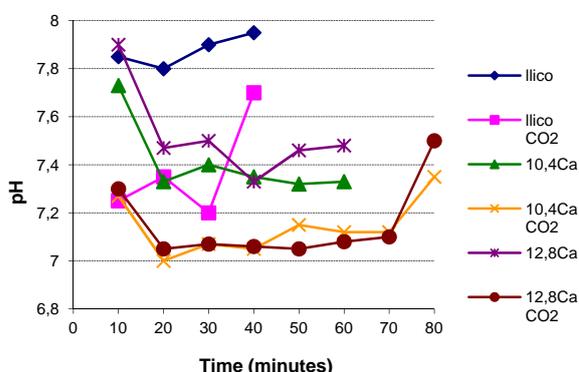


Figura 1. Evolución del pH del suelo. Tipo de suelo: no calizo (LL), de moderada (10,4 Ca) y de elevada caliza (12,8 Ca)

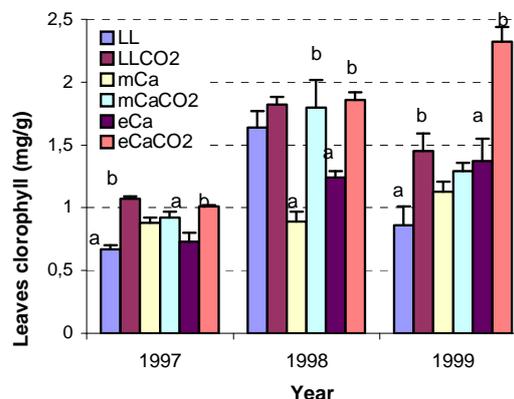


Figura 2. Evolución del contenido de clorofila en hojas. Suelos no calizos (LL), con 10.4% caliza activa (mCa) y 12.8% (eCa) y riego sin acidificar (LL,mCa,eCa) y con adición de CO₂ (LLCO₂,mCaCO₂,eCaCO₂). Letras diferentes muestran diferencias significativas entre la acidificación del riego y el control.

En la figura 2 se muestra la evolución del contenido de clorofila en las hojas en los 3 tipos de suelo. El aumento significativo del contenido de Fe del suelo al regar con 400ppm de CO₂ (Tabla 1) se tradujo en unos contenidos en hoja de 193µg de Fe/g frente 95µg de Fe/g de peso seco del control (resultados no mostrados).Igualmente, en los tres tipos de suelo y en los tratamientos con agua acidificada, se produce un incremento de la concentración de clorofila en hoja, siendo este aumento más acusado en suelos calizos (Figura 2).

4. Conclusiones

Las valores más elevados de nutrientes en el suelo, en las condiciones calizas más extremas, se obtuvieron con las concentraciones de 400ppm (pH6.5), H₂SO₄ (pH6) y H₂SO₄ (pH5.5). Los incrementos de clorofila y Fe que se midieron en las hojas fueron similares a los incrementos de hierro del suelo en los tratamientos con agua acidificada.

Podemos concluir que el riego acidificado con dióxido de carbono y ácido sulfúrico en suelos calizos, favorece la absorción de nutrientes resultando un incremento del crecimiento de las plantas y mejor metabolismo primario, así como un mayor rendimiento y una mejor calidad de la fruta. Globalmente, el tratamiento con 400 ppm CO₂ es el que ha dado los mejores resultados. Es importante resaltar que el CO₂ es inocuo con el medio ambiente mientras que sulfúrico es un producto agresivo.

5. Bibliografía

1. Arienzo, M., Basile, G., D'Andria, R., Magliulo, V., Zena, A.; 1995: Irrigazione con acqua carbonicata e disponibilità di elementi nutritivi. Prova su coltura di fragola. *Agrochimica* Vol. XXXIX-N.1, 61-72
2. Arteca, R.N., Poovaiah, B.W., Smith, O.E.; 1979: Change in carbon fixation, tuberization, and growth induced by CO₂. applications to the root zone of potato plants. *Science* 205, 1279-1280.
3. Brancadoro, L., Vanoli, M., Zocchi, G.; 1996: Adaptive responses to high concentration of HCO₃ in Cabernet Sauvignon. *Acta Hort.* **427**, 75-81.
4. Bergquist, N.O.; 1964: Absorption of carbon dioxide by plant roots. *Botaniska notiser* 117, 249-261.
5. D'Andria, R., Magliulo, V., Maggio, A., Basile, G., Arienzo, M.; 1993: Soil and plant nutrient modifications in response to irrigation with CO₂ enriched water on tomato. *Act. Hort.* 335, 557-562.
6. Davies, D.H; 1976. Carotenoids. In: *Chemistry and Biochemistry of Algal Pigments*. Goodwin, T.W.Ed., Academic Press, New York, U.S.A. **Vol.2**, 38-165
7. Ibrahim, AA.; 1992: Response of plant to irrigation with CO₂-enriched water. *Acta Horticulturae* 323, 205-214.
8. Lampreave, M. 2002: Fisiologia de l'absorció en l'ecosistema vitícola sòl-planta-atmosfera i repercussions en la qualitat del raïm. Thesse doctoral. Dept. bioquímica i biotecnologia, URV, Taragona.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por AGF97-1180, ALI98-0534 y la empresa Carburos Metálicos SA, y por el Proyecto Nacional "Contribución del portainjertos a los balances de agua y carbono: componentes estructurales y dinámicos y relación con la producción y la calidad de uva y vino".AGL2011-30408-C04-02, 2011-2014.

V19 - EFECTO DEL PORTAINJERTO EN LA VARIEDAD MARSELAN ADAPTADA AL CLIMA MEDITERRANEO

Nadal, M., Sánchez-Ortiz, A.

Universitat Rovira i Virgili, D. Bioquímica i Biotecnologia. Facultat d'Enologia de Tarragona.
Campus Sescelades, Marcel·lí Domingo, s/n, 43007 Tarragona.
Email: montserrat.nadal@urv.cat

RESUMEN:

La disminución de la síntesis de antocianos en la variedad Garnacha bajo condiciones de estrés hídrico -cada vez más frecuente en el nuevo escenario de cambio global- nos lleva al estudio de un nuevo material genético, la variedad Marselan, en el sentido de mejorar el color de los vinos producidos en viñedos mediterráneos. El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la composición fenólica de los vinos obtenidos de las variedades Garnacha, Cabernet Sauvignon y Marselan injertados sobre 4 portainjertos (Richter-110, 140-Ruggeri, 41B y FERCAL). El ensayo se realizó en el viñedo experimental de la Universidad Rovira i Virgili (Tarragona), en clima mediterráneo y suelos de textura franco-arcillosa, de pH 8.2, 56% de carbonatos y de reserva hídrica media. Las combinaciones variedad / portainjerto se distribuyen al azar en 3 bloques de repetición e incluyendo 17 cepas por tratamiento. Las cepas de 5 años se encuentran en un marco de 1.1mx 2.4m, en espaldera y cordón bilateral. Durante 2012 y 2013 se caracterizó el clima y se midió el potencial hídrico foliar. La composición fenólica de los vinos se determinó por HPLC-DAD / FLD. Los resultados muestran el patrón Fercal con menor resistencia a la sequía. La severidad del clima afecta negativamente la concentración de fenoles, especialmente en antocianos. Los vinos de Marselan en el patrón más vigoroso (140Ru) dieron lugar al menor contenido en fenoles, mientras que en 41B fueron vinos equilibrados y presentaron concentraciones más elevadas de antocianos.

Palabras clave: estrés hídrico, HPLC- DAD/FLD, compuestos fenólicos

1. Introducción

Los compuestos fenólicos determinan la calidad de los vinos tintos debido a que son responsables de atributos visuales y sensoriales fundamentales como son el color, la tanicidad y la estructura (Kirsten *et al.* 2007). La biosíntesis y la concentración final de fenoles en la baya depende del clima, del suelo, del vigor de la variedad y portainjerto y de las prácticas culturales (Jackson y Lombard, 1993) que afectan la fisiología de la maduración y por lo tanto, la acumulación de los compuestos fenólicos en la uva (Downey *et al.* 2003). La influencia de los portainjertos en el comportamiento del vástago es relativamente desconocida. Sin embargo, estudios realizados por Smith y Holzapfel (2002) muestran que el portainjerto ejerce una cierta influencia en el rendimiento y vigor de la vid (Smith y Holzapfel, 2002). Stefanini *et al.* (1995) midieron una serie de patrones y correlacionaron el aumento de vigor y la madurez avanzada.

Actualmente existen escasos estudios sobre la composición fenólica de Marselan (Liang *et al.* 2012; Williams, 2010). El objetivo de este estudio se centra en evaluar la calidad fenólica de la uva de la variedad Marselan en clima mediterráneo y suelos calizos, en un ensayo con 4 diferentes portainjertos. Marselan presenta un potencial fenólico elevado y por

esta razón puede resultar de gran interés para complementar y facilitar la crianza en la producción de vinos tintos de base Garnacha.

2. Material y métodos

El experimento tuvo lugar en un viñedo establecido en 2009 en el campo experimental de la Universidad Rovira i Virgili en Constantí (Tarragona, España) (Lat: 41,15º, Long: 1,217). La zona posee clima mediterráneo y suelo profundo y calizo de reserva hídrica media. En 2013 la precipitación anual fue de 536,2mm y la temperatura media de 15,4°C. En el diseño experimental establecido comprende la variedad Marselan (*V. vinifera* Garnacha x *V. vinifera* Cabernet sauvignon) clon 980 en 4 portainjertos con 3 bloques de repetición en diseño Split-plot; cada combinación Marselan/portainjerto consiste en 17 cepas plantadas en un marco de 2,4m x 1,1m. El sistema de conducción en espaldera vertical sostiene una poda en cordón bilateral con 3 pulgares por brazo. Los portainjertos fueron: Richter110 –R110– (*V. berlandieri* Resseguier nº2 x *V. rupestris* Martin), 140Ruggeri –140Ru– (*V. berlandieri* Rességuier nº2 y *V. rupestris* de Lot), Millardet et de Grasset 41B MGt –41B– (*V. vinifera* chasselas y *V. berlandieri*) y Fercal (*V. berlandieri* Colombard nº 1 y 31-Richter [*V. berlandieri* x [*V. riparia* x *V. rupestris* x *V. candicans*]]) (Laucou *et al.* 2008). Dos portainjertos vigorosos -R110 y 140Ru- muy resistentes a la sequía (140Ru además resistente a la caliza); Fercal y 41B con elevada resistencia a la caliza, vigor medio-alto y tolerancia media a la sequía.

Para determinar el estrés de la cepa, se midió el potencial hídrico foliar (Ψ_{hf} , MPa) con la cámara de Scholander desde el estado de envero hasta el momento de la vendimia, a las 5:30 y 11:30 hora solar (hs), dos hojas por bloque de repetición. Los vinos se elaboraron en pequeñas tinas de acero inoxidable en sala con temperatura controlada (23°C) para evitar excesiva subida de temperatura durante la fermentación alcohólica. El proceso de vinificación consistió en el estrujado de la uva previo despallado, adición de 40mg/l de SO₂ y siembra de *Saccharomyces cerevisiae*. La maceración de los hollejos se prolongó hasta el final de la fermentación alcohólica, seguido del descube y prensado. Se determinaron y cuantificaron las familias de compuestos fenólicos en los vinos mediante HPLC (Gómez-Alonso *et al.* 2007), acoplada a dos detectores diodos en fila (DAD) y fluorescencia (FLD). Fueron determinados e identificados 28 compuestos entre antocianinas monoglucósidos (delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, con sus respectivos glucósidos acetatos y cumaratos), flavonoles (miricetin-3-glucósido, quercetin-3-glucósido, quercetin-3-galactósido, quercetin-3-rutinósido, quercetin-3-O-glucósido, isorhamnetin), proantocianidinas (B1, B2 y B3), ácidos hidroxibenzoicos (gálico, protocatehuico, hidroxibenzoico, siríngico), ácidos hidroxicinámicos (caftárico, cafeico, p-cumárico, ferúlico, trans-ferúlico), flavanoles ((+)-catequina y (-)-epicatequina), estilbenos (resveratrol) y tirosol. Se analizaron los resultados mediante el programa SPSS Statistics 21.0 (ANOVA) y se compararon las medias con la prueba de Tukey (sig. de 0,05).

3. Resultados

Los resultados del Ψ_{hf} en 2012 (Figura 1) muestran valores más elevados en Garnacha y Marselan si se comparan con Cabernet Sauvignon. El Ψ_{hf} en Garnacha y Marselan a las 7:00am alcanza valores de -1Mpa en los patrones 140Ru y 41B, dos décimas por encima de Fercal y R110, por lo tanto, indicando una mejor recuperación de las cepas en 140Ru y 41B. En la añada 2013 se registraron temperaturas menores y mayor precipitación, hecho que comportó Ψ_{hf} menos negativos en todos los tratamientos y en consecuencia, las plantas sufrieron un menor estrés hídrico (0,6Mpa a las 7:00). Igualmente, en 2013 los patrones 140Ru

y 41B tienden a presentar un mejor comportamiento hídrico (Figura 2). La concentración total de fenoles en año 2012 de maduración cálida y prolongada resultó afectada; disminuyendo a la mitad o un tercio (según el portainjerto) la cantidad alcanzada en el año con menor estrés (2013). Destacó el buen resultado en los vinos de 41B, con mayor concentración total de fenoles, contrario a los datos observados en 140Ru (Figura 3).

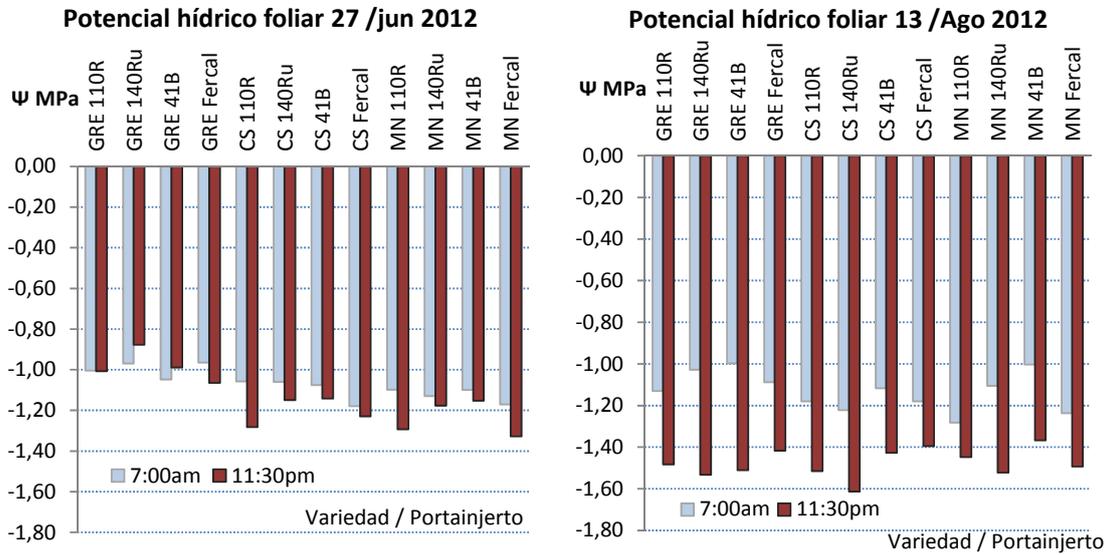


Figura 1. Potencial hídrico foliar en baya guisante y maduración añada 2012. En maduración diferencias significativas entre medidas mañana y mediodía en todos los portainjertos y variedades (garnacha GRE); (Cabernet Sauvignon CS); (Marselan MN)

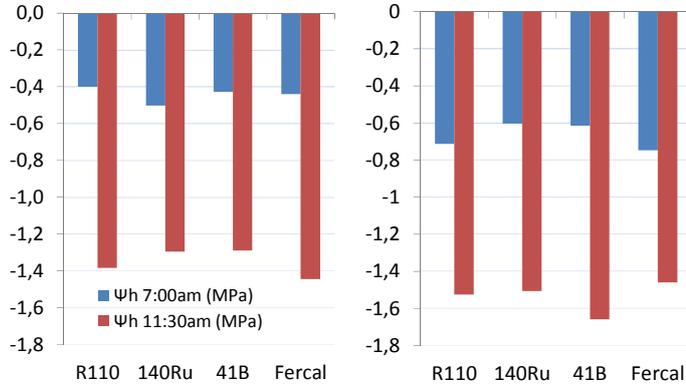


Figura 2. Potencial hídrico foliar en baya guisante y maduración añada 2013 (Marselan)

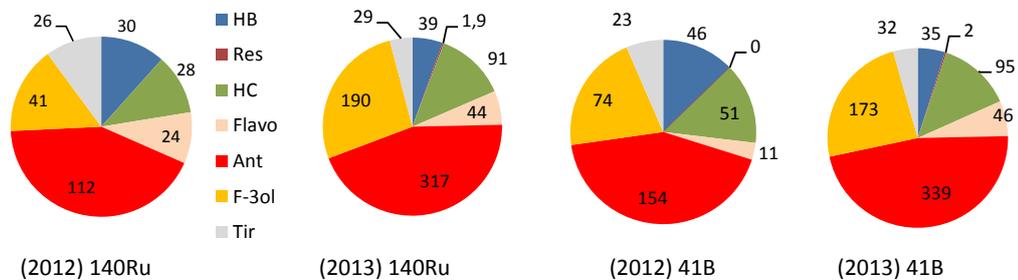


Figura 3. Compuestos fenólicos (mg/l): Ácidos hidroxibenzoicos (HB), Ácidos Hidroxicinámicos (HC), Resveratrol (Res); Flavonoles (Flavo); Antocianos (Ant); flavan-3-ol (F-3ol) y Tirosol (Tir). Izquierda 140Ru; derecha 41B.

La vigorosidad de 140Ru provocó además un retraso en la maduración y una disminución del grado alcohólico. Cabe apuntar la mayor proporción de antocianos en 41B, mientras que en 140Ru la familia más abundante fue la de flavan-3-ol.

4. Conclusiones

La severidad del clima en añadas en las que se prolonga el período estival cálido y seco en la época de maduración provoca un estrés hídrico acusado que conduce a una notable disminución del contenido del color en los vinos de Marselan.

En suelos cuaternarios de reserva hídrica media, el portainjerto 140Ru, resistente a la sequía pero en exceso vigoroso, da lugar a vinos menos equilibrados con menor concentración en antocianos y mayor proporción relativa de flavan-3-ol. Contrariamente, 41B presenta un buen comportamiento tanto en referencia a los análisis químicos de los vinos como en la concentración y naturaleza de los compuestos fenólicos.

5. Bibliografía

1. Kirsten Skogerson, Mark Downey, Marica Mazza y Roger Boulton (2007) Rapid Determination of Phenolic Components in Red Wines from UV-Visible Spectra and the Method of Partial Least Squares, *Am. J. Enol. Vitic.* 58:3
2. Jackson, J.I., Lombard, P.B. (1993). Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality – A review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 409-429.
3. Downey, M.O. Harvey, J.S. Robinson, S.P (2003). Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Aust. J. Grape Wine Res.* 9, 15-27.
4. Smith, J. Holzapfel, B. (2002). How do rootstocks control scion vigour and yield in grapevines? *The Australian Grapegrower and Winemaker* 465, 29-32.
5. Stefanini, M. Pinamonti, F. Dorigoni, A. (1995). Effects of several rootstocks on vegetative, productive and nutritional status of Chardonnay in Trentino. *Proceedings for the 4th International Symposium On Cool Climate Viticulture and Enology*, 53-58.
6. Liang, N. He, F. Pan, Q. Wang, J., Reeves, M. J., & D, C. (2012). Optimization of Sample Preparation and Phloroglucinol Analysis of Marselan Grape Skin Proanthocyanidins using HPLC-DAD- E SI-MS / MS, 33, 122–131.
7. Williams L. E. (2010). Interaction of rootstock and applied water amounts of various fractions of estimated evapotranspiration (ET_c) on productivity of Cabernet Sauvignon. *Aust. J. Grape Wine Res.* 16, 434-444.
8. Gómez-Alonso, S. García-Romero, E. Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *J. Food Compos. Anal.*, 20, 618-626.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto Nacional MICINN (Ref. AGL 2011 -30408-C04-02).

V20 - POTENCIAL ENOLÓGICO DE LA VARIEDAD CARABUÑENTA

Elvira Soto Vázquez, Emilia Díaz Losada, María José Graña Caneiro, Francisco Rego Martínez

Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia (EVEGA-INGACAL), Ponte San Clodio s/n, 32427 Leiro, Ourense, España

emilia.diaz.losada@xunta.es

RESUMEN:

En este Trabajo se presenta un estudio del potencial enológico de la variedad Carabuñenta, cultivada en el Sureste de Galicia, a través del estudio de las características analíticas del mosto de vendimia.

Los resultados muestran que, aún siendo una variedad de maduración tardía, puede alcanzar graduaciones altas, manteniendo un buen equilibrio entre graduación y acidez. Por sus características analíticas podría ser idónea para la elaboración de vinos gallegos envejecidos en madera, en mezcla con variedades más tánicas y de elevado potencial fenólico, aportándoles suavidad y estructura.

Palabras clave: Carabuñenta, Galicia, mostos.

1. Introducción

El potencial vitícola nacional está centrado en poco más de un centenar de variedades que representan un escaso porcentaje de la variabilidad presente en los viñedos.

Galicia cuenta con un importante complejo varietal, son 30 las variedades admitidas para la elaboración de vino, sin embargo en los últimos años se están poniendo de manifiesto la existencia de otros cultivares que pueden ser de interés para dar una mayor personalidad a los vinos gallegos. Es el caso de la variedad Carabuñenta.

La variedad Carabuñenta está presente en los viñedos de Moterrei en la DO Monterrei, y también se han encontrado ejemplares centenarios en la Comarca de O Condado. Conocida en Portugal como Touriga Nacional es la base de la elaboración de vinos tintos de portugueses.

El objetivo de este trabajo es mostrar el potencial enológico de esta variedad en la región gallega. Para ello se han realizado, durante cinco campañas, estudios de las características analíticas de los mostos de vendimia, en relación a parámetros básicos (grado, acidez total, contenido en ácido málico y tartárico) y a parámetros relacionados con la composición fenólica de los mismos (IPT, taninos totales, antocianos potenciales y extraíbles).

2. Material y métodos

Los estudios se realizaron en los años 2008, 2010, 2011, 2012 y 2014, con uvas procedentes de una parcela situada en la Denominación de Origen Protegida Ribeiro. Las cepas, de 15 años de edad, están injertadas sobre patrón 196-17C, con una densidad de 4500 plantas/ha, y conducidas en cordón Royat.

Muestras representativas de las uvas se recogieron en fecha de vendimia, fijada ésta por el productor. Se dividieron en dos partes; una de ellas se utilizó para la determinación del contenido en sólidos solubles, pH, acidez total y concentración de ácido málico y tartárico; otra se utilizó para el estudio de la maduración fenólica.

La determinación de sólidos solubles se llevó a cabo mediante refractometría. El pH se determinó mediante potenciometría y la acidez total por valoración ácido-base con detección potenciométrica. La concentración de los ácidos orgánicos, málico y tartárico, se determinó por métodos enzimático-espectrofotométrico y colorimétrico, respectivamente. Para el estudio de la madurez fenólica se utilizó el método propuesto por Saint-Cricq et al. (1998).

3. Resultados

El contenido medio en sólidos solubles, expresado en °Brix, se corresponde con una concentración de azúcares de 260 gL⁻¹, lo que pone de manifiesto la adecuación de la variedad estudiada a esta zona de cultivo, ya que se considera que una variedad es apta para un lugar determinado cuando es capaz de acumular, en la madurez, concentraciones de azúcar próximas a 180–200 gL⁻¹ (Riberau-Gayon *et al.* 2002).

Los valores de pH son similares a los obtenidos, en la misma zona de producción, para las variedades Brancellao, Tinta Femia, Caiño Longo y Sousón en la campaña 2010 y para Brancellao y Caiño Tinto en la campaña 2012 (Soto, *et al.* 2012; Soto *et al.* 2014). Los valores de acidez total son superiores a los de la variedad Mencía, en esta misma zona vitícola, en las campañas 2005 y 2006 (Cortes *et al.*, 2008) y en la campaña 2011 (Soto *et al.*, 2014).

La concentración de ácido málico varió en función del año. El valor máximo de concentración fue inferior a los valores que pueden encontrarse, en la madurez, en los mostos de regiones septentrionales (4 y 6,5 gL⁻¹); sin embargo el valor medio para el ácido tartárico superó la concentración de 6 gL⁻¹, habitual para los mostos de estas zonas (Riberau-Gayon *et al.* (2002).

Tabla 1. Madurez tecnológica de la variedad Carabuñenta

Parámetro	Resultado (27/09 – 06/10)*	
	Mediana	Intervalo**
°Brix	25.4	[23.6, 28.2]
pH	3.32	[3.26, 3.45]
Acidez total (gL ⁻¹ ácido tartárico)	7.24	[6.46, 7.59]
Ácido málico (gL ⁻¹)	2.05	[1.63, 3.36]
Ácido tartárico (gL ⁻¹)	6.71	[5.33, 7.81]

*Fecha vendimia (día/mes); ** n=4

El peso de baya (tabla 2) es similar a los expuestos por Soto *et al.* (2011) para la variedad Merenzao y ligeramente superiores a los de la variedad Sousón, en la DOP Ribeiro, Ribeira Sacra, Valdeorras y Monterrei en las campañas 2008 y 2009; y similar a los obtenidos para la variedad Mouratón y considerablemente inferior a los de la variedad Mencía de la DO Ribeiro Cortés *et al.* (2008).

La riqueza fenólica total, expresada como IPT a pH 3.2, es superior a la obtenida para la variedad Mencía en las campañas 2005 y 2006 (Río *et al.* 2008) y similar a la que presentó esta variedad en campaña 2011 (Soto *et al.* 2014) y la de las variedades Tinta Femia y Caiño Bravo en la campaña 2010 (Soto *et al.*, 2012), en estudios realizados en una finca de la DOP Ribeiro.

El potencial antociánico, concentración de antocianos a pH1, es similar al publicado por Roson y Mountounet (1992) para las variedades Cabernet Franc y Dura, y superior a la obtenida para la variedad Mencía (~1000 mgKg⁻¹ de uva) en estudios realizados en la campañas 2005, 2006 (Río *et al.*, 2008) y 2011 (~1200 mgKg⁻¹ de uva) (Soto *et al.* 2014) en la DOP Ribeiro. Esta misma tendencia se manifiesta en un estudio realizado en la campaña de 2008 en diferentes parcelas pertenecientes a las distintas subzonas de la DOP Ribeira Sacra (Río *et al.*, 2011), donde se obtiene un intervalo para la concentración de antocianos a pH 1 para la variedad Mencía comprendido entre 1026 y 1529 mgKg⁻¹ y un valor central de 1235 mgKg⁻¹

El contenido en antocianos totales es considerablemente inferior al de las variedades Ferrón (2500 mg/Kg - 2700 mg/Kg) y Sousón (2000 mgKg⁻¹ - 2500 mgKg⁻¹) (Río *et al.*, 2008, Soto *et al.* 2012; Soto *et al.* 2014).

En relación a la extractabilidad (EA), haciendo una interpretación entorno a valores centrales, se puede decir que la dificultad de extracción de los antocianos es ligeramente superior a la encontrada para la variedad Mencía (35% - 45%) o para la variedad Brancellao (30% - 35%); mientras que es inferior a la encontrada para las variedades Ferrón (50 - 55%) y Sousón (50-60%) (Río *et al.* 2008, Soto *et al.* 2010; Soto *et al.* 2014).

Tabla 2. Madurez fenólica de la variedad Crabuñenta

Parámetro	Resultado (15/09 – 06/10)*	
	Mediana	Intervalo**
Peso medio baya (g)	1.99	[1.64, 2.09]
IPT (pH 3.2)	56.0	[45.4 , 59.4]
A1 (mgKg ⁻¹ uva)	1563,53	[1190.75 , 1941.45]
A3.2 (mgKg ⁻¹ uva)	806.06	[658.98 , 937.06]
EA (%)	48.45	[43.47, 53.12]
MP (%)	29.23	[23.00, 34.30]

*Fecha vendimia (día/mes); ** n=5

La contribución de los taninos de la pepita al contenido fenólico global (MP), el valor obtenido es próximo al 30%, indicativo de un nivel óptimo del grado de madurez (Zamora, 2003). Este valor es próximo al obtenido en otros estudios para la variedad Mencía, y muy próximo o ligeramente superior a los valores obtenidos para las variedades Ferrón, Sousón, Caiño Longo y Tinta Amarela) que presentan siempre valores inferiores al 30% y habitualmente

al 20%; sin embargo es muy inferior al obtenido para las variedades Brancellao, Merenzao, Caiño Bravo y Caiño Tinto (Rio et al. 2008, Soto *et al.*, 2012, Soto *et al.* 2014).

4. Conclusiones

Esta variedad, puede acumular importantes cantidades de azúcar en la madurez, manteniendo un valor medio de acidez, y un bajo pH lo que contribuiría a una fácil conservación del vino y a alcanzar un adecuado equilibrio grado/acidez. Presenta un importante potencial fenólico, con una riqueza antocianica que permitiría que los vinos obtenidos fuesen destinados a crianza y con una escasa contribución de los taninos de la pepita que contribuiría positivamente a las características sensoriales de sus vinos.

En comparación con la variedad Mencía, variedad tinta más cultivada en Galicia, la variedad Carabuñenta acumula igual o superior concentración de azúcares en la madurez pero manteniendo un mayor valor de acidez, presenta mayor potencial antocianico y similares valores en cuanto a la contribución de los taninos de la pepita.

5. Bibliografía

1. Cortés S., Río S., Soto E., Rego F., Díaz E., 2008. Potencial enológico de los cultivares tintos Caiño da Terra, Caiño Longo, Caiño Astureses y Caiño Redondo. Estudio comparativo de la maduración. In: Vinoteq 40, pp. 24-27
2. Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdiou D., 2002. Tratado de Enología Química del Vino Estabilización y Tratamientos. In: Editorial Hemisferio Sur
3. Río S., Soto E., Díaz E., 2008. Influence of ripeness grade on accumulation and extractability of grape skin anthocyanins in different cultivars. In: Journal of Food Composition and Analysis 21, pp 599-607.
4. Río S., Soto E., Orriols I., Giacosa S., Rolle L., 2011. Possible use of texture characteristics of wine grapes as markers for zoning and their relationship with anthocyanin extractability index. In: International Journal of Food Science and Technology 46:386-394.
5. Saint-Cricq N., Vivas N., Glories Y., 1998. Maturité phénolique: définition and contrôle. In: Revue Française d'Œnologie 173, pp 22-25.
6. Soto, E., Díaz, E., Graña, M., Cabello, F., Rego, F. 2014. Estudio comparativo del comportamiento agronómico y enológico de las variedades Mencía, Sousón, Brancellao, Caiño tinto y Ferrón en diferentes áreas de cultivo. 29 Reunión del Grupo de Trabajo en Viticultura y Enología, 41:48.
7. Soto E., Río S., Antelo A., Rego F.J., 2011. Caracterización de tres variedades tintas autóctonas gallegas. In: Enovicultura 11, pp 6-13.
8. Soto E., Río S., Orriols I., 2010. Effect of the winemaking technique on phenolic composition and chromatic characteristics in young red wines. In: Eur. Food Res. Technol. 231, pp 789-802
9. Soto E., Río S., Rego F., Díaz E., Queimadelos L., 2012. Estudio comparativo de ocho variedades tintas de la Denominación de Origen Ribeiro. In: Alimentación 265: 30-35
10. Zamora, F., 2003. Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos. Mundi Prensa

6. Agradecimientos

Este estudio ha sido realizado en el marco de Programa de Desenvolvemento Rural (acción E001-2012-2013-2014)

V21 - ESTUDIOS PRELIMINARES DE LA SELECCIÓN DE CLONES DE LA VARIEDAD ESPADEIRO

María José Graña Caneiro, Beatriz Castiñeiras Gallego, Emilia Díaz Losada

Estación de Viticultura e Enoloxía de Galicia (EVEGA-INGACAL), Ponte San Clodio s/n, 32427

Leiro, Ourense, España

emilia.diaz.losada@xunta.es

Correo.electronico@de.contacto

RESUMEN:

El cultivar Espadeiro, es una variedad autóctona gallega que se encuentra autorizada para la elaboración de vinos en la D.O. Rías Baixas, y está siendo objeto de estudios de selección clonal.

En este tabajo se muestran los estudios agronómicos, (relativos a la producción, fertilidad, fenología), y enológicos de las características del mosto (grado probable, acidez total, contenido en ácido málico y ácido tartárico) y de los vinos elaborados (parámetros básicos y características fenólicas).

Si bien los resultados no son concluyentes, se han observado diferencias significativa entre clones en relación a la producción, y la tendencia de algunos de ellos a presentar un mayor potencial alcohólico manteniendo niveles de acidez adecuados.

Palabras clave: Selección clonal, Espadeiro, Galicia

1. Introducción

La finalidad de la selección clonal es poder proporcionar al sector vitivinícola variabilidad dentro de las propias cracterísticas varietales de un cultivar, con garantías sanitarias y características agronómicas y enológicas contrastadas y, si es posible, ofrecer clones idóneos para la elaboración de vinos que el sector demanda.

El cultivar Espadeiro se caracteriza por presentar ciclo largo que, en las condiciones climáticas de Rías Baixas subzona do Salnés produce vinos de graduaciones alcohólicas y acideces medias, vinos de capa media, destacando el color cereza oscuro, poco tánicos y con un intenso carácter frutal, resultando ser interesantes para la elaboración de vinos tintos jóvenes o con ligeras crianzas (Ruiz, M.2002) que no enmascaren el carácter afrutado de la variedad.

Es una variedad autóctona gallega que se encuentra autorizada para la elaboración de vinos en la D.O. Rías Baixas, y está siendo objeto de estudios de selección clonal, siguiendo el protocolo establecido para este proceso por la mayoría de los grupos seleccionadores de vid (Aguirrezaba L,F. *et al.* 2008).

En este tabajo se muestran los estudios agronómicos, (relativos a la producción, fertilidad, fenología), enológicos de las características del mosto (grado probable, acidez total,

contenido en ácido málico y ácido tartárico), y de los vinos elaborados (parámetros básicos y características fenólicas).

2. Material y métodos

Los estudios se están desarrollando en una parcela situada en el ayuntamiento de Ribadumia (Pontevedra) subzona Salnés de la D.O. Rías Baixas, cuyas características climáticas responden a un tipo Mediterráneo subhúmedo con tendencia atlántica. La plantación, se estableció entre los años 2006 y 2007, el portainjerto elegido fue 101-14 de Millardet estableciéndose un total 5 clones. El sistema de formación es una espaldera, con un marco de plantación de 2,5 x 1,0 m, el sistema de poda elegido es cordón simple tipo Royat.

Durante las campañas 2011 a 2014 se realizaron estudios de fenología (Baggiolini, 1952), producción, brotación y fertilidad de las yemas siguiendo el protocolo establecido por la O.I.V. (1983-2001)

Todos los clones se vendimiaron en la misma fecha. Y se realizaron microvinificaciones siguiendo el protocolo clásico de elaboración de tintos. Los mostos se inocularon con la levadura 71-B (Lallemand) del tipo *Saccharomyces cerevisiae* var. *Cerevisiae*. Para la determinación de parámetros de mostos se siguieron los métodos de análisis comunitarios aplicables al sector del vino (Reglamento (CEE) 2676/90 de la Comisión).

3. Resultados

En cuanto a los clones en estudio, no se observan diferencias significativas a la hora de alcanzar los diferentes estadios fenológicos, sin embargo es de señalar la tendencia a un adelanto de la brotación para los clones EP-018 y EP-022, de la floración para EP-009 y EP-018, y del envero para EP-009 y EP-022 los más adelantados .

Con respecto a las tasas de brotación, destacar que el porcentaje de brotación de yemas francas se situó en valores del 95,03% no observándose diferencias estadísticamente significativas entre clones, por el contrario, sí se observaron diferencias significativas en la fertilidad de las yemas y pámpanos. El clon EP-009 presentó los valores más altos, tanto en tasa de brotación como en fertilidad de las yemas francas, yemas francas brotadas así como de los pámpano. Por el contrario, los valores más bajos fueron para el clon EP-018 en cuanto a brotación de las yemas y para EP-020 a nivel de fertilidad real y potencial así como para fertilidad de los pámpanos (Tabla 1).

A nivel interanual estos parámetros, muestran diferencias significativas, lo que viene a señalar la importancia de las condiciones climáticas del año para el desarrollo y fertilidad de las yemas. Resaltar que el año 2013 destaca por ser el de menor porcentaje de brotación y el de menor Nº racimos, tanto por yema franca como por yema franca brotada así como por pámpano, de forma contraria, el año 2014 resultó ser el de índices de fertilidad más altos alcanzando.

En cuanto al comportamiento durante estos años, los clones EP-009 y EP-022 se mantienen como los de menor y mayor producción respectivamente mientras que EP-011 y EP-020 tienen un comportamiento más errático, moviéndose entre los valores más altos y más

bajos del año, finalmente, el clon EP-018 resultó tener un comportamiento más próximo a la media.

Tabla 1. Tasas de brotación, fertilidad de las yemas francas y pámpanos y producción durante el periodo 2011-2014.

Clon/año	Clon/año	% Brot	Nº Rac/YF	Nº Rac/YFbrot	NºRac/Pamp	Producción/cepa (Kg)
Media/clon	EP-009	99,29	0,88	0,89	0,86	1,13
	EP-011	95,44	0,56	0,58	0,55	1,71
	EP-018	93,82	0,59	0,62	0,6	1,71
	EP-020	94,09	0,54	0,57	0,55	1,5
	EP-022	95,82	0,83	0,86	0,84	2,58
Media/año	2011	98,17	0,68	0,7	0,63	1,88
	2012	95,05	0,78	0,81	0,8	2,09
	2013	90,97	0,28	0,3	0,3	0,91
	2014	96,19	0,81	0,84	0,84	2,15
Total	Media	95,03	0,63	0,65	0,63	1,74
	Desv. típ.	7,24	0,33	0,33	0,33	0,51674462
	Mínimo	58,33	0	0	0	
	Máximo	100	1,67	1,82	1,82	

En relación a las características del mosto no se observaron diferencias significativas entre clones para los parámetros de pH y grado alcohólico probable en mosto. Destacaron los clones EP-009 y EP-020 en referencia al pH de mosto (valores medios) y los clones EP-009 y EP-022 por mostrar los valores de graduación probable media más altos y bajos respectivamente (Tabla 2). Para los demás parámetros analizados, tanto en mosto como en vino, no se observaron diferencias significativas pero se constatan tendencias que pueden ser de interés a lo hora de seleccionar los clones.

Tabla 2. Parámetros enológicos en mosto durante los años 2011 a 2014 y composición polifenólica de los vinos para los años 2011,2013 y 2014.

Clon	ATM (g/L)	pHM	GRPM (%vol)	TARTM (g/L)	MALICM (g/L)	IPT	Antocianos (mg/L)	Taninos (g/L)	IC
EP-009	6,26	3,54	12,64	4,47	4,10	40,67	502,04	0,93	9,95
EP-011	7,00	3,45	11,39	4,40	5,40	35,67	548,42	0,80	6,44
EP-018	6,93	3,45	11,42	4,43	5,67	32,13	509,08	0,90	7,15
EP-020	7,58	3,41	11,30	4,77	5,80	33,30	463,50	0,60	7,09
EP-022	7,42	3,44	10,96	4,70	5,83	32,10	467,75	0,60	6,44
Media	7,05	3,46	11,51	4,55	5,36	34,77	498,16	0,77	7,42
Desv. típ.	1,21	0,08	1,08	0,78	1,01	7,48	115,15	0,34	2,79
Mínimo	5,40	3,23	9,30	3,50	3,80	23,00	306,25	0,40	2,41
Máximo	9,30	3,60	13,18	6,20	7,0	47,00	716,63	1,50	11,27

ATM: acidez total en mosto; pHM: pH en mosto; GRPM: grado probable en mosto; TARTM: ácido tartárico en mosto; MALICM: ácido málico en mosto; IPT: índice polifenoles totales; IC: intensidad colorante

En relación con la composición fenólica de los vinos obtenidos, no se observaron diferencias significativas. Los valores medios de polifenoles totales (IPT) se situaron en 34,77, los antocianos en 498,16 mg/L, taninos en 0,77 g/L y, finalmente, la intensidad colorante (IC) en 7,42. A nivel individual, destaca el clon EP-009 por mostrar los valores más altos para los parámetros fenólicos analizados, seguido por los clones EP-011 y EP-018, resultando ser de interés para la elaboración de vinos de mayor calidad.

4. Conclusiones

La fertilidad de las yemas y pámpanos así como la producción han sido los parámetros que permiten establecer diferencias significativas entre los clones. Se han encontrado diferencias significativas en la producción, siendo EP-022 fue el que presentó la producción media más alta y, EP-009 el que ofrece la cifra más baja del periodo 2011-2014.

En cuanto a los parámetros enológicos se observaron diferencias significativas en mosto para las variables pH y grado alcohólico probable, aunque es de señalar que EP-009, seguido por los clones EP-011 y EP-018 presentan los valores más altos en relación a su composición fenólica lo que los hace de interés para la elaboración de vinos de mayor calidad.

Las variaciones interanuales de los parámetros estudiados durante el periodo 2011-2014 son realmente significativas lo que aconseja seguir con el estudio del cultivar para testar el comportamiento de los diferentes clones de una manera fiable y ver como se estabilizan en el tiempo lo que supondrá una mayor garantía a la hora de poner los clones certificados en manos del sector vitivinícola.

5. Bibliografía

1. AguirrezabaL,F.; Cibrian, J.F., Sagüés, A.; Suberviola, J. 2008. Evaluación de clones comerciales de seis variedades de vid en Navarra 1995-2002. Fondo de publicaciones del Gobierno de Navarra.
2. Baggiolini, A. 1952. "Les stades reperés dans le developpment annuel de la vigne et leur utilization pratique". Station fed. Essais agric. Lousanne Switzerland.
3. Ruiz, M.2002. La crianza del vino tinto desde la perspectiva vitícola. Ed. Mundi-Prensa y A. Madrid Vicente. Madrid
4. O.I.V. 1983. Codes des caractères descriptifs des variétés et espèces de Vitis. Dedon A. París.
5. O.I.V. 2001. Codes des caractères descriptifs des variétés et espèces de Vitis. Dedon A. París.

6. Agradecimientos

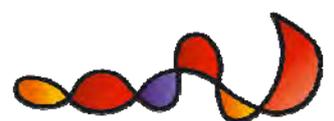
Este trabajo ha sido desarrollado en el marco del Programa de Desenvolvimento Rural (Acción E001-20012-2013-2014).



M

Microbiología

ENOLOGIA2.015
INNOVACIÓN VITIVINÍCOLA



M01 - VARIACIONES DEL PERFIL METABOLÓMICO EN LEVADURAS DURANTE EL PROCESO DE SECADO Y REHIDRATACIÓN

López-Martínez G.¹, Borrull A.¹, Poblet M.¹, Rozès N.¹, Cordero-Otero R.¹

¹Universidad Rovira i Virgili, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Marcel·lí Domingo, 1, 43007, Tarragona, España
ricardo.cordero@urv.cat

RESUMEN:

En este estudio analizamos los metabolitos involucrados en la tolerancia al proceso de secado y rehidratación de tres especies de levadura con diferente tasa de viabilidad a este estrés pero genéticamente emparentadas, *Saccharomyces cerevisiae*, *Naumovia castellii* y *Saccharomyces mikatae*. En *S. mikatae*, la presencia de lisina o glutamina durante la rehidratación incrementa un 20% la tolerancia mientras que durante la deshidratación los niveles de ambos aminoácidos mostraron una reducción significativa.

Palabras clave: deshidratación y rehidratación, viabilidad, metabolómica, levaduras

1. Introducción

La levadura seca activa (LSA) es ampliamente utilizada en la industria alimentaria gracias a su estabilidad genética a temperatura ambiente, reduciéndose así los costes de transporte y almacenamiento. Sin embargo, la pérdida de viabilidad durante el secado y la rehidratación dificulta el desarrollo de un inóculo de calidad. En este estudio, identificamos los compuestos celulares involucrados en el secado/rehidratación de tres especies de levadura que difieren en su tolerancia a la deshidratación, *Saccharomyces cerevisiae*, *Naumovia castellii* y *Saccharomyces mikatae*, a pesar de su proximidad genética. *S. mikatae* pertenece al grupo *sensu stricto*, que incluye especies de levadura estrechamente emparentadas con *S. cerevisiae*; mientras que *N. castelli* pertenecen al grupo *sensu lato* que incluye especies heterogéneas que divergen de *S. cerevisiae* [2].

2. Material y métodos

Las tres especies de levadura, *Saccharomyces cerevisiae* (CECT-1477), *Naumovia castellii* (CECT- 11356) y *Saccharomyces mikatae* (CECT-11823), fueron sometidas al proceso de secado y rehidratación descrito anteriormente por Rodríguez-Porrata *et al.* [4]. La viabilidad celular fue determinada por citometría de flujo (citómetro CyFlow de Partec, Alemania) [4] mediante el uso del kit de determinación de viabilidad LIVE/DEAD (Life Technologies). Los datos fueron analizados posteriormente con el programa FloMax (Quantum Analysis, Alemania). Los efectos en la viabilidad celular por suplementación individual de lisina (1, 2, 5 y 10%), Na₂HPO₄ (2, 5 y 10%), y glutamina (2, 5 y 10%) fueron estudiados durante la rehidratación. La extracción de los metabolitos fue optimizada en base al método de Roessner *et al.* [5]. La rotura de las células en presencia de metanol-agua (1:1 v/v), ribitol (patrón interno) (Sigma, Suiza) y *glass beads* de 0,5 mm, y se llevó a cabo mediante el disruptor bead-

beater (BioSpec Products, EEUU) con cinco ciclos de 1min/beat-beater, seguido de 30s a 4°C. El sobrenadante fue evaporado y las muestras derivatizadas en metoxiamina hidroclicorídica en piridina (Sigma, Japón; Fluka, India) y N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (Sigma, EEUU). La cromatografía de gases se llevó a cabo en base al sistema de GC-MS descrito por Borrull *et al.* [1] con los cambios descritos a continuación. La temperatura del inyector fue 200°C. La temperatura del horno de la columna se inició a 80°C durante 4 min y fue incrementándose primeramente a 200°C a 5°C/min y después a 300°C a 25°C/min, donde se mantuvo durante 7 min. El cuadrupolo del MSD y las temperaturas se mantuvieron a 180°C y 280°C respectivamente. Los datos analíticos del MSD fueron adquiridos por un escáner de ionización electrónica a 70 eV entre 35-650 uma después de un desfase de 4 min. Los valores analizados se expresaron en porcentajes relativos a 1×10^9 CFU después del recuento de células viables antes del secado (AS) y después de rehidratación (DR). Los datos fueron posteriormente analizados estadísticamente mediante el test de Tukey y ANOVA usando el programa estadístico SPSS 20.0 con una significancia establecida a $P \leq 0,05$.

3. Resultados

Entre las tres especies de levaduras evaluadas, *S. cerevisiae* es la que presenta una mayor tasa de viabilidad (100%). Las viabilidades de las otras especies fueron relativas a la obtenida por *S. cerevisiae*, obteniéndose una tolerancia al secado y rehidratación de 60% y 40% en *N. castellii* y *S. mikatae*, respectivamente.

La cuantificación de los metabolitos identificados en el GC-MS para las tres especies de levaduras en las condiciones AS y DR mostraron diferencias en ácidos grasos, ácidos orgánicos y compuestos resultantes de la glicolisis (Fig. 1). Durante el proceso de estrés, el fosfato se incrementó en 1,5 veces en *N. castellii* (Fig. 1). Por el contrario, *S. mikatae* y *S. cerevisiae* disminuyeron el contenido de fosfato entre las dos condiciones entre un 70% y un 30%, respectivamente, observándose que estos valores no se correlacionan directamente con los valores de tolerancia a la deshidratación (Fig. 1). La retención citoplasmática de glicerol por parte de *S. cerevisiae* es la principal respuesta al estrés osmótico, homologable al que sufre la célula durante el secado [3]. La acumulación intracelular de este compuesto en *N. castellii* y *S. cerevisiae* durante la imposición al estrés se incrementó un 50%, mientras que *S. mikatae* se redujo en un 50%, pudiendo ser la razón de la baja viabilidad de esta especie (Fig. 1). La glicólisis es una vía utilizada para convertir la glucosa en piruvato mediante reacciones enzimáticas y posteriormente es convertido en acetil-CoA para iniciar el ciclo de Krebs. Alternativamente, el piruvato actúa como precursor de la síntesis de α -alanina [6], que se incrementó 3 veces en *N. castellii* y 2 veces en *S. cerevisiae* entre las dos condiciones evaluadas, mientras que disminuyó 2 veces en *S. mikatae* (Fig. 1). EL Acetil-CoA puede ser convertido también en ácido cítrico o lípidos y ácidos grasos, tales como el ácido palmítico, el cual durante la deshidratación se incrementó en *N. castellii* y *S. cerevisiae* mientras que disminuyó un 30% en *S. mikatae*. El ácido succínico muestra una variación significativa entre las condiciones AS y DR, cuyos niveles incrementaron en 9 y 2 veces en *N. castellii* y *S. cerevisiae* respectivamente, mientras que *S. mikatae* mantuvo el mismo nivel (Fig. 1). El ácido succínico puede ser convertido a oxaloacetato en el ciclo de Krebs para formar aspartato. La abundancia de ácido aspártico aumentó 13 veces durante la imposición al estrés en *N. castellii* y *S. cerevisiae* mientras que en *S. mikatae* solo lo hizo en 3,5 veces (Fig. 1). El intermediario del ciclo de Krebs 2-oxoglutarato puede ser transaminado a lisina y glutamato para la biosíntesis de otros aminoácidos, como la glutamina, prolina o arginina. Durante el estrés el nivel de lisina en *S. mikatae* disminuyó tres veces, mientras que en *N. castellii* y *S. cerevisiae* se incrementó

en 3 y 2 veces, respectivamente. La glutamina disminuyó 6 veces en *S. mikatae* y 3 veces en *S. cerevisiae* (fig. 1).

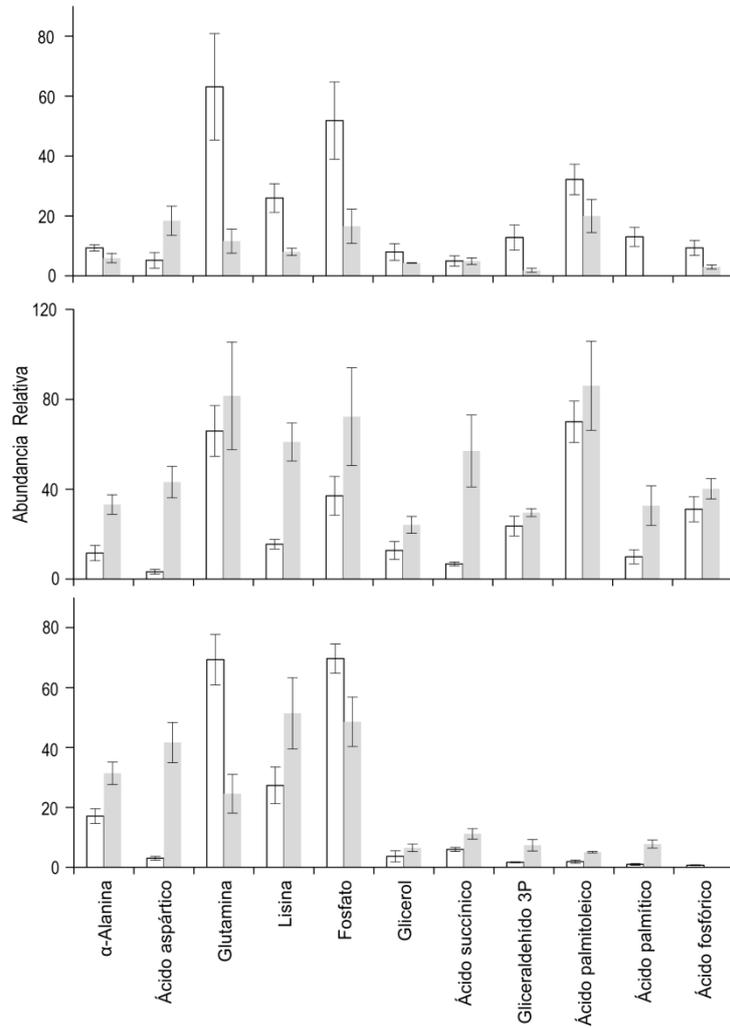


Figura 1. Abundancia relativa de los metabolitos intracelulares en AS (barras blancas) y DR (barras grises) para las tres especies evaluadas. Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes \pm DS.

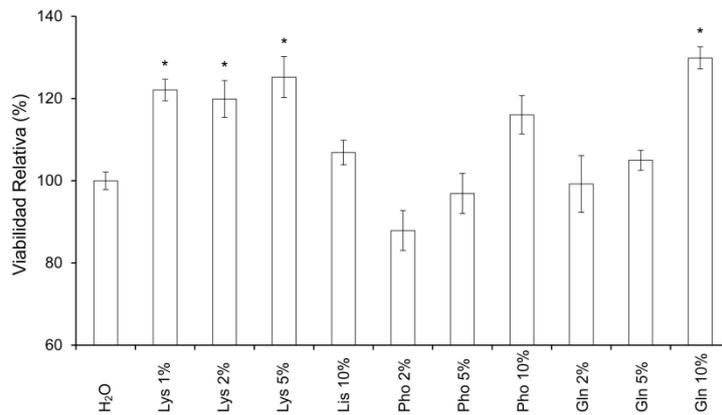


Figura 2. Efecto de la rehidratación en presencia de lisina (Lys), fosfato (Pho), o glutamina (Gln) en la viabilidad celular expresada en porcentaje. Los valores mostrados son el promedio de tres experimentos independientes \pm DS. *Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$) al comparar con la condición H₂O.

Se evaluó la tolerancia a la deshidratación de la especie con menor viabilidad, *S. mikatae*, suplementado las células en la etapa de rehidratación con diferentes concentraciones de lisina, Na₂HPO₄ o glutamina. *S. mikatae* mostró un incremento de la viabilidad en presencia de 1, 2, y 5% de lisina o 10% de glutamina respecto a la rehidratación con agua (Fig. 2). Por el contrario, la suplementación de fosfato incrementó la mortalidad celular en un 30% respecto del control (dato no mostrado).

4. Conclusiones

La comparación del perfil metabólico de las tres cepas evaluadas en las condiciones AS y DR muestran una acumulación de ácido succínico y ácido fosfórico durante el estrés en *N. castellii* que explicaría la baja viabilidad (60%). Además, *N. castellii* junto con *S. cerevisiae* sugieren una actividad de la vía glicolítica y del ciclo de Krebs opuesta a *S. mikatae*, que mostró una reducción en los niveles de los metabolitos secundarios. La presencia de lisina o glutamina durante la rehidratación en *S. mikatae* tiene un efecto positivo en la recuperación de la actividad celular.

5. Bibliografía

1. Borrull, A., López-Martínez, G., Poblet, M., Cordero-Otero, R., Rozès, N. 2014. A simple method for the separation and quantification of neutral lipid species using GC-MS. *In European J. of Lipid Science and Technology*. 117, 274-280.
2. Muller, L. A., McCusker, J. H. 2009. A multispecies-based taxonomic microarray reveals interspecies hybridization and introgression in *Saccharomyces cerevisiae*. *In FEMS Yeast Res.* 9, 143-152.
3. Larsson, K., Ansell, R., Eriksson, P., Adler, L. 1993. A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *In Mol Microbiol.* 10, 1101-1111.
4. Rodríguez-Porrata, B., Carmona-Gutierrez, S., Reisenbichler, A., Bauer, M., Lopez, G., Escote, X., Mas, A., Madeo, F., Cordero-Otero, R. 2012. Sip18 hydrophilin prevents yeast cell death during desiccation stress. *In J Appl Microbiol* 112, 512-525.
5. Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R., Willmitzer, L. 2000. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry. *In Plant J.* 23, 131-142.
6. Pronk, J. T., Steensma, H. Y., van Dijken, J. P. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *In Yeast.* 12, 1607-1633.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2010-22001-C02-02 y AGL2012-40018-C02-01 del Gobierno de España concedidos a los profesores NR y RC, respectivamente. GL y AB agradecen a la Universidad Rovira i Virgili y la Generalitat de Catalunya por las becas predoctorales FI-DGR 1012, AGAUR y 2009BRDI/12/12, respectivamente.

M02 - OBTENCIÓN Y VALIDACIÓN DE UNA CEPA VÍNICA DE *CANDIDA ZEMPLININA* EN FORMA DE LSA

Roca-Domènech G.¹, López-Martínez G.¹, Moliné A.¹, Poblet M.¹, Rozès N.¹, Cordero-Otero R.¹

¹Universidad Rovira i Virgili / Fac. de Enología, Dep. Bioquímica y Biotecnología, Marcel·lí D. 1, 43007, Tarragona, España
ricardo.cordero@urv.cat

RESUMEN:

La diferencia en la cinética de consumo de la glucosa respecto a la fructosa durante la fermentación por parte de *Saccharomyces cerevisiae* resulta en un retraso o parada de la misma. Este problema ha conducido al estudio de la levadura fructofílica del vino como *Candida zemplinina* para su aplicación en el restablecimiento de la proporción óptima glucosa/fructosa del mosto o bien para la eliminación de los azúcares residuales del vino. Quedando supeditada su aplicación de forma general a la disponibilidad de *C. zemplinina* en forma de LSA. En el presente estudio hemos desarrollado un protocolo para la preparación de LSA de *C. zemplinina* que alcanza una viabilidad de hasta un 40%. Además, su desempeño en inóculos mixtos en microvinificaciones resultó en una mayor complejidad organoléptica en comparación con los vinos obtenidos con *S. cerevisiae*.

Palabras clave: Levadura seca activa, viabilidad, *Candida zemplinina*

1. Introducción

La capacidad fructofílica de la levadura vínica *C. zemplinina* puede ser de gran utilidad para la prevención de paradas de fermentación producidas por la sensibilidad de *S. cerevisiae* a fermentar eficientemente mostos donde la fructosa presenta mayor concentración en la proporción fructosa : glucosa [1]. Se mostró que el restablecimiento de este equilibrio mediante la adición de glucosa permitía reactivar la fermentación mediada por cepas de *S. cerevisiae* sensibles, o bien por el mantenimiento del equilibrio mediado por la capacidad fructofílica de *C. zemplinina* [2, 3]. Los vinos producidos con inóculos mixtos *S. cerevisiae/C. zemplinina* presentan un enriquecimiento en acetoína, acetaldehídos, ácido succínico y niveles elevados de glicerol respecto a los producidos únicamente con *S. cerevisiae* [4]. Para lograr que *C. zemplinina* se vuelva una herramienta biotecnológica, tanto para aplicaciones puntuales durante la fermentación o bien para inducir cambios organolépticos del vino, ha de poderse comercializar en formato de Levadura Seca Activa (LSA), reduciéndose así gastos de almacenado y transporte, y asegurando la pureza del inóculo.

Debido a la capacidad fructofílica de *C. zemplinina*, la cual puede ser necesaria en algunos momentos puntuales de la fermentación o para acentuar características organolépticas del vino, se podrían realizar inóculos mixtos de *C. zemplinina* y *S. cerevisiae*. Para que estos inóculos puedan ser una herramienta biotecnológica para los enólogos, deberían poder comercializarse como LVSA (levadura vínica seca activa), formato para el cual los profesionales del sector ya cuentan con las competencias requeridas para su uso.

Consecuentemente, el objetivo de este trabajo es la obtención de un protocolo para obtener una cepa de *C. zemplinina* en formato de LVSA y evaluar su impacto en el perfil organoléptico de un vino elaborado a partir de inóculos mixtos.

2. Material y métodos

Se evaluaron 6 cepas de *C. zemplinina* aisladas de mosto de uva, éstas fueron cultivadas en agitación constante a 100 rpm y a 32°C en YPD e inoculadas con un precultivo a una DO_{600} inicial de 0,250.

Se procedió a la desecación de $5 \cdot 10^7$ células, previamente sonicadas (3 veces durante 3 s con descansos en frío de 4 s), con diferentes concentraciones de trehalosa (5%, 10%, 20% y 30%) durante 20 h con un flujo de aire a 28°C [5]. Transcurridas las 20 h se rehidrataron las células a: 30°C, 40°C y 50°C; durante: 10min, 20min y 30min. Además de rehidratar las células con H₂O se evaluaron la presencia de rafinosa 0,25%, 0,5mM FeSO₄, 1mM ácido ascórbico, 5mM MgSO₄, prolina 10% y sus combinaciones.

La viabilidad celular fue evaluada mediante siembra en YPD, usando un sembrador automático (AES Laboratoire, Francia). Se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (UFC) tras haber sido incubadas a 32°C durante 48 h, mediante el software ProtoCol SR/HR versión 1.27 de Symbiosis (Cambridge, UK).

Las microvinificaciones se realizaron en 1,5 L a partir de mosto concentrado y suplementado con 300 mg·L⁻¹ de nitrógeno asimilable. Al día 4 se había consumido el 50% de los azúcares totales, cuando las fermentaciones fueron complementadas con 50 mg·L⁻¹ de fructosa. Los componentes volátiles principales fueron determinados por el Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología (Zaragoza, España).

3. Resultados

Se evaluó la tolerancia a la deshidratación de 6 cepas de *C. zemplinina* en diferentes puntos de crecimiento para determinar la tasa de viabilidad para cada cepa en diferentes estados fisiológicos (Fig. 1). Todas las cepas evaluadas presentaron perfiles similares de tolerancia a la deshidratación, con células obtenidas entre 16 h y 24 h de cultivo en fase estacionaria. No obstante los resultados aquí presentados corresponden a los obtenidos para la cepa CBS1713, la cual alcanzó el mayor valor de viabilidad una vez sometida al proceso de secado y rehidratación.

Para la cepa *C. zemplinina* CBS1713 se evaluó la viabilidad rehidratando las células entre 30°C y 50°C durante 10 min, 20 min y 30 min (Fig. 2). Se observó una disminución significativa de la viabilidad en los casos en que las células se rehidrataron a 50°C durante 10 min. La mayor viabilidad se obtuvo con células rehidratadas durante 30 min a 30°C. De los suplementos evaluados durante la rehidratación prolina 10% duplicó la viabilidad celular, alcanzándose un 40% (dato no mostrado).

Las microfermentaciones mixtas finalizaron al 9 día de ser inoculadas, cuando las inoculadas con *S. cerevisiae* se extendieron 5 días más (datos no mostrados). Los valores

enológicos obtenidos aproximadamente para las diferentes fermentaciones fueron: etanol 13.5 % vol·vol⁻¹, azúcares residuales 3.2 mg·L⁻¹ y ácido acético 150 mg·L⁻¹.

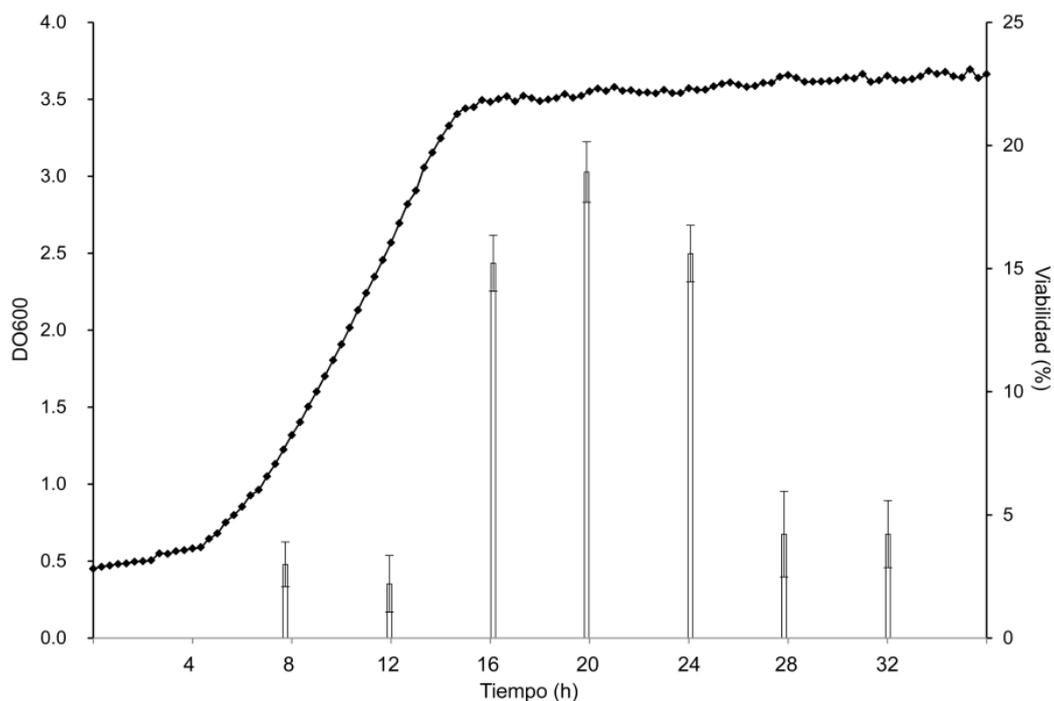


Fig. 1 Viabilidad celular a diferentes puntos de la curva de crecimiento. A título de ejemplo se representan los valores obtenidos para la cepa *C. zemplinina* CBS1713. Resultados de 3 réplicas biológicas \pm DS.

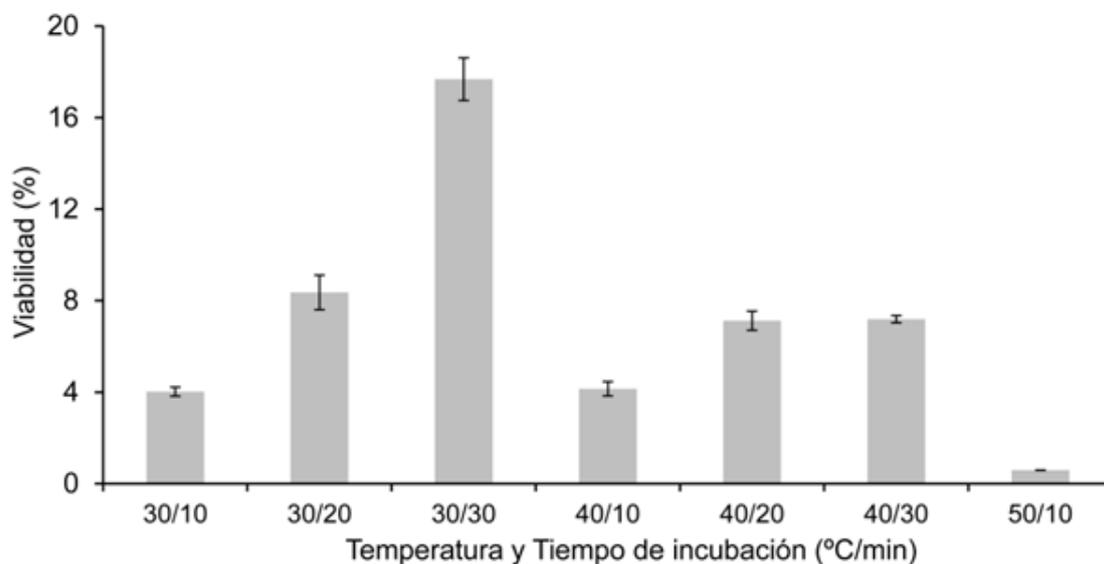


Fig. 2 Viabilidad celular a diferentes condiciones de rehidratación. Resultados de 3 réplicas biológicas \pm DS.

Los perfiles aromáticos obtenidos de las diferentes microfermentaciones mixtas muestran un marcado incremento de acetato de etilo, acetato isoamilo, butirato etilo, hexanoato etilo, octanoato etilo, alcohol isoamílico, metionol, β -feniletanol, ácido butírico, ácido isovaleriánico, ácido hexanoico y ácido octanoico. De los 29 compuestos analizados solamente el acetaldehído de las fermentaciones mixtas presentó un valor tres veces inferior a las inoculadas solamente con *S. cerevisiae*.

Tabla 1 Componentes volátiles producidos durante las fermentaciones mixtas y simples.

	Compuestos	<i>S. cerevisiae</i> + <i>C. zemplinina</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Umbral de percepción
Carbonilos, notas oxidativas y lácticas	Acetaldehído	21.03±5.65	77.24±9.11	0.5
Acetatos, notas frutales y florales	Acetato de etilo	41.10±1.57	4.29±4.30	12.3
	Acetato isoamilo	1.01±0.20	N.D.	0.03
Ésteres etílicos lineales, notas frutales	Butirato etilo	0.20±0.01	N.D.	0.125
	Hexanoato etilo	1.16±0.78	N.D.	0.062
	Octanoato etilo	0.56±0.32	0.15±0.03	0.58
	Decanoato etilo	0.08±0.04	N.D.	0.2
Alcoholes, notas fusel y verdes	Alcohol isoamílico	101.01±3.16	23.09±0.42	30
	Metionol	2.49±0.18	0.30±0.01	1
	β-feniletanol	16.55±2.57	8.22±5.82	14
Ácidos, notas de queso	Ácido butírico	0.76±0.02	0.20±0.01	0.173
	Ácido isovaleriánico	0.73±0.01	0.18±0.01	0.033
	Ácido hexanoico	3.54±0.41	0.32±0.02	0.42
	Ácido octanoico	8.81±0.50	1.32±0.13	0.5

Los valores del umbral de olfacción están estimados en vinos sintéticos. Los valores representados en $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de al menos tres réplicas de fermentación \pm DS.

4. Conclusiones

Se ha podido demostrar que la presencia de prolina durante la rehidratación tiene un efecto positivo en la mejora de la viabilidad celular en la preparación de *C. zemplinina* en forma de LSA. La evaluación de la LSA de *C. zemplinina* en inóculo mixto confirmó el aporte organoléptico positivo de esta levadura al vino aportando notas florales, fusel y de queso.

5. Bibliografía

1. Bisson, L.F., Kunathigan, V. 2003. On the trail of an elusive flux sensor. *Res Microbiol.* 154: 603-610.
2. Berthels, N.J., Cordero Otero, R.R., Bauer, F.F., Pretorius, I.S., Thevelein, J.M. 2008. Correlation between glucose/fructose discrepancy and hexokinase properties in different *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 77: 1083-1091.
3. Magyar, I., Tóth, T. 2011. Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol* 28: 94-100.
4. Ciani, M., Maccarelli, F. 1998. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J Microb Biot* 14: 199–203.
5. Rodríguez-Porrata, B., Carmona-Gutierrez, D., Reisenbichler, A., Bauer, M., López, G., Escoté, X., Madeo, F., Cordero-Otero, R. 2012. Sip18 hydrophilin prevents yeast cell death during desiccation stress. *J Appl Microbiol* 112: 512-25.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen la ayuda del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2012-40018-CO1-01), a la Generalitat de Catalunya por la beca doctoral de GL (FI-DGR 2012 AGAUR) y a la Universidad Rovira y Virgili por la beca doctoral de GR (2014PMF-PIPF-47).

M03 - INCREMENTO DE LA TOLERANCIA AL SECADO DE CEPAS VÍNICAS DE *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*

Gemma Roca-Domènech¹, Gema López Martínez¹, Víctor Tirado¹, Montse Poblet¹, Nicolas Ròzes¹, Ricardo Cordero-Otero¹

¹Universidad Rovira y Virgili, Dpto. Bioquímica y Biotecnología, Campus Sescelades. Marcel·lí Domingo s/n, 43007 - Tarragona, España

ricardo.cordero@urv.cat

RESUMEN:

En este estudio se evalúan diferentes metabolitos durante el proceso de secado y rehidratación para 9 cepas de *Schiz. pombe* y de este modo determinar si estos metabolitos presentan un efecto positivo para asegurar la viabilidad celular antes de su inoculación en mosto. Se observó que la presencia del 10% de trehalosa durante el secado y la rehidratación con una solución 5mM MgSO₄ aumenta la viabilidad hasta un 70% en algunas de las cepas evaluadas.

Palabras clave: Levadura seca activa, viabilidad, *Schizosaccharomyces pombe*

1. Introducción

Actualmente, la mayor parte del vino producido a nivel mundial proviene de mostos inoculados a partir de levaduras vínicas seleccionadas, que a menudo son comercializadas en forma de levadura seca activa (LSA), asegurando así la estabilidad genética durante el almacenado y la pureza e identidad microbiana de la entidad iniciadora de la fermentación del mosto [1].

Por otro lado, inoculaciones mixtas secuenciales del mosto con *S. cerevisiae* y diferentes no-*Saccharomyces* como: *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Candida*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces* y *Torulaspora*, evidencian su capacidad de proporcionar una mayor complejidad aromática, debido a la producción de metabolitos secundarios, tales como glicerol, acetato de 2-feniletilo y acetato de isoamilo [2]. De estos géneros, se muestra especial interés en *Schiz. pombe* por su elevado poder fermentativo, su capacidad de reducir el contenido de ácido glucónico y metabolizar eficientemente el ácido L-málico a etanol y C₂O. En este estudio se desarrolló un protocolo para obtener *Schiz. pombe* en formato de LSA.

2. Material y Métodos

Se evaluaron 9 cepas de *Schiz. pombe* (Sp1 – Sp9), éstas fueron cultivadas en agitación constante a 100 rpm y a 32°C en EMM (Edinburgh Minimal Medium) e inoculadas con un precultivo a una DO₆₀₀ inicial de 0,250.

Se procedió a la desecación de 5·10⁷ células, previamente sonicadas (3 veces durante 3 s con descansos en frío de 4 s), con diferentes concentraciones de trehalosa (5%, 10%, 20% y 30%) durante 20 h con un flujo de aire a 28°C [3]. Transcurridas las 20 h se rehidrataron las células a: 25°C, 30°C, 37°C y 40°C; durante: 5min, 15min, 30min y 45min. Además de

rehidratar las células con H₂O se evaluaron la presencia de rafinosa 0,25%, 0,5mM FeSO₄, 1mM ácido ascórbico, 5mM MgSO₄ y sus combinaciones.

La viabilidad celular fue evaluada mediante siembra en YPD, usando un sembrador automático (AES Laboratoire, Francia). Se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (UFC) tras haber sido incubadas a 32°C durante 48 h, mediante el software ProtoCol SR/HR versión 1.27 de Symbiosis (Cambridge, UK).

Para evaluar la acumulación de ROS se usó dihidroetidio (DHE) realizando el protocolo descrito por López-Martínez *et al.* [4]. La fluorescencia fue cuantificada con el uso de un microscopio de fluorescencia Leica (DM400B, Germany), una cámara digital (Leica DFC300FX) y el Software Leica IM50.

Finalmente, se evaluaron los parámetros biológicos, tiempo de duplicación (TD) y la fase lag (λ), usando los datos obtenidos de las curvas de crecimiento con el modelo de Baranyi y Roberts [5] con el Software MicroFit. Las curvas fueron obtenidas mediante el seguimiento del crecimiento en microplacas con un inóculo inicial de 0,6 DO₆₀₀ durante 24 h a 32°C, con mediciones cada 10 min y agitación en un lector de placas (POLARstar OMEGA).

3. Resultados y Discusión

Se evaluó la tolerancia a la deshidratación de las 9 cepas de *Schiz. pombe* con el protocolo de Rodríguez *et al.* [6]. Se agruparon en tres grupos según su viabilidad celular: Sp3, Sp5 y Sp6 (< 8% de viabilidad); Sp1, Sp4 y Sp7 (8-17 % de viabilidad) y Sp2, Sp8 y Sp9 (>17 % de viabilidad). Luego, se escogieron las cepas Sp2, Sp3 y Sp4 para evaluar el efecto de la temperatura y el tiempo de rehidratación en la viabilidad celular. Se evaluó la viabilidad rehidratando las células entre 20°C y 60°C durante 30 min; y también se evaluaron los tiempos entre 5min y 45min a 37°C (Fig. 1). Se observó una disminución significativa de la viabilidad en los casos en que se incubaron las células a 55°C y 60°C, pero no se observaron diferencias significativas en el rango de 20°C y 50°C (Fig. 1A). Tampoco se observaron diferencias significativas de la viabilidad a diferentes tiempos con una temperatura de 37°C (Fig. 1B). Por ello, a continuación se rehidrataron las células a 37°C durante 5 min.

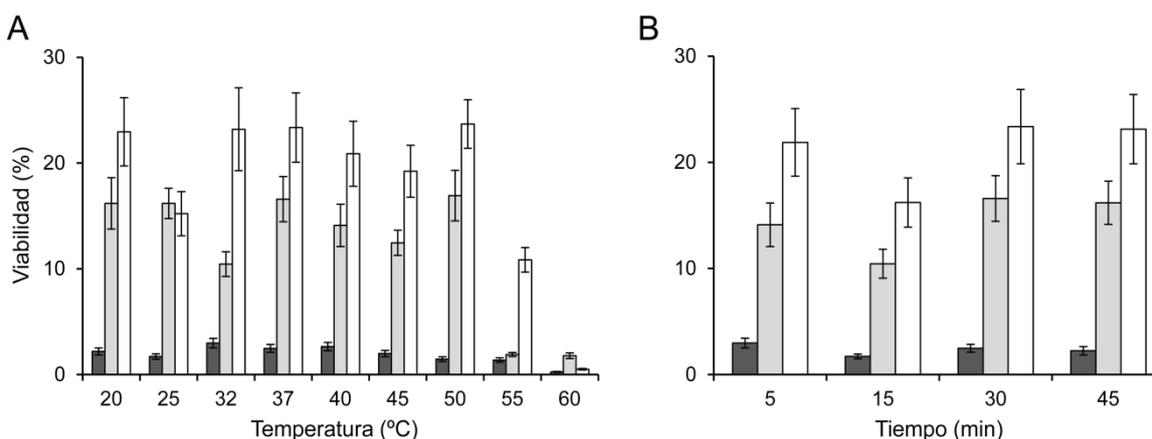


Fig. 1. Efecto de la temperatura y el tiempo de rehidratación vs la viabilidad celular de *Schiz. pombe* (Sp2 barras blancas, Sp3 barras grises y Sp4 barras negras). La viabilidad se encuentra representada como la mediana de 3 réplicas biológicas \pm SD. A) Rehidratación a diferentes temperaturas durante 30 min. B) Rehidratación a 37°C durante diferentes tiempos.

A continuación, se evaluó la viabilidad de las células secadas en presencia de trehalosa 5%, 10%, 20% y 30% o H₂O pura como referencia. Se observó un incremento significativo de la viabilidad en 5% y 10% de trehalosa respecto del control (Fig. 2). Se eligió la condición 10% trehalosa para seguir con el estudio.

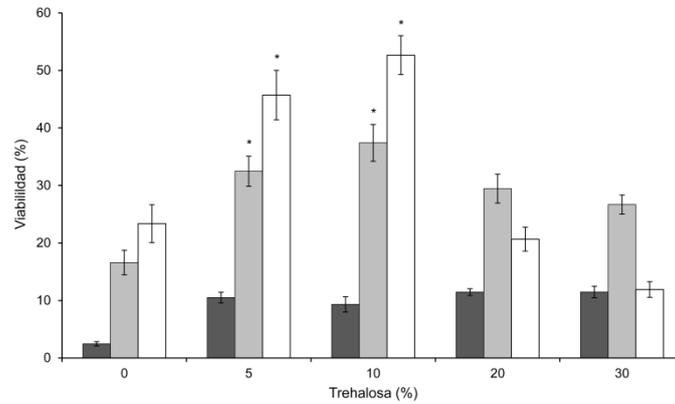


Fig. 2. Efecto de la trehalosa a diferentes concentraciones en la viabilidad celular de Sp2 (barras blancas), Sp3 (barras grises) y Sp4 (barras negras). Resultados de 3 réplicas biológicas \pm SD. * Indica $p < 0.01$ en referencia al 0% de trehalosa.

Además, para la cepa Sp2 se evaluó la rehidratación en presencia de: rafinosa 0,25%, Fe⁺² 0,5mM y MgSO₄ 5mM, que mostraron un incremento en la viabilidad del 15%, 65% y 74% respectivamente, respecto del control. Finalmente, también se evaluó el efecto del antioxidante ácido ascórbico, pero no se observó un incremento significativo de viabilidad (dato no mostrado). Los estudios de rehidratación posteriores se realizaron en MgSO₄ 5mM.

A continuación, se evaluó si la rehidratación con MgSO₄ se correlaciona con la reducción de ROS durante el proceso de rehidratación. Para ello, se realizó el ensayo con dihidroetidio (DHE) tras 5 min de rehidratación con agua, ácido ascórbico 1mM o MgSO₄ 5mM (Fig. 3A). Se observó que después de 1h y 2h en YPD las células rehidratadas en agua o ácido ascórbico presentan 10% de reducción del ROS respecto de las células rehidratadas, 5 min. En cambio, las células rehidratadas en presencia de MgSO₄ presentan una acumulación reducida de ROS a los 5 min. Esto sugiere que MgSO₄ permite que las células prevengan la acumulación de ROS durante la exposición al estrés.

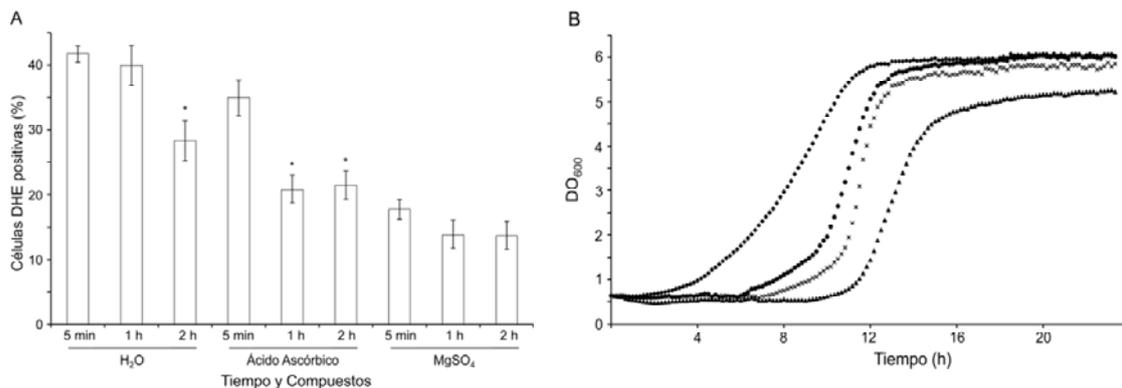


Fig. 3. A) Acumulación de compuestos ROS durante la imposición de estrés. Cuantificación de las células acumulando ROS después de la rehidratación, a los 5min y una vez transcurridas 1h o 2h en YPD. Los valores son resultado de la evaluación de $n = 4$ réplicas biológicas \pm SD y por cada experimento se evaluaron al menos $1 \cdot 10^3$ células. *Diferencias significativas ($p \leq 0.05$) respecto a los valores obtenidos a los 5min de rehidratación de cada compuesto.

B) Curva de crecimiento de células rehidratadas con agua (□), 1mM ácido ascórbico Δ (□), 5mM Mg₂SO₄ (Δ) y el combo 1mM ácido ascórbico + 5mM Mg₂SO₄ (x).

Finalmente, se evaluó la vitalidad celular de las células rehidratadas en presencia de ácido ascórbico para las cuales se observó un aumento de 1,53 veces el tiempo de duplicación (TD) en relación al control agua. Por el contrario, en el caso de MgSO₄ se observó una disminución de 1,51 veces el TD respecto de la condición de referencia y la rehidratación con el mix de ácido ascórbico y MgSO₄ no presentó diferencias significativas en el TD (Fig. 3B). No obstante, las células tratadas con ácido ascórbico presentan una reducción de 2 h de su fase λ y las rehidratadas en presencia MgSO₄ un incremento de 4 h respecto a las rehidratadas en agua. Por lo que se puede concluir que un incremento en la vitalidad, mediante la reducción de la fase λ de las células rehidratadas, no se correlaciona con la reducción del ROS acumulado por las células durante el proceso de secado y rehidratación.

4. Conclusiones

Se ha podido demostrar que la presencia de trehalosa durante el proceso de secado y de Mg durante la rehidratación tiene un efecto sinérgico en la mejora de la viabilidad celular en la preparación de *Schiz. pombe* en forma de LSA. Por otro lado, el Mg promueve una fase λ más larga lo cual es indicador de una actividad celular más lenta.

5. Bibliografía

1. Dupont, S., Rapoport, A., Gervais, P., and Beney, L. 2014. Survival kit of *Saccharomyces cerevisiae* for anhydrobiosis. *Appl Microbiol Biot* 98: 8821-8834.
2. Viana, F., Belloch, C., Vallés, S., and Manzanares, P. 2011. Monitoring a mixed starter of *Hanseniaspora vineae*-*Saccharomyces cerevisiae* in natural must: impact on 2-phenylethyl acetate production. *Int J Food Microbiol* 151: 235-240.
3. Rodríguez-Porrata, B., Carmona-Gutierrez, D., Reisenbichler, A., Bauer, M., López, G., Escoté, X., Madeo, F., Cordero-Otero, R. 2012. Sip18 hydrophilin prevents yeast cell death during desiccation stress. *J Appl Microbiol* 112: 512-25.
4. López-Martínez, G., Rodríguez-Porrata, B., Margalef-Catalá, M., and Cordero-Otero, R. 2012. The STF2p hydrophilin from *Saccharomyces cerevisiae* is required for dehydration stress tolerance. *PLoS One*: 7(3):e33324.
5. Baranyi, J., Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol* 23: 277-294.
6. Rodríguez-Porrata, B., Lopez-Martinez, G., Redón, M., Sancho, M., Mas, A., Rozès, N., Cordero-Otero, R. 2011. Enhancing yeast cell viability after dehydration by modification of the lipid profile. *W J Microbiol Biotech* 27: 75-83.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen la ayuda del Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2012-40018-CO1-01), a la Generalitat de Catalunya por la beca doctoral de GL (FI-DGR 2012 AGAUR) y a la Universidad Rovira y Virgili por la beca doctoral de GR (2014PMF-PIPF-47).

M04 - FACTORES IMPLICADOS EN LA ALTERACIÓN DE LOS VINOS TINTOS POR LEVADURAS *Brettanomyces*

Patrocinio Garijo, Ana Rosa Gutiérrez*, Rosa López, Pilar Santamaría, Lucía González-Arenzana, Isabel López-Alfaro, Teresa Garde-Cerdán, Carmen Olarte, Susana Sanz
Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (Gobierno de La Rioja-CSIC-Universidad de La Rioja).
C/Madre de Dios 53, 26006 Logroño, España. *ana-rosa.gutierrez@unirioja.es

RESUMEN:

Las condiciones climatológicas en las que tiene lugar una vendimia influyen en el estado de las uvas, en el desarrollo de la vinificación, en los microorganismos presentes y, en consecuencia, en las características de los vinos finalmente obtenidos. Una de las principales problemáticas que pueden ocurrir en los vinos tintos es su alteración por levaduras de la especie *Brettanomyces bruxellensis*. En este trabajo se analizaron 100 vinos tintos jóvenes de una campaña climatológicamente conflictiva (2013), y se compararon con 100 vinos de una campaña normal (2012). Se encontraron diferencias significativas en algunos parámetros analíticos y también en la incidencia y desarrollo de levaduras alterantes del género *Brettanomyces*, que fue mayor en la campaña de 2013. Algunos vinos en los que *Brettanomyces* se encontraba en niveles superiores a 10^2 ufc/ml, no desarrollaron carácter "Brett" al someterlos a un test odorimétrico. Esto indicaría que la contaminación de un vino con esta levadura no es el único factor determinante de la alteración. La existencia en los vinos de sustancias susceptibles de ser transformadas en compuestos responsables del carácter "Brett", y/o la presencia de clones de *Brettanomyces* capaces de sintetizarlos, podrían ser importantes. En dicha prueba odorimétrica, los vinos que desarrollaron la alteración presentaron valores superiores de pH, Ac. volátil y Azúcares, así como menor Grado alcohólico que los vinos que no la desarrollaron. Puesto que la contaminación por *Brettanomyces* no es fácilmente evitable, especialmente en campañas conflictivas, el control del carácter "Brett" debe realizarse mediante medidas que prevengan la multiplicación de dichas levaduras. Pero también se debería seguir investigando sobre la importancia que compuestos minoritarios y clones de *Brettanomyces* presentes en un vino tienen en el desarrollo de la alteración.

Palabras clave: *Brettanomyces*, campañas conflictivas, vinos tintos

1. Introducción

Las condiciones climatológicas reinantes durante una vendimia afectan a las características de las uvas, a los microorganismos presentes y al desarrollo de la vinificación y, en consecuencia, a las características de los vinos obtenidos. Vendimias conflictivas, realizadas en condiciones climatológicas no favorables, pueden presentar problemas en la calidad de la uva y exigen a las bodegas la aplicación de tecnologías que intenten paliar el descenso en la calidad de la materia prima y obtener vinos que cumplan los requisitos exigidos.

Uno de los principales problemas que se puede presentar en los vinos es el desarrollo de *Brettanomyces*, ya que esta levadura está implicada en el deterioro del vino al provocar cambios organolépticos en el vino debidos a la aparición de olores fenólicos, denominados carácter "Brett" (6). La presencia de *Brettanomyces* en vinos es un problema de importancia internacional, ya que todas las regiones vinícolas están afectadas en mayor o menor medida. Además, las importantes repercusiones económicas que supone la contaminación de vinos con *Brettanomyces/Dekkera*, hacen del control de estos microorganismos el mayor reto de la

enología moderna (7, 8). Sin embargo, a pesar de la información existente hasta la fecha, aún no es posible establecer qué factores están realmente implicados en la aparición de carácter “Brett” en los vinos. Un mayor conocimiento de los factores que determinan si vinos contaminados por *Brettanomyces* desarrollan alteración es esencial para establecer el origen del deterioro de un vino. Este conocimiento es especialmente necesario en las vinificaciones conflictivas en las que son mayores los riesgos de contaminación y proliferación de *Brettanomyces* y la aparición de vinos defectuosos.

El objetivo de este trabajo es estudiar la incidencia de *Brettanomyces* en vinos correspondientes a una de las campañas más conflictivas en la D.O.Ca. Rioja de los últimos años y los factores que pudieran estar implicados en la aparición de este carácter “Brett”.

2. Material y métodos

El estudio se realizó durante la campaña de 2013 con 100 vinos tintos jóvenes que acababan de finalizar las fermentaciones alcohólica y maloláctica. Los vinos procedían todos de bodegas de la D.O.Ca. Rioja y se compararon con 100 vinos tintos jóvenes de la cosecha del 2012 de la misma procedencia. Los análisis químicos realizados a los vinos se llevaron a cabo mediante los métodos recogidos en el Reglamento CEE nº 2676/1990. Para el Análisis por qPCR se utilizó el ETS Scorpions Systems. Para la identificación y cuantificación se utilizó el termociclador Smart cycler II (Cepheid) y marcadores fluorescentes. El análisis Odorimétrico se llevó a cabo inoculando un caldo de enriquecimiento selectivo (3) con el vino, incubando a 30°C durante 10 días y monitorizado por análisis olfativo periódico, registrando los días necesarios en detectar aroma a “Brett” característico.

3. Resultados

El año 2013 resultó ser una campaña conflictiva. Hubo retrasos en la maduración y en la vendimia, y se presentaron problemas sanitarios en la uva y dificultades durante la vinificación que determinaron las características de los vinos de esa campaña. De hecho, los vinos del 2013 presentaron diferencias estadísticamente significativas con los vinos correspondientes al 2012 (campaña sin problemas sanitarios y con fermentaciones normales) para los parámetros pH, acidez total, ácido málico, contenido en azúcares reductores, grado alcohólico, sulfuroso libre, Intensidad Colorante, Índice de Polifenoles Totales y extracto seco.

Cuando se consideran como positivos los vinos en los que se detecta *Brettanomyces* mediante qPCR, fueron 47 las muestras positivas en el 2013, cifra notablemente superior a la registrada en 2012 que fue sólo de 27. Las mayores dificultades en maduración y vinificación registradas de la campaña del 2013 justificarían el mayor número de muestras con presencia de *Brettanomyces*, e indicarían que la calidad de la uva y el desarrollo de las fermentaciones podrían ser factores muy relacionados con la presencia de estas levaduras en los vinos (4). Señalar igualmente que los vinos del 2013 tuvieron un contenido de SO₂ libre significativamente inferior a los vinos del 2012.

Al considerar el nivel de contaminación y estimar como positivas las muestras con recuentos de *Brettanomyces* superiores a 10² ufc/ml mediante qPCR, el número de positivas se redujo hasta 45 en 2013. Sin embargo, en el 2012 sólo 5 de las 100 muestras presentaron niveles de contaminación por encima de 10² ufc/ml. Estos resultados indican que, efectivamente, en campañas sanas y salvo en vinos con problemas, no sólo la frecuencia de

vinos contaminados por *Brettanomyces* es baja sino que, además, la presencia de esta levadura no llega a alcanzar poblaciones que puedan originar defectos. Sin embargo, en añadas difíciles la incidencia de *Brettanomyces* es mayor y además los recuentos son elevados. Los 45 vinos positivos de 2013 tuvieron un valor de pH ligeramente inferior al de las muestras consideradas como negativas. La acidez volátil también presentó valores más elevados en los vinos positivos frente a los negativos, lo que podría indicar una alteración incipiente de estos vinos. Para el resto de los parámetros químicos analizados, los vinos con niveles de *Brettanomyces* superiores a 10^2 ufc/ml por qPCR fueron indistinguibles de los vinos con poca o ninguna presencia de esta levadura.

Finalmente, al aplicar el método odorimétrico en los vinos de 2013, el número de positivos se redujo drásticamente a 13. Esta disminución podría explicarse por las características de los métodos de detección empleados. Así, la qPCR contabiliza el ADN de todas las células de *Brettanomyces* presentes, ya estén vivas, muertas o se encuentren en estado VBNC, así como clones de esta especie incapaces de producir etilfenoles. Por su lado, el método odorimétrico sólo detecta como positivos los vinos que presentan *Brettanomyces* vivas y capaces de producir etilfenoles. De las 13 muestras consideradas positivas por el método odorimétrico, 12 de ellas presentaron, efectivamente, recuentos claramente superiores a 10^2 ufc/ml por qPCR. Sin embargo, hubo una muestra que, siendo positiva por el criterio odorimétrico, los recuentos por PCR no alcanzaron las 10^2 ufc/ml. Además, también se observó que vinos con altos recuentos en *Brettanomyces*, no desarrollaron carácter "Brett". Este hecho parece indicar que la existencia de altas poblaciones de *Brettanomyces* no siempre se traduce en la aparición de defectos sensoriales y que otros factores podrían estar implicados. De hecho distintos clones de *Brettanomyces* presentan diferente capacidad en la producción de etilfenoles (1). Por otro lado la cantidad y naturaleza en el vino de compuestos minoritarios susceptibles de ser transformados por *Brettanomyces* en compuestos responsables de la aparición de olores anómalos, podría ser otro factor de influencia (2).

Los vinos clasificados como positivos con el criterio odorimétrico presentaban unos valores de pH inferiores a los vinos que no desarrollaron este carácter, así como mayores valores de acidez volátil. También presentaron menores niveles de grado alcohólico mientras que el contenido en azúcares reductores fue superior y, consecuentemente, una densidad mayor que en los vinos negativos. Los vinos del 2013 positivos presentaron un contenido inferior en SO_2 que los considerados negativos, lo que podría señalar la influencia del SO_2 en la presencia y desarrollo de *Brettanomyces* (5). Por otra parte, indicar que aunque en este estudio los vinos clasificados como positivos no presentaron diferencias significativas en los niveles de polifenoles totales, sería necesario profundizar en la composición de estos componentes puesto que son los precursores de los etilfenoles.

4. Conclusiones

Las condiciones climatológicas en las que tiene lugar una campaña influyen en el desarrollo de la vinificación y, a su vez, en las características de los vinos finales obtenidos. Así, los vinos de la campaña conflictiva del 2013 fueron marcadamente diferentes a los de la campaña del 2012, que había transcurrido con normalidad. Las diferencias se reflejaron no sólo en parámetros analíticos sino también en la incidencia y desarrollo de *Brettanomyces*, que resultó mucho mayor en la campaña de 2013. Por lo tanto, campañas complicadas exigen una mayor atención al desarrollo de *Brettanomyces* y la aparición de carácter "Brett". Al comparar el número de vinos en los que *Brettanomyces* está presente, incluso a niveles superiores a 10^2 ufc/ml, con los que muestran carácter "Brett" en el test odorimétrico, se deduce que la

contaminación de un vino con esta levadura no es el único factor determinante de la alteración. De hecho, se han encontrado vinos con elevados recuentos que resultaron negativos en el test odorimétrico.

En este estudio, los vinos clasificados como positivos en carácter "Brett" por odorimetría presentaron valores ligeramente inferiores de pH, pero superiores de acidez volátil, azúcares reductores y densidad así como menor grado alcohólico que los vinos negativos. Sin embargo, no se encontraron diferencias en el contenido en polifenoles totales, si bien este resultado no significa necesariamente que la composición de esta fracción fenólica fuera la misma.

Puesto que la contaminación por *Brettanomyces* de los vinos no parece ser fácilmente evitable, el control del desarrollo del carácter "Brett" debería igualmente buscarse a través de los compuestos minoritarios del vino. Así, además de medidas tecnológicas para prevenir la contaminación, desarrollo y crecimiento de *Brettanomyces*, resultaría necesario controlar las prácticas enológicas que influyen en la composición de la fracción fenólica.

5. Bibliografía

1. Conterno, L., Joseph, C.M.L., Arvik, T.J., Hening-Kling, T., Bisson, L.F., 2006. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 139-147.
2. Coulon, J., Perello, M.C., Lonvaud-Funel, A., De Revel, G., Renouf, V., 2010. *Brettanomyces bruxellensis* evolution and volatile phenols production in red wines during storage in bottles. *J. Appl. Microbiol.* 108, 1450-1458.
3. Couto, J.A., Barbosa, A., Hogg, T., 2005. A simple cultural method for the presumptive detection of the yeast *Brettanomyces/Dekkera* in wines. *Lett. Appl. Microbiol.* 41, 505-510.
4. Garijo, P., González-Arenzana, L., López-Alfaro, I., Garde-Cerdán, T., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A.R., 2015. Analysis of grapes and the first stages of vinification process in wine contamination with *Brettanomyces bruxellensis*. *Eur. Food Res. Technol.* 240, 525-532.
5. Laforgue, R., Lonvaud-Funel, A., 2012. Hydroxycinnamic acid decarboxylase activity of *Brettanomyces bruxellensis* involved in volatile phenol production: relationship with cell viability. *Food Microbiol.* 32, 230-234.
6. Licker, J.L., Acree, T.E., Henick-Kling, T., 1998. What is "Brett" (*Brettanomyces*) flavor? A preliminary investigation, in: Waterhouse, A.L., Ebeler, S.E. (Eds.), *Chemistry of Wine Flavor*. Am. Chemical Society, Washington DC., pp. 96-115.
7. Wedral, D., Shewfelt, R., Frank, J. 2010. The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT- Food Sci. Technol.* 43, 1474-1479.
8. Zuehlke, J.M., Petrova, B., Edwards, C.G., 2013. Advances in the control of wine spoilage by *Zygosaccharomyces* and *Dekkera/Brettanomyces*. *Ann. Rev. Sci. Technol.* 4, 57-78.

6. Agradecimientos

Este estudio se ha realizado con ayuda del Gobierno de La Rioja, (Proyectos PR-08-12 y PR-07-13), de la Universidad de La Rioja-Banco Santander (PROFAI 13/02) y del INIA (RTA 2013-00053-C03-03).

M05 - EFECTO DE LA ADICIÓN DE NUTRIENTES DE LEVADURA EN LA COMPOSICIÓN FINAL DE VINOS AIRÉN

E. García Romero¹, M. Fernández González^{2,3}, S. Gómez Alonso^{2,3}, J.M. Heras Manso⁴
P.M. Izquierdo Cañas^{1,2}

¹ Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha (IVICAM). Crta. Toledo-Albacete s/n. 13700, Tomelloso (CR).

² Parque Científico y Tecnológico de Castilla-La Mancha, Paseo de la Innovación, 1, 02006 Albacete.

³ IRICA, UCLM, Avda. Camilo José Cela s/n 13071 CR

⁴ Lallemand Península Ibérica, Tomás Edison, 4, 28521 Madrid.

estebang@jccm.es

RESUMEN:

Deficiencias en nitrógeno de los mostos, vitaminas o factores de crecimiento son causa de ralentizaciones, paradas y/o una producción excesiva de SH₂ en fermentación. En este trabajo se ha estudiado el empleo de fosfato diamónico y los nutrientes Fermaid® E y Fermaid® AT (Lallemand) en fermentación alcohólica y su impacto sobre la calidad de los vinos. La evolución de la fermentación alcohólica en los vinos Fermaid® E fue más lenta. En cuanto a composición nitrogenada se observó mayor concentración de aminoácidos en los vinos que habían sido suplementados con amonio. Además, estos vinos presentaron mayor acidez total. En composición volátil, los vinos Fermaid® E y AT contenían más alcoholes bencénicos, terpenos, norisoprenoides y compuestos furánicos, y menos alcoholes lineales. Sensorialmente los vinos Fermaid® E destacaron por mayor intensidad aromática, más frescos, complejos, persistentes y afrutados en boca.

Palabras clave: Fermentación alcohólica, Nutrición, Composición vinos.

1. Introducción

Una adecuada nutrición de las levaduras durante la fermentación alcohólica (FA) reduce el riesgo de fermentaciones lentas o paradas y es esencial para una fermentación sana evitando contaminaciones y proliferación de microorganismos no deseados. La composición en nitrógeno de los mostos de uva afecta el crecimiento, al metabolismo de la levadura, la rapidez y la finalización de la FA. El mosto de uva es un medio nutritivo completo, aunque en ocasiones se encuentran carencias en compuestos nitrogenados. Las deficiencias de nitrógeno son causa de las ralentizaciones o paradas de la FA [1]. Una concentración por debajo de 140 mg/L de nitrógeno asimilable dificulta la fermentación [2]. Para evitar estos problemas se añaden suplementos nutricionales.

Existen distintas posibilidades de nutrición de las levaduras durante la fermentación alcohólica según la procedencia del nitrógeno utilizado. Fuentes de nitrógeno 100% inorgánico

como sales de amonio (fosfato diamónico (DAP) y/o sulfato diamónico (DAS)), que se asimilan muy rápidamente y tienen una influencia directa sobre la biomasa debido al aumento del crecimiento durante la fase exponencial. Preparaciones compuestas por nitrógeno inorgánico y nitrógeno orgánico (partes de levadura inactiva ricas en nitrógeno α -amino), que combinan los efectos del nitrógeno inorgánico y orgánico para el crecimiento y la fermentación de levaduras. Otras preparaciones o nutrientes, denominados complejos, mezclan nitrógeno inorgánico y orgánico, junto con otros nutrientes esenciales y biofactores, vitaminas (ácido pantoténico, biotina, ácido fólico, riboflavina y tiamina) y minerales esenciales (Magnesio, Manganeso, Zinc), así como factores de supervivencia (ácidos grasos poliinsaturados y esteroides).

El nitrógeno orgánico es asimilado más lentamente que el nitrógeno inorgánico y ello, previene los picos de la actividad fermentativa y por tanto limita los picos de temperatura.

En este trabajo se ha estudiado el efecto del empleo de distintos tipos de nutrientes para la levadura durante la FA y su impacto sobre la calidad de los vinos.

2. Material y métodos

2.1. Elaboraciones

Durante la vendimia 2013 se elaboraron vinos blancos de la variedad Airén en la bodega experimental del IVICAM. Tras el estrujado y prensado de las uvas, el mosto fue distribuido uniformemente en 9 depósitos de 100 L cada uno. La levadura empleada para llevar a cabo la FA fue Enoferm M2[®] en dosis de 20 g/HL. En todos los casos los nutrientes se añadieron en dosis de 30 g/HL a 1/3 de la FA (aproximadamente 1060 de densidad). Los nutrientes empleados fueron: Fosfato diamónico y los nutrientes complejos Fermaid[®] E y Fermaid[®] AT (Lallemand). La única diferencia entre estos dos últimos es que el nitrógeno inorgánico de Fermaid[®] E está formado por una mezcla de DAP y DAS, mientras que el Fermaid[®] AT solo contiene DAP. La temperatura de fermentación fue de 18 °C y en todos los casos se realizó el descube a 995 de densidad. Acabada la FA los vinos fueron trasegados y sulfitados. Finalmente se estabilizaron y filtraron antes de su embotellado.

2.2. Análisis de los vinos

Los parámetros fisicoquímicos habituales en vinos se analizaron de acuerdo con los métodos oficiales de la Organización Internacional de la Viña y el Vino [3]. Los compuestos volátiles se determinaron por cromatografía de gases [4] y los aminoácidos por HPLC [5].

2.3. Análisis sensorial

Se realizó una prueba triangular y el análisis sensorial descriptivo de los vinos por un panel de cata formado por 10 catadores, utilizando la norma ISO 11035.

3. Resultados

3.1. Evolución de la fermentación alcohólica

En los vinos Fermaid[®] E la evolución de la FA fue algo más lenta que en los vinos fosfato diamónico y Fermaid[®] AT. En todo caso las diferencias son mínimas y sin importancia práctica.

3.2. Composición nitrogenada

En la **Tabla 1** se presenta la concentración de amonio y aminoácidos del mosto inicial, de los vinos finales y la concentración añadida con cada uno de los nutrientes. En la fermentación se consume la práctica totalidad del amonio presente (natural y añadido) y entre 200-160 mg/L de aminoácidos. El contenido en aminoácidos tras la fermentación fue mayor en los vinos fosfato diamónico, ya que tienen más amonio y consumen éste antes que los aminoácidos disponibles, al ser más fácilmente asimilable por las levaduras. El contenido final en amonio fue similar en los tres casos.

Tabla 1: Compuestos nitrogenados

	Amonio	Aminoácidos
Mosto inicial (mg/L)	12,02	332,37
Nutriente añadidos		
Fosfato diamónico (mg/L)	23,76	
Fermaid E (mg/L)	15,53	4,71
Fermaid AT (mg/L)	11,96	11,74
Vinos finales		
Vino Fosfato diamónico (mg/L)	0,78 ± 0,04	170,75 ± 14,82 ^b
Vino Fermaid E (mg/L)	0,76 ± 0,02	148,02 ± 2,31 ^{ab}
Vino Fermaid AT (mg/L)	0,71 ± 0,15	130,20 ± 26,05 ^a

3.3. Análisis físico-químicos, compuestos volátiles

Los resultados obtenidos en los vinos se presentan en la **Tabla 2**. Los vinos fosfato diamónico difieren significativamente, con una mayor acidez total, con respecto a los vinos en los que se adicionó Fermaid® E y Fermaid® AT, sin embargo el pH no sigue la lógica correspondencia inversa con la acidez y por el contrario los vinos suplementados con Fermaid AT presentaron la acidez total y el pH más bajo. También se observa un aumento de la producción de metabolitos secundarios (ácido succínico y glicerina) al añadir Fermaid® E y Fermaid® AT.

Tabla 2: Parámetros físico-químicos y compuestos volátiles

	Fosfato diamónico	Fermaid® E	Fermaid® AT
Grado alcohólico (% v/v)	12,29 ± 0,01 ^b	12,32 ± 0,01 ^c	12,26 ± 0,01 ^a
Acidez total (g/L)	5,75 ± 0,09 ^b	5,66 ± 0,00 ^a	5,58 ± 0,03 ^a
pH	3,57 ± 0,05 ^b	3,54 ± 0,04 ^{ab}	3,50 ± 0,01 ^a
Acidez volátil (g/L)	0,34 ± 0,04	0,32 ± 0,04	0,31 ± 0,05
Ácido succínico (g/L)	0,20 ± 0,01 ^a	0,23 ± 0,04 ^a	0,27 ± 0,02 ^b
Glicerina (g/L)	5,71 ± 0,13	5,99 ± 0,16	6,13 ± 0,42
Acetatos (mg/L)	48,15 ± 15,51	51,19 ± 7,67	38,59 ± 16,25
Esteres etílicos (mg/L)	11,22 ± 0,47	12,85 ± 1,89	12,59 ± 0,81
Alcoholes lineales (mg/L)	264,83 ± 40,71	258,49 ± 21,97	237,15 ± 6,77
Terpenos (µg/L)	45,19 ± 12,68	83,66 ± 30,81	86,71 ± 24,29
Alcoholes C6 (mg/L)	0,54 ± 0,39	0,78 ± 0,22	0,62 ± 0,07
Alcoholes bencénicos (mg/L)	7,09 ± 1,76 ^a	14,89 ± 4,94 ^b	16,54 ± 1,69 ^b
Norisoprenoides (µg/L)	5,53 ± 1,92 ^a	8,16 ± 1,18 ^b	9,29 ± 0,15 ^b
Fenoles volátiles (mg/L)	2,59 ± 0,75 ^a	3,58 ± 1,59 ^a	5,22 ± 0,29 ^b
Compuestos furánicos (µg/L)	2,65 ± 0,36 ^a	15,87 ± 9,92 ^b	13,09 ± 0,25 ^b

En la composición volátil, se ha observado mayor contenido en alcoholes bencénicos, norisoprenoides y compuestos furánicos, con diferencias estadísticamente significativas en los vinos Fermaid® E y Fermaid® AT. También se observó mayor contenido en terpenos y alcoholes C6 y menor contenido alcoholes lineales en estos vinos, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. La mayoría de estos compuestos se encuentran en forma libre y como glicósidos y su aumento puede ser debido a una mayor actividad de las enzimas β -glucosidasas de las levaduras.

3.4. Análisis sensorial

En las pruebas triangulares sólo se observaron diferencias significativas entre los vinos en los que se añadió fosfato diamónico y el nutriente Fermaid® E. Los resultados del análisis sensorial descriptivo mostraron que los vinos Fermaid® E tenían en la fase olfativa con una mayor intensidad aromática con respecto a los vinos en los que se añadió fosfato diamónico. Además los vinos Fermaid® E destacaron por ser más frescos y con mayor duración en la fase gustativa y más complejos, persistentes y afrutados. Por el contrario los vinos suplementados con fosfato diamónico se evaluaron con mayor intensidad a fruto seco.

4. Conclusiones

Una adecuada nutrición nitrogenada es esencial para un correcto desarrollo de la FA, pero se ha demostrado que también es importante el tipo de nutriente empleado. La elección entre sales de amonio o un nutriente complejo modifica el perfil del vino final, tanto desde el punto de vista de la composición química como de sus cualidades sensoriales.

5. Bibliografía

1. Beltrán, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozés, N., Más, A., Guillamón, J. M. 2005. Influence of the timing of nitrogen addition during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *In: J. Agric. Food Chem. American Chemical Society.* 53, 996-1002.
2. Bely, M., Sablayrolles, J. M., Barre, P. 1990. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *In: J. Ferment. Bioeng. Elsevier.* 70, 246-252.
3. OIV Organización Internacional de la Viña y el Vino 2011. Compendium of international methods of wine and must analysis.
4. Izquierdo Cañas, P. M., García, E., Gómez, S., Palop, M. Ll., 2008. Changes in the aromatic composition of Tempranillo wines during spontaneous malolactic fermentation. *In: Journal of Food Composition Analysis. Elsevier.* 21, 724–730.
5. Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutierrez, I., García-Romero, E. 2007. Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino Acids, and amonium ion as aminoenone derivates in wine and beer samples. *In: J. Agric. Food Chem. American Chemical Society.* 55, 608-613.

6. Agradecimientos

P. M. Izquierdo Cañas, S. Gómez Alonso y M. Fernández González agradecen al Fondo Social Europeo y a INCRECYT la financiación de su contrato y a Lallemand España la financiación de este proyecto de investigación.

M06 - CULTIVOS MIXTOS DE *Saccharomyces cerevisiae*: IMPLANTACIÓN Y CALIDAD DE LOS VINOS OBTENIDOS

E. García Romero*¹, M. Fernández-González^{2,3}, S. Gómez Alonso^{2,3}, P. M. Izquierdo Cañas^{1,2}, A. Mena Morales³

¹ Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha. Crta. Toledo-Albacete s/n. 13700, Tomelloso (Ciudad Real).

² Parque Científico y Tecnológico de Castilla-La Mancha, Paseo de la Innovación, 1, 02006 Albacete.

³ IRICA, UCLM, Avda. Camilo José Cela s/n 13071 CR

estebang@jccm.es

RESUMEN:

Durante los últimos años los cultivos mixtos de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o de *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces* se han aplicado con buenos resultados para mejorar las características aromáticas del vino. Con el fin de conocer el dominio del proceso y la competencia entre cepas, se ensayaron dos cepas de *S. cerevisiae* comerciales (A y B) inoculadas individualmente o en forma de cultivo mixto (AB) en mostos Airén en bodega experimental. Los resultados mostraron que los porcentajes de implantación para la levadura A fueron del 65-70%, y para B del 35-40%. En el caso de los cultivos mixtos estos porcentajes disminuyeron considerablemente, siendo la presencia de A del 35-40% y de B sin representación.

Palabras clave: cultivos mixtos, levadura, dominio de cepas, *Saccharomyces*, vino

1. Introducción

La obtención de vino a partir de mosto de uva es un proceso complejo que implica la participación de diferentes microorganismos siendo *S. cerevisiae*, junto con otros géneros y especies de levaduras, la principal responsable de la fermentación alcohólica. Para fermentar el mosto, existen dos posibilidades, bien llevar a cabo una fermentación natural o espontánea donde se deja evolucionar la propia microbiota del mosto, o bien lo que se conoce como fermentación inoculada, donde se potencia la imposición de una determinada cepa de *S. cerevisiae* mediante su inoculación en forma de levadura seca activa (LSA), con el fin de controlar mejor las fermentaciones, evitar incidentes organolépticos y conseguir una calidad homogénea añadida tras añada.

Durante los últimos años los cultivos mixtos de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o de *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces* se han aplicado con buenos resultados para mejorar las características aromáticas del vino [1, 2]. Además de tener en cuenta las posibles interacciones entre los componentes del cultivo iniciador mixto, resulta imprescindible determinar la influencia de la microbiota autóctona en la implantación de dicho cultivo. De hecho, la implantación de un cultivo iniciador, aunque se trate de una cepa comercial de *S. cerevisiae* inoculada en forma de LSA, no está en absoluto garantizada. Diversos estudios han demostrado que varias cepas de esta levadura, inoculadas como cultivos iniciadores, no son capaces de competir con éxito frente a las cepas indígenas, no siendo por tanto las responsables de la fermentación alcohólica [3, 4]. Esta situación tiene consecuencias prácticas muy importantes, ya que el coste económico que supone la inoculación de LSA no va acompañado de un control real de la fermentación.

Por ello en este trabajo, se han ensayado dos cepas de *S. cerevisiae* comerciales (A y B) inoculadas individualmente o en forma de cultivo mixto (AB) en mostos Airén en bodega experimental, con el fin de conocer la dominancia o no del proceso, la competencia entre cepas, y la calidad de los vinos obtenidos.

2. Material y métodos

Durante la vendimia 2014 se elaboraron vinos blancos de la variedad Airén en la bodega experimental del IVICAM. Tras el estrujado y prensado de las uvas, el mosto fue distribuido uniformemente en 9 depósitos de 50 L cada uno. Tres de ellos se inocularon con la levadura comercial A, a una dosis de 20 g/HL, otros 3 con la levadura B también a una dosis de 20g/HL y los tres últimos depósitos se inocularon con 10g/HL de la levadura A y 10g/HL de la levadura B. Diariamente se controló la temperatura de fermentación que fue de 18°C y la densidad, realizando el descube a 995 g/L. Una vez acabada la fermentación alcohólica los vinos fueron trasegados y sulfitados. Finalmente se estabilizaron y filtraron antes de su embotellado.

Se tomaron muestras de mosto-vino a mitad (F1) (densidad 1060-1050 g/L) y final de fermentación (F2) (densidad 1010-1000g/L), y las diluciones apropiadas se sembraron en Agar YPD (Pronadisa) incubándose durante 48h a 28°C. Los recuentos se expresaron como unidades formadoras de colonias por mL de muestra (UFC/mL).

Se seleccionaron al azar 10 colonias por placa, y a continuación se purificaron y sembraron en Agar YPD. Los cultivos puros además se conservaron a -80°C con glicerol al 15% para su posterior estudio. Los aislados de *S. cerevisiae* se diferenciaron a nivel de cepa, mediante la amplificación de las regiones delta con los primers $\delta 12$ and $\delta 21$, según las condiciones descritas por Legras y Karst [5].

Los parámetros físico-químicos convencionales de los vinos se analizaron según los métodos OIV [6], los volátiles mayoritarios y minoritarios por cromatografía de gases [2] y el análisis sensorial descriptivo de los vinos por un panel de cata formado por 10 catadores, utilizando la norma ISO 11035.

3. Resultados

La evolución de la fermentación alcohólica fue muy similar en los tres ensayos realizados y en todos los casos fueron suficientes 11 días para agotar los azúcares del mosto. Además mostraron una adecuada viabilidad celular, obteniéndose recuentos propios en este tipo de procesos.

Los porcentajes de implantación para la levadura A fueron del 65 y 70%, y para B del 40 y 35% en las Fases 1 y 2 respectivamente. Para los cultivos mixtos se encontró que en F1, la presencia de A fue del 45% y de B del 5%, y en F2, A un 35% y B sin representación. Además se aislaron hasta once cepas distintas, una de ellas (P1) con una presencia muy importante en la mayoría de las elaboraciones, y que corresponde con una levadura comercial muy utilizada en esa bodega y muy aclimatada a la zona. De aquí la importancia del uso de cultivos iniciadores autóctonos, bien adaptados a las condiciones específicas de cada zona o región vitivinícola.

En la **Figura 1**, se muestran los porcentajes de cada perfil encontrados para las distintas fases de fermentación y levaduras utilizadas. Las muestras de final de fermentación elaboradas

con la levadura B fue la que mayor diversidad de cepas mostró encontrando hasta 8 perfiles distintos, en cambio, en las elaboraciones realizadas con A, se encontraron solo 2 perfiles distintos.

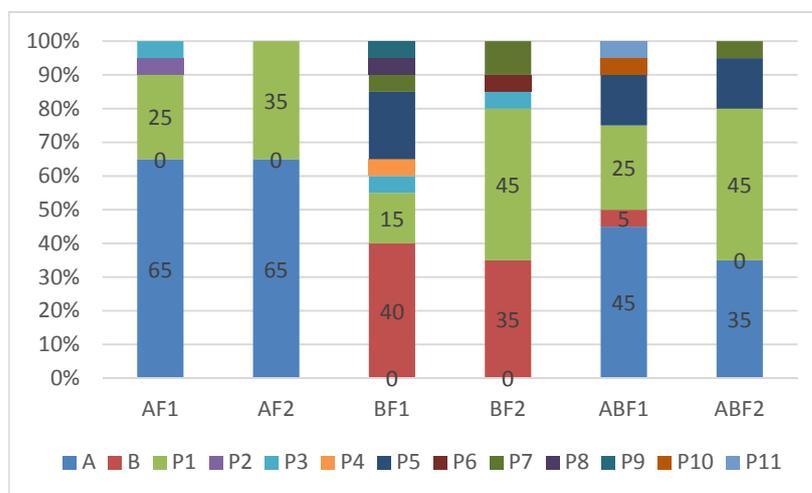


Figura 1. Porcentaje de los distintos perfiles encontrados (levaduras inoculadas A, B, levaduras espontaneas P1-P11) agrupados en función de la levadura inoculada y la fase de fermentación muestreada: F1: Fase 1, mitad de fermentación, F2, Fase 2, final de fermentación.

Los vinos producidos por cultivos puros y cultivos mixtos no presentaron apenas diferencias en los parámetros físico-químicos. El análisis de los compuestos volátiles (**Tabla 1**) mostró una mayor concentración de ésteres de ácidos dicarboxílicos, lactonas y norisoprenoides en los vinos AB, sin embargo para la mayoría de los compuestos ofreció valores intermedios entre aquellos inoculados con cultivos puros.

Tabla 1. Concentración de compuestos volátiles minoritarios agrupados por familias, de los vinos elaborados con la levadura A (A), levadura B (B) e inoculaciones mixtas (AB)

	A	B	AB
Acetatos ¹	76,94 ± 6,35	74,32 ± 7,97	62,21 ± 6,93
Esteres etílicos ¹	5,13 ± 0,29 ^a	6,56 ± 0,28 ^b	6,33 ± 0,26 ^b
Esteres de hidroxiaácidos ¹	1,37 ± 0,16 ^a	1,97 ± 0,36 ^b	1,44 ± 0,03 ^a
Esteres de ácidosdicarboxílicos ¹	2,34 ± 0,09 ^b	2,20 ± 0,01 ^a	2,83 ± 0,09 ^c
Ácidos ¹	9,41 ± 0,35	11,32 ± 1,57	11,30 ± 1,33
Alcoholes lineales ¹	283,29 ± 2,89 ^b	268,31 ± 5,63 ^a	294,06 ± 13,71 ^b
Alcoholes C6 ²	1452,46 ± 14,69	1422,79 ± 49,49	1750,22 ± 244,68
Terpenos ²	5,24 ± 0,23	4,46 ± 1,01	4,67 ± 0,07
Lactonas ²	248,89 ± 31,42 ^a	267,27 ± 10,79 ^a	378,59 ± 91,96 ^b
Alcoholes bencénicos ¹	15,53 ± 0,49 ^a	19,88 ± 1,51 ^c	17,64 ± 1,51 ^b
Compuestos carbonílicos ¹	37,64 ± 1,68	41,08 ± 6,64	36,72 ± 1,84
Tioalcoholes ²	299,54 ± 44,02 ^a	582,54 ± 106,74 ^b	389,38 ± 62,46 ^a
Norisoprenoides ²	6,04 ± 0,40 ^a	6,81 ± 0,75 ^{ab}	8,09 ± 1,62 ^b
Metoxifenoles ²	64,73 ± 8,01 ^b	43,75 ± 2,42 ^a	41,93 ± 5,82 ^a
Compuestos furánicos ²	3,08 ± 0,19 ^a	5,29 ± 0,09 ^b	5,48 ± 1,82 ^b
Fenoles volátiles ¹	6,37 ± 1,29	7,43 ± 1,40	6,68 ± 2,93

Los valores son las medias de los triplicados. ¹ mg/L; ² µg/L. los superíndices (^{a,b,c}) indican la existencia de diferencias significativas (p<0.05) entre las distintas elaboraciones

En las pruebas triangulares solo existieron diferencias significativas entre los vinos elaborados con la levadura A y el cultivo mixto AB. El análisis sensorial descriptivo de estos vinos mostro que los vinos A presentaron mayor intensidad aromática, mientras que los vinos AB destacaron por un mayor carácter floral y herbáceo y mayor volumen y duración en boca.

4. Conclusiones

La inoculación de los depósitos con levaduras seco activas, no asegura que la cepa adicionada se implante durante la fermentación y en ocasiones su presencia puede resultar escasa. En este trabajo se ha observado que la levadura A, ha sido medianamente eficaz cuando se inocula de forma individual, por el contrario en el caso del cultivo mixto no llega a dominar el proceso, quizás debido a la menor dosis utilizada, y al final del proceso hay una codominancia con una levadura autóctona. La levadura B no logró imponerse cuando se inoculó de forma individual, coexistiendo con otras poblaciones de cepas de *Saccharomyces*, y desapareció completamente al final de la fermentación cuando se inoculó de forma mixta. Los resultados demuestran la importancia de una adecuada formulación de los cultivos mixtos antes de su uso en bodega.

5. Bibliografía

1. Barraón, N.; Capece, A.; Arévalo, M.; Briones, A. y Romano, P 2011.Co-inoculation of different *S. cerevisiae* strains and influence on wine aroma. *In:FoodMicrobiol. Elsevier*.28. 1080-1086
2. Izquierdo Cañas, P; García-Romero, E; Heras Manso, J.M.; Fernández-González, M. 2014.Influence of sequential inoculation of *Wickerhamomycesanomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* in the quality of red wines. *In:EurFood Res Technol. Springer*. 239.279-286.
3. Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., Pietrafesa, R., Massari, C., Poeta, C., Romano, P. 2010. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. *In:Int J Food Microbiol. Elsevier*. 144, 187-192.
4. Barraón, N.; Arévalo-Villena, M.; Úbeda, J. y Briones, A. 2011. Competition between wild and commercial yeasts during vinification process. *In: World J Microbiol Biotech. Springer*. 27, 2703-2710
5. Legras, J.L.; Karst, F. 2003. Optimisation of interdelta for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. *In: FEMS MicrobiolLett*.John Wiley&Sons Ltd. 221, 249–255.
6. OIV Organización Internacional de la Viña y el Vino 2011. Compendium of international methods of wine and must analysis. OIV.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen al fondo social europeo y al programa INCRECYT por la contratación de S. Gómez Alonso, M. Fernández González y P.M. Izquierdo Cañas.

M07 - LEVADURAS PRESENTES EN EL AIRE Y EN EL VINO DE UNA BODEGA DURANTE DOS VENDIMIAS CONSECUTIVAS

Fernández-González, M^{1,3}, Pérez-Martín, F², Villar, C¹, Arévalo Villena, M¹

^{1,2}Dpto. Química Analítica y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Castilla-La Mancha,

¹Avda/Camilo José Cela s/n 13071 Ciudad Real ² Avda/ Carlos III s/n 45071 Toledo

³Parque Científico y Tecnológico de Castilla-La Mancha, Paseo de la Innovación, 1 02006 Albacete.

Monica.Fernandez@uclm.es

RESUMEN:

El objetivo de este trabajo fue estudiar las poblaciones de levaduras en el aire y el vino de una bodega, con el fin de evaluar el posible intercambio de microorganismos entre ellos. Se detectaron 11 especies de levaduras distintas, 7 de ellas en el aire, siendo *Saccharomyces cerevisiae* la especie predominante en ambos medios y vendimias y en general, la presencia de levaduras no-*Saccharomyces* en el aire fue muy baja (< 4%).

La tipificación de los aislados de *S. cerevisiae* mostró una gran variabilidad de cepas, encontrando hasta 37 genotipos distintos, y la presencia de genotipos coincidentes en el vino y en el aire, confirma el intercambio de microorganismos entre los dos entornos y el papel del aire en la dispersión de los microorganismos dentro de la bodega.

Palabras clave: levadura, bodega, aire, vino, identificación

1. Introducción

Las levaduras responsables de la fermentación alcohólica de los vinos, tienen su origen en el hollejo de la uva, en la maquinaria de la bodega y en la adición de cultivos iniciadores principalmente. Sin embargo, algunos estudios [1,2] han demostrado la presencia de estos microorganismos en el aire de las bodegas, lo que sugiere que podría ser una posible fuente de levaduras vínicas, además de ser el medio para su difusión.

El aire actúa como soporte, o como medio de transporte de los microorganismos que viajan a través de él, adhiriéndose a partículas de polvo, a gotitas o a partículas individuales, hasta que caen y se depositan sobre las superficies circundantes [3]. Los factores ambientales tales como la temperatura, el tamaño de partícula de polvo, la humedad y la velocidad del aire, y otros como la ubicación, la actividad o el diseño bodega, podrían afectar a la composición microbiológica del aire [2].

En este trabajo se ha estudiado la población de levaduras en el aire de una bodega y en los vinos de los tanques de fermentación cercanos con el fin de evaluar el posible intercambio de microorganismos entre ellos [4]. El estudio se llevó a cabo en una bodega ubicada en Castilla-La Mancha (España) durante el período de elaboración del vino de dos cosechas consecutivas (2011 y 2012).

2. Material y métodos

El muestreo se llevó a cabo en una bodega que produce y comercializa vinos bajo la Denominación de Origen Métrida. Las muestras de aire y vino se tomaron en 3 zonas distintas de la bodega (zona 1 exterior, recepción de uva y zona 2 y 3 interiores, de vinificación) en dos vendimias consecutivas, de septiembre a noviembre de 2011 (22 y 29 de septiembre 19 de octubre y el 7 de noviembre) y de septiembre a octubre de 2012 (11 y 24 Septiembre, 16 y 23 de octubre), entre las 10.00 am y 13.00 pm. Además, se tomó una muestra de aire entre las dos cosechas (24 Mayo 2012), cuando no había actividad en la bodega.

Las muestras de aire se tomaron utilizando un muestreador portátil AirPort MD8 (Sartorius Stedim Biotech), siendo el volumen de aire muestreado de 250 L para el recuento de levaduras. Los filtros de membrana, se sembraron en placas de Agar Glucosa cloranfenicol (CGA) (Scharlau, Barcelona, Spain), durante 48h a 25°C, añadiendo 100mg de bifenilo por placa para evitar el crecimiento de mohos. Tras la incubación, las colonias se contaron (UFC) y los resultados se expresaron como el promedio de los recuentos obtenidos en las dos muestras repetidas. Posteriormente, los valores se transformaron en el número probable de microorganismos (NMP/m³) mediante el uso de la ley de Feller [5], siguiendo las indicaciones del equipo.

Las muestras de mosto-vino se tomaron en 3 depósitos situados en la zona 2, y las diluciones apropiadas se sembraron por duplicado en CGA en las condiciones descritas anteriormente. Los recuentos se expresaron como unidades formadoras de colonias por mL de muestra (UFC/mL).

Se seleccionaron al azar un número representativo de colonias (10%), y a continuación se purificaron y sembraron en agar YPD (Pronadisa). Los cultivos puros además se conservaron a -80°C con glicerol al 15% para su posterior estudio.

Los aislados se sembraron en agar lisina (Oxoid) con el fin de poder diferenciarlos en *Saccharomyces* y no *Saccharomyces*, y a continuación se identificaron a nivel de especie mediante PCR (ITS-5.8 S rDNA)-RFLP [6], utilizando la base de datos yeast ID (<http://www.yeast-id.org>). Los aislados de *S. cerevisiae* se diferenciaron a nivel de cepa, mediante la amplificación de las regiones delta con los primers $\delta 12$ and $\delta 21$, según las condiciones descritas por Legras and Karst [7].

3. Resultados

Se detectó la presencia de levaduras en el aire en todas las áreas muestreadas durante todo el período estudiado en ambas cosechas, y los recuentos de levaduras fueron mayores en la vendimia de 2011. Los valores más altos se encontraron en las muestras tomadas durante la fermentación alcohólica en ambas cosechas (29 y 24 de septiembre), con la excepción del recuento obtenido en la zona 2 el último día de muestreo en 2011 (7 de noviembre), coincidiendo con el vaciado de los tanques una vez terminada la fermentación, cuando se obtuvo un valor de 2.300 NMP / m³. No se observaron diferencias en los recuentos de levaduras para las muestras tomadas entre la zona 2 y 3, el último día de muestreo en ambas cosechas. Los recuentos más bajos se obtuvieron para las muestras de aire tomadas entre las dos cosechas (24 de mayo de 2012) con valores de 87 NMP / m³.

La evolución de los recuentos de levaduras en las muestras de vino, de ambas vendimias fueron los habituales para el proceso de vinificación. Los mayores recuentos se obtuvieron coincidiendo con la fermentación alcohólica con valores en torno a 10^8 UFC/mL (29 de septiembre 2011 y el 24 de septiembre de 2012) y la disminución al comienzo de la fermentación maloláctica. Se aislaron un total de 421 levaduras de aire y el vino.

Las levaduras aisladas de muestras de aire y el vino tomadas durante el 2011 y 2012 fueron identificados a nivel de especie por PCR (ITS-5.8S rDNA) -RFLP. En la figura 1, se encuentran recogidos el porcentaje y las especies de levaduras encontradas tanto en el aire como en el vino en ambas cosechas. La mayoría de los aislados identificados como *S. cerevisiae* mostraron el típico patrón de restricción con *Hae* III de la región ITS-5,8S amplificada para esta especie (320, 230, 180 y 150 pb), sin embargo dos cepas (SC33 y SC36) aisladas de muestras de vino durante la fermentación maloláctica del 2012 presentaron perfiles anómalos (320, 230, 160, 155 bp).

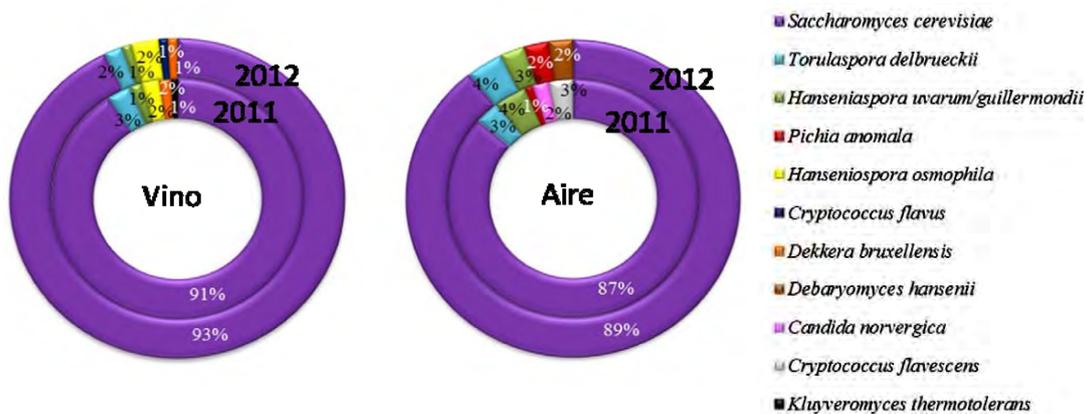


Figura 1. Porcentaje y especies de levaduras encontradas en el aire y en el mosto-vino durante las vendimias 2011 y 2012 [4]

La tipificación de los 378 aislados de *S. cerevisiae* mediante la amplificación de regiones delta, mostró una gran variabilidad de cepas, encontrando hasta 37 genotipos distintos. Siete de ellos aparecieron en ambas cosechas, dos eran de muestras de aire (I, IV) y cinco de muestras de vino (V, X, XIV, XIX, XXI), sin embargo, no se encontró ningún genotipo común en el aire y el vino en ambas vendimias. En 2011 se encontraron 19 genotipos diferentes, 6 en muestras de aire y 15 en muestras de vino, y sólo dos ellos comunes en ambos medios. La frecuencia de aparición de estos era 15,9 y 2,4% en las muestras de aire y 2,2 y el 15,3% en las muestras de vino, respectivamente. El perfil I fue el mayoritario en el aire (39,0%), seguido por el perfil IV con el 29,3%. Estos perfiles también se encontraron en 2012 muestras de aire, con 30,7 y 5,6%, respectivamente. En el vino, no se encontró un genotipo dominante siendo los perfiles V y XXX con una presencia del 20,4 y 19,5% los más abundantes.

En 2012, se encontraron 25 genotipos diferentes, 8 en muestras de aire y 21 en muestras de vino y sólo cuatro se encontraron en ambos tipos de muestras. El Perfil V fue el principal, ya que se encontró tanto en el aire (44,0%) como en el vino (16,7%). Este perfil también estuvo presente en las muestras de vino tomadas durante 2011 con un 20,4% de la representación. El Perfil X fue el genotipo más abundante encontrado en el vino (22,2%) durante el 2012, sin embargo no se encontró en el aire.

4. Conclusiones

El recuento de levaduras del aire de una bodega es indicativo de los procesos que tienen lugar en ella, siendo mayores cuanto mayor es la actividad en la bodega. La presencia de genotipos y especies coincidentes entre el medio líquido (mosto/vino) y el gaseoso (aire), confirma el intercambio de microorganismos entre los dos entornos y el papel del aire en la dispersión de los microorganismos dentro de la bodega.

5. Bibliografía

1. Garijo, P.; Santamaría, P.; López, R.; Sanz, S.; Olarte, C.; Gutiérrez, A.R. 2008. The occurrence of fungi, yeasts and bacteria in the air of a Spanish winery during vintage. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 141–145.
2. Ocón, E.; Garijo, P.; Sanz, S.; Olarte, C.; López, R.; Santamaría, P.; Gutiérrez, A.R. 2013. Analysis of airborne yeasts in one winery over a period of one year. *Food Control* 30, 585–589.
3. Curiel, G.J.; Van Eijk, H.M.J.; Lelieveld, H.L.M. 2000. Risk and control of airborne contamination. In: Robinson, R.K.; Butt, C.A.; Patel, P.D. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, London, pp. 1816–1822
4. Pérez-Martín, F.; Seseña, S.; Fernández-González, M.; Arévalo, A. Palop, M.L. 2014. Microbial communities in air and wine of a winery at two consecutive vintages. *Int. J. Food Microbiol.*; 190, 44–53
5. Feller, W.; Higgins, E. 1968. third ed. *An Introduction to Probability Theory and Its Applications*. vol. I. John Wiley & Sons, Inc.; London
6. Fernández, M.; Ubeda, J.F.; Briones, A.I. 2000. Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzyme activities of interest in winemaking. *Int. J. Food Microbiol.* 59, 29–36.
7. Legras, J.L.; Karst, F. 2003. Optimisation of interdelta for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. *FEMS Microbiol. Lett.* 221, 249–255.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen a la Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Comunidades de Castilla La Mancha (JCCM) por la financiación del proyecto POI09-0159-1914. F. Pérez-Martín por la beca concedida de la JCCM y M. Fernández-González al Fondo Social Europeo y a INCRECYT por la cofinanciación de su contrato

M08 - OBTENCION DE CEPAS VÍNICAS HÍBRIDAS DE *Saccharomyces cerevisiae* CON BUENAS APTITUDES TECNOLÓGICAS Y SENSORIALES

Fernández-González, M^{1,2}, Izquierdo-Cañas, P.M^{2,3}, Briones, A.I¹

¹Dpto. Química Analítica y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Castilla-La Mancha (UCLM) Avda Camilo José Cela s/n 13071 Ciudad Real

²Parque Científico y Tecnológico de Castilla-La Mancha, Paseo de la Innovación, 1, 02006 Albacete.

³ Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha. Crta. Toledo-Albacete s/n. 13700, Tomelloso (Ciudad Real)

Monica.Fernandez@uclm.es

RESUMEN:

En este trabajo se han obtenido híbridos intraespecíficos de *Saccharomyces cerevisiae* con el fin de mejorar una cepa comercial productora de altas concentraciones de compuestos positivos del aroma y del sabor, pero con problemas para agotar azúcares al final de la fermentación, utilizando 3 cepas previamente seleccionadas por sus excelentes habilidades fermentativas mediante conjugación de esporas utilizando un micromanipulador. Los vinos obtenidos con los 5 híbridos finalistas resultaron adecuados y similares a los parentales, y en todos los casos con azúcares residuales inferiores a 2g/L. Además 3 de ellos disminuyeron significativamente el grado alcohólico de los vinos.

Palabras clave: vino, hibridación, *Saccharomyces cerevisiae*, espora

1. Introducción

Una de las cuestiones que en los últimos años preocupa tanto a los productores de biomasa de levadura seco-activa como a las bodegas son las paradas y ralentizaciones en la fermentación de mostos azucarados debido a la incapacidad de las cepas vínicas inoculadas de proseguir el proceso una vez traspasado el último tercio de la fermentación. Las uvas tintas, para alcanzar la madurez fenólica adecuada, se sobre-maduran con lo que hay un exceso de azúcar inicial o, si finaliza correctamente la fermentación, de alcohol. Esta situación que se agudiza campaña tras campaña, también afecta a los mostos blancos de las últimas partidas de uva cosechadas, y si además las condiciones climáticas son adversas, junto a un elevado grado alcohólico se obtienen vinos con más de 2 g/L de azúcar susceptibles de alteraciones microbianas. Es difícil que una cepa de levadura vínica posea aptitudes enológicas y tecnológicas sobresalientes de forma simultánea, por lo que la obtención de levaduras híbridas contemplando las dos vertientes, constituye un avance importante para solucionar los problemas de paradas y ralentizaciones en la fermentación de mostos muy azucarados traspasado el último tercio del proceso.

Las limitaciones de la hibridación son el homotalismo, la aneuploidia, la baja eficiencia de esporulación de las levaduras vínicas así como la ausencia de marcadores de selección de los híbridos obtenidos [1]. No obstante, se han producido avances en la mejora genética de cepas vínicas mediante cruces que alcanzan aspectos que van desde la mejora de la

deseccación, estrés térmico y osmótico, y tolerancia al etanol, hasta la extracción de compuestos del color del hollejo usando cepas criotolerantes [2].

En este trabajo se han obtenido levaduras híbridas de cepas de *S. cerevisiae* previamente seleccionadas por sus excelentes habilidades fermentativas [3] y una cepa comercial, productora de altas concentraciones de compuestos positivos del aroma y del sabor, pero con problemas para agotar azúcares al final de la fermentación.

2. Material y métodos

Cepas de levaduras. Se han utilizado 3 cepas de *S. cerevisiae* UCLMS-147 (C), UCLMS-267 (S), y UCLMS-277 (T) de la colección de la UCLM procedentes de ecosistemas vínicos y que en estudios previos habían demostrado que eran capaces de agotar los azúcares durante la fermentación de mostos muy azucarados y algunas de ellas además con baja producción de etanol [3] y una levadura seco-activa comercial ADY1 (U) con problemas al final de la fermentación, que se mantendrá en anonimato por motivos de confidencialidad.

Esporulación y Formación de híbridos mediante micromanipulación. Las levaduras se esporularon en agar acetato (% w/v acetato potásico 1, extracto de levadura 0,1, glucosa 0.05, agar 2) durante 5-7 días a 28°C. Tras la digestión de las paredes de las ascas con 200 µg/mL de Zymolyase 20T (Seikagaku Kogyo Ltd) 20 minutos a 37°C, se sembraron en una misma placa de YPD, pares de las diferentes cepas parentales. Las tétradas se diseccionaron y se juntaron una a una las esporas de ambos parentales, utilizando un micromanipulador manual (Singer Instruments MSM Systems). Las placas se incubaron a 28°C y se siguió a distintos tiempos por microscopía la formación de shmoo, fusión de células y cigotos, permitiendo su germinación y crecimiento de colonias. La confirmación de los híbridos se realizó mediante la amplificación de las regiones delta con los primers $\delta 2$ - $\delta 12$ y $\delta 12$ - $\delta 21$ [4].

Selección de híbridos. Los híbridos generados se ensayaron en diversos medios de cultivo sólido con distintas condiciones de estrés [3], y además se estudió la cinética de crecimiento, utilizando un lector de microplacas Absorbance Microplate Reader ELx808 (BIO-TEK instruments), en mosto muy azucarado (127 g/L de glucosa y 133 g/L de fructosa, pH 3.7) preparado a partir de un mosto Airén concentrado, inoculados con una población de 2×10^6 cl/mL, midiendo la absorbancia a 600nm cada 30 minutos durante 48h a 25°C. Con los híbridos preseleccionados, se realizaron microvinificaciones a 20°C, utilizando el mismo mosto citado anteriormente, en las condiciones descritas por [3], con el fin de conocer su capacidad fermentativa y si dejaban azúcares residuales al final de la fermentación. Con los híbridos finalistas se realizaron microvinificaciones a 20°C, utilizando además las cepas parentales como control, utilizando 75mL de mosto natural Airén en matraces de 125mL inoculados con una población de 2×10^6 cl/mL y se siguió la cinética de fermentación por pérdida de peso debido a la producción de CO₂. Se analizaron los parámetros convencionales según los métodos OIV [5], y los volátiles mayoritarios por cromatografía de gases de los vinos obtenidos.

3. Resultados

Se realizaron 40 cruces espóra a espóra de cada par de parentales (UC, US y UT) y casi el 100% de los cruces fueron viables. Las colonias se purificaron por siembra en estría para asegurar que eran cultivos puros debido a la posibilidad de que hubieran germinado las dos

esporas de cada parental por separado. Solo el 25% de UC, el 20% de US y el 15% de UT, se confirmaron como híbridos tras el análisis de las regiones delta (**Figura 1**).

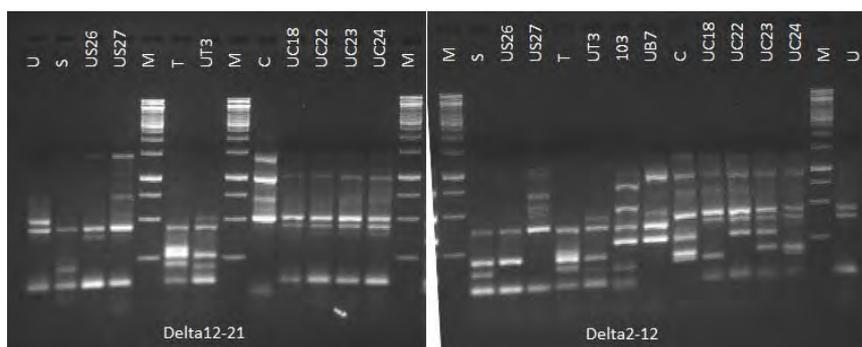


Figura 1. Perfiles delta obtenidos para los distintos parentales (U, S, T, C) e híbridos (US26, US27, UT3, UC18, UC22, UC23, UC24). M. Marcador 1kb (biotools)

Los 24 híbridos obtenidos crecieron bien tras 48h de incubación en agar YPD, Sacarosa al 30% y etanol 12%, sin embargo, otros factores como 16% de etanol y temperatura 15°C si afectaron a dicho crecimiento, pero en ningún caso inhibió su crecimiento y por lo tanto no se consideraron factores excluyentes. Además se estudió la cinética de crecimiento de los híbridos, seleccionando aquellos con una velocidad específica de crecimiento máxima superior a 0,06 h⁻¹, resultando un total de 8 híbridos UC (1, 2, 4, 9, 18, 22, 23, 24), 4 US (24, 26, 27 y 28), 3 UT (2, 3 y 7).

Con los 15 híbridos preseleccionados se realizaron microvinificaciones en mostos muy azucarados a 20°C, analizando la glucosa y la fructosa residual, y se seleccionaron aquellos que fueron capaces de agotar los azúcares del mosto (< 2g/L). Con los 5 híbridos finalistas (UC22, UC23, US26, US27, UT7) se realizaron microvinificaciones de mostos Airén. En la **Figura 2** se recoge el análisis de componentes principales (ACP) utilizando los datos de los principales parámetros de fermentación (grado alcohólico, Azúcares reductores, glicerol, acidez total, acidez volátil, ácidos málico, tartárico, succínico y láctico), así como los compuestos volátiles mayoritarios en los vinos obtenidos (acetaldehído, Acetato de etilo, Metanol, Propanol, isobutanol, Acetato de isoamilo, 1-butanol, alcoholes isoamílicos, 3-hidroxi-2butanona y Lactato de etilo). Para los parámetros convencionales los dos componentes principales explicaron el 88,9% de la varianza y para los volátiles mayoritarios el 89,6%.

Los vinos elaborados con US26, US27 y UT3 y el parental S, mostraron grados alcohólicos comprendidos entre 14,1-14,3%v/v, y en cambio el resto mostraron valores entre 15,4 y 15,7% v/v. Respecto a los azúcares residuales únicamente la cepa U mostró un valor superior a los 2g/L, seguido por C, UC22 y UC23, con valores en torno a 1,5 g/l y las demás con cantidades entre 0,4-0,6 g/L. El glicerol osciló entre 6,1-6,6 g/L para todos los híbridos y los parentales U, S, en cambio C y T produjeron una cantidad de glicerol significativamente superior al resto. C y UC22 mostraron una acidez volátil (0,92 y 0,87g/L respectivamente), significativamente superior al resto, estando al límite de los niveles permitidos.

Respecto a los compuestos volátiles mayoritarios, el acetaldehído fue el que más influyó en el ACP, oscilando entre 87 y 58 g/L, seguido de los alcoholes isoamílicos con valores entre 104 y 78 g/L. Hay que resaltar además que T y el híbrido derivado de este parental UT3, produjeron una cantidad significativamente mayor de acetato de isoamilo, característico del aroma a plátano y deseable en algunos vinos.

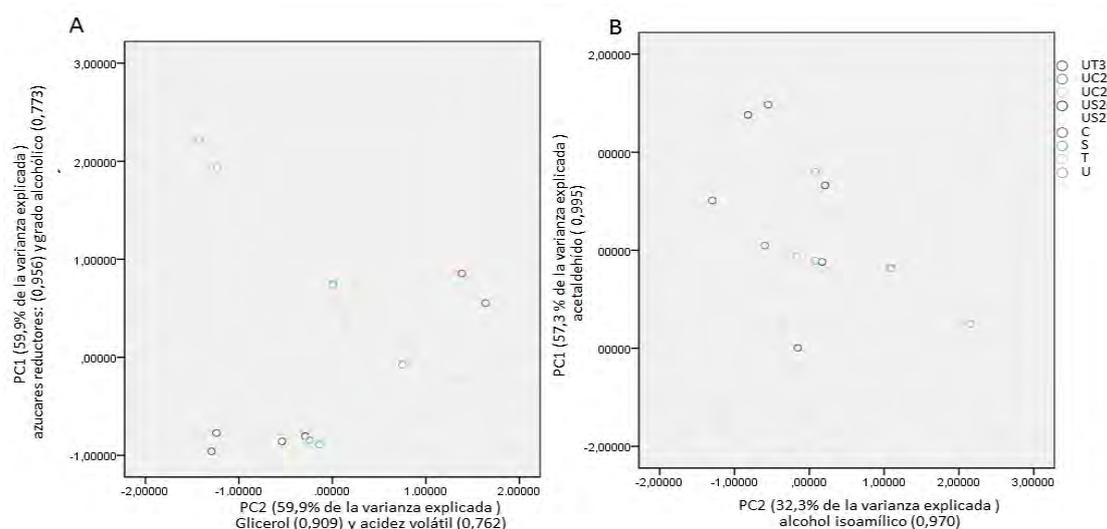


Figura 2. Análisis de componentes principales realizado con el método de rotación varimax con Kaiser. A) parámetros convencionales y B) volátiles mayoritarios

4. Conclusiones

Los híbridos obtenidos mediante la conjugación espora a espora se han comportado de forma muy similar a sus parentales, siendo muy interesantes US26, US27 y UT3 por haber disminuido significativamente el grado alcohólico de los vinos. En cambio, UC22 mostró una elevada acidez volátil, al igual que uno de sus parentales (C). Serán necesarios más estudios complementarios para conocer la estabilidad de los híbridos obtenidos, así como ensayos de implantación y uso en bodega.

5. Bibliografía

7. Benitez, T.; Gasent-Ramirez, J.M; Castrejón, F.; Codon, AC. 1996. Development of new strains for the food industry. In: Biotechnol Progress. John Wiley & Sons. 12, 149-163.
8. Caridi, A.; Cufari, A.; Ramondino, D. 2002. Winemaking from gaglioppo grapes with hybrid strains of *Saccharomyces*. In: Folia Microbiologica. Springer. 47, 407-408.
9. Fernández-González, M.; Úbeda, J.; Briones A. 2015 Study of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains for breeding purposes by fermentation efficiency and tetrad analysis. In: Curr Microbiol. Springer. 70. 441-449
10. Legras, J.L.; Karst, F. 2003. Optimisation of interdelta for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. In: FEMS Microbiol Lett. John Wiley & Sons Ltd. 221, 249–255.
11. OIV Organización Internacional de la Viña y el Vino 2011. Compendium of international methods of wine and must analysis. In: OIV.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen al fondo social europeo y al programa INCRECYT por la contratación de M. Fernández González y P.M. Izquierdo Cañas

M09 - PROTEÍNAS DE PARED DE *Saccharomyces cerevisiae* DESPUÉS DE LA SEGUNDA FERMENTACIÓN EN BOTELLA

Juan Antonio Porras¹, Jaime Moreno-García¹, Anna Puig-Pujol², Fina Capdevila², Juan Moreno³, Teresa García-Martínez¹, Juan Carlos Mauricio¹

¹Universidad de Córdoba/Facultad de Ciencias, departamento de Microbiología, Edificio Severo Ochoa (C6), Planta baja, Campus Universitario de Rabanales, (Ctra. Madrid, Km 396, 14014, Córdoba, España)

²IRTA-INCAVI/ Departamento de Investigación Enológica, (08720 Vilafranca del Penedès, España)

³Universidad de Córdoba/Facultad de Ciencias, departamento de Química Agrícola y Edafología, Edificio Marie Curie (C3), Planta tercera, Campus Universitario de Rabanales, (Ctra. Madrid, Km 396, 14014, Córdoba, España)

mi1gamaj@uco.es

RESUMEN:

El cava se produce como consecuencia de una segunda fermentación en botella de un vino base, seguida por un prolongado proceso de envejecimiento en contacto con lías. Durante este envejecimiento se produce una autólisis de las células de levadura que libera compuestos de la pared y del citoplasma contribuyendo en gran medida a la calidad organoléptica de éste. Se han estudiado las proteínas de pared de una levadura típica de cava un mes después de finalizada la segunda fermentación. La identificación de las proteínas se realizó mediante un análisis proteómico de tercera generación usando la técnica de fraccionamiento OFFGEL y detección LTQ Orbitrap XL MS. Los resultados se han comparado con los obtenidos bajo una condición similar sin presión. Se han identificado un total de 8 proteínas de pared celular bajo presión, 11 proteínas en la condición sin presión y 15 comunes en ambas condiciones. Las proteínas expresadas bajo presión intervienen sobre todo en la síntesis de pared y en el mantenimiento, integridad y reparación. Sin presión se han descrito proteínas que intervienen en el proceso de citocinesis y formación de la espora. En ambas condiciones, se han detectado proteínas de la glicolisis, integridad y síntesis de pared celular, y proteínas que se expresan en distintas condiciones de estrés.

Palabras clave: Proteínas, pared, segunda fermentación, *Saccharomyces cerevisiae*, OFFGEL

1. Introducción

La pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* es una estructura rígida, situada entre la membrana plasmática y el medio extracelular, esencial para el mantenimiento de la supervivencia e integridad celular. Sin esta pared las células se lisarían como consecuencia de cambios de osmolaridad en el medio. También, tiene otras funciones importantes como mantener la forma durante el ciclo celular, modula la entrada de moléculas, e interviene en la interacción entre células. También, es una estructura dinámica debido a los cambios morfológicos constantes que sufre la levadura en respuesta a las variaciones en el medio. Factores ambientales como el pH, la fuente de carbono, el CO₂, la temperatura o la presión, afectan a la estructura de la pared celular, que pueden originar cambios en la composición y la expresión génica [1]. En concreto, nuestro estudio se ha centrado en comparar las proteínas

relacionadas con la pared celular de una cepa de *S. cerevisiae* al final de la segunda fermentación en la elaboración de cava, en dos condiciones: una bajo estrés por presión de CO₂ (condición típica) y otra sin presión de CO₂ (condición de referencia). Estas diferencias se han llevado a cabo mediante técnicas avanzadas de proteómica de tercera generación, que han permitido separar e identificar las proteínas implicadas en la pared celular. Se usó la técnica de OFFGEL para la separación y preparación de las fracciones proteicas de las muestra de células de levadura. Posteriormente, se usaron equipos de alta resolución (LTQ Orbitrap XL MS) que permiten la identificación de las proteínas.

2. Material y métodos

En este trabajo se ha usado como cultivo de partida un crecimiento en pie de cuba de la cepa P29 de *Saccharomyces cerevisiae* (CECT 11770), elaborado a partir de mosto pasteurizado. Posteriormente, se realizó el tiraje para la segunda fermentación en botella. Botellas de vino espumoso de 750 mL se rellenaron con una mezcla de vino base (Macabeo y Chardonnay, 6:4), 22g/L de azúcar y 1.5×10^6 células/mL. La mitad de las botellas se taparon herméticamente con un obturador y una cápsula metálica (condición bajo presión, CP). El resto de botellas se taparon con un obturador perforado (condición sin presión, CNP). La botellas CP se colocaron en horizontal y las botellas CNP en vertical a una temperatura de 14°C. Una vez que se alcanzó el máximo de presión medida con un afrometro (6,5 atmosferas) en las botellas CP, se mantuvieron durante un mes bajo máxima presión, se abrieron y se recogieron las células de todas las botellas, lavando el sedimento dos veces con agua fría destilada estéril. Las células del pellet se resuspendieron en 1 mL de tampón de extracción con inhibidores de proteasas y se rompieron en un Vibrogen Cell Mill con bolas de vidrio de 500 µm de diámetro. El procedimiento de obtención del extracto de proteínas, separación e identificación de proteínas está descrito en Moreno-García et al., [2]. La técnica de fraccionamiento que se llevó a cabo fue OFFGEL y la de detección LTQ Orbitrap XL MS. Por último, se han usado las bases de datos <http://www.yeastgenome.org/> y <http://www.uniprot.org/> para el tratamiento de los resultados y de la discusión.

3. Resultados

Del total de proteínas detectadas en las dos condiciones de estudio, se filtraron en base a su localización en la pared celular y a su relación con la biosíntesis de pared celular. Los resultados obtenidos mostraron un total de 34 proteínas (23 en CP y 26 en CNP). Un total de 8 entre las 23 fueron únicamente detectadas bajo presión (CP). Tras un análisis funcional, se observó que la mayoría de éstas juegan un papel en el mantenimiento de la integridad de la pared celular. En cuanto a CNP, 11 se encontraron sólo bajo esta condición, que principalmente están involucradas en el crecimiento celular. Tanto en CP como en CNP, se encontraron 15 proteínas cuyas funciones corresponden a la degradación de carbohidratos, división celular, respuesta a daño en la pared celular, transporte de polipéptidos a través de la membrana mitocondrial y en el retículo endoplasmático.

Entre las proteínas específicas de CP, las proteínas más abundantes fueron, Cis3p y Pmi40p, con una concentración de 0,9 y 0,7% mol (considerando el total de proteínas detectadas bajo esta condición), respectivamente. Cis3p es una glicoproteína que contiene manosa y se requiere para la estabilidad de la pared celular [3, 4] mientras que Pmi40p es una isomerasa fosfomanosa cuya delección causa auxotrofia para manosa, aglutinación, morfología anormal y presentación de glicoproteínas en la superficie celular [5]. El resto de proteínas son responsables del suministro celular de leucina (Ape2p), actividad barrera (Bar1p), integridad

de la pared celular (Ecm33p y Pst1p), remodelado de la pared celular (Sun4p) y adaptaciones celulares a la fase estacionaria (Ygp1p).

Con respecto a las proteínas identificadas sólo en CNP, destacar tres de ellas que tienen una mayor concentración que las demás: Hsp150p, Sps100p y Sim1p. La primera es una proteína O-manosilada de choque térmico, que se secreta y se une covalentemente a la pared celular vía beta-1,3-glucano y por puentes disulfuro [6]. Hsp150p es la proteína que más concentración tuvo en las muestras sin presión. Por otro lado, se conoce que Sps100p se requiere para la maduración de la espora y que Sim1p participa en la replicación del ADN. El resto de proteínas tienen una menor concentración y la mayoría son septinas, involucradas en la citocinesis (Cdc11p, Cdc3p, Spr3p y Dse4p) y meiosis (Sps2p). Estos resultados concuerdan con los observados sobre viabilidad. La mayor viabilidad se alcanzó en la CNP ($1.14 \times 10^6 \pm 4 \times 10^5$ células/mL) y la menor en la CP ($3.33 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$ células/mL).

En cuanto a las proteínas comunes en ambas condiciones, destaca Yjl171cp, que se encuentra en orden de 7 veces más expresada en la muestra con presión. Se trata de una proteína de pared celular con anclaje a GPI cuya función se desconoce y que se induce en respuesta a agentes que dañan la pared celular y por mutaciones de genes involucrados en la síntesis de pared [7]. También hay otras proteínas que se expresan bajo condiciones de estrés y detectadas en mayor proporción en CP, como son Pst2p y Rny1p. La primera es una proteína que posee homología con las flavodoxinas y aumenta en respuesta al estrés por la replicación del ADN [8], y la segunda es una RNasa localizada en el citoplasma donde degrada ARNt bajo condiciones de estrés oxidativo y promueve la apoptosis bajo condiciones de estrés, función independiente de su actividad catalítica [9]. Otras proteínas también encontradas más abundantes en la CP fueron Pry1p, proteína de unión al estero, sensible a componentes hidrofóbicos [10], y Ssa1/2p, que son ATPasas involucradas en el plegamiento de proteínas que actúan como chaperona molecular [11]. El resto de proteínas obtenidas en ambas condiciones son mayormente glucanasas abundantes en la pared celular que contribuyen a su rigidez: Bgl2p, Exg1p, Scw4p y Scw10p; gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasas: Tdh1p, Tdh2p y Tdh3p, que participan en la glicolisis/gluconeogénesis; la invertasa Suc2p y la GDP-manosa pirofosforilasa Psa1p.

4. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, y en relación con el objetivo propuesto, se han extraído las siguientes conclusiones: la mayoría de las proteínas obtenidas en la condición con presión (CP) están involucradas en la síntesis de pared celular y su integridad, lo que sugiere que las levaduras, al estar en condiciones de estrés por presión de CO₂, están sintetizando componentes de la pared celular protegiéndose así del mencionado estrés. Las proteínas identificadas sólo en la condición sin presión (CNP), están involucradas mayormente en el proceso de citocinesis y formación de la espora indicando que cuando no hay estrés por presión, las proteínas relacionadas con la pared se encuentran principalmente implicadas en procesos de crecimiento y viabilidad celular. Por último, las proteínas comunes de ambas condiciones participan en procesos de glicolisis, integridad y síntesis de pared celular, y proteínas que se expresan en respuesta a diversos estreses. Estos resultados permitirán entender la importancia de las proteínas de la pared celular de levaduras bajo presión en la elaboración de cava, y nos da información para una mejora futura en la producción y calidad de las propiedades de estos vinos espumosos.

5. Bibliografía

1. Klis, F.M., Boorsman, A.; De Groot, P.W.J. 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *In: Yeast*. 23, 185-202.
2. Moreno-García, J., García-Martínez, T., Moreno, J.; Mauricio, J.C. 2015. Proteins involved in flor yeast carbon metabolism under biofilm formation conditions. *In: Food Microbiol*. 46, 25-33.
3. Yin, Q. Y., de Groot, P. W., Dekker, H. L., de Jong, L., Klis, F. M.; de Koster, C. G. 2005. Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. *In: J Biol Chem*. 280, 20894-20901.
4. Mrsa, V., Seidl, T., Gentzsch, M.; Tanner, W. 1997. Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *In: Yeast*. 13, 1145-1154.
5. Payton, M. A., Rheinneck, M., Klig, L. S., DeTiani, M.; Bowden, E. 1991. A novel *Saccharomyces cerevisiae* secretory mutant possesses a thermolabile phosphomannose isomerase. *In: J Bacteriol*. 173, 2006-2010.
6. Russo, P., Kalkkinen, N., Sareneva, H., Paakkola, J.; Makarow, M. 1992. A heat shock gene from *Saccharomyces cerevisiae* encoding a secretory glycoprotein. *In: Proc Natl Acad Sci USA*. 89, 3671-3675.
7. Garcia, R., Bermejo, C., Grau, C., Perez, R., Rodriguez-Pena, J. M., Francois, J., Nombela, C.; Arroyo, J. 2004. The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *In: J Biol Chem*. 279, 15183-15195.
8. Tkach, J. M., Yimit, A., Lee, A. Y., Riffle, M., Costanzo, M., Jaschob, D., Hendry, J. A., Ou, J., Moffat, J., Boone, C., Davis, T. N., Nislow, C.; Brown, G. W. 2012. Dissecting DNA damage response pathways by analysing protein localization and abundance changes during DNA replication stress. *In: Nat Cell Biol*. 14, 966-976.
9. Thompson, D. M.; Parker, R. 2009. The RNase Rny1p cleaves tRNAs and promotes cell death during oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *In: J Cell Biol*. 185, 43-50.
10. Choudhary, V.; Schneider R. 2012. Pathogen-Related Yeast (PRY) proteins and members of the CAP superfamily are secreted sterol-binding proteins. *In: Proc Natl Acad Sci USA*. 109, 16882-16887.
11. Winkler, J., Tyedmers, J., Bukau, B.; Mogk, A. 2012. Hsp70 targets Hsp100 chaperones to substrates for protein disaggregation and prion fragmentation. *In: J Cell Biol*. 198, 387-404.

6. Agradecimientos

Agradecemos la financiación concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad de España y a la Comunidad Europea (FEDER) MINECO-INIA-CCAA. Grant RTA2011-00020-C02-01 y 02.

M10 - METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS DESPUÉS DE LA SEGUNDA FERMENTACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE CAVA

María del Carmen González¹, Jaime Moreno-García¹, Fina Capdevila², Anna Puig-Pujol², Juan Moreno³, Juan Carlos Mauricio¹, Teresa García-Martínez¹

¹Universidad de Córdoba/Facultad de Ciencias, departamento de Microbiología, Edificio Severo Ochoa (C6), Planta baja, Campus Universitario de Rabanales, (Ctra. Madrid, Km 396, 14014, Córdoba, España)

²IRTA-INCAVI/ Departamento de Investigación Enológica, (08720 Vilafranca del Penedès, España)

³Universidad de Córdoba/Facultad de Ciencias, departamento de Química Agrícola y Edafología, Edificio Marie Curie (C3), Planta tercera, Campus Universitario de Rabanales, (Ctra. Madrid, Km 396, 14014, Córdoba, España)

mi2gamam@uco.es

RESUMEN:

La elaboración de cava implica dos procesos fermentativos secuenciales. Una primera fermentación donde el mosto de uva se transforma en vino base y una segunda fermentación alcohólica que se realiza en botella cerrada herméticamente. Los aminoácidos tienen una gran importancia en la elaboración del cava, éstos son la principal fuente de nitrógeno para las levaduras, son precursores de compuestos aromáticos que contribuyen a las características organolépticas, la biosíntesis o hidrólisis de algunos de ellos está relacionada con el mantenimiento del potencial redox celular, y además ciertos aminoácidos pueden ser precursores de compuestos tóxicos. Se ha realizado un análisis proteómico mediante la técnica de fraccionamiento OFFGEL y detección LTQ Orbitrap XL MS para estudiar las rutas metabólicas implicadas en el metabolismo de aminoácidos, después de la segunda fermentación en botella. Un total de 59 de estas proteínas se han identificado en la condición bajo presión, son proteínas principalmente relacionadas con la biosíntesis de Cys, Leu, His, Pro y Ser. En la condición sin presión se han identificado 84, que están involucradas con la biosíntesis de Ala, Arg, Phe, Met, Asp, Ile, Cys, Glu, His, metabolismo del azufre, Thre, transporte de aminoácidos desde la vacuola al citoplasma y descarboxilación de Gly.

Palabras clave: cava, *Saccharomyces cerevisiae*, proteínas, aminoácidos

1. Introducción

El cava es un vino espumoso elaborado por el método tradicional en la región del Penedés. El método tradicional de elaboración del cava es el mismo que el utilizado para el champán, pero con las variedades de uva autóctonas del Penedès. El cava se obtiene tras dos fermentaciones alcohólicas sucesivas. En la primera, el mosto de uva se transforma en vino base y en la segunda, éste junto con el licor de tiraje (suspensión de levaduras en sacarosa), realizada en botella herméticamente cerrada, da lugar al etanol y gas carbónico endógeno con unas características analíticas concretas para continuar con la etapa de envejecimiento.

En la segunda fermentación de los vinos espumosos, los péptidos se asimilan por las células de levadura junto con los aminoácidos libres como fuente de nitrógeno y pueden ser

precursores de compuestos del aroma, lo que contribuye a las características organolépticas de estos vinos. Después de los procesos de fermentación, se realiza un periodo de envejecimiento en el que el cava está en contacto con las lías. Durante este tiempo tiene lugar la autólisis de las células, y por consiguiente, la liberación de compuestos intracelulares al medio, esto modifica las características organolépticas de los vinos [1,2]. Debido al proceso de autólisis de las levaduras se liberan enzimas al medio, aumentando la actividad proteásica del vino. Estas proteasas, que permanecen activas en el vino, hidrolizan enlaces peptídicos y son responsables de la formación de péptidos pequeños y aminoácidos libres.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar las rutas metabólicas implicadas en el metabolismo de aminoácidos después de la segunda fermentación en botella bajo presión de CO₂ y sin presión.

2. Material y métodos

La levadura usada ha sido la cepa P29 de *Saccharomyces cerevisiae* (CECT11770) aislada de un cava procedente de la DO Penedès (Barcelona, España). Se usó mosto pasteurizado. Posteriormente, se realizó el tiraje para la segunda fermentación en botella de 750 mL, éstas se rellenaron con una mezcla de vino base de Macabeo y Chardonnay. La mitad de las botellas se taparon herméticamente con un obturador y una cápsula metálica (condición bajo presión, CP) y se colocaron en horizontal. El resto de botellas se taparon con un obturador perforado (condición sin presión, CNP) se dispusieron en vertical a una temperatura de 14°C. Tras medir la presión máxima con un afrómetro (6,5 atmosferas) en las botellas CP, se mantuvieron durante un mes bajo máxima presión. A continuación, se abrieron y se recogieron las células de todas las botellas. Una vez las células se rompieron, se extrajeron las proteínas en un tampón de extracción que contiene urea, tiourea, DTT, glicerol y tampón con anfolitos. Se utilizó el fraccionador Offgel con el programa Preset OG12PR00. La detección fue por LTQ Orbitrap XL MS. Para el tratamiento de los resultados y de la discusión se han usado las bases de datos <http://www.yeastgenome.org/> y <http://www.uniprot.org/>. La determinación de aminoácidos fue por HPLC, con detector de fluorescencia (2475 WATERS,). Derivatización precolumna con o-phtaldehido (OPA). El gradiente utilizado con algunas modificaciones fue el descrito según Pripis-Nicolau et al., [3].

3. Resultados

En el presente estudio proteómico, se han identificado un total de 99 proteínas involucradas en el metabolismo de los aminoácidos: 59 en la condición con presión (CP) y 84 en la condición sin presión (CNP) y 44 proteínas comunes a ambas condiciones, entre las cuales 9 fueron más abundantes en CP y 13 en CNP. Se han seleccionado para su posterior discusión aquellas proteínas específicas junto con las más abundantes de cada condición, a partir de ahora serán nombradas como “proteínas más abundantes”. Se han clasificado las proteínas según su función usando el “GO Term finder” con un filtro de p-value < 0,01 (Tabla 1) con respecto al metabolismo del aminoácidos.

De las proteínas más abundantes bajo presión (CP), 12 están involucradas específicamente en la “biosíntesis de aminoácidos”, 6 en “procesos catabólicos” y 2 intervienen en la “síntesis de cisteína”. También, Mis1p media el aumento del contenido de metionina a través de la producción de 5,10-metileno-THF. Por otro lado, Aat2p e Idh1p contribuyen a la “producción de glutamato” y Pro2p, Lys20p e His1p participan en la “síntesis de prolina, lisina e histidina”, respectivamente. Además, hay tres, Bat1p, Arg80p y Mcm1p que

intervienen tanto en la biosíntesis como en la degradación de aminoácidos: leucina, isoleucina, valina y arginina. Las proteínas relacionadas con el catabolismo a destacar son Dtd1p consumiendo leucina y tirosina; Pdc5p isoleucina, fenilalanina, triptófano y valina; y Adh3p valina, leucina, fenilalanina, triptófano e isoleucina. Como producto final de la degradación de los aminoácidos por Pdc5p y Adh3p se obtienen alcoholes de cadena larga y alcoholes de fusel, respectivamente, que pueden influir en las propiedades organolépticas del cava durante la segunda fermentación [4, 5].

Tabla 1. Clasificación de proteínas más abundantes en la condición con presión (CP) y en la condición sin presión (CNP).

Categorías Implicadas	Frecuencia del total de proteínas más abundantes		p-value		Proteínas	
	CP	CNP	CP	CNP	CP	CNP
Biosíntesis de aminoácidos	50%	62,3%	$6,84 \times 10^{-13}$	$6,15 \times 10^{-43}$	Cys3p, Mis1p, Lys20p, His1p, Aro2p, Bat1p, Aat2p, Met17p, Arg80p, Mcm1p, Idh1p, Pro2p	Gdh3p, Lys2p, His7p, Leu2p, His4p, Thr4p, Lys21p, Lys14p, Lpd1p, Leu1p, Asn2p, Arg4p, Thr1p, Put2p, His5p, Arg3p, Ilv3p, Cpa2p, Met5p, Bat2p, Mtd1p, Alt1p, Arg7p, Ald2p, Leu4p, Cit1p, Lys9p, Arg1p, Met22p, Arg8p, Idh2p, Gdh1p, Sam4p
Biosíntesis de alfa-aminoácidos	41,70%	54,7%	$5,42 \times 10^{-10}$	$1,79 \times 10^{-36}$	Cys3p, Mis1p, Lys20p, His1p, Aat2p, Met17p, Arg80p, Mcm1p, Idh1p, Pro2p	Gdh3p, Lys2p, His7p, Leu2p, His4p, Thr4p, Lys21p, Lys14p, Lpd1p, Leu1p, Asn2p, Arg4p, Thr1p, Put2p, His5p, Arg3p, Cpa2p, Mtd1p, Alt1p, Arg7p, Leu4p, Cit1p, Lys9p, Arg1p, Met22p, Arg8p, Idh2p, Gdh1p, Sam4p
Aminoacilación del tRNA en la traducción de proteínas	29,2%	11,3%	$1,16 \times 10^{-08}$	0,00014	Grs1p, Ses1p, Arc1p, Gus1p, Dps1p, Msk1p, Ism1p	Krs1p, Ded81, Yhr020wp, Ths1p, Frs1p Ala1p
Catabolismo de aminoácidos	25,00%	20,8%	$3,56 \times 10^{-06}$	$1,95 \times 10^{-11}$	Dtd1p, Bat1p, Pdc5p, Arg80p, Mcm1p, Adh3p	Gcv3p, Uga2p, Lpd1p, Uga1p, Put2p, Dal81p, Bat2p, Alt1p, Asp3-1p, Gcv2p, Lap3p
Regulación del metabolismo de la arginina	12,50%		$4,76 \times 10^{-05}$		Arg82p, Arg80p, Mcm1p	
Metabolismo de la familia de la glutamina	20,8%		$8,87 \times 10^{-05}$		Arg82p, Arg80p, Mcm1p, Idh1p, Prop2p	
Biosíntesis de cisteína	8,30%		0,00946		Cys3p, Met17p	
Catabolismo de la arginina	8,30%		0,01888		Arg80p, Mcm1p	
Metabolismo de los aminoácidos de la familia de la glutamina		26,4%		$1,67 \times 10^{-17}$		Gdh3p, Uga2p, Arg4p, Put2p, Arg3p, Ura2p, Cpa2p, Asp3-1p, Arg7p, Cit1p, Arg1p, Arg8p, Idh2p, Gdh1p
Metabolismo de los aminoácidos de la familia del aspartato		20,8%		$1,12 \times 10^{-11}$		Lys2p, Thr4p, Lys21p, Lys14p, Sam2p, Asn2p, Thr1p, Asp3-1p, Lys9p, Met22p, Sam4p
Metabolismo de aminoácidos de la familia de la serina		9,4%		0,00060		Gcv3p, Lpd1p, Thr1p, Gcv2p, Sam4p
Metabolismo de la arginina		11,3%		$6,49 \times 10^{-07}$		Arg4p, Arg3p, Cpa2p, Arg7p, Arg1p, Arg8p,
Metabolismo de la metionina		7,5%		0,00667		Sam2p, Thr1p, Met22p, Sam4p
Metabolismo de la ornitina		5,7%		0,00496		Arg4p, Arg7p, Arg8p,
Metabolismo del glutamato		11,3%		$2,47 \times 10^{-07}$		Gdh3p, Uga2p, Put2p, Cit1p, Idh2p, Gdh1p

Entre las proteínas más abundantes de la condición sin presión (CNP), se han detectado 4 que están implicadas en la biosíntesis de aminoácidos como la lisina: Lys2p, Lys21p, Lys9p y Lys14p; esta última es un factor de transcripción que activa la transcripción de genes de la ruta biosintética de este aminoácido [6]. Además, bajo esta condición se detectaron proteínas de la ruta biosintética de la histidina, leucina, metionina, treonina y en menor proporción relacionadas con la síntesis de asparragina, arginina o alanina. Por otro lado, se identificaron enzimas que degradan glicina, GABA, arginina y prolina. La proteína Asp3-1p cataliza la conversión de L-asparragina en aspartato y amoníaco. Asp3p es secretada en respuesta a la inanición de nitrógeno y parece estar regulada por Gln3p/Ure2p [7].

Por último, en ambas condiciones, se encontraron proteínas como Grs1p, Ses1p, Arc1p, Gus1p, Dps1p, Msk1p e Ism1p en CP y Krs1p, Ded81p, Yhr020wp, Ths1p,

Frs1p, Ala1p en CNP que están relacionadas con la aminoacilación del tRNA en la traducción de proteínas que podría asociarse con una mayor biosíntesis de proteínas.

Con respecto a los aminoácidos cuantificados en el medio, se ha encontrado una mayor concentración de aminoácidos en CP que en CNP. Los aminoácidos que presentaron mayor concentración en CP fueron: Leu, His, Glu, Gln, Arg, Tyr, GABA, Lys, y Val, y en CNP fue Ile.

4. Conclusiones

En la condición sin presión, se observa un mayor porcentaje de proteínas relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos frente a la condición con presión. Sin embargo, con respecto al catabolismo, ocurre lo contrario, en la CP se presenta una mayor frecuencia de proteínas de degradación de aminoácidos. Los resultados sugieren que no existe una relación directa entre las proteínas implicadas en la biosíntesis y catabolismo de la mayoría de los aminoácidos y los cuantificados en el medio, aunque parece ser que los aminoácidos que podrían estar relacionados con las proteínas de biosíntesis serían la histidina y arginina.

5. Bibliografía

1. Charpentier C., Aussenac J., Charpentier M., Prome J.C., Duteurtre B.; Feuillat M. 2005. Release of nucleotides and nucleosides during yeast autolysis: kinetics and potential impact on flavor. *In: J Agric and Food Chem.* 53, 3000-3007.
2. Nunez Y.P., Carrascosa A.V., González R., Polo M.C.; Martínez-Rodríguez A.J. 2005. Effect of accelerated autolysis of yeast on the composition and foaming properties of Sparkling wines elaborated by a champenoise Method. *In: J Agric and Food Chem.* 53, 7232-7237.
3. Pripis-Nicolau, L., De Revel, G., Marchand, S., Anocibar Beloqui, A.; Bertrand, A. Automated HPLC method for the measurement of free aminoacids including cysteine in must and wines, firts application. *J.Sci. Food Agric* 81:731-738.
4. Dickinson, J. R., Salgado, L. E. J.; Hewlins, M. J. 2003. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *In: J Biol Chem.* 278, 8028-8034.
5. Hazelwood, L. A., Daran, J. M., van Maris, A. J., Pronk, J. T.; Dickinson, J. R. 2008. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *In: Appl Environ Microb.* 74, 2259-2266.
6. Ramos, F., Dubois, E.; Pierard, A. 1988. Control of enzyme synthesis in the lysine biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a regulatory role of gene LYS14. *In: Eur J Biochem.* 171, 171-176.
7. Bon, E. P., Carvajal, E., Stanbrough, M., Rowen, D.; Magasanik, B. 1997. Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. GLN3/URE2 regulation of a periplasmic enzyme. *In: Appl Biochem Biotechnol.* 63-65, 203-212.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO-INIA-CCAA) y FEDER al Proyecto coordinado RTA2011-00020-C02-01 y 02.

M11 - RUTAS METABÓLICAS IMPORTANTES EN LA FORMACIÓN DE VELO DE FLOR

Jaime Moreno-García¹, Juan Carlos Mauricio¹, Juan Moreno², Nieves López de Lerma², Rafael A. Peinado², Teresa García-Martínez¹

¹Universidad de Córdoba/Facultad de Ciencias, departamento de Microbiología, Edificio Severo Ochoa (C6), Planta baja, Campus Universitario de Rabanales, (Ctra. Madrid, Km 396, 14014, Córdoba, España)

²Universidad de Córdoba/Facultad de Ciencias, departamento de Química Agrícola y Edafología, Edificio Marie Curie (C3), Planta tercera, Campus Universitario de Rabanales, (Ctra. Madrid, Km 396, 14014, Córdoba, España)

mi2gamam@uco.es

RESUMEN:

La crianza biológica de los vinos tipo Sherry es un proceso que se caracteriza por la formación y mantenimiento sobre la superficie del vino de una película (biofilm) de levaduras llamada "velo de flor" que aporta el aroma y sabor característico de estos vinos. Para dilucidar las rutas metabólicas de relevancia en una condición típica de velo de flor, se han identificado enzimas sobreexpresadas de una levadura de flor mediante la técnica de fraccionamiento OFFGEL y detección LTQ Orbitrap XL MS. Como referencia se ha comparado con una condición sin formación de velo de flor. Los resultados indican una sobreexpresión de proteínas en formación de velo relacionadas con las rutas metabólicas del complejo 2-cetoglutarato deshidrogenasa, la cadena de transporte de electrones, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) y de glioxilato, la degradación de isoleucina y leucina, y la biosíntesis de folato, entre otras. Los resultados obtenidos podrían servir como una herramienta para desarrollar estrategias con objeto de mejorar la calidad de los vinos sometidos a procesos tales como la crianza biológica.

Palabras clave: velo de flor, *Saccharomyces cerevisiae*, proteínas, rutas metabólicas, OFFGEL, LC-MS/MS.

1. Introducción

Los vinos finos se elaboran mediante el proceso de crianza biológica, que básicamente consiste en el desarrollo y mantenimiento sobre la superficie del vino de una película de varios milímetros de espesor de levaduras de color marfil, conocidas como "velo de flor". Este tipo de crianza se lleva a cabo después de la fermentación del mosto de uva, cuando la levadura de flor es predominante en un medio donde los azúcares glucosa y fructosa se han consumido y el contenido en etanol es elevado [1].

El etanol ejerce sobre las levaduras un efecto tóxico, pero también puede ser utilizado como una fuente de carbono, dependiendo de la adaptación de las levaduras a las condiciones del medio. Los metabolitos excretados por las levaduras de flor, al consumir las fuentes de carbono remanentes de la fermentación previa, determinan la calidad organoléptica del vino fino obtenido [2].

En este estudio, se ha utilizado la técnica OFFGEL y el espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL MS para el fraccionamiento e identificación, respectivamente, de las proteínas participantes en rutas metabólicas. Paralelamente, se han sometido a las mismas técnicas de análisis, las proteínas de células de levadura desarrolladas durante 12 horas en un medio pre-fermentativo, con objeto de usar la información obtenida como referencia para comparar con las proteínas en una y otra condición de cultivo. El objetivo de este trabajo es identificar las proteínas más abundantes y las rutas metabólicas en las que intervienen durante la formación de velo de flor.

2. Material y métodos

La cepa de levadura que se usó en este estudio fue *Saccharomyces cerevisiae* G1 (ATCC: MYA-2451). Se inocularon con 5×10^6 células/mL (células crecidas previamente en YPD) dos medios de cultivo diferentes: uno de referencia (CR) que contenía como fuente de carbono 17% glucosa (YNB con ácido glutámico como fuente de nitrógeno) y otro de formación de velo de flor (CVF) que contenía 10% etanol y 1% glicerol como fuente de carbono (YNB con ácido glutámico como fuente de nitrógeno). Las células se recogieron en fase exponencial en ambas condiciones, 12 horas y 29 días, respectivamente. Para el análisis proteómico se usó el fraccionador OFFGEL para su separación por punto isoeléctrico (pH 3-10) y el espectrómetro de masas LTQ Orbitrap para su identificación [3]. Con el fin de comparar la cantidad de proteínas detectadas en la misma condición y entre las dos condiciones, se ha realizado una cuantificación relativa utilizando el índice empAI o índice modificado de abundancia de proteínas de forma exponencial [4]. Tras la identificación y cuantificación, se seleccionaron las proteínas implicadas en las rutas metabólicas según la base de datos SGD (<http://www.yeastgenome.org/>).

3. Resultados

En este estudio se han identificado un total de 413 proteínas de levadura de flor bajo la condición de velo de flor (CVF) y 611 bajo la condición de referencia (CR). Tras aplicar un filtrado usando la base de datos SGD, se seleccionaron aquellas proteínas que están implicadas en rutas metabólicas para su posterior discusión, obteniendo así 114 proteínas en la CVF y 144 en la CR.

Entre las proteínas más abundantes en CVF se observó un mayor número, en comparación con la condición de referencia, de aquellas que participan en rutas como la del complejo 2-cetoglutarato deshidrogenasa, cadena de transporte de electrones, ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) y de glioxilato, degradación de isoleucina y leucina, y la biosíntesis de folato (Fig. 1). Por otro lado, las rutas metabólicas con proteínas más sobreexpresadas en la CR fueron el sistema de glutatión-glutaredoxina, el sistema de tioredoxina, la ruta de asimilación del sulfato y la biosíntesis de histidina (Fig. 1).

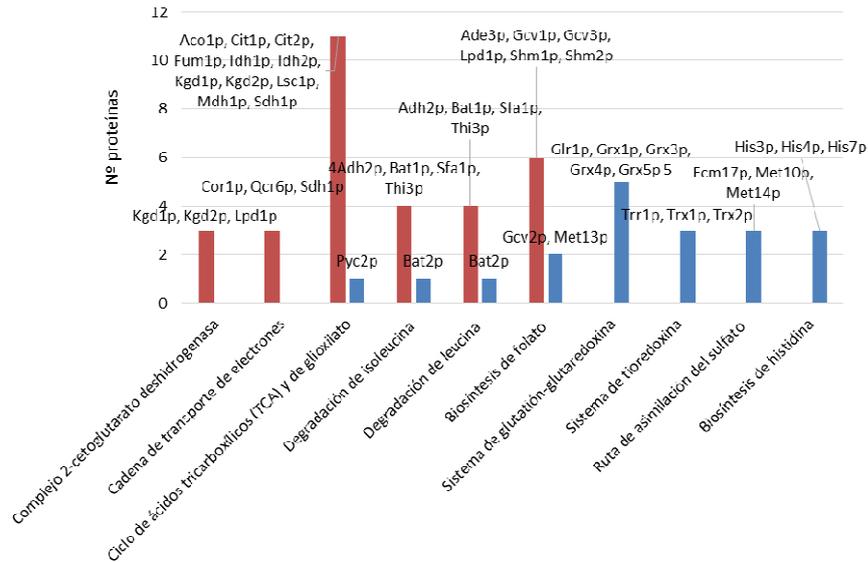


Figura 1. Rutas metabólicas de la levadura de flor bajo una condición de formación de velo de flor (CVF, rojo) y una condición de referencia (CR, azul) considerando sólo las proteínas más abundantes.

Las rutas del complejo 2-cetoglutarato deshidrogenasa y la cadena de transporte de electrones fueron aquéllas que en CVF presentaron mayor diferencia con respecto a CR. Ambas, agruparon 3 proteínas más abundantes (Kgd1p, Kgd2p y Lpd1p en el primer caso y Cor1p, Qcr6p y Sdh1p) mientras que en CR, ninguna proteína con esta función fue detectada con mayor abundancia. El complejo 2-cetoglutarato deshidrogenasa incluye 3 enzimas (las tres detectadas en CVF), éstas transforman los ácidos 2-oxo a los derivados de acil-CoA correspondientes y produce NADH y CO₂ en una reacción irreversible. En cuanto a la cadena de transporte de electrones, ésta constituye el paso final de la vía respiratoria, que está implicada en la síntesis de ATP, así como en el transporte de metabolitos a través de la membrana [5]. También relacionada con la respiración aerobia está el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y de glioxilato. En este estudio se han detectado 11 proteínas más abundantes en CVF y 1 en la condición de referencia. Estas rutas se pueden enmarcar en el contexto del metabolismo oxidativo que desarrollan las levadura de flor en condiciones de crianza biológica, a través del cual el etanol es oxidado y se producen subproductos responsables del sabor y aroma característicos del vino fino [2,6].

Además, un alto porcentaje de proteínas con más abundancia en CVF fueron agrupadas en dos rutas de degradación de aminoácidos y en la síntesis de folato. Estos aminoácidos fueron la isoleucina y la leucina. En ambos, su isómero L forma parte de los 22 aminoácidos proteínogénicos mientras que su isómero D se utiliza como fuente de carbono, nitrógeno, y de energía a través de la vía de Ehrlich que culmina en la reducción del aldehído para formar un alcohol de cadena larga o complejo, conocido como un alcohol fusel o aceite de fusel. Los alcoholes fusel son compuestos de sabor y aroma importantes en los productos alimenticios y bebidas fermentadas [7]. En cuanto al folato, o vitamina B₉, se identificaron 6 proteínas más abundantes bajo esta condición que están relacionadas con su síntesis. Este compuesto contiene propiedades saludables y se usa como aditivo alimenticio ya que el ser humano es incapaz de sintetizarlo [8, 9]. Futuros análisis metabólicos se requieren para detectar la posible presencia de esta molécula que hasta la fecha no ha sido descrita en los vinos finos.

4. Conclusiones

Como resultado de un análisis proteómico, se ha detectado un alto porcentaje de proteínas presentes en altas concentraciones en la condición de formación de velo de flor relacionadas con las rutas metabólicas del complejo 2-cetoglutarato deshidrogenasa, la cadena de transporte de electrones, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y de glioxilato, la degradación de isoleucina y leucina, y la biosíntesis de folato, cuya presencia no ha sido descrita hasta la fecha en los vinos finos. Estos datos pueden servir como un recurso para el desarrollo de estrategias con objeto de mejorar la calidad de los vinos sometidos a procesos tales como la crianza biológica.

5. Bibliografía

1. Esteve-Zaroso, B., Peris-Toran, M. J., García-Maiquez, E., Uruburu, F.; Querol, A. 2001. Yeast population dynamics during the fermentation and biological ageing of sherry wines. *In: Appl Environ Microb.* 67, 2056–2061.
2. Peinado, R. A.; Mauricio, J. C. 2009. Biologically Aged Wines. *In: Wine Chemistry and Biochemistry.* Moreno-Arribas, M.V; Polo, M.C. (Eds.). Springer. ISBN: 978-0-387-741161-1. pp 81–103.
3. Moreno-García, J., García-Martínez, T., Moreno, J.; Mauricio, J.C. 2015. Proteins involved in flor yeast carbon metabolism under biofilm formation conditions. *In: Food Microbiol.* 46, 25-33.
4. Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J.; Mann, M., 2005. Exponentially modified protein abundance Index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *In: Mol Cell Proteomics.* 4, 1265-1272.
5. Joseph-Horne, T., Hollomon, D. W.; Wood P. M. 2001. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *In: Biochim Biophys Acta.* 1504, 179-195.
6. Mauricio, J.C., Moreno, J.; Ortega, J.M., 1997. In vitro specific activities of alcohol and aldehyde dehydrogenases from two flor yeasts during controlled wine aging. *In: J Agric Food Chem.* 45, 1967-1971.
7. Lilly, M., Bauer, F. F., Styger, G., Lambrechts, M. G.; Pretorius, I. S. 2006. The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. *In: FEMS Yeast Res.* 6, 726-743.
8. Botez, M. I. 1976. Folate deficiency and neurological disorders in adults. *In: Med. Hypotheses,* 2, 135-140.
9. Weinstein, S. J., Hartman, T. J., Stolzenberg-Solomon, R. Pietinen, P., Barrett, M. J., Taylor, P. R., Virtamo, J.; Albanes, D. 2003. Null association between prostate cancer and serum folate, vitamin B(6), vitamin B(12), and homocysteine. *In: Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12, 1271-1272.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto RTA2011-00020-C02-02 del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO-INIA-CCAA) y FEDER.

M12 - EFECTO DE *Torulaspora delbrueckii* SOBRE LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA Y LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA DE VINOS BLANCOS

Matilde Maqueda¹, Rocío Velázquez¹, Emiliano Zamora², Pedro Cotilla², Manuel Ramírez^{1*}

¹Departamento de Ciencias Biomédicas (Área de Microbiología), Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06071 Badajoz, Spain

² Estación Enológica, 06200 Almendralejo, Spain

*mramirez@unex.es

RESUMEN:

La inoculación del mosto con levaduras *Torulaspora* puede mejorar la calidad del vino. La inoculación secuencial de *T. delbrueckii* y posteriormente de *S. cerevisiae* no asegura una participación importante de *Torulaspora* en el proceso de fermentación, y no conlleva una mejora evidente de la calidad del vino blanco. En fermentaciones co-inoculadas inicialmente con las dos levaduras utilizando estirpes killer de *T. delbrueckii*, éstas últimas desplazaron a las levaduras *S. cerevisiae* durante la fermentación cuando su proporción inicial fue muy alta (90%), pero no cuando su proporción inicial fue menor (50%). Sin embargo, las levaduras *T. delbrueckii* no-killer nunca desplazaron a *Saccharomyces*, independientemente de su proporción inicial. El vigor fermentativo y la tasa de crecimiento son mayores en *S. cerevisiae*, lo que facilitó que dominaran la fermentación desplazando a *Torulaspora* no-killer. La inoculación inicial de mosto bien desfangado exclusivamente con levaduras *T. delbrueckii* killer permitió su dominancia durante la mayor parte de la fermentación, originando vinos característicos con distinto perfil aromático. No se realizó fermentación maloláctica en ninguno de los vinos, qué si se realizó en los vinos de *T. delbrueckii* elaborados con el mismo mosto más turbio. El dominio de *T. delbrueckii* origino aromas de fruta procesada o golosinas poco habituales en vinos frescos, mientras que *S. cerevisiae* originó más aromas a fruta fresca como consecuencia de que produjeron más esteres etílicos con bajo nivel de percepción, fundamentalmente butanoato de etilo, acetato de isopentilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo. Dada la menor concentración de aromas frutales en los vinos de *Torulaspora*, los catadores pudieron detectar matices de fruta procesada y golosinas probablemente debido a la presencia de etoxi-gamma-butirolactona en estos vinos.

Palabras clave: Levaduras, *Torulaspora delbrueckii*, killer, vino blanco, aromas

1. Introducción

Algunas levaduras no-*Saccharomyces* se pueden utilizar para corregir defectos del vino o mejorar su complejidad organoléptica. A diferencia de *Saccharomyces*, estas levaduras secretan más enzimas (esterasas, glicosidasas, lipasas, proteasas, celulasas, etc.), que degradan ciertos componentes del mosto mejorando aspectos tecnológicos como maceración, filtración, clarificación, rendimiento alcohólico, extracción de color, etc., y la calidad aromática del vino. Además, algunas levaduras no-*Saccharomyces*, producen poca cantidad de compuestos indeseables como acetaldehído, acetoína, ácido acético, y acetato de etilo. Por esta razón, se ha evaluado su utilidad para reducir la acidez volátil del vino co-inoculando estas levaduras con *Saccharomyces* en cultivos mixtos o de forma secuencial, y de manera singular

en vinos elaborados con mostos muy ricos en azúcar procedentes de uvas botritizadas. El mayor problema del este uso combinado de diferentes levaduras es que los resultados de la fermentación son imprevisibles, y pueden afectar de forma inesperada a la composición química y aromática del vino. Normalmente, las levaduras no-*Saccharomyces* tienen menos vigor fermentativo que las *Saccharomyces*, tienen dificultad para completar la fermentación del mosto en un tiempo razonable, y suelen ser desplazadas fácilmente por las *Saccharomyces* (inoculadas o silvestres). Esto hace difícil apreciar diferencias importantes entre los vinos co-inoculados con levaduras no-*Saccharomyces* respecto a los inoculados exclusivamente con *Saccharomyces*. La levadura no-*Saccharomyces* más utilizada es *Torulaspota delbrueckii*, que se puede adquirir en el mercado para elaborar vino; aunque su utilidad práctica en bodega está por confirmar. En este trabajo se analiza la utilidad de inocular exclusivamente levaduras *Torulaspota* asesinas (killer) para elaborar vinos blancos diferenciados y su efecto sobre la fermentación maloláctica.

2. Material y métodos

Se utilizaron tres cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*: EX85 (killer K2, seleccionada comercial de Heral SC), EX85R (no-killer, resistente a cicloheximida), E7AR1 (killer K2, resistente a cicloheximida); tres de *Torulaspota delbrueckii* patentadas por la Universidad de Extremadura: EX1180 (autóctona silvestre, killer Kbarr), EX1180-11C4 (killer Kbarr, resistente a cicloheximida), EX1180-2K⁻ (mutante espontáneo no-killer, resistente a cicloheximida); y una *T. delbrueckii* comercial: TD291 de Lallemand. Las fermentaciones se realizaron con mosto de la variedad Macabeo. Los parámetros fisicoquímicos se midieron según los Métodos Oficiales. El análisis organoléptico se realizó por catadores entrenados en la Estación Enológica de Almendralejo. Los aromas minoritarios se analizaron mediante cromatografía de gases con detector de masas (1).

3. Resultados

Las fermentaciones realizadas con mosto estéril de uva Cigüente y co-inoculadas inicialmente con mezclas de levaduras *T. delbrueckii* + *S. cerevisiae* transcurrieron de forma correcta en cuanto a cinética de fermentación y evolución de la población de levaduras totales y viables (Fig. 1). Solo las levaduras *Torulaspota* killer pudieron evitar ser desplazadas totalmente durante la fermentación por las *Saccharomyces*, mientras que las levaduras *Torulaspota* no-killer fueron desplazadas por las levaduras *Saccharomyces* durante la fermentación. Este desplazamiento fue muy rápido (un día) cuando la proporción de levaduras *Torulaspota* no-killer fue del 50%, y más lento cuando la proporción de levaduras *Torulaspota* no-killer fue del 90%, manteniéndose por encima del 50% de la población total durante los primeros cuatro días de fermentación (Fig. 1D). Por el contrario, las levaduras *T. delbrueckii* killer Kbarr desplazaron totalmente a las *S. cerevisiae* cuando se inocularon en una proporción inicial del 90%. Esta proporción inicial de levaduras *Torulaspota* killer requerida para desplazar a las levaduras *Saccharomyces* fue muy superior a la proporción de levaduras *Saccharomyces* K2 requerida para obtener tasas de similares de desplazamiento (menos del 10%) (2). El desplazamiento fue más evidente en mosto filtrado sin partículas adsorbentes de las toxinas killer, aunque también se observó dominancia de *Torulaspota* en mosto desfogado con partículas adsorbentes cuando se inocularon en la misma proporción del 90% (Fig. 1D). Las levaduras *Torulaspota* no-killer no dominaron la fermentación en las mismas condiciones,

siendo desplazadas totalmente por las levaduras *S. cerevisiae*. En las fermentaciones inoculadas con 50% inicial *Torulasporea* (killer o no-killer), éstas fueron desplazadas rápidamente (un día) por *Saccharomyces* en mosto desfogado, aunque las levaduras *Torulasporea* killer permanecieron en mayor proporción que las no-killer durante varios días en mosto filtrado (Fig. 1D).

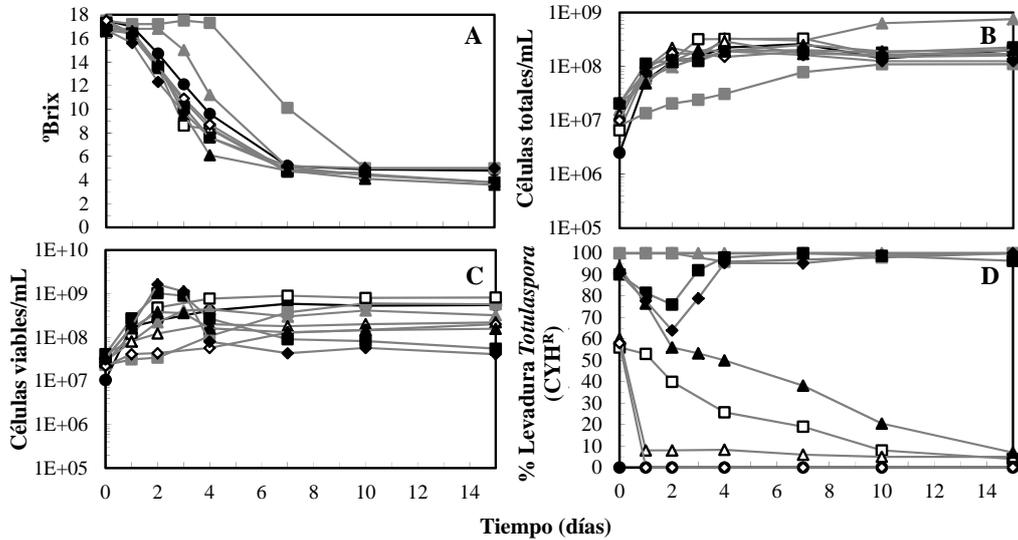
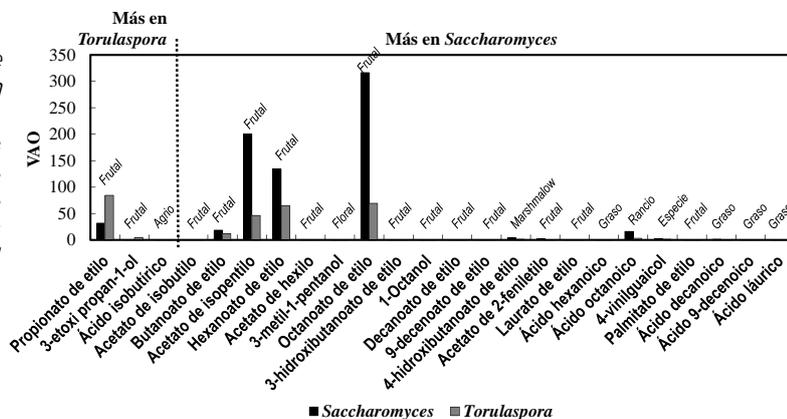


Figura 1. A: Evolución de las fermentaciones de mosto Cigüente estéril desfogado o filtrado inoculado con distintas levaduras. Estirpes de *S. cerevisiae*: EX85 (K2, CYH^R). Estirpes de *T. delbrueckii*: EX1180-11C4 (Kbarr-1, CYH^R) y EX1180-2K (no-killer, CYH^R). A: °Brix. B: Levaduras totales. C: Levaduras viables. D: Proporción de levaduras *Torulasporea* resistentes a cicloheximida (CYH^R). Símbolos: EX85 (●—), EX1180-11C4 filtrado (■—), EX1180-2K filtrado (▲—), EX85 (50%)+EX1180-11C4 (50%) filtrado (□—), EX85 (50%)+EX1180-11C4 (50%) desfogado (◇—), EX85 (50%)+EX1180-2K (50%) filtrado (△—), EX85 (10%)+EX1180-11C4 (90%) filtrado (■—), EX85 (10%)+EX1180-11C4 (90%) desfogado (◆—) y EX85 (10%)+EX1180-2K (90%) filtrado (▲—).

La inoculación secuencial de mosto desfogado con *T. delbrueckii* y posteriormente de *S. cerevisiae* no aseguró una participación importante de *Torulasporea* en el proceso de fermentación, y no se apreció mejora la calidad del vino blanco (no mostrado). Sin embargo, la inoculación inicial de mosto bien desfogado exclusivamente con levaduras *T. delbrueckii* killer permitió su dominancia durante la mayor parte de la fermentación, originando vinos característicos con distinto perfil aromático. No se realizó fermentación maloláctica en ninguno de los vinos, qué si se realizó en los vinos de *T. delbrueckii* elaborados con el mismo mosto más turbio.

Figura 2. Composición aromática de los vinos blancos elaborados con *Saccharomyces* o *Torulasporea*. Valor medio de actividad odorante (VAO) para los compuestos aromáticos con diferencias estadísticamente significativas entre los vinos de *Saccharomyces* y *Torulasporea*.



El dominio de *T. delbrueckii* originó aromas de fruta procesada o golosinas poco habituales en vinos frescos, mientras que *S. cerevisiae* originó más aromas a fruta fresca como consecuencia de que produjeron más ésteres etílicos con bajo nivel de percepción (Fig. 2), fundamentalmente butanoato de etilo, acetato de isopentilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo. Dada la menor concentración de aromas frutales en los vinos de *Torulaspota*, los catadores pudieron detectar matices de fruta procesada y golosinas probablemente debido a la presencia de etoxi-gamma-butirolactona en estos vinos.

4. Conclusiones

Las levaduras *T. delbrueckii* killer pudieron dominar la fermentación de vino blanco en presencia de levaduras silvestres *Saccharomyces*, mientras que las mismas levaduras no-killer fueron fácilmente desplazadas por las levaduras *Saccharomyces* con mayor vigor fermentativo. El dominio de *T. delbrueckii* originó aromas característicos de fruta procesada o golosinas que son poco habituales en los vinos frescos, mientras que *S. cerevisiae* originó los habituales aromas a fruta fresca como consecuencia de que produjeron más ésteres etílicos con bajo nivel de percepción, fundamentalmente butanoato de etilo, acetato de isopentilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo.

5. Bibliografía

1. García-Carpintero, E. G., E. Sánchez-Palomo, and M. A. González-Viñas. 2011. Aroma characterization of red wines from cv. Bobal grape variety grown in La Mancha region. *Food Research International* 44:61-70.
2. Pérez, F., M. Ramírez, and J. A. Regodón. 2001. Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.* 79:393-399.

6. Agradecimientos

Proyectos GR10088 (Junta de Extremadura) y AGL2011-25711 (Ministerio de Ciencia e Innovación). Rocío Velázquez, becaria de la Junta de Extremadura. Análisis de aromas: Servicio de Análisis Elemental y Molecular, UEx.

M13 - EFECTO DE *Torulaspota delbrueckii* SOBRE LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA Y LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA DE VINOS TINTOS

Matilde Maqueda¹, Rocío Velázquez¹, Emiliano Zamora², María Luz Álvarez², Manuel Ramírez^{1*}

¹Departamento de Ciencias Biomédicas (Área de Microbiología), Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06071 Badajoz, Spain

² Estación Enológica, 06200 Almendralejo, Spain

*mramirez@unex.es

RESUMEN:

Se analiza el efecto de nuevas levaduras *Torulaspota delbrueckii* en la elaboración de vino tinto. La inoculación secuencial, inicialmente *T. delbrueckii* y dos días después *Saccharomyces cerevisiae*, no aseguró una participación importante de *T. delbrueckii* durante la fermentación, y no se apreció ninguna mejora digna de destacar en la calidad organoléptica de los vinos. Sin embargo, la inoculación inicial y exclusiva con levaduras *T. delbrueckii* killer permitió su dominancia durante la fermentación, aunque estas fermentaciones fueron algo más lentas que las inoculadas con *S. cerevisiae*. Sólo se apreció fermentación maloláctica o maloalcohólica en los vinos inoculados con *Torulaspota*. Además, se apreciaron mejoras evidentes en algunos parámetros enológicos y en la calidad de los vinos de *Torulaspota*. Éstos resultaron más redondos en boca, con aromas a fruta confitada/pastelería, y tonos lacteados. En contraprestación, disminuyó la intensidad de los aromas frutales respecto a los vinos de *S. cerevisiae*, en los que no hubo fermentación maloláctica. La mayoría de compuestos con descriptor aromático frutal y bajo nivel de percepción fueron más abundantes en los vinos de *S. cerevisiae*. Sin embargo, en los vinos de *Torulaspota* se apreció una cantidad de γ -hexalactona y etoxi- γ -butirolactona significativamente mayor, que pudiera ser responsable del aroma a pastelería, fruta procesada o golosinas. La mejora organoléptica fue evidente en los vinos más ácidos y estructurados, pero no se observó en los vinos menos estructurados, probablemente debido a que la total dominancia de *Torulaspota* hasta el final de la fermentación de estos vinos venció su pobre estructura hasta deteriorarlos.

Palabras clave: Levaduras, *Torulaspota delbrueckii*, killer, vino tinto, aromas

1. Introducción

Algunas levaduras no-*Saccharomyces* se pueden utilizar para corregir defectos del vino o mejorar su complejidad organoléptica. A diferencia de *Saccharomyces*, estas levaduras secretan más enzimas (esterasas, glicosidasas, lipasas, proteasas, celulasas, etc.), que degradan ciertos componentes del mosto mejorando aspectos tecnológicos como maceración, filtración, clarificación, rendimiento alcohólico, extracción de color, etc., y la calidad aromática del vino. Además, algunas levaduras no-*Saccharomyces*, producen poca cantidad de compuestos indeseables como acetaldehído, acetoina, ácido acético, y acetato de etilo. Por esta razón, se ha evaluado su utilidad para reducir la acidez volátil del vino co-inoculando estas levaduras con *Saccharomyces* en cultivos mixtos o de forma secuencial, y de manera singular en vinos elaborados con mostos muy ricos en azúcar procedentes de uvas botritizadas. El mayor problema del este uso combinado de diferentes levaduras es que los resultados de la

fermentación son imprevisibles, y pueden afectar de forma inesperada a la composición química y aromática del vino. Normalmente, las levaduras no-*Saccharomyces* tienen menos vigor fermentativo que las *Saccharomyces*, tienen dificultad para completar la fermentación del mosto en un tiempo razonable, y suelen ser desplazadas fácilmente por las *Saccharomyces* (inoculadas o silvestres). Esto hace difícil apreciar diferencias importantes entre los vinos co-inoculados con levaduras no-*Saccharomyces* respecto a los inoculados exclusivamente con *Saccharomyces*. La levadura no-*Saccharomyces* más utilizada es *Torulaspota delbrueckii*, que se puede adquirir en el mercado para elaborar vino; aunque su utilidad práctica en bodega está por confirmar. En este trabajo se analiza la utilidad de inocular exclusivamente levaduras *Torulaspota* asesinas (killer) para elaborar vinos tintos diferenciados y su efecto sobre la fermentación maloláctica.

2. Material y métodos

Se utilizaron tres cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*: EX85 (killer K2, seleccionada comercial de Heral SC), EX85R (no-killer, resistente a cicloheximida), E7AR1 (killer K2, resistente a cicloheximida); tres de *Torulaspota delbrueckii* patentadas por la Universidad de Extremadura: EX1180 (autóctona silvestre, killer *Kbarr*), EX1180-11C4 (killer *Kbarr*, resistente a cicloheximida), EX1180-2K (mutante espontáneo no-killer, resistente a cicloheximida); y un mutante resistente a cicloheximida, TL3, procedente de una estirpe de *T. delbrueckii* comercial (TD291 de Lallemand). Las fermentaciones se realizaron con uva de distinta variedades: Cabernet-Sauvignon, tempranillo, Garnacha Tinta y Pinot-Noir. Los parámetros fisicoquímicos se midieron según los Métodos Oficiales. El análisis organoléptico se realizó por catadores entrenados en la Estación Enológica de Almodralejo. Los aromas minoritarios se analizaron mediante cromatografía de gases con detector de masas (1).

3. Resultados

Las fermentaciones inoculadas con *Saccharomyces* fueron siempre más rápidas en comenzar y terminar que las inoculadas con *Torulaspota*, las cuales arrancaron rápidamente pero fueron haciéndose algo más lentas al final de fermentación. Las levaduras *Torulaspota* dominaron la fermentación, aunque con más dificultad en la fase final que en vino blanco, probablemente porque en las fermentaciones de tinto había muchas levaduras *Saccharomyces* silvestres procedentes de los hollejos. La dominancia fue mayor cuando se inocularon levaduras *Torulaspota* killer respecto a las *Torulaspota* no-killer. La cinética de fermentación de *Torulaspota* fue siempre más lenta que la correspondiente a *Saccharomyces*, aunque al contrario que en vinos blancos, nunca se observaron problemas de final de fermentación, quedando siempre los vinos secos. Sólo se apreció fermentación maloláctica y presencia de bacterias o fermentación maloalcohólica en las fermentaciones más lentas inoculadas con *Torulaspota* (Fig. 1).

En contraste con lo observado en vinos blancos, se apreciaron mejoras de algunos parámetros enológicos y en la calidad de los vinos de *Torulaspota*: más redondos en boca, aromas a fruta confitada/pastelería, tonos lacteados, y sensaciones de vinos más maduros. En contraprestación, como es lógico, disminuyó la intensidad de aromas frutales respecto a los vinos de *Saccharomyces*, en los que nunca se produjo fermentación maloláctica. La mayoría de los compuestos con descriptor aromático frutal fueron más abundantes en los vinos de *Saccharomyces* respecto a los de *Torulaspota*. Tan solo cuatro compuestos con descriptor

frutal (etil propionato, etil isobutirato, etil lactato y 3-etoxi propan-1-ol) fueron más abundantes en los vinos tintos de *Torulaspora*; mientras que en los vinos de *Saccharomyces* fueron nueve compuestos. Esto explica la mayor intensidad de los aromas a fruta fresca detectada por los catadores en los vinos de *Saccharomyces*. Sin embargo, en los vinos de *Torulaspora* se detectaron cantidades de gamma-hexalactona y etoxi-gamma-butirolactona significativamente mayores que en los vinos de *Saccharomyces*, que pueden ser responsables del característico aroma a pastelería, fruta procesada o golosinas encontrado en estos vinos (Fig. 2).

Figura 1. Evolución de las fermentaciones de uva Cabernet-Sauvignon 2011-2 levaduras exclusivamente en el encubado. A: Densidad. B: Proporción de levaduras resistentes a cicloheximida (CYH^R). C: Consumo de ácido málico y azúcares, y producción de ácido láctico.

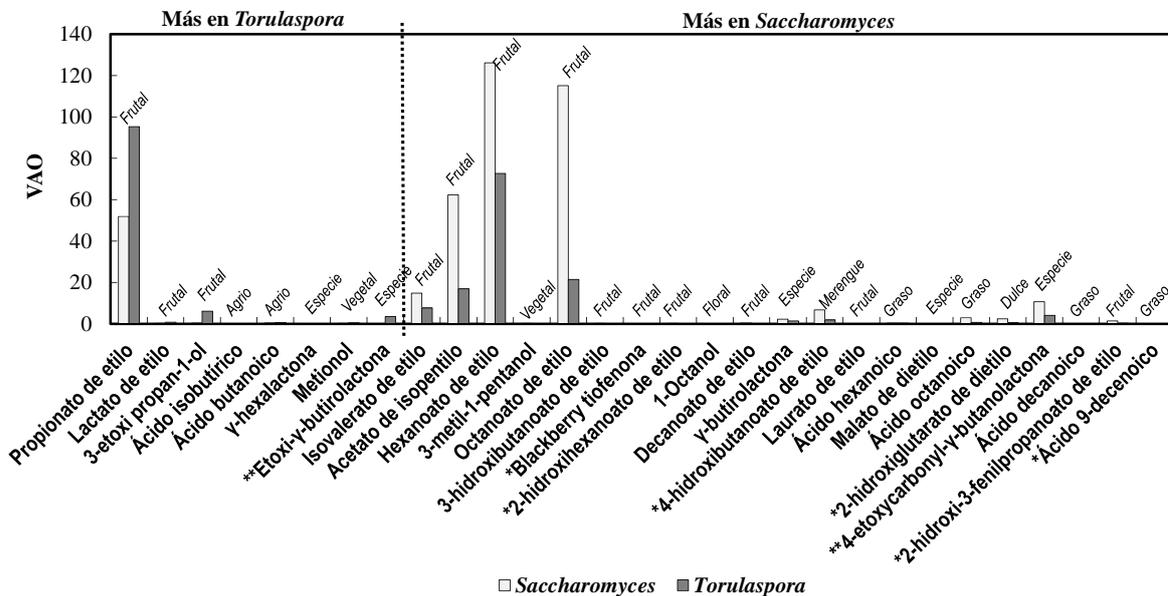
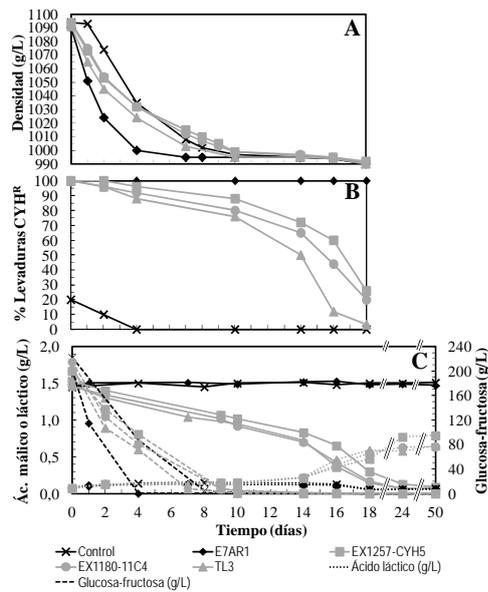


Figura 2. Compuestos aromáticos para los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las cantidades presentes en los vinos tintos inoculados con *Torulaspora* o *Saccharomyces*. Valor medio de actividad odorante (VAO). *, valor de umbral de detección desconocido; se ha tomado arbitrariamente el valor de 1 para el cálculo del VAO. **, valor de umbral de detección desconocido; para el cálculo del VAO se ha tomado arbitrariamente el valor de 0,035 ppm correspondiente a la γ-butirolactona.

En conjunto, los vinos de *Torulaspora* fueron de calidad más apreciada que los de *Saccharomyces* cuando se trató de vinos tintos muy estructurados elaborados con uva Cabernet-Sauvignon o Tempranillo. En los vinos tintos poco estructurados se detectaron notas de evolución excesiva que fueron consideradas negativas para la calidad del vino, probablemente debido a que demasiada presencia de *Torulaspora* hasta el final de fermentación de estos vinos venció su poca estructura hasta deteriorarlos.

4. Conclusiones

La inoculación inicial y exclusiva del mosto con levaduras *Torulaspora* killer Kbarr permitió la dominancia de estas levaduras durante toda o la mayor parte de la fermentación y originó vinos secos con distinto perfil aromático que los elaborados con levaduras *Saccharomyces*, que fueron de calidad más apreciada cuando se trató de vinos tintos muy estructurados. En los vinos tintos poco estructurados se detectaron notas de evolución excesiva que fueron consideradas negativas para la calidad del vino. Se realizó fermentación maloláctica o maloalcohólica en todas las fermentaciones lentas (con más azúcares residuales) inoculadas con *Torulaspora*; y muy excepcionalmente en las fermentaciones inoculadas con *Saccharomyces* o en las fermentaciones control.

5. Bibliografía

1. García-Carpintero, E. G., E. Sánchez-Palomo, and M. A. González-Viñas. 2011. Aroma characterization of red wines from cv. Bobal grape variety grown in La Mancha region. Food Research International 44:61-70.

6. Agradecimientos

Proyectos GR10088 (Junta de Extremadura) y AGL2011-25711 (Ministerio de Ciencia e Innovación). Rocío Velázquez, becaria de la Junta de Extremadura. Análisis de aromas: Servicio de Análisis Elemental y Molecular, UEx.

M14 - INOCULACIÓN DE CEPAS AUTÓCTONAS DE SACCHAROMYCES Y NO-SACCHAROMYCES EN VINOS DE LA D.O. "VINOS DE MADRID"

Margarita García¹, Braulio Esteve-Zarzoso², Juan Mariano Cabellos¹, Julia Crespo¹, Valeria Romero¹, Teresa Arroyo¹

¹IMIDRA, Departamento de Agroalimentación, Finca "El Encín", Ctra. A-2, Km 38,200, 28800, Alcalá de Henares, Madrid.

²Universitat Rovira i Virgili, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Marcel·li Domingo 1, 43007, Tarragona.

margarita_garcia_garcia@madrid.org

RESUMEN:

En la elaboración del vino, hay un interés creciente en el uso de levaduras no-*Saccharomyces* en cocultivo con *Saccharomyces cerevisiae* con una consecuente mejora en el control de la fermentación combinado con el uso de nuevos procesos biotecnológicos. En este trabajo, se analizan los cultivos puros junto a inoculaciones mixtas y secuenciales de las cepas autóctonas aisladas de la D.O. "Vinos de Madrid", *Torulaspora delbrueckii*, CLI 918; *Schizosaccharomyces pombe*, CLI 1085; *Candida stellata*, CLI 920; *Metschnikowia pulcherrima*, CLI 475; *Lachancea thermotolerans*, 9-6C, con la cepa autóctona de *Saccharomyces cerevisiae*, CLI 889, sobre mosto de la variedad Malvar. Del estudio de la composición físico-química, aromática y sensorial de los vinos resultantes se deduce que las inoculaciones secuenciales han sido las que aportan mayor complejidad y calidad a los vinos elaborados.

Palabras clave: Levaduras autóctonas; cultivo puro/mixto/secuencial; *Saccharomyces*; no-*Saccharomyces*; Malvar

1. Introducción

Un importante avance tecnológico en la industria del vino ha sido la inoculación de mosto con cultivos seleccionados de *Saccharomyces cerevisiae*. El control microbiológico del proceso de fermentación permite un mejor manejo de la fermentación alcohólica y confiere al vino una calidad y estilo seguro y predecible [1]. Sin embargo, hay evidencias de que las fermentaciones controladas producen vinos menos complejos y estandarizados [2]; por lo que en la búsqueda de respuestas a la demanda de los consumidores, se plantea el uso de levaduras no-*Saccharomyces* en combinación con *Saccharomyces cerevisiae* para diversificar y mejorar las propiedades sensoriales de los vinos [3].

El presente trabajo se enmarca en la línea de mejora de vinos de la D.O. "Vinos de Madrid". Con el fin de exaltar las propiedades organolépticas de variedades de uva regionales, nos planteamos la aplicación de nuevos procesos fermentativos que ayuden a una mayor diferenciación y aporten personalidad a los vinos elaborados en la D.O. "Vinos de Madrid".

2. Material y métodos

En este estudio, se han utilizado las cepas: *Torulaspora delbrueckii* CLI 918 (Td), *Schizosaccharomyces pombe* CLI 1085 (Sp), *Candida stellata* CLI 920 (Cs), *Metschnikowia pulcherrima* CLI 457 (Mp), *Lachancea thermotolerans* 9-6C (Lt), y la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* CLI 889 (Sc) aisladas en viñedos y bodegas de la D.O. “Vinos de Madrid”.

Los ensayos se realizaron por triplicado con inóculos de 10^6 células/mL en fermentadores con 1L de mosto de la variedad Malvar, en una sala termostatizada (a 18°C) con agitación mecánica (150 rpm) siguiendo tres modalidades de cultivo:

Cultivo puro (p) de cada una de las cepas analizadas.

Cultivo mixto (m) con inoculación simultánea de *S. cerevisiae* y la cepa no-*Saccharomyces* correspondiente.

Cultivo secuencial (s) con inoculación inicial de la cepa no-*Saccharomyces* y adición de *S. cerevisiae* una vez alcanzados 5º de etanol por la cepa no-*Saccharomyces*.

Se analizaron parámetros generales de los vinos elaborados siguiendo métodos oficiales de análisis, análisis de aromas mediante cromatografía de gases y análisis sensorial [4].

3. Resultados

	Ensayo <i>S. cerevisiae</i> - <i>T. delbrueckii</i>				Ensayo <i>S. cerevisiae</i> - <i>S. pombe</i>				Ensayo <i>S. cerevisiae</i> - <i>C. stellata</i>				Ensayo <i>S. cerevisiae</i> - <i>M. pulcherrima</i>				Ensayo <i>S. cerevisiae</i> - <i>L. thermotolerans</i>			
	p-Sc	p-Td	m-Td	s-Td	p-Sc	p-Sp	m-Sp	s-Sp	p-Sc	p-Cs	m-Cs	s-Cs	p-Sc	p-Mp	m-Mp	s-Mp	p-Sc	p-Lt	m-Lt	s-Lt
GA [¶]	13,13 (0,06)	10,88 (0,28)	13,03 (0,01)	12,80 (0,00)	13,13 (0,06)	10,21 (0,74)	13,70 (0,10)	10,88 (0,94)	13,13 (0,06)	3,40 (0,05)	13,70 (0,41)	13,23 (0,24)	12,90 (0,12)	4,12 (0,71)	11,31 (0,77)	10,50 (2,44)	12,80 (0,00)	7,19 (0,26)	12,63 (0,05)	7,29 (0,13)
pH	3,30 (0,00)	3,34 (0,04)	3,30 (0,01)	3,30 (0,00)	3,30 (0,00)	2,98 (0,01)	3,20 (0,00)	3,01 (0,01)	3,30 (0,00)	3,71 (0,02)	3,37 (0,03)	3,27 (0,00)	3,10 (0,00)	3,04 (0,02)	3,10 (0,02)	3,12 (0,01)	3,10 (0,00)	2,43 (0,07)	3,10 (0,00)	2,47 (0,02)
AV [#]	0,50 (0,01)	0,60 (0,01)	0,46 (0,06)	0,61 (0,20)	0,50 (0,01)	0,33 (0,05)	0,73 (0,05)	0,38 (0,05)	0,50 (0,01)	0,63 (0,01)	0,70 (0,01)	0,55 (0,07)	0,86 (0,00)	0,27 (0,02)	0,83 (0,00)	0,50 (0,03)	0,40 (0,00)	0,78 (0,01)	0,46 (0,05)	0,77 (0,01)
AT [£]	5,60 (0,01)	6,75 (0,22)	5,46 (0,06)	6,06 (0,06)	5,60 (0,01)	7,08 (0,12)	6,56 (0,05)	6,95 (0,02)	5,60 (0,01)	4,79 (0,01)	4,10 (0,06)	4,85 (0,06)	6,51 (0,00)	5,24 (0,22)	6,23 (0,04)	5,98 (0,05)	6,36 (0,11)	16,24 (0,77)	6,46 (0,11)	15,80 (0,33)
AR [‡]	<1,50	33,70 (4,20)	<1,50	2,20 (0,05)	<1,50	52,93 (4,2)	2,43 (0,66)	42,46 (6,48)	<1,50	174,18 (0,71)	9,67 (0,70)	25,21 (5,19)	2,42 (0,35)	152,93 (13,85)	45,19 (12,04)	55,60 (15,12)	1,60 (0,00)	77,15 (4,75)	<1,50	73,05 (2,37)
GI [†]	3,12 (0,14)	7,14 (0,3)	2,87 (0,20)	5,28 (0,20)	3,12 (0,14)	6,92 (0,90)	3,22 (0,17)	5,22 (0,30)	3,12 (0,14)	9,17 (0,25)	5,72 (0,12)	6,91 (0,68)	6,00 (0,03)	9,66 (0,29)	6,02 (0,19)	7,40 (0,52)	4,30 (0,11)	0,93 (0,14)	4,75 (0,07)	0,92 (0,19)
Ác.M [†]	0,95 (0,03)	1,05 (0,01)	0,90 (0,01)	0,93 (0,06)	0,95 (0,03)	<0,20	0,79 (0,03)	<0,20	0,95 (0,03)	<0,20	0,87 (0,20)	<0,20	0,84 (0,20)	<0,20	0,94 (0,06)	0,85 (0,20)	0,77 (0,04)	<0,20	0,61 (0,02)	<0,20
Ác.L [†]	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	0,61 (0,07)	<0,50	0,53 (0,08)	<0,50	0,91 (0,04)	<0,50	0,59 (0,14)	0,59 (0,14)	1,08 (0,10)	0,73 (0,09)	0,74 (0,15)	<0,50	8,32 (0,10)	0,56 (0,04)	7,99 (0,29)
Aromas [*]																				
Σ Alcoholes	115,81	206,85	151,05	283,41	115,81	120,92	149,94	108,29	115,81	182,16	410,77	288,05	97,29	83,40	83,58	133,51	182,2	251,87	170,10	299,74
Σ Ácidos	7,03	3,46	7,90	4,66	7,03	10,52	8,53	8,72	7,03	0,75	16,50	9,82	11,82	2,49	14,24	14,19	16,74	19,22	17,04	41,34
Σ Ésteres	6,09	5,32	7,15	11,40	6,09	5,66	5,49	4,84	6,09	1,05	13,27	6,99	4,74	4,28	5,15	2,98	4,71	28,50	7,71	60,44
Σ Otros	2,49	1,75	1,77	2,58	2,49	60,75	2,31	7,13	2,49	4,69	7,48	3,94	5,11	7,57	6,81	4,56	9,16	13,09	7,85	16,29

Tabla 1. Resultados analíticos de los vinos resultantes de los cultivos puros, mixtos y secuenciales y concentración total (mg/L) de los compuestos aromáticos analizados dentro de cada grupo (alcoholes, ácidos, ésteres, otros (aldehídos, cetonas y lactonas)). Los valores entre paréntesis corresponden a las desviaciones estándar. GA: grado alcohólico; AV: acidez volátil; AT: acidez total; AR: azúcares reductores; GI: glicerol; Ác.M: ácido málico; Ác.L: ácido láctico; [¶]%v/v; [#]g/L ác.acético; [£]g/L ác.tartárico; [†]g/L; ^{*}mg/L.

Ensayo con *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae*: La fermentación alcohólica se ha completado en todos los ensayos a excepción del cultivo puro de *T. delbrueckii* que presenta altos contenidos de azúcares residuales. Destaca el contenido en glicerol y menor grado alcohólico del vino producido en la fermentación secuencial (Tabla 1). Tanto el cultivo puro de *T. delbrueckii* como el secuencial poseen una mayor cantidad de compuestos aromáticos frutales y florales como 2-feniletanol, isovalerato de etilo, hexanoato de etilo y acetato de 2-feniletilo; esto coincide con el análisis de cata sensorial, siendo estos dos vinos los mejor valorados en intensidad aromática, aroma frutal y calidad global (Figura 1).

Ensayo con *S. pombe* y *S. cerevisiae*: Los valores de azúcares residuales a final de fermentación en cultivo puro de *S. pombe* y secuencial son elevados, alcanzándose como máximo 10-11 grados de alcohol. En el cultivo mixto, la acidez total y la acidez volátil son más bajas (Tabla 1). Los valores de ácido láctico son elevados en los cultivos puro y secuencial de *S. pombe* coincidiendo con un mayor consumo de ácido málico en las mismas condiciones. En la cata, destaca el cultivo secuencial que contiene mayor concentración de los ésteres, butirato de etilo, hexanoato de etilo y acetato de 2-feniletilo responsables de los aromas frutales y florales de los vinos (Figura 2).

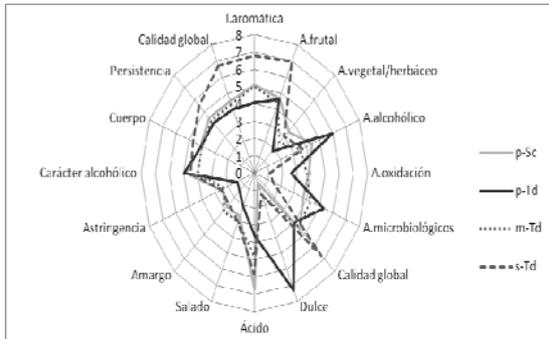


Figura 1. Valoración organoléptica de los cultivos ensayados con Td y Sc.

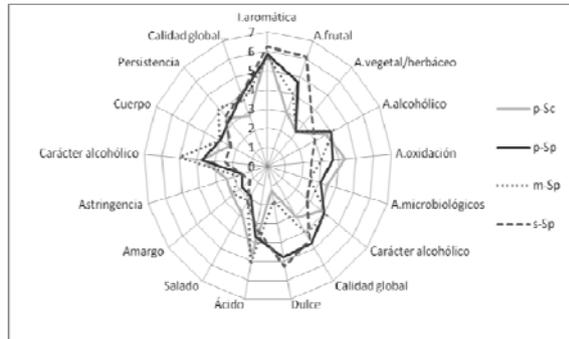


Figura 2. Valoración organoléptica los cultivos ensayados con Sp y Sc.

Ensayo con *C. stellata* y *S. cerevisiae*: La concentración de azúcares residuales es >3 g/L en todas las fermentaciones con *C. stellata*. El cultivo mixto destaca por la mayor producción de acidez volátil (Tabla 1). En cultivo puro y secuencial de *C. stellata*, se aprecia consumo de ácido málico, producción de ácido láctico y mayor contenido en glicerol. En la cata, el vino mejor valorado fue el del cultivo puro de *C. stellata* por su mayor aroma frutal y su carácter dulce en boca (Figura 3). Estos datos coinciden con el análisis aromático dónde este cultivo se distingue por poseer una alta cantidad de compuestos aromáticos agradables como 2-feniletanol y acetato de 2-feniletilo (Tabla 1).

Ensayo con *M. pulcherrima* y *S. cerevisiae*: La cantidad de azúcares residuales es elevada en todas las fermentaciones con la cepa no-*Saccharomyces*. Se observa que *M. pulcherrima* en cultivo puro es productora de una baja acidez volátil (Tabla 1). Destaca la alta concentración de glicerol en los cultivos puro y secuencial de *M. pulcherrima*. Tanto en los análisis aromáticos como en la cata (Figura 4), sobresale el cultivo elaborado de manera secuencial, aportando más intensidad aromática y mayor concentración de ésteres como 3-OH butirato de etilo, acetato de hexilo y octanoato de etilo, asociados con el aroma a pera descrito por los catadores.



Figura 3. Valoración organoléptica de los cultivos ensayados con Cs y Sc.

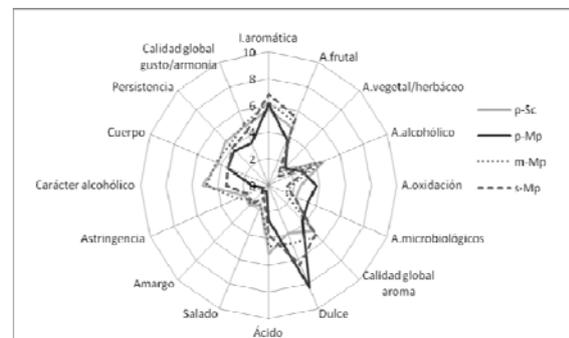


Figura 4. Valoración organoléptica de los cultivos ensayados con Mp y Sc.

Ensayo con *L. thermotolerans* y *S. cerevisiae*: En el cultivo puro y secuencial de *L. thermotolerans* no se han consumido la totalidad de azúcares del mosto, acabando el vino con 8° de alcohol. Se observa una disminución de pH en cultivo puro y secuencial de *L. thermotolerans* y un aumento de la acidez total por la elevada producción de ácido L-láctico (Tabla 1). En composición aromática destacan los cultivos puro y secuencial con la cepa no-*Saccharomyces*, siendo elevadas las concentraciones de 2-feniletanol y lactato de etilo. En cata (Figura 5), resalta la acidez en boca de los cultivos puro y secuencial de *L. thermotolerans* y su aroma a fruta madura aunque fue el cultivo mixto, con aromas cítricos y más fresco en boca, el mejor valorado organolépticamente.

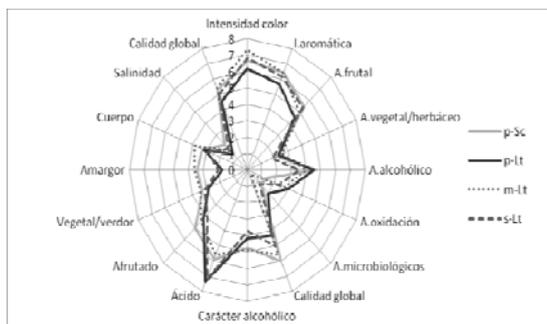


Figura 5. Valoración organoléptica de los cultivos ensayados con Lt y Sc.

4. Conclusiones

En los ensayos realizados, se aprecian diferencias físico-químicas y organolépticas en los diferentes modos de elaboración de los vinos. La elaboración secuencial ha aportado de manera general mayor calidad y tipicidad al vino, siendo la más aceptada a nivel sensorial. Las características más destacadas del cultivo secuencial son menor acidez volátil, menor grado alcohólico, mayor cantidad de glicerol y la conservación del perfil aromático aportado por la cepa no-*Saccharomyces* al principio de la fermentación.

Estos ensayos son pioneros en los estudios de cultivos asociados con levaduras autóctonas de la D.O. "Vinos de Madrid". Futuros trabajos están focalizados en el total consumo de azúcares para obtener vinos secos, mejorando el momento de inoculación de *Saccharomyces* para poner en evidencia las diferencias entre los sistemas de elaboración y las mejoras que aportan estas combinaciones de levaduras a la calidad final de los vinos, y fermentaciones a nivel de bodega experimental.

5. Bibliografía

1. Barre, P.; Vezinhet, F. 1984. Evolution towards fermentation with pure culture yeasts in wine making. *In: Microbiology Science*. 1. 7, 159-163.
2. Fleet, G.H. 2008. Wine yeasts for the future. *In: FEMS Yeast Research*. 8. 7, 979-995.
3. Cominiti, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazu, I.; Ciani, M. 2011. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *In: Food Microbiology*. 28. 5, 873-882.
4. Arroyo, T., Lozano, J., Cabellos, J.M., Gil-Díaz, M., Santos J.P.; Horrillos, M.C. 2009. Evaluation of wine aromatic compounds by a sensory human panel and an electronic nose. *In: Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57. 24, 11449-11582.

6. Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado en el IMIDRA y ha sido co-financiado por FEADER.

M15 - INFLUENCIA DE LA POBLACIÓN DE LEVADURAS EN FERMENTACIONES DE MOSTO ECOLÓGICO Y CONVENCIONAL DE LA VARIEDAD MENCÍA EN LA D.O. RIBEIRA SACRA (GALICIA)

David Castrillo¹, Pilar Blanco¹, Mónica Cid¹, Alba Camesella¹, Elvira Soto¹

¹Estación de Viticultura e Enología de Galicia (EVEGA-INGACAL), Ponte San Clodio s/n, 32427, Leiro, Ourense, España. Tfno: 988 488 033.

david.castrillo.cachon@xunta.es

RESUMEN:

En este trabajo se presenta la influencia de la población de levaduras durante la fermentación natural de mostos de origen ecológico y convencional de la variedad Mencía, cultivada durante 2013 y 2014 en la DO Ribeira Sacra (Galicia). Se observaron diferencias en las curvas de fermentación de los mostos de origen ecológico y convencional, dependiendo del tipo y evolución de la población de microorganismos presentes. La concentración de azúcares de los mostos ecológicos fue menor que la de los convencionales mientras que la población de levaduras fue similar en ambos tipos de mosto. Sin embargo, las especies de levaduras presentes y su evolución durante la fermentación, mostraron diferencias entre las muestras de cultivo ecológico y convencional y, por tanto, influyeron en las características finales del vino.

Palabras clave: levaduras, cultivo ecológico, fermentación natural, Mencía, Ribeira Sacra

1. Introducción

Actualmente existe una tendencia mundial de la viticultura hacia el cultivo ecológico por ser una producción más saludable, sostenible y respetuosa con el medio. En Galicia existen cinco Denominaciones de Origen (DO), caracterizadas por unas condiciones climáticas que no siempre favorecen el cultivo ecológico. Por ello, en el Consello Regulador de Agricultura Ecolóxica de Galicia (CRAEGA) solo constan 20 productores y 12 bodegas inscritas.

Los microorganismos presentes durante la fermentación modulan las propiedades químicas y sensoriales del vino (Swiegers *et al.*, 2005). Diversos estudios han puesto de manifiesto que los vinos obtenidos mediante los métodos tradicionales basados en la fermentación natural espontánea, sin aditivos químicos (Guzzon *et al.*, 2011), son apreciados por los consumidores debido a su estructura y complejidad aromática (Lambrechts y Pretorius, 2000; Blanco *et al.*, 2013). También las prácticas culturales utilizadas en el viñedo pueden repercutir en la diversidad de microorganismos presentes en la uva y, por tanto, en el mosto (Cordero-Bueso *et al.*, 2011).

En la Estación de Viticultura e Enología de Galicia (EVEGA) se está llevando a cabo un estudio comparativo sobre la producción ecológica y convencional en las distintas DO gallegas. En el presente trabajo se muestran los resultados obtenidos sobre la caracterización de la población de levaduras en mosto, su dinámica durante la fermentación y la repercusión en las características del vino para la variedad de uva tinta *Vitis vinifera* L. Mencía procedente de cultivo ecológico y convencional en la DO Ribeira Sacra (Galicia).

2. Material y métodos

Las muestras de uva procedieron de dos parcelas, una cultivada en ecológico y otra siguiendo prácticas convencionales, de la finca Horta da Cal, Portutide (Mourellos, O Saviñao) en la DO Ribeira Sacra. Por cada tipo de cultivo se dividió la parcela en 3 bloques representativos aleatorios y se recogieron 5 kg de racimos. En el laboratorio los racimos se despallaron manualmente, se estrujaron, y se dejaron fermentar de forma natural (sin añadir sulfuroso ni levaduras) en botellas de 2 L a temperatura ambiente (24 °C). Se recogió una muestra de mosto para análisis de los parámetros químicos básicos y otra para análisis microbiológicos. También se tomaron muestras al inicio (Fi) y al final (Ff) de la fermentación para seguimiento de las levaduras responsables del proceso. La evolución de la fermentación se monitorizó mediante medida del grado Brix. A los 10 días de fermentación, el vino se descubó y la fermentación se mantuvo unos días más hasta la finalización del proceso. El vino obtenido se centrifugó, se sulfitó con 25 mg/l de SO₂ y se guardó hasta su análisis.

Las muestras de mosto y de fase inicial (Fi) y final (Ff) de la fermentación se diluyeron de forma adecuada y se sembraron en medio WL Nutrient Agar (Scharlau Microbiology). Las placas se incubaron a 28 °C hasta la aparición de colonias visibles, tras lo cual se procedió al recuento de levaduras y al aislamiento de un número representativo de colonias de cada muestra para su posterior identificación. Los aislados se crecieron en Lysine Medium (Scharlau Microbiology) para su diferenciación en levaduras de tipo *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*.

La identificación de las levaduras a nivel de especie se realizó mediante amplificación por PCR del gen 5.8S rRNA y dos espaciadores ribosomales internos (ITS) según el método de Esteve-Zarzoso *et al.* (1999). Aquellos aislados identificados como *Saccharomyces* se caracterizaron a nivel de cepa mediante la técnica de análisis de los patrones de restricción del mtDNA (mtDNA-RFLPs) según el protocolo descrito por Querol *et al.* (1992).

Los distintos parámetros de mostos (Brix, azúcares reductores, pH, acidez total, ácido L-málico, ácido tartárico) y vinos (grado alcohólico, azúcares reductores, acidez total, acidez volátil, ácidos málico, tartárico, láctico y pH) se determinaron utilizando los métodos oficiales (OIV, 2012), excepto el ácido tartárico que se determinó por colorimetría. Para detectar diferencias significativas entre los mostos de cultivo ecológico y convencional, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software SPSS 18.0.

3. Resultados

El análisis de los mostos reveló una concentración de azúcares mayor en las muestras procedentes de producción convencional con respecto a las ecológicas, con diferencias significativas en 2014 (Tabla 1). El contenido de ácido L-málico fue significativamente más alto en el cultivo convencional en 2013 mientras que en 2014 lo fue en el cultivo ecológico. Sin embargo, el ácido tartárico fue mayor en el mosto de uva ecológica en ambos años, no apreciándose diferencias en la acidez total y pH.

En cuanto a la población de levaduras, a nivel cuantitativo (número de levaduras viables/mL), ésta fue mayor en 2013 en mosto convencional mientras que en 2014 fue mayor en mosto de origen ecológico, aunque sin diferencias significativas. A nivel cualitativo, la diversidad de especies fue mayor en mostos de cultivo ecológico (10) que en convencional (6). Las especies predominantes en ambos casos fueron *Metschnikowia* sp. y *Hanseniaspora*

uvarum. Las diferencias se encontraron en las especies minoritarias. Así en ecológico se identificaron, además, levaduras de las especies: *Pichia kluyveri*, *Pichia kudriavzevii*, *Uncultured Zygosaccharomyces*, *Issatchenkia terricola*, *Candida apicola*, *Candida zemplinina* y *Pichia anomala*. En los mostos convencionales se encontraron: *P. kluyveri*, *C. zemplinina*, *Pichia membranifaciens* y *Z. bisporus*.

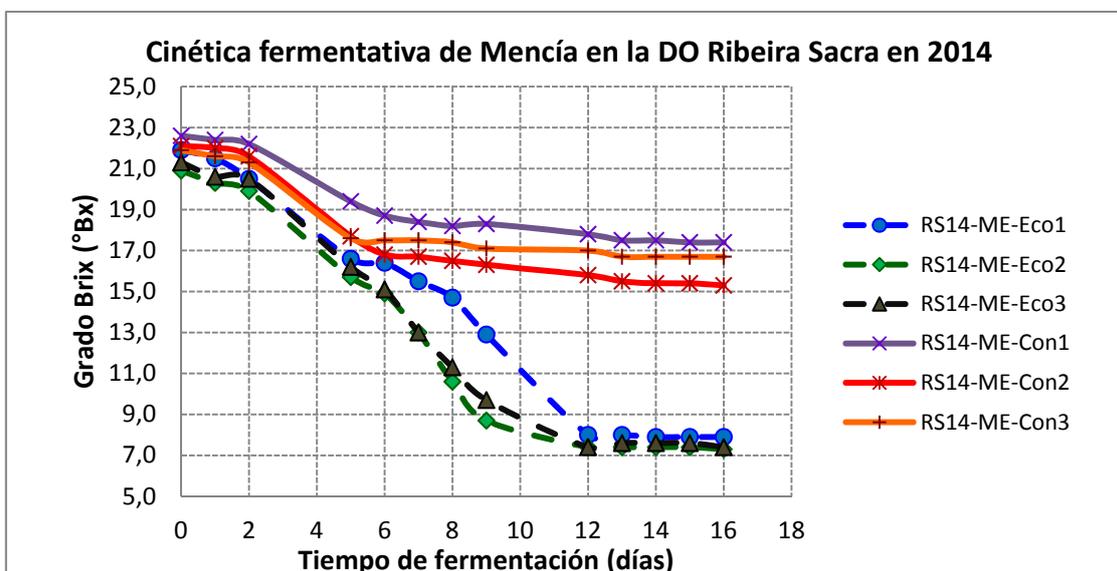
Tabla 1. Características de los mostos ecológicos y convencionales de la variedad Mencía (ME-Eco y ME-Con) cultivada en la DO Ribeira Sacra en 2013 y 2014.

Parámetro	RS13-ME-Eco	RS13-ME-Con	RS14-ME-Eco	RS14-ME-Con
Azúcares (g/L) ²	216,73±8,72	225,50±18,12	209,47±2,87	219,47±3,45
Grado alcohólico probable (% vol)	12,87±0,51	13,40±1,04	11,97±0,13	12,13±0,56
Acidez total (g tart/L)	4,13±0,29	4,10±0,56	4,07±0,35	3,63±0,29
Ácido L-málico (g/L) ^{1, 2}	1,23±0,19	1,72±0,14	1,87±0,31	1,27±0,23
Ácido tartárico (g/L) ¹	5,93±0,06	5,80±0,00	6,63±0,15	6,57±0,25
pH	3,47±0,03	3,56±0,11	3,75±0,05	3,77±0,06
Núm. levaduras viables (log10UFC/mL)	6,11±1,14	7,53±0,11	6,69±0,16	6,52±0,31

Los datos son la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los mostos procedentes de cultivo ecológico y convencional en 2013 ⁽¹⁾ y 2014 ⁽²⁾ para el parámetro indicado.

Las fermentaciones con mosto ecológico en 2014 mostraron una evolución típica (Figura 1) con descenso a menos de 8 °Brix (niveles de azúcar inferiores a 2,0 g/L) y producción de alcohol (12,4 % vol.). Por el contrario, en los mostos convencionales la fermentación no se completó. Se detuvo en torno al intervalo 19-17 °Brix, dando lugar a vinos con azúcares residuales (138,5 g/L) y bajo contenido en alcohol (3,6 % vol.). En 2013 solo dos de las fermentaciones transcurrieron de forma satisfactoria, una de mosto ecológico y otra de mosto convencional (Blanco *et al.*, 2014).

Figura 1. Evolución de la fermentación de los mostos de Mencía de cultivo ecológico (ME-Eco) y convencional (ME-Con) de 2014.



El estudio de la dinámica de la población de levaduras durante las fermentaciones de mosto ecológico indicó que en la fase inicial estaban presentes levaduras de distintas especies incluyendo *H. uvarum*, *Metschnikowia* sp., *Candida californica* y *Z. bisporus*. Estas levaduras fueron reemplazadas durante la fermentación por la especie *Saccharomyces cerevisiae* que

aparece como dominante al final del proceso. En las fermentaciones con mosto convencional también se identificaron distintas levaduras en la fase inicial del proceso incluyendo *P. kluyvery*, *H. uvarum*, *Metschnikowia* sp., *C. californica* y *C. zemplinina*. Sin embargo, a diferencia con lo ocurrido en los ensayos con mosto ecológico, estas levaduras no fueron sustituidas por *S. cerevisiae*, deteniéndose la fermentación. Estas diferencias observadas a nivel microbiológico explican los datos obtenidos en los vinos.

4. Conclusiones

En la DO Ribeira Sacra el cultivo ecológico del viñedo repercute en las características del mosto de Mencía, que presenta menor contenido en azúcares. La fermentación natural muestra una evolución normal en los mostos ecológicos pero no en los convencionales, donde se observan paradas fermentativas. La diferencia en la población de levaduras presentes en los mostos ecológico y convencional, y su evolución durante la fermentación, influye en las características del producto final.

5. Bibliografía

1. Blanco, P.; Mirás-Avalos, J.M.; Pereira, E.; Orriols, I. 2013. Fermentative aroma compounds and sensory profiles of Godello and Albariño wines as influenced by *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. *In: J Sci Food Agric.* 93, 2849–2857.
2. Blanco, P.; Díaz, E.; Lamas, A.; Soto, E.; Rego, F. 2014. Evaluación del cultivo ecológico y convencional de la variedad Mencía en la DO Ribeira Sacra (Galicia). *In: 29ª Reunión del Grupo de Trabajo de Experimentación en Viticultura y Enología.* 85-91.
3. 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. *In: Int J Food microbiol.* 145, 132-139.
4. Esteve-Zarzoso, B.; Belloch, C.; Uruburu, F.M; Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *In: Int J Syst Bacteriol.* 49, 329-337.
5. Guzzon, R.; Widmann, G.; Settanni, L.; Malacarne, M.; Francesca, N.; Larcher, R. 2011. Evolution of yeast populations during different biodynamic winemaking processes. *In: S Afr J Enol Vitic.* 32, 242-250.
6. Lambrechts, M.G.; Pretorius, I.S. 2000. Yeasts and its importance to wine aroma: a review. *In: S Afr J Enol Vitic.* 21, 97–121.
7. OIV. International Organisation of Vine and Wine. 2012. Compendium of international methods of wine and must analysis. Vol. 1 y 2.
8. Querol, A.; Barrio, E.; Huerta, T.; Ramón, D. 1992. Molecular Monitoring of Wine Fermentations Conducted by Active Dry Yeast Strains. *Appl Environ Microbiol.* 58, 2948-2953.
9. Swiegers, JH.; Bartowsky, EJ.; Henschke, PA.; Pretorius, IS. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. *In: Aust J Grape Wine R.* 11, 139-173.

6. Agradecimientos

Este estudio está financiado por el proyecto RTA2012-00021-C03-01 del INIA y fondos FEDER. Gracias a los productores Dña. Esther Teixeira Lemos y Roberto Regal López por permitirnos realizar el ensayo en sus fincas. David Castrillo agradece al INIA su contrato predoctoral-FPI.

M16 - DIVERSIDAD DE LEVADURAS EN BODEGAS QUE ELABORAN VINO ECOLÓGICO EN GALICIA

David Castrillo, Mónica Cid, Alba Camesella, Pilar Blanco

Estación de Viticultura e Enología de Galicia (EVEGA-INGACAL), Ponte San Clodio s/n, 32427, Leiro, Ourense, España. Tfno: 988 488 033.

david.castrillo.cachon@xunta.es

RESUMEN:

En este estudio se presentan los resultados preliminares obtenidos sobre la evaluación de la diversidad de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en distintas bodegas gallegas, que elaboran vino ecológico, en las que no se practica la inoculación de levaduras comerciales para la elaboración del vino. Para ello, se tomaron muestras durante la fermentación en distintas bodegas, se aislaron las levaduras presentes y se caracterizaron mediante mtDNA-RFLP. Los resultados mostraron que en las fermentaciones participaban diferentes cepas de *S. cerevisiae*, que actuaban en codominancia. La participación de distintas levaduras durante la vinificación contribuye a aumentar la complejidad de los vinos. Además, el estudio permitió evaluar la diversidad y distribución de cepas de *S. cerevisiae* en bodegas de las distintas Denominaciones de Origen de Galicia.

Palabras clave: levaduras, bodegas, vino ecológico, fermentación espontánea, Galicia

1. Introducción

Los productos de origen ecológico tienen cada vez más aceptación entre los consumidores por ser más saludables y respetuosos con el medio ambiente. En Galicia el vino constituye un sector muy importante de la economía; sin embargo, nuestras condiciones climáticas no siempre facilitan el cultivo ecológico. Por ello, solo un pequeño número de productores y bodegas gallegos siguen estas prácticas.

La elaboración y etiquetado de vino ecológico requiere, en primer lugar, que la uva proceda de producción ecológica (Reglamento de Ejecución (UE) Nº 203/2012), pero también que se respeten ciertas prácticas en la bodega. Entre estas últimas hay que destacar la utilización de levaduras derivadas de materias primas ecológicas. Además, la utilización de levaduras propias es una práctica que da un valor añadido al producto final.

Los vinos obtenidos mediante los métodos tradicionales de fermentación espontánea, son más apreciados por los consumidores por su estructura y complejidad aromática (Guzzon *et al.*, 2011; Blanco *et al.*, 2013). Se ha demostrado que las prácticas de cultivo ecológico y la vinificación espontánea favorecen la diversidad de las levaduras autóctonas y que algunas cepas son capaces de completar las fermentaciones satisfactoriamente (Tello *et al.*, 2012).

En la Estación de Viticultura e Enología de Galicia (EVEGA) se está llevando a cabo un estudio sobre la producción ecológica de vino en nuestra comunidad. En este estudio se presentan los resultados preliminares obtenidos sobre la evaluación de la diversidad de levaduras en distintas bodegas gallegas que elaboran vino ecológico.

2. Material y métodos

En este estudio se tomaron muestras durante la etapa de vinificaciones en bodegas que elaboran vino ecológico dentro de las distintas Denominaciones de Origen (DO) de Galicia: Corisca (DO Rías Baixas), Pazo Vieite y Adegas Beatriz (DO Ribeiro), Quinta da Muradella (DO Monterrei) y Diego de Lemos (DO Ribeira Sacra).

Las muestras se recogieron en recipientes estériles y se trasladaron al laboratorio de la EVEGA para su procesado. Se diluyeron de forma adecuada y se sembraron en medio WL Nutrient Agar (ScharlauMicrobiology). Las placas se incubaron a 28 °C hasta la aparición de colonias visibles, tras lo cual se procedió al recuento de levaduras y al aislamiento de un número representativo de colonias de cada muestra para su posterior identificación. Los aislados se crecieron en Lysine Medium (ScharlauMicrobiology) para su diferenciación en levaduras de tipo *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*. De cada bodega se analizaron un número representativo de aislados de tipo *Saccharomyces cerevisiae* para determinar la diversidad de cepas.

La caracterización de las levaduras *S. cerevisiae* a nivel de cepa se llevó a cabo mediante la técnica de análisis de los patrones de restricción del mtDNA (mtDNA-RFLPs) según el protocolo descrito por Querol *et al.* (1992).

3. Resultados

La caracterización genética de las levaduras aisladas en bodegas de las distintas DO gallegas permitió diferenciar hasta 32 cepas diferentes. Las cepas se denominaron LBE_n (levaduras de bodegas ecológicas), siendo *n* un número del 1 al 32. La distribución de las distintas cepas por DO, bodega y tipo de vino (blanco o tinto) se muestra en la Tabla 1. Algunos perfiles genéticos de las cepas aisladas pueden observarse en la Figura 1. En casi todas las fermentaciones se identificaron distintas cepas de *S. cerevisiae*, tanto en las muestras procedentes de elaboraciones de vino blanco como de tinto. Algunas cepas aparecían ligadas a distintas DOs, mientras que otras solo aparecían en una bodega concreta. Por ejemplo, la cepa LBE3 estaba presente en todas las DOs, excepto en Ribeira Sacra. LBE10 se encontró en la bodega de la DO Monterrei y también en las dos bodegas de la DO Ribeiro, tanto en vinos blancos como en tintos.

La diversidad media fue de 5 ó 6 cepas diferentes por fermentación. En la DO Monterrei el número de cepas identificadas fue mayor porque se muestrearon más fermentaciones, pero en cada proceso fermentativo la diversidad de cepas estaba dentro de la media (datos no mostrados). En la bodega Pazo Vieite, se tomó muestra en varias etapas de la fermentación encontrándose una codominancia de cepas en todas ellas. En esta bodega hay que destacar que también se elabora vino mediante las técnicas convencionales con inoculación de levaduras comerciales; sin embargo, los datos obtenidos indican que esto no afecta a la elaboración ecológica en cuanto a posibles contaminaciones con las levaduras comerciales utilizadas.

La participación de distintas levaduras durante la vinificación contribuye a aumentar la complejidad de los vinos. Además, el hecho de que en cada bodega y zona se identifiquen cepas características y únicas puede influir en la diversificación y singularidad de los vinos elaborados.

Tabla 1. Fermentaciones y diversidad de las levaduras aisladas en las distintas bodegas

Bodega (DO)	Nº fermentaciones (tipo-nº muestras)	Nº aislados analizados	Diversidad (Nº: cepas)
<i>Corisca (Rías Baixas)</i>	1 (Blanco)	9	5: LBE1, LBE2, LBE3, LBE4, LB5
<i>Quinta da Muradella (DO Monterrei)</i>	5 (Tinto)	54	12: LBE3, LBE6, LBE7, LBE10, LBE11, LBE12, LBE13, LBE14, LBE15, LBE16, LBE17, LBE18
	2 (Blanco)	18	5: LBE3, LBE6, LBE8, LBE9, LBE10
<i>Diego de Lemos (DO Ribeira Sacra)</i>	2 (Tinto)	18	3: LBE12, LBE19, LBE20
	1 (Blanco)	14	3: LBE12, LBE21, LBE22
<i>Adega Beatriz (DO Ribeiro)</i>	1 (Tinto)	6	1: LBE23
	1 (Blanco)	18	9: LBE3, LBE10, LBE23, LBE24, LBE25, LBE26, LBE27, LBE28, LBE29
<i>Pazo Vieite* (DO Ribeiro)</i>	1 (Tinto- 2 muestras)	18	6: LBE2, LBE3, LBE12, LBE15, LBE17, LBE32
	1 (Blanco-3 muestras)	18	6: LBE10, LBE12, LBE13, LBE29, LBE30, LBE31

*Se tomaron muestras en distintas etapas de la fermentación

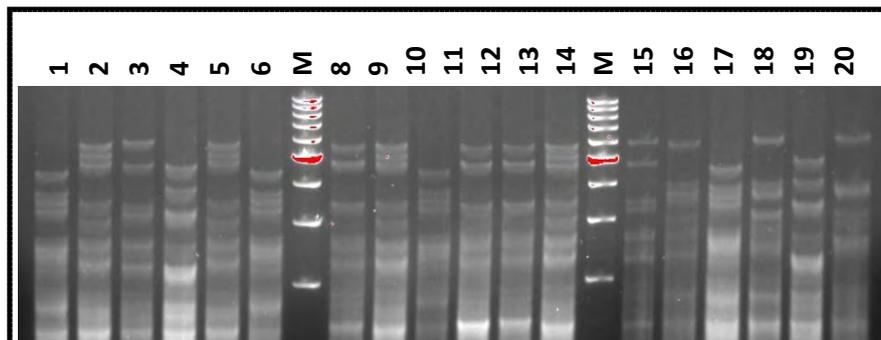


Figura 1. Perfil genético (mtDNA-RFLPs) de distintas cepas de *S. cerevisiae* aisladas en una fermentación de este estudio. Los carriles 1 a 6, 8 a 13 y 15 a 20 corresponden a las distintas cepas. Los carriles M (7 y 14) corresponden al marcador de peso molecular de 1kB (Promega).

4. Conclusiones

- La elaboración de vinos ecológicos utilizando fermentación espontánea favorece la diversidad de las levaduras durante el proceso.
- Cada bodega posee unas levaduras propias que podrían condicionar la peculiaridad de sus vinos.

5. Bibliografía

1. Blanco, P.; Mirás-Avalos, J.M.; Pereira, E.; Orriols, I. 2013. Fermentative aroma compounds and sensory profiles of Godello and Albariño wines as influenced by *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. *In: J Sci Food Agric.* 93, 2849–2857.
2. Guzzon, R.; Widmann, G.; Settanni, L.; Malacarne, M.; Francesca, N.; Larcher, R. 2011. Evolution of yeast populations during different biodynamic winemaking processes. *In: S Afr J Enol Vitic.* 32, 242-250.
3. Reglamento de ejecución (UE) Nº 203/2012 de la Comisión de 8 de marzo de 2012 que modifica el Reglamento (CE) nº 889/2008, por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 834/2007 del Consejo, en lo que respecta a las disposiciones de aplicación referidas al vino ecológico.
4. Querol, A.; Barrio, E.; Huerta, T.; Ramón, D. 1992. Molecular Monitoring of Wine Fermentations Conducted by Active Dry Yeast Strains. *Appl Environ Microbiol.* 58, 2948-2953.
5. Tello, J.; Cordero-Bueso, G.; Aporta, I.; Cabellos, J.M.; Arroyo, T. 2012. Genetic diversity in commercial wineries: effects of the farming system and vinification management on wine yeasts. *In: J Appl Microbiol.* 112, 302-3015.

6. Agradecimientos

Este estudio está financiado por el proyecto RTA2012-00021-C03-01 del INIA y fondos FEDER. Gracias a las bodegas Quinta de Muradella, Corisca, Pazo Vieite, Diego de Lemos y Adegas Beatriz por su colaboración. David Castrillo agradece al INIA su contrato predoctoral-FPI.

M17 - INCREMENTO DE LOS POLISACARIDOS Y PROTEINAS DEL CAVA UTILIZANDO LEVADURAS KILLER

Rocío Velázquez^{1*}, Emiliano Zamora², Luis Miguel Hernández¹, Alexis Guillet³, Manuel Ramírez¹

¹Departamento de Ciencias Biomédicas (Área de Microbiología), Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06071 Badajoz, Spain

² Estación Enológica, 06200 Almendralejo, Spain

³IUT Génie Biologique, Université de Bourgogne, BP 17867, 21078 DIJON CEDEX, France

*rociovelazquez@unex.es

RESUMEN:

Se analiza la posibilidad de incrementar la cantidad de polisacáridos y proteínas del cava para mejorar sus propiedades espumantes. Se realizaron fermentaciones de vino base en tubos a media presión inoculados con una levadura (*T. delbrueckii* o *S. cerevisiae*), o con mezclas de levaduras killer y sensibles para provocar la muerte anticipada de parte de la población e incrementar la cantidad de productos procedentes de las levaduras muertas en el cava. Las cinéticas de las fermentaciones inoculadas con *T. delbrueckii* resultaron mucho más lentas que las inoculadas con *S. cerevisiae*, e incluso algunas de estas fermentaciones no llegaron a completarse totalmente. Sorprendentemente, a los 9 meses aún había células viables en todas las fermentaciones (10^2 a 10^5 ufc/mL), probablemente debido a la ausencia de alta presión en el tubo. En las mezclas de levaduras *S. cerevisiae*, hubo correspondencia entre efecto killer e incremento de las cantidades de polisacáridos y proteínas durante la segunda fermentación, hasta el 10% y el 25% respectivamente. En mezclas de *T. delbrueckii* + *T. delbrueckii* y *T. delbrueckii* + *S. cerevisiae*, no se apreció incremento en polisacáridos, sólo incrementaron las proteínas un 17%. Probablemente, la causa de este menor incremento de proteínas en mezclas de *T. delbrueckii* respecto a *S. cerevisiae* se deba a que el incremento de la muerte celular fue generalizado en las poblaciones de *T. delbrueckii* con independencia del fenotipo killer.

Palabras clave: Levaduras, efecto killer, polisacárido, proteína, cava.

1. Introducción

La elaboración de cava es una actividad en continuo crecimiento en Extremadura y supone una alternativa para incrementar el valor añadido del vino, que se comercializa mayoritariamente a granel. La composición química y la calidad de los vinos espumosos dependen de muchos factores como la variedad de uva, la gestión del viñedo, la calidad del vino base, o la estirpe de levadura inoculada en la segunda fermentación. Sin embargo, la segunda fermentación y la crianza del vino con las lías de levaduras son factores claves en la calidad de los vinos espumosos. Durante este envejecimiento se produce la autólisis de las levaduras que realizaron la segunda fermentación, se hidrolizan los biopolímeros celulares y se liberan los compuestos intracelulares (péptidos, aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos) y de la pared celular (glucanos, manoproteínas) en el vino, lo cual determina en gran medida las propiedades químicas y sensoriales del vino espumoso (1). Desde hace años se investiga la forma de acelerar este proceso. Una de las alternativas consiste en utilizar mezclas de levaduras asesinas (killer) y sensibles como inóculos en la segunda fermentación. La toxina asesina mata a las células sensibles y acelera su autólisis (2). Aunque esta estrategia ha dado prometedores resultados en sistemas modelo en laboratorio, aún no se ha aplicado en la

industria ni se ha analizado su efecto sobre las propiedades organolépticas de vinos espumosos. Estos estudios iniciales se realizaron cuando sólo se conocía un tipo de levaduras vínicas *Saccharomyces killer*, K2. Hoy disponemos, de nuevas levaduras K2 con buenas características enológicas, otro tipo de levaduras *Saccharomyces killer*, Klus, y nuevas levaduras *Torulaspota killer*, Kbarr-1 y Kbarr-2. En este trabajo se analiza la posibilidad de incrementar la cantidad de polisacáridos y proteínas durante la segunda fermentación utilizando inóculos mixtos de levaduras *Saccharomyces* y *Torulaspota killer* en las condiciones de elaboración de cava.

2. Material y métodos

Se utilizaron las levaduras *Saccharomyces* EX85 (K2, CYH^S), EX85R (K2⁻, CYH^R), Rod23-1B (K2, ROD^{PC}, CYH^R), EX229 (Klus, CYH^S), EX229-R1 (Klus⁻, CYH^R); y las *Torulaspota* EX1180 (Kbarr-1, CYH^S), EX1180-2K⁻ (Kbarr-1⁻, CYH^R), EX1180-11C4 (Kbarr-1, CYH^R), EX1257 (Kbarr-2, CYH^S), EX1257-CYH5 (Kbarr-2, CYH^R). Previo al tiraje, las levaduras se crecieron en YEPD, se concentraron 10× y se adaptaron al crecimiento en vino base (Macabeo). Al vino base se le añadieron 25 g/L de azúcar y 0,2 g/L de (NH₄)₂HPO₄. Se utilizaron 10 tubos de plástico estériles de 15 mL para cada levadura o mezcla de dos con inóculos de 10⁷ células/mL de cada una. En las mezclas *Saccharomyces:Torulaspota* la proporción fue 1:3. Se incubaron durante 7 días a 12-14°C, 7 días más a 20°C, y el resto a 12-14°C. A lo largo de la segunda fermentación se analizó la cantidad de glucosa+fructosa, se monitorizaron las levaduras analizando la resistencia a cicloheximida (CYH^R) o rodamina 6G (ROD^{PC}) mediante réplica en placas de YEPD suplementado con cicloheximida o rodamina 6G, la muerte celular por tinción con azul de metileno, los polisacáridos por el método del fenol-ácido sulfúrico, y las proteínas por el método Bradford.

3. Resultados

Todos los tirajes inoculados con *S. cerevisiae* terminaron la segunda fermentación antes de 10 días (Fig. 1A), al igual que la mayoría de las mezclas *Saccharomyces* y *Torulaspota* o, como mucho, antes de 20 días (Fig. 1B). Los vinos inoculados con una levadura *T. delbrueckii* terminaron la fermentación mucho más tarde, a los 40 días. La mezcla de dos *Torulaspota* fue algo más rápida porque se inoculó con el doble de levaduras (Fig. 1B). El vino sin inocular y el tiraje de la *Torulaspota* EX1257 Kbarr-2 no terminaron la segunda fermentación (Figs. 1A y B). Se alcanzaron poblaciones de 10⁸ y 10⁹ ufc/mL a los 7 días después del tiraje; y a partir del día 20 disminuyó la viabilidad progresivamente en todas las poblaciones. Sorprendentemente, a los 9 meses todavía quedaban células viables (de 10² a 10⁵ ufc/mL) (Figs. 1C y D), las levaduras fueron capaces de sobrevivir en estas condiciones de bajo pH y baja temperatura, probablemente debido a la ausencia de presión. En todas las fermentaciones inoculadas con mezclas de *Saccharomyces* se apreció desplazamiento de la levadura no-killer por la levadura killer (Fig. 1E), aunque en las inoculadas con mezclas de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* siempre prevalecieron las *Saccharomyces* independientemente del efecto killer (Fig.1F). No obstante, en la mezcla de dos *Torulaspota*, EX1180 (Kbarr-1) desplazó a EX1180-2K⁻ (Kbarr-1⁻), como era de esperar (Fig. 1F). El porcentaje de muerte fue mayor en las mezclas de *Saccharomyces* hasta los 6 meses; sin embargo, en las mezclas de *Saccharomyces* y *Torulaspota* fue similar a la de los controles inoculados sólo con *Torulaspota* (Fig. 1G y H).

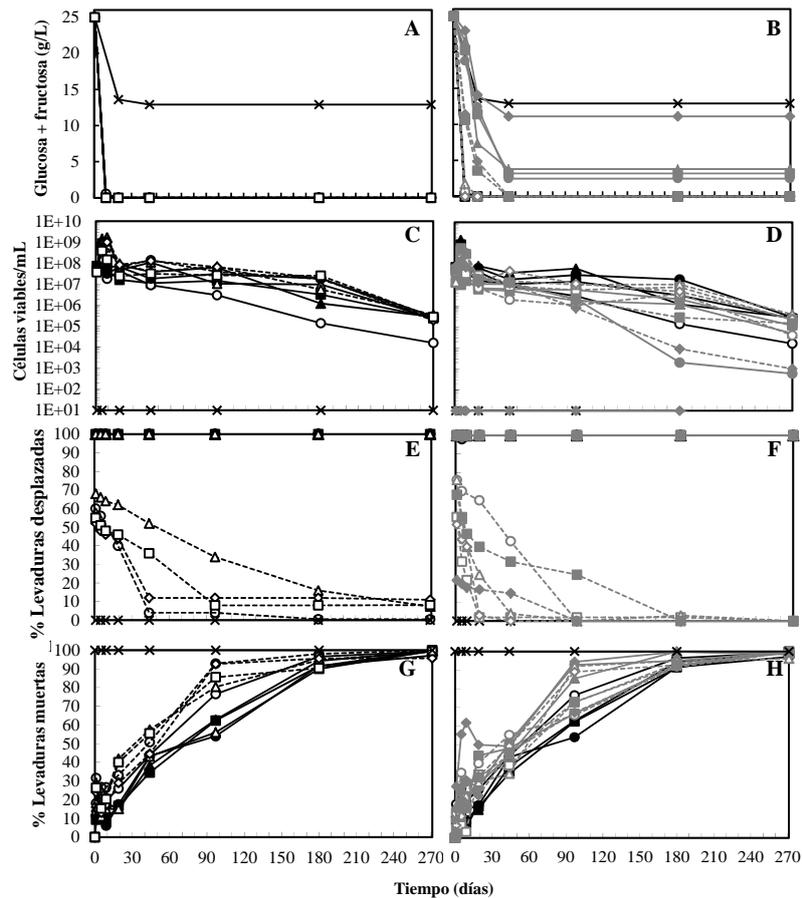


Figura 1. Evolución del consumo de glucosa + fructosa (A y B), viabilidad celular (C y D), porcentaje de desplazamiento killer + no-killer o killer+killer (E y F) y porcentaje de muerte (G y H), en las fermentaciones con mezclas de *Saccharomyces* (A, C, E, G) y mezclas de *Torulaspora + Torulaspora* y *Torulaspora + Saccharomyces* (B, D, F, H) y sus correspondientes controles inoculados con cada levadura por separado. Símbolos: Sin inocular (—x—), EX85 (—●—), EX85R (—■—), Rod23-1B (—○—), EX229 (—▲—), EX229-R1 (—△—), EX85+EX229-R1† (—◇—), EX229+Rod23-1B† (—◊—), EX229+EX85R† (—◊—), EX85+EX85R† (—□—), EX1257 (—◆—), EX1180-11C4 (—●—), EX1180-2K (—▲—), EX85R+EX1180† (—◊—), Rod23-1B+EX1180† (—◊—), EX229+EX1180-11C4† (—△—), EX85+EX1180-2K† (—◇—), EX1180+EX1180-2K† (—■—), y EX1180-11C4+EX1257† (—◆—). El símbolo (†) indica la levadura que resultó desplazada en cada mezcla de dos levaduras y cuyo porcentaje se representa en la correspondiente gráfica.

El contenido de polisacáridos y proteínas totales aumentó significativamente a lo largo de las fermentaciones inoculadas con mezclas de *S. cerevisiae* (con efecto killer), respecto a las inoculadas con cada levadura en solitario (Fig. 2A), hasta un 10% de polisacáridos y un 25% de proteínas a los 9 meses. Sin embargo, en las fermentaciones inoculadas con mezclas de *Torulaspora + Torulaspora* y *Torulaspora + Saccharomyces* no aumentó la cantidad de polisacáridos respecto los controles de una sola levadura, en consecuencia no se apreciaron diferencias dependientes del efecto killer. No obstante, la cantidad de proteínas aumentó de forma significativa una media del 17% a los 9 meses cuando hubo efecto killer (Fig. 2B).

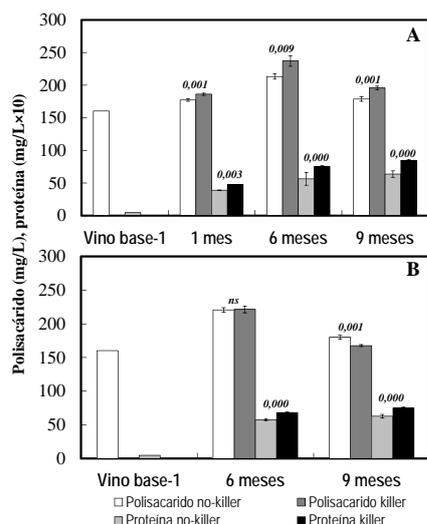


Figura 2. Evolución de la concentración media de polisacáridos y proteínas durante la segunda fermentación de los cavas inoculados con: (A), una levadura *Saccharomyces* (no existe efecto killer), o mezclas de *Saccharomyces* + *Saccharomyces* (si existe efecto killer); y (B), una levadura *Saccharomyces* o *Torulaspora*, o mezclas de *Torulaspora* + *Torulaspora* o *Saccharomyces* + *Torulaspora*. En la parte superior se muestra el nivel de significación (p) correspondiente al análisis de la varianza.

4. Conclusiones

Las cinéticas de fermentaciones inoculadas con *T. delbruekii* fueron más lentas que las inoculadas con *S. cerevisiae*, e incluso algunas no llegaron a completarse totalmente. En las mezclas de *Saccharomyces* hubo una evidente correspondencia entre efecto killer e incremento de la cantidad de polisacárido y proteína durante la segunda fermentación y envejecimiento, hasta el 10% y el 25% respectivamente. En las mezclas con *Torulaspora*, no se apreció ningún incremento en la cantidad de polisacárido, sólo hubo incremento de proteínas de hasta un 17% asociado al efecto killer. Probablemente, este incremento de proteínas fue menor que en las mezclas de *Saccharomyces* porque el incremento de la muerte celular fue generalizado en las poblaciones de *Torulaspora* con independencia del fenotipo killer. Además, *Torulaspora* no mató y desplazó a *Saccharomyces* en ningún caso, lo que hubiese podido resultar en la liberación de más proteínas y polisacáridos.

5. Bibliografía

- Alexandre, H., and M. Guilloux-Benatier. 2006. Yeast autolysis in sparkling wine - a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12:119-127.
- Todd, B. E., G. H. Fleet, and P. A. Henschke. 2000. Promotion of autolysis through the interaction of killer and sensitive yeasts: potential application in sparkling wine production. *American Journal of Enology and Viticulture* 51:65-72.

6. Agradecimientos

Proyectos GR10088 (Junta de Extremadura) y AGL2011-25711 (Ministerio de Ciencia e Innovación). Rocío Velázquez, becaria de la Junta de Extremadura.

M18 - MEJORA DE LA ESPUMA Y LA CALIDAD ORGANOLÉPTICA DEL CAVA UTILIZANDO LEVADURAS KILLER

Rocío Velázquez^{1*}, Emiliano Zamora², Benjamín Mignot³, Luis Miguel Hernández¹,
Manuel Ramírez¹

¹Departamento de Ciencias Biomédicas (Área de Microbiología), Facultad de Ciencias,
Universidad de Extremadura, 06071 Badajoz, España

² Estación Enológica, 06200 Almendralejo, España

³IUT Génie Biologique, Université de Bourgogne, BP 17867, 21078 DIJON CEDEX, Francia

*rociovelazquez@unex.es

RESUMEN:

Se analiza la posibilidad de mejorar el cava (espuma y calidad organoléptica) utilizando en el tiraje mezclas de levaduras killer y sensibles (*T. delbrueckii* o *S. cerevisiae*) para provocar una liberación anticipada del metaboloma celular de las levaduras. Las levaduras *Saccharomyces* fueron muy eficaces, alcanzando 6 atms de presión en 30 días. El incremento de temperatura de 12 a 18°C durante los primeros 30 días, aceleró la fermentación y el efecto killer de *Saccharomyces*. Las levaduras *Torulaspota* mostraron poco vigor fermentativo y poca viabilidad en estas condiciones de alta presión y baja temperatura hasta el punto de que algunas no completaron la segunda fermentación. Los cavas elaborados exclusivamente con *Torulaspota* fueron descalificados por el comité de cata y descartados para continuar el análisis de parámetros espumantes, polisacáridos, proteínas y compuestos aromáticos de los vinos. El efecto killer incrementó la cantidad y estabilidad de la espuma del cava, además de mejorar su calidad organoléptica. Los cavas mejor evaluados, elaborados con mezclas de levaduras killer y sensibles, mostraron más cantidad de células destrozadas (indicativo de efecto killer real) durante la fermentación y más espuma que el resto. No se apreció correlación de la espuma (HM, HS y TS) con la concentración de proteínas, polisacáridos, o manosa procedente de polisacáridos hidrolizados. Aunque varios compuestos aromáticos correlacionaron positiva o negativamente con la espuma, solo el octanoato de etilo parece estar realmente implicado en su estabilidad (TS).

Palabras clave: Levaduras, efecto killer, espuma, cava.

1. Introducción

La elaboración de cava es una actividad en continuo crecimiento en Extremadura y supone una alternativa para incrementar el valor añadido del vino, que se comercializa mayoritariamente como granel. La composición química y la calidad de los vinos espumosos dependen de muchos factores como la variedad de uva, la gestión del viñedo, la calidad del vino base, o la estirpe de levadura inoculada en la segunda fermentación. Sin embargo, la segunda fermentación y la crianza del vino con las lías de levaduras son factores claves en la calidad de los vinos espumosos. Durante este envejecimiento se produce la autólisis de las levaduras que realizaron la segunda fermentación, se hidrolizan los biopolímeros celulares y se liberan los compuestos intracelulares (péptidos, aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos) y de la pared celular (glucanos, manoproteínas) en el vino, lo cual determina en gran medida las propiedades químicas y sensoriales del vino espumoso (1). Desde hace años se investiga la forma de acelerar este proceso. Una de las alternativas consiste en utilizar mezclas de levaduras asesinas (killer) y sensibles como inóculos en la segunda fermentación. La toxina

asesina mata a las células sensibles y acelera su autólisis (3). Aunque esta estrategia ha dado prometedores resultados en sistemas modelo en laboratorio, aún no se ha aplicado en la industria ni se ha analizado su efecto sobre las propiedades organolépticas de vinos espumosos. Estos estudios iniciales se realizaron cuando sólo se conocía un tipo de levaduras vínicas *Saccharomyces* killer, K2. Hoy disponemos, de nuevas levaduras K2 con buenas características enológicas, otro tipo de levaduras *Saccharomyces* killer, Klus, y nuevas levaduras *Torulaspota* killer, Kbarr-1 y Kbarr-2. En este trabajo se analiza la posibilidad de mejorar el cava (espuma y calidad organoléptica) realizando el tiraje con mezclas de levaduras killer y sensibles (*T. delbruekii* o *S. cerevisiae*) para provocar una liberación anticipada del metaboloma celular de las levaduras, además de acelerar la autólisis para incrementar la cantidad de polisacáridos y proteínas durante la segunda fermentación.

2. Material y métodos

Se utilizaron las levaduras *Saccharomyces* EX85 (K2, CYH^S), EX85R (K2, CYH^R), Rod23-1B (K2, ROD^{PC}, CYH^R), EX229 (Klus, CYH^S), EX229-R1 (Klus, CYH^R); y las *Torulaspota* EX1180 (Kbarr-1, CYH^S) y EX1180-2K- (Kbarr-1, CYH^R). Previo al tiraje, las levaduras se crecieron en YEPD, se concentraron 10× y se adaptaron al crecimiento en vino base (Macabeo). Al vino base se le añadieron 24 g/L de azúcar y 0,2 g/L de (NH₄)₂HPO₄. Se realizó el tiraje en botellas de 0,75 L con obturador de plástico y tapón de corona para cada levadura o mezcla de dos, inoculando 1-4×10⁷ células/mL de *Torulaspota* y 1-4×10⁶ de *Saccharomyces*. Se incubaron a 18°C durante los primeros 30 días de fermentación (sólo para *Saccharomyces* y mezclas de *Saccharomyces*, excepto EX229 y Rod23-1B), y el resto a 12-14°C. A lo largo de la segunda fermentación se analizó la cantidad de glucosa+fructosa, se monitorizaron las levaduras analizando la resistencia a cicloheximida (CYH^R) o rodamina 6G (ROD^{PC}) mediante réplica en placas de YEPD suplementado con cicloheximida o rodamina 6G, la muerte celular por tinción con azul de metileno, los polisacáridos por el método del fenol-ácido sulfúrico, la manosa por un método desarrollado previamente (2), proteínas por el método Bradford, los volátiles minoritarios se midieron en el Servicio de Análisis Elemental y Molecular de la UEx, y los parámetros de la espuma con equipo Mosalux.

3. Resultados

Todas las levaduras *Saccharomyces* terminaron la fermentación a 18°C antes de 30 días alcanzando una presión de 6 atm (Fig. 1A y C). A 12°C sólo terminaron la fermentación antes de 60 y 270 días, EX229 y Rod23-1B (Fig. 1B y D); los tirajes con *Torulaspota* se pararon el día 60, excepto EX1180 que continuó fermentando lentamente hasta los 270 días (Fig. 1B y D). *Torulaspota* murió más rápido que *Saccharomyces* aun teniendo más yemas; por el contrario, *Saccharomyces* permaneció viva más de 90 días (no mostrado). En todas las mezclas de *Saccharomyces* se observó desplazamiento de la levadura sensible por la killer, aunque no correlacionó con un incremento de la muerte celular a partir de los 30 días (Fig. 1E y G), en las mezclas de *Saccharomyces*+*Torulaspota* dominó siempre *Saccharomyces*, aunque esta fuera la estirpe sensible, y el porcentaje de muerte fue similar al de los controles sólo con *Torulaspota* (Fig. 1F y H).

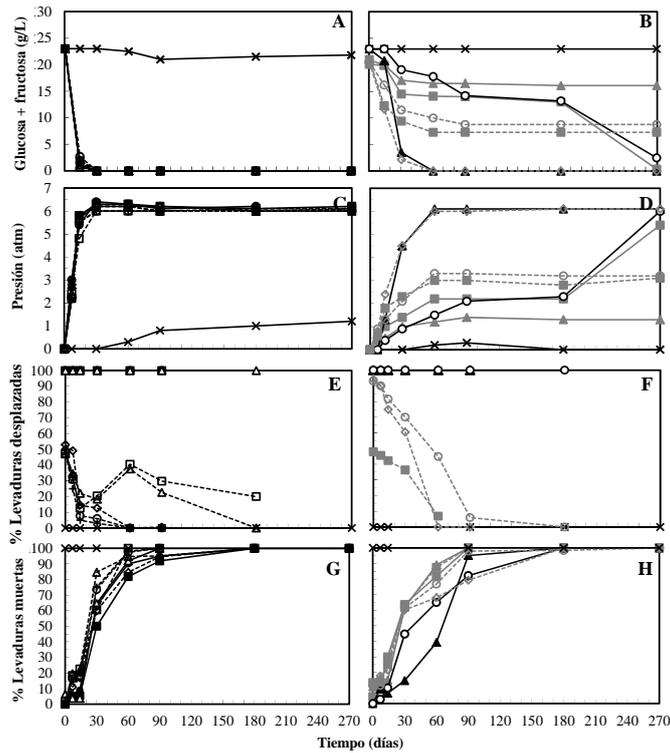


Figura 1. Evolución del consumo de glucosa + fructosa (A y B), presión en atm (C y D), porcentaje de desplazamiento killer + no-killer o killer + killer (E y F) y porcentaje de muerte (G y H), en las fermentaciones con mezclas de *Saccharomyces* (A, C, E, G) y mezclas de *Torulaspota* + *Torulaspota* y *Saccharomyces* + *Torulaspota* (B, D, F, H) y sus correspondientes controles con cada levadura por separado a 18°C y 12°C (A, C, E, G), o 12°C (B, D, F, H). Símbolos: Sin inocular (x), EX85 (●), EX85R (■), EX229-R1 (▲), EX85+EX85R (□), EX85+EX229-R1 (△), EX229+Rod23-1B (○), EX229+EX85R (◇), EX229+EX85+Rod23-1B+EX85R (⋈), EX1180 (■), EX1180-2K (▲), EX229 (▲), Rod23-1B (○), EX1180+EX1180-2K (⋈), EX229+EX1180-2K (⋈) y Rod23-1B+EX1180 (○).

Los cavas inoculados con *Torulaspota* fueron descalifados por el comité de cata y descartados para continuar con el resto de análisis. Se observó diferencia significativa en la calidad organoléptica (sin considerar la espuma) de los vinos con efecto killer (74% de aceptación en cavas con killer vs 65% en no-killer, $p < 0,05$), los mejor evaluados fueron los elaborados con las mezclas: EX229+Rod23-1B y EX229+EX85+Rod23-1B+EX85R. Los parámetros de espuma (HM, HS y TS) no mejoraron respecto al vino base en la mayoría de los cavas, excepto para estas dos mezclas (Fig. 2), curiosamente donde se hallaron más células destrozadas (indicativo de killer real) al principio de la segunda fermentación. En general, la espuma mejoró significativamente en los cavas con mezclas de levaduras, con respecto a los cavas con una sola levadura (Fig. 2).

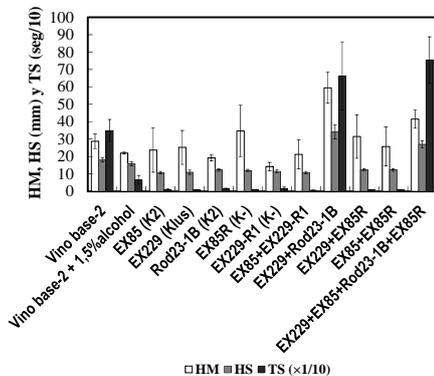


Figura 2. Evolución de los parámetros de espuma de los cavas elaborados con levaduras *Saccharomyces* killer, no-killer o mezclas de levaduras *Saccharomyces* tras 9 meses de crianza respecto al vino base-2. HM, altura máxima de la espuma; HS, altura de la espuma estabilizada; TS, tiempo de mantenimiento de la espuma.

La cantidad de polisacáridos disminuyó durante la segunda fermentación y, aunque la cantidad de manosa y proteína aumentó durante la misma, sólo la cantidad de manosa incrementó significativamente en los cavas con mezclas de levaduras (media del 31%, Fig. 3). No se apreció correlación entre la cantidad de estos compuestos con los parámetros de espuma, aunque sí se apreció correlación entre TS y distintos compuestos aromáticos: negativa con ácido octanoico, succinato de dietilo y malato de dietilo, y positiva con 2-metilbutanoato de etilo, octanoato de etilo, γ -butirolactona y 4-hidroxitbutanoato de etilo. Agrupando el vino base y los cavas en tres categorías, según su capacidad para generar espuma, sólo la cantidad de octanoato de etilo, fue mayor en los cavas con más espuma y más efecto killer (no mostrado).

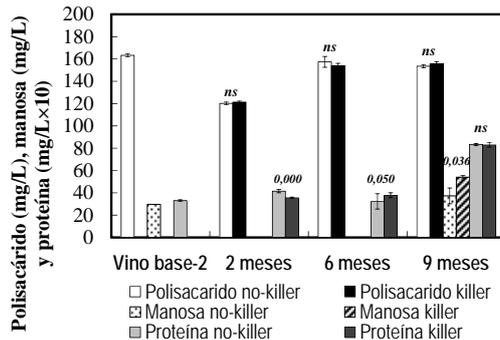


Figura 3. Evolución de la concentración media de polisacáridos y proteínas durante la segunda fermentación, y manosa (sólo a los 9 meses) de los cavas inoculados con una levadura *Saccharomyces* (no existe efecto killer), o mezclas de *Saccharomyces*+*Saccharomyces* (si existe efecto killer). En la parte superior se muestra el nivel de significación (p) correspondiente al análisis de la varianza.

4. Conclusiones

Las levaduras *Saccharomyces* fueron muy eficaces alcanzando 6 atms de presión a los 30 días, excepto EX229 y Rod23-1B a 12°C que lo hicieron a los 60 y 270 días respectivamente. Las *Torulaspors* mostraron poco vigor fermentativo y viabilidad en estas condiciones, y no completaron la fermentación sin la presencia de *Saccharomyces*. El efecto killer aumentó la cantidad y estabilidad de la espuma en los cavas mejorando también su calidad organoléptica. Precisamente los dos mejor evaluados mostraron más cantidad de células destrozadas durante el primer mes de tiraje y mayor cantidad de espuma que el resto. No se apreció correlación entre los parámetros de espuma con la cantidad de polisacáridos, manosa y proteínas y, aunque varios compuestos correlacionaron positiva o negativamente con la espuma, sólo el octanoato de etilo parece estar realmente implicado en su estabilidad (TS).

5. Bibliografía

- Alexandre, H., and M. Guilloux-Benatier. 2006. Yeast autolysis in sparkling wine - a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12:119-127.
- Quirós, M., R. Gonzalez, and P. Morales. 2012. A simple method for total quantification of mannoprotein content in real wine samples. *Food Chemistry* 134:1205-1210.
- Todd, B. E., G. H. Fleet, and P. A. Henschke. 2000. Promotion of autolysis through the interaction of killer and sensitive yeasts: potential application in sparkling wine production. *American Journal of Enology and Viticulture* 51:65-72.

6. Agradecimientos

Proyectos GR10088 (Junta de Extremadura) y AGL2011-25711 (Ministerio de Ciencia e Innovación). Rocío Velázquez, becaria de la Junta de Extremadura. Análisis de aromas: Servicio de Análisis Elemental y Molecular, UEx.

M19 - ANÁLISIS DEL GENOMA DE LOS VIRUS DE LEVADURAS KILLER *Torulaspota delbrueckii* MEDIANTE NGS (NEW GENERATION SEQUENCING)

Manuel Ramírez^{1*}, Rocío Velázquez¹, Matilde Maqueda¹, Antonio López-Piñeiro³,
Emiliano Zamora²

¹Departamento de Ciencias Biomédicas (Área de Microbiología), Facultad de Ciencias,
Universidad de Extremadura, 06071 Badajoz, Spain

² Estación Enológica, 06200 Almendralejo, Spain

³Departamento de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra, Facultad de Ciencias,
Universidad de Extremadura, Badajoz, Spain

*mramirez@unex.es

RESUMEN:

Se describe la caracterización del fenotipo y del genoma de nuevas levaduras *T. delbrueckii* asesinas (killer) mediante secuenciación masiva de nueva generación (NGS). Estas levaduras son capaces de matar y desplazar a todos los tipos de levaduras *S. cerevisiae* durante la fermentación, ya sean sensibles o killer de cualquiera de los tipos conocidos: K1, K2, K28, o Klus. Estas nuevas levaduras killer contienen en su interior moléculas de dsRNA vírico de tamaño mediano (M) con el gen que codifica para la toxina killer Kbarr, y dsRNA vírico de tamaño grande (L) que codifica para las funciones virales (proteína de la cápsida y RNA-polimerasa) de ambos virus. Se compara la estructura del genoma de estos dos nuevos virus de *T. delbrueckii*, TdV-LAbarr y TdV-Mbarr-1, con los correspondientes a otras levaduras killer.

Palabras clave: Levaduras, *Torulaspota delbrueckii*, killer, genoma, NGS

1. Introducción

Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* killer se agrupan en cuatro tipos (K1, K2, K28, y Klus) en base a su fenotipo y a la ausencia de inmunidad cruzada. Los miembros de cada grupo pueden matar a las levaduras no-killer y a las killer pertenecientes a otros grupos. Las levaduras killer secretan una toxina proteica que pueden ser letales incluso para otras especies de levaduras. Cada levadura killer es inmune a su propia toxina y a las toxinas producidas por otras levaduras killer del mismo tipo. Las toxinas killer de *S. cerevisiae* (K1, K2, K28, y Klus) están codificadas en la cadena positiva de los genomas de virus de dsRNA de tamaño mediano (1.6 to 2.4 kb) (M1, M2, M28, y Mlus, respectivamente). La región 5' contiene una ORF que codifica el precursor de la toxina o preprotoxina (pptox), que también provee la inmunidad frente a la propia toxina. Las secuencias de los genomas de estos cuatro virus M no poseen identidad global entre ellas. El mantenimiento en la célula y la replicación de estos virus M dependen de otro virus helper de dsRNA de tamaño grande (4.6 kb), LA. El virus LA proporciona la cápsida en la que se empaquetan independientemente ambos virus, LA y M, y los virus M contienen algunas estructuras stem-loop que imitan señales del virus LA necesarias para la replicación del genoma y su empaquetamiento en la cápsida. El genoma de LA codifica dos proteínas, la proteína mayoritaria de la cápsida Gag y la proteína minoritaria de fusión Gag-Pol (proteína de la cápsida+polimerasa de RNA) traducida por un cambio de fase -1 en la traducción de los ribosomas.

La co-inoculación con levaduras *Torulaspota delbrueckii* puede corregir ciertos defectos del vino o mejorar su calidad, aunque su utilidad práctica en bodegas comerciales está por confirmar. El mayor problema de la co-inoculación con distintas levaduras es que los resultados de la fermentación son imprevisibles debido al desplazamiento de las levaduras no-*Saccharomyces* por *Saccharomyces cerevisiae*, que tiene mayor vigor fermentativo y suele dominar las fermentaciones de mosto anulando el efecto de las primeras sobre la composición química y aromática del vino. Se requiere conocer mejor las interacciones entre las distintas levaduras para controlar la participación de las distintas poblaciones de levaduras durante la fermentación. En este trabajo se describe la caracterización del genoma de nuevas levaduras *T. delbrueckii* asesinas (killer) capaces de matar a *S. cerevisiae* e imponerse durante la fermentación de mosto.

2. Material y métodos

Se utilizaron 2 estirpes killer autóctonas silvestres de levaduras *Torulaspota* (una Kbarr-1, EX1180, y otra Kbarr-2, EX1257) y un mutante curado sin virus no-killer (K) y resistente a cicloheximida (CYH^R), EX1180-2K. Las levaduras no-*Saccharomyces* utilizadas se indican en cada figura. El test de fenotipo killer, aislamiento de ácidos nucleicos, análisis de restricción del mtDNA, y análisis de los dsRNA víricos se realizaron como se describió previamente (1, 2). La secuenciación y el ensamblaje de secuencias se realizaron en la Unidad de Genómica Cantoblanco (Fundación Parque Científico de Madrid, c/ Faraday, 7, 28049 Madrid, Spain) y en la empresa Biotechvana S.L. (Benjamin Franklin nº 12, Module 19, Technological Park of Valencia, 46980-Paterna, Valencia, Spain) respectivamente.

3. Resultados

Caracterización fenotípica de las levaduras killer Kbarr. Las levaduras Kbarr-1 matan a los cuatro tipos de levaduras *S. cerevisiae* killer (K1, K2, K28, y Klus) y a las *T. delbrueckii* Kbarr-2, pero no matan a las mismas levaduras Kbarr-1 (Fig. 1A). También matan a otras especies de levaduras no-*Saccharomyces* como *Hanseniaspora* sp., *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida kefir*, *Candida glabrata*, *Candida parasitopsis*, *Candida krusei*, *Yarrowia lypolitica*, y *Hansenula mrakii*, aunque desgraciadamente no matan a las levaduras perjudiciales *Brettanomyces* como sería de desear (Fig. 1B). Las levaduras Kbarr-1 tan solo son ligeramente sensibles a las toxinas de *S. cerevisiae* Klus y *Hansenula mrakii*, y resistentes al resto de las levaduras killer analizadas (no mostrado). El espectro killer de las levaduras Kbarr-1 es incluso más amplio que el de las levaduras *S. cerevisiae* Klus (2), y la actividad killer de las Kbarr-1 es más intensa que las de las Klus, tan intensa como la de *S. cerevisiae* K1, K2, o K28.

Análisis de la secuencia del genoma dsRNA de TdV-Mbarr-1 y de la ORF de la preprotoxina Kbarr-1. Las dos bandas de dsRNA vírico de la levadura Kbarr-1 EX1180 se purificaron por electroforesis en agarosa y se secuenciaron con técnicas NGS. Se obtuvo una secuencia total de 1705 nucleótidos para la banda de tamaño mediano del virus Mbarr-1, coincidente con el peso molecular estimado en electroforesis (1.7 kb). En esta secuencia se aprecia la existencia de distintos motifs previamente descritos en otros virus L y M de levaduras: un 5'GAAAAA conservado probablemente necesario para el inicio de transcripción,

una ORF de 271 amino ácidos de la supuesta preprotoxina, una parte central con 78 residuos de adeninas (poli(A) central), y una región 3' no-codificante con elementos estructurales necesarios para la replicación y encapsidación del virus, de los que en este caso solo es patente el stem-loop 3'-terminal de reconocimiento para replicación (3'-TRE) con un $\Delta G = -4.9$ kcal/mol. No obstante, en esta zona no-codificante situada hacia el extremo 3' del poli(A) central se aprecian 10 fragmentos de secuencia con mucha identidad con otras secuencias ubicadas en posiciones equivalentes o relacionadas con señales de replicación, potenciación de la replicación, o encapsidación de varios genomas de virus M de *S. cerevisiae* y *Zygosaccharomyces bailii*, y que no se encuentran en la mitad 5' codificante del genoma de TdV-Mbarr1.

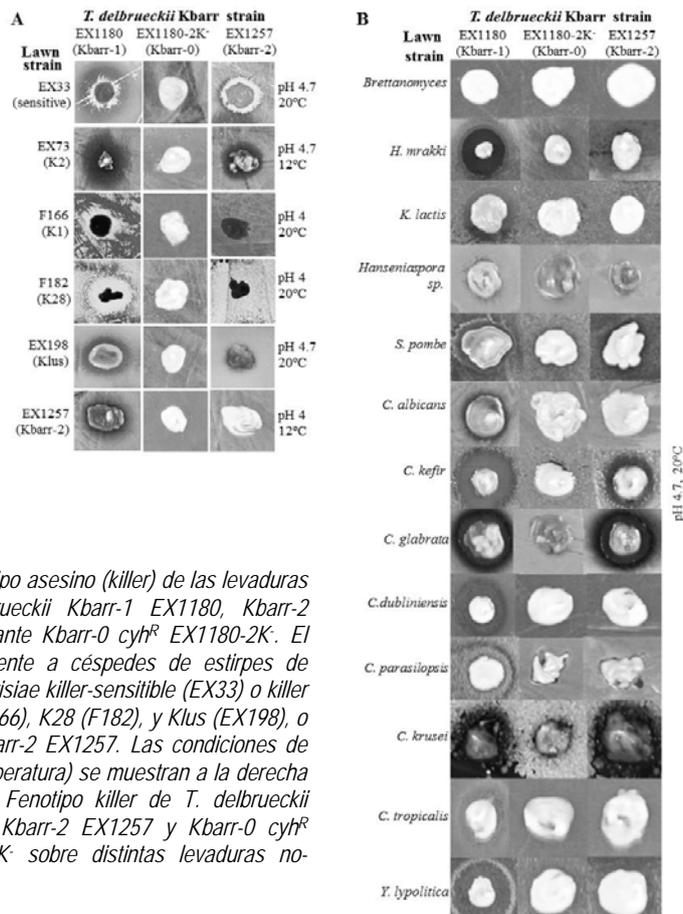


Figura 1. A: Fenotipo asesino (killer) de las levaduras *Torulaspora delbrueckii* Kbarr-1 EX1180, Kbarr-2 EX1257 y el mutante Kbarr-0 *cyh^R* EX1180-2K. El test se realizó frente a céspedes de estirpes de levaduras *S. cerevisiae* killer-sensible (EX33) o killer K2 (EX73), K1 (F166), K28 (F182), y Klus (EX198), o *T. delbrueckii*. Kbarr-2 EX1257. Las condiciones de ensayo (pH y temperatura) se muestran a la derecha de cada foto. B: Fenotipo killer de *T. delbrueckii* Kbarr-1 EX1180, Kbarr-2 EX1257 y Kbarr-0 *cyh^R* mutant EX1180-2K sobre distintas levaduras no-*Saccharomyces*.

La ORF localizada en la mitad 5' de Mbarr-1 contiene una región rica en aminoácidos hidrofóbicos que parece ser la señal N-terminal necesaria para la secreción de la toxina Kbarr-1, el correspondiente sitio de corte para la peptidasa señal, seis sitios Kex2p/Kex1p de procesamiento proteolítico, y cuatro sitios de N-glicosilación de la preprotoxina (Fig. 2). Esta estructura es muy similar a la de otras preprotoxinas killer de levaduras. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos general de Kbarr-1 no muestra homología con la secuencia de otras toxinas killer conocidas.

La secuencia del genoma y las ORFs encontradas en el virus TdV-LAbarr correspondientes a la banda de dsRNA de tamaño grande son homólogas de los virus LA descritos previamente en levaduras.

M20 - INFLUENCIA DE *Torulaspora delbrueckii* EN LA COMPOSICIÓN AROMÁTICA Y LA CAPACIDAD ESPUMANTE DEL VINO BASE PARA CAVA

Manuel Ramírez^{1*}, Rocío Velázquez¹, Emiliano Zamora², María Luz Álvarez², Gabriela Carbalho³

¹Departamento de Ciencias Biomédicas, Área de Microbiología, Edificio Juan Remón Camacho, Avda. de Elvas s/n. 06071 Badajoz, España

²Estación Enológica, Consejería de Agricultura, Medio Ambiente, Desarrollo Rural y Energía, Junta de Extremadura, 06200 Almendralejo, España

³IUT Génie Biologique, Université de Bourgogne, BP 17867, 21078 DIJON CEDEX, France

*mramirez@unex.es

RESUMEN:

Se analiza la influencia de nuevas levaduras *Torulaspora delbrueckii* killer en la elaboración de vino base para cava. La cinética de fermentación de las levaduras *Torulaspora* fue más lenta que la de *Saccharomyces cerevisiae*, aunque ambas dominaron fácilmente la fermentación. Los valores de todos los parámetros permanecieron en un rango propio de vinos de calidad. Resultaron estadísticamente significativas las diferencias para T15 y T100, y marginalmente significativa para ácido láctico. La concentración de polisacáridos fue mayor en los vinos de *T. delbrueckii* y la de proteínas en los de *S. cerevisiae*. Se encontró mayor concentración de alcoholes, lactonas y norisoprenoides en los vinos de *T. delbrueckii*, que podrían explicar las notas especiadas y de crianza detectadas en estos vinos, y de ésteres etílicos, ésteres de acetato, furanos, fenoles volátiles y ácidos orgánicos en los de *S. cerevisiae*, vinos con más notas a fruta fresca. Los vinos de *T. delbrueckii* fueron menos espumógenos (HM y HS) que los de *S. cerevisiae*, aunque su espuma fue más estable (TS). En general se apreció un antagonismo entre las correlaciones de HM o HS y las de TS con distintos compuestos. Hubo correlación positiva significativa de HM y HS con la cantidad de proteínas además de 31 compuestos, fundamentalmente ésteres etílicos de C₄-C₁₆; y del TS con varios alcoholes. La correlación de HM y HS con la cantidad de polisacáridos fue negativa; al igual que la de TS con 35 compuestos aromáticos, fundamentalmente alcoholes y ésteres etílicos.

Palabras clave: Levaduras, vino base, cava, *Torulaspora delbrueckii*, killer

1. Introducción

Las levaduras *Torulaspora delbrueckii* pueden ser utilizadas para mejorar las propiedades organolépticas del vino. En los espumosos como el cava, la formación y estabilidad de la espuma son características organolépticas visuales muy importantes, ya que son muy valoradas por los consumidores. Se ha descrito que la espuma del cava depende en gran medida de su contenido en proteínas y manoproteínas, fundamentalmente con el TS (1, 4). También se ha descrito previamente que la altura máxima de la espuma (HM) correlaciona negativamente con ácidos grasos C₈, C₁₀ y C₁₂, y positivamente con los ésteres etílicos de los ácidos grasos C₆, C₈ y C₁₀ (2). Estos estudios se han realizado con cavas elaborados íntegramente con levaduras *Saccharomyces*. Muy pocos estudios se han realizados con cavas elaborados con levaduras no-*Saccharomyces* como *Torulaspora* (3). Aquí se describe la elaboración de vino base para cava con

levaduras *T. delbrueckii* killer y se evalúa su utilidad para mejorar la espuma y su perfil aromático.

2. Material y métodos

Se utilizaron dos estirpes de levaduras *T. delbrueckii*, EX1180 (killer Kbarr-1), y EX1180-2K (no-killer y resistente a cicloheximida, CYH^R), y dos de *S. cerevisiae*, E7AR1 (killer K2, CYH^R) y EX85R (no-killer, CYH^R). Las fermentaciones se realizaron con mosto muy bien desfogado de la variedad Macabeo. Los parámetros de espuma se midieron con Mosalux: altura máxima de espuma (HM) en mm, altura de estabilidad (HS) en mm, y tiempo de estabilidad de espuma (TS) en segundos. Parámetros fisicoquímicos según los Métodos Oficiales. El análisis organoléptico se realizó por catadores entrenados en la Estación Enológica de Almendralejo. Los volátiles minoritarios se midieron en Servicio de Análisis Elemental y Molecular de la UEx, los polisacáridos con el método del fenol-ácido sulfúrico, y las proteínas con el método de Bradford.

3. Resultados

La cinética de fermentación de las levaduras *T. delbrueckii* killer fue más lenta que la de *S. cerevisiae*, aunque todas dominaron fácilmente la fermentación y dejaron los vinos secos (Fig. 1A y B), probablemente debido a su baja graduación alcohólica. Los vinos de *T. delbrueckii* fueron claramente distintos a los de *S. cerevisiae*. Los catadores prefirieron estos últimos por ser más intensos y afrutados, aunque las diferencias en valoración no fueron estadísticamente significativas (Tabla 1). Los vinos de *S. cerevisiae* fueron más espumógenos, aunque su espuma fue menos estable (Fig. 2). Así pues, los vinos de *T. delbrueckii* resultaron más especiados, con más notas de crianza, y su espuma fue más estable, características interesantes para acortar el tiempo de envejecimiento o intensificar su efecto en el cava.

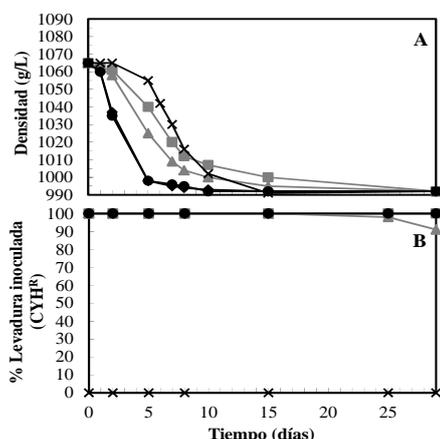


Figura 1. Evolución de las fermentaciones de mosto macabeo desfogado (<100 NTU) inoculado con distintas levaduras exclusivamente en el encubado. A: Evolución de la densidad. B: Evolución del porcentaje de imposición de cada levadura inoculada marcada genéticamente con resistencia a cicloheximida (CYH^R). Símbolos: Sin inocular (—x—), EX85R (no-killer, —■—), E7AR1 (killer K2, —◆—), EX1180-2K (no-killer, —▲—) y EX1180-11C4 (killer Kbarr-1, —■—).

Tabla 1. Medias de los parámetros generales de vinos blancos (variedad Macabeo) elaborados con levaduras seleccionadas *Saccharomyces* o *Torulaspota*. Análisis de la varianza para estudiar el efecto de la inoculación del mosto con cada tipo de levadura.

Parámetro	Vinos		p ^a
	<i>Saccharomyces</i>	<i>Torulaspota</i>	
T15 (días)	1,58±0,05	3,81±0,35	0,000
T100 (días)	5,80±0,58	18,2±2,22	0,001
Aceptación (%)	59,0±3,67	51,4±4,44	0,174
Imposición en FT (%)	100±0,00	93,8±4,54	0,209
Imposición en FF (%)	100±0,00	76,4±17,12	0,205
Etanol (% v/v)	10,54±0,36	9,78±0,41	0,206
pH	2,98±0,07	3,12±0,05	0,189
Acidez total (g/L)	7,28±0,07	7,10±0,11	0,197
Acidez volátil (g/L)	0,23±0,03	0,27±0,02	0,258
Densidad (g/L)	991±0,00	995±0,00	0,143
Az. reductores (g/L)	1,14±0,08	6,46±3,91	0,211
Ácido málico (g/L)	1,34±0,14	1,31±0,16	0,898
Ácido láctico (g/L)	0,06±0,00	0,10±0,01	0,084
Glicerol (g/L)	6,10±0,20	5,65±0,37	0,315

^ap, valores obtenidos con ANOVA para el efecto de la inoculación con levaduras. Los datos corresponden a la media ± error estándar de 5 experimentos independientes de *Saccharomyces* y 5 de *Torulaspota*. FT, fermentación tumultuosa. FF, final de fermentación. T15, tiempo requerido para consumir el 15% del azúcar inicial del mosto. T100 tiempo requerido para consumir todos los azúcares del mosto hasta niveles no fluctuantes o inferiores a 2 g/L.

La concentración de ésteres etílicos, ésteres de acetato, furanos, fenoles volátiles y ácidos orgánicos fue mayor en los vinos de *S. cerevisiae* (Fig. 3B), lo que explica su mayor intensidad aromática y su carácter más frutal. La mayor cantidad de proteínas (Fig.3A) también podría explicar su mayor espumabilidad, y su mayor cantidad de glicerol (Tabla 1) la menor estabilidad de la espuma (Fig. 2). La mayor cantidad de alcoholes en vinos de *T. delbrueckii* (Fig. 3B) puede explicar su menor espumabilidad, y su mayor cantidad de polisacáridos (Fig. 3A) puede explicar que la poca espuma que se forma sea más estable (Fig. 2).

Figura 2. Parámetros de espuma de los vinos bases elaborados con levaduras *Saccharomyces* y *Torulaspota killer*, no-killer o mezclas de levaduras *Saccharomyces*. HM, altura máxima de la espuma; HS, altura de la espuma estabilizada; TS, tiempo de mantenimiento de la espuma. En la parte superior se muestra el nivel de significación (p) correspondiente al análisis de la varianza. ns, no significativo.

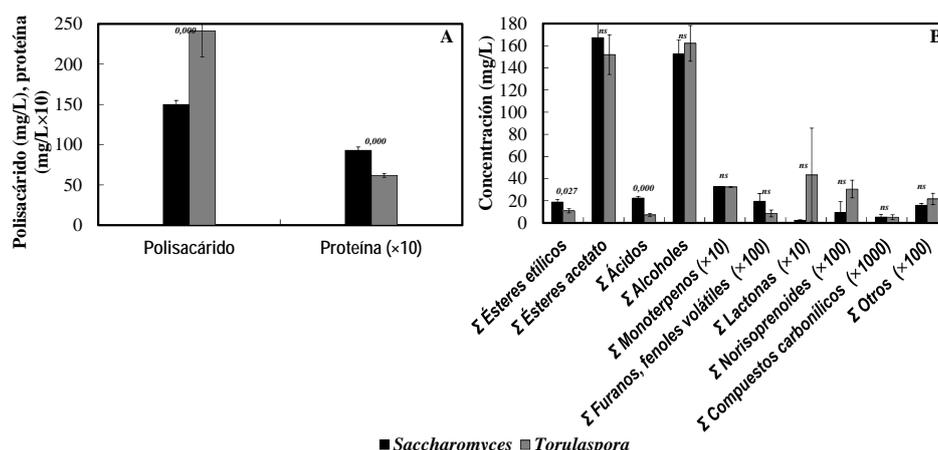
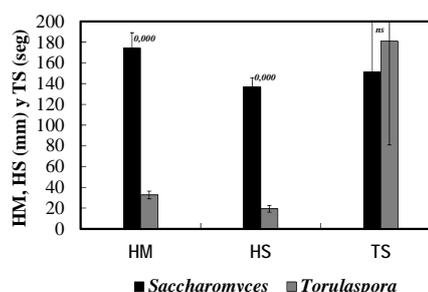


Figura 3. Concentración de polisacáridos (mg/L) y proteínas totales (mg/L) (A) y sumatorios de los distintos compuestos aromáticos agrupados por familias (ésteres etílicos, ésteres de acetato, ácidos orgánicos, alcoholes, monoterpenos, furanos+fenoles volátiles, lactonas, norisoprenoides, compuestos carbonílicos y otros) en los vinos bases inoculados con *Saccharomyces* y *Torulaspota* (B). En la parte superior se muestra el nivel de significación (p) correspondiente al análisis de la varianza. ns, no significativo.

En general se apreció una correlación positiva significativa de HM y HS con la cantidad de proteínas y de 31 compuestos aromáticos, fundamentalmente ésteres etílicos de C₄-C₁₆; y del TS con varios alcoholes (Fig.4). La mayoría de las correlaciones de HM o HS con distintos compuestos aromáticos fueron antagónicas con las correlaciones de TS con los mismos compuestos, parece que la mayoría de los compuestos que mejoraron HM o HS empeoran TS, y viceversa (Fig.4). La correlación de HM y HS con la cantidad de polisacáridos fue negativa; al igual que la de TS con 35 compuestos aromáticos, fundamentalmente alcoholes y ésteres etílicos (Fig.4).

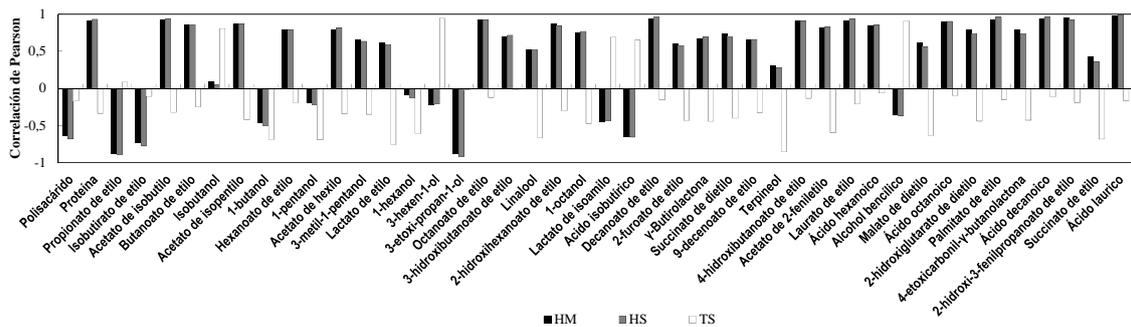


Figura 4. Coeficientes de correlación de Pearson entre los parámetros de espuma (HM, HS y TS) de los vinos base y la concentración de polisacáridos, proteínas y 42 compuestos aromáticos. Solo se muestran los resultados de las correlaciones que resultaron estadísticamente significativas. La correlación (bilateral) se consideró significativa al nivel 0,01 ó 0,05.

4. Conclusiones

Las levaduras *T. delbrueckii* son una alternativa interesante para incrementar las notas especiadas y de crianza del cava, a la vez que puede mejorar la estabilidad de la espuma. Esto puede ser especialmente relevante en cavas con mucho envejecimiento y poca intensidad frutal que suelen generar poca espuma.

5. Bibliografía

1. Brissonnet, F., and A. Maujean. 1993. Characterization of foaming proteins in a champagne base wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 44:297-301.
2. Gallart, M., E. López-Tamames, G. Suberbiola, and S. Buxaderas. 2002. Influence of fatty acids on wine foaming. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:7042-7045.
3. González-Royo, E., O. Pascual, N. Kontoudakis, M. Esteruelas, B. Esteve-Zarzoso, A. Mas, J. M. Canals, and F. Zamora. 2014. Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulasporea delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *European Food Research and Technology*:1-14.
4. Vanrell, G., R. Canals, M. Esteruelas, F. Fort, J. M. Canals, and F. Zamora. 2007. Influence of the use of bentonite as a riddling agent on foam quality and protein fraction of sparkling wines (Cava). *Food Chemistry* 104:148-155.

6. Agradecimientos

Proyectos GR10088 (Junta de Extremadura) y AGL2011-25711 (Ministerio de Ciencia e Innovación). Rocío Velázquez, becaria de la Junta de Extremadura. Análisis de aromas: Servicio de Análisis Elemental y Molecular, UEx.

M21 - OPTIMIZACIÓN MULTIRRESPUESTA DE LAS CONDICIONES DE MICROENCAPSULACIÓN DE *O. oeni* EN SOPORTES DE SÍLICE-ALGINATO

Guillermo Simó¹, Josefina Vila-Crespo², Encarnación Fernández-Fernández¹, José M. Rodríguez-Nogales¹

¹Universidad de Valladolid, Dpto. Ing. Agrícola y Forestal, Avda. Madrid 57, 34004 Palencia, España. E-mail: rjosem@iaf.uva.es

² Universidad de Valladolid, Área de Microbiología, Avda. Madrid 57, 34004 Palencia, España.

Correo electrónico: rjosem@iaf.uva.es

RESUMEN:

El objetivo de este estudio fue realizar una optimización multirrespuesta de las condiciones de inmovilización de *Oenococcus oeni* en geles mixtos de sílice-alginato atendiendo a la concentración de nanopartículas de sílice (0,00-1,23 M) y silicato de sodio (0,00-0,08 M) y al pH de la mezcla (4,0-6,3), trabajando con una concentración de alginato de sodio del 2%. Para ello se evaluaron tres respuestas diferentes: (i) degradación de ácido málico durante el desarrollo de la fermentación maloláctica, (ii) resistencia mecánica de la matriz de alginato-sílice y (iii) capacidad de la matriz para retener las bacterias lácticas inmovilizadas.

Palabras clave: *Oenococcus oeni*, encapsulación, ácido málico, silicato, LUDOX, alginato.

1. Introducción

La fermentación maloláctica (FML) es un proceso difícil de controlar puesto que el vino supone un ambiente poco favorable para el desarrollo de las bacterias lácticas (BAL), organismos responsables de llevarla a cabo. Esta dificultad se acentúa por el cambio climático, que está dando lugar a vinos con mayor contenido de azúcar y por tanto grados alcohólicos más elevados [1]. Siendo *Oenococcus oeni* la principal bacteria responsable de la FML, resultaría interesante mejorar las condiciones para su adaptación a este ambiente estresante, para mejorar así el proceso de la FML. Una metodología que permite FML más rápidas y fiables es la encapsulación de bacterias [2], que consiste en el confinamiento físico o localización de las células intactas en una determinada región del espacio con la preservación de su actividad metabólica [3]. Esto permite separar así la fase de crecimiento microbiano de la etapa de transformación del ácido málico; pudiéndose de este modo inocular al vino altas densidades celulares de BAL, incrementando las probabilidades de una FML rápida y completa [4].

Palabras clave: *Oenococcus oeni*, encapsulación, ácido málico, silicato, LUDOX, alginato.

La técnica de encapsulación presenta además otra serie de ventajas como son: (i) incremento de la tolerancia de los microorganismos al estrés ambiental; (ii) selección de los organismos idóneos para el desarrollo de la FML en cada caso; (iii) reutilización de la biomasa inmovilizada y posibilidad de aplicar procesos continuos; (iv) disminución de los costes de recuperación y reciclado [3,5] y la posibilidad de iniciar o detener la FML en un instante determinado sin que ello acarree aspectos negativos en el vino [2].

El soporte más empleado para la inmovilización de células es el basado en el ácido algínico. Se trata de un polisacárido obtenido a partir de algas marinas, que gelifica en presencia de cationes multivalentes como el calcio [6]. Además presenta la ventaja de que es un gel fácil de preparar, económico y las condiciones de inmovilización son suaves [1]. Pese a que recientemente se ha estudiado la posibilidad de inmovilizar bacterias lácticas como *O. oeni* en una matriz de alginato [7, 8], las propiedades mecánicas poco consistentes de este biopolímero hacen muy atractiva la búsqueda de alternativas que mejoren la resistencia de las esferas de gel formadas para mejorar así su aplicabilidad comercial. Una alternativa para solucionar esta problemática es la elaboración de geles de inmovilización con biocomposites de alginato-sílice, ya que el componente inorgánico permite incrementar la dureza del gel [9].

2. Materiales y métodos

Se realizó una microencapsulación de *O. oeni* (LALVIN VP 41 MBR, Lallemand) en geles mixtos de alginato-sílice, siguiendo el método propuesto por Trivedi *et al.* [10] con modificaciones. Se empleó alginato de sodio (Panreac) al 2%; y diferentes concentraciones de silicato coloidal (Ludox HS40, Sigma) y silicato de sodio (Sigma) como componentes inorgánicos. Se ensayaron diferentes rangos de pH durante la inmovilización (ver Tabla 1).

La FML se realizó en tubos falcon a 22° C empleándose ≈ 0,03 g gel/ml de vino (≈ 107 UFC/ml de vino). La medida de la degradación de ácido málico se efectuó a las 48 horas de la puesta en contacto de las BAL con el vino, realizándose mediante kit enzimático (TDI, España) por espectrofotometría (Spectronic Unicam, modelo 4001/4, Reino

Tabla 1. Factores y respuestas del diseño experimental.

Muestra	FACTORES			RESPUESTAS		
	Silicato de sodio (M)	Silicato coloidal (M)	pH	Degradación relativa del ácido málico (%*)	Resistencia mecánica (%**)	Fuga bacteriana (%)
1	0,00	0,00	5,15	6,36	100	< 10 ⁻³
2	0,08	0,00	5,15	9,47	111	< 10 ⁻³
3	0,00	1,23	5,15	83,18	105	< 10 ⁻³
4	0,08	1,23	5,15	64,94	171	< 10 ⁻³
5	0,00	0,62	4,00	7,40	110	< 10 ⁻³
6	0,08	0,62	4,00	22,85	138	< 10 ⁻³
7	0,00	0,62	6,30	97,26	102	< 10 ⁻³
8	0,08	0,62	6,30	60,18	131	< 10 ⁻³
9	0,04	0,00	4,00	16,31	100	< 10 ⁻³
10	0,04	1,23	4,00	27,40	136	< 10 ⁻³
11	0,04	0,00	6,30	89,73	101	< 10 ⁻³
12	0,04	1,23	6,30	100,00	109	< 10 ⁻³
13	0,04	0,62	5,15	62,44	124	< 10 ⁻³
14	0,04	0,62	5,15	50,42	133	< 10 ⁻³
15	0,04	0,62	5,15	75,62	117	< 10 ⁻³

* Se le atribuyó el 100 % a la muestra que presentó una mayor tasa de degradación.

** Se le atribuyó el 100 % al control (sólo alginato).

La resistencia mecánica de las perlas se efectuó, tras 48 horas en agitación a 165 rpm en CaCl₂ 0,2 M, siguiendo el procedimiento descrito por Serp *et al.* [11] consistente en un ensayo TPA (Texture Profile Analysis) de doble compresión. Se utilizó un texturómetro Texture Analyser Plus-Upgrade (Stable Microsystems, Reino Unido). La capacidad de la matriz para retener las BAL inmovilizadas se efectuó mediante recuento de la población de bacterias en el vino tras 24 h, siguiendo el método descrito por Gamazo *et al.* [12]. Las condiciones experimentales se establecieron mediante un diseño experimental de tipo Box-Behnken de tres factores (silicato de sodio, silicato coloidal y pH) con tres puntos centrales empleando el paquete estadístico Statgraphics CenturionXVI.II. A partir de éste, se realizó una optimización

de las variables “Degradación de ácido málico”, “Resistencia mecánica” y “Capacidad de retención de las BAL por la matriz”.

3. Resultados

Los resultados de los experimentos ensayados son los que se muestran en la tabla 1. El objetivo final de este estudio fue diseñar un soporte de inmovilización de BAL atendiendo a estos criterios: (i) incrementar la resistencia mecánica del soporte, (ii) maximizar la degradación del ácido málico, y (iii) minimizar la liberación de BAL inmovilizadas al vino.

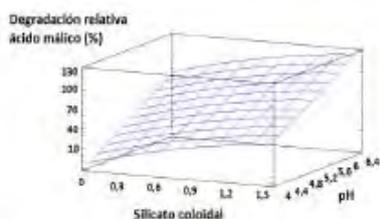


Figura 1. Gráfico de superficie de respuesta para la degradación de ácido málico.

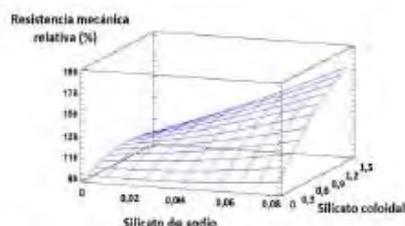


Figura 2. Gráfico de superficie de respuesta para la resistencia mecánica.

En la figura 1 se recoge la superficie de respuesta para la degradación de ácido málico, que mostraron una influencia estadísticamente significativa ($\alpha=0,05$) y positiva del pH y del silicato coloidal. En la figura 2 se muestran los resultados para la resistencia mecánica, donde tanto el silicato de sodio como el silicato coloidal mostraron una influencia estadísticamente significativa ($\alpha=0,05$) y positiva. Puesto que todas las muestras presentaron una retención adecuada de BAL, esta última respuesta no fue incluida en la optimización multirrespuesta. En la figura 3 puede observarse como en función del peso que se le atribuya a cada una de las dos respuestas analizadas, los valores óptimos varían. En este caso se han establecido como óptimas las condiciones de inmovilización: 1,23M y 0,06 M para los silicatos coloidal y de sodio y 6,29 para el pH; que proporcionan los valores 84,23 % para la degradación de ácido málico y 87,54 g para la resistencia mecánica.

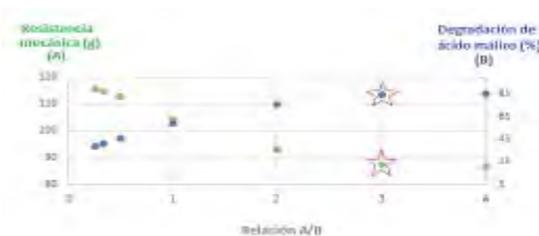


Figura 3. Valores óptimos teóricos de cada factor obtenidos mediante una optimización multirrespuesta atendiendo a la importancia relativa de cada factor.

4. Conclusiones

La aplicación de derivados de sílice durante el proceso de inmovilización mejoró significativamente la resistencia mecánica del soporte, siendo más elevada cuanto mayor fue la concentración de silicato de sodio y silicato coloidal, esto pudo deberse a la dispersión de las nanopartículas de sílice en la matriz de alginato y a la formación de puentes de hidrógeno entre las partículas de silicatos y la superficie del alginato [13].

También se observó significancia estadística del pH en la capacidad de degradación de ácido málico, obteniéndose la máxima degradación con los valores de pH ensayados más elevados, posiblemente debido a que pH próximos a la neutralidad reducen el esfuerzo que deben hacer las BAL para tamponar su pH intracelular [14]. La capacidad de degradación de

ácido málico también aumentó significativamente con la adición de silicato coloidal, lo que parece ir en consonancia con lo descrito por Perullini [15], que estableció que la sustitución parcial de silicato coloidal por silicato de sodio reduce el estrés ambiental que sufren las bacterias ya que disminuye la citotoxicidad de los iones de sodio.

5. Bibliografía

1. Vila-Crespo, J.; Rodríguez-Nogales, J.M.; Fernández-Fernández E.; Hernández-Moral, M.C. (2006). Strategies for the enhancement of malolactic fermentation in the new climate conditions. In: Editorial Formatex.
2. Maicas, S.; Pardo, I.; Ferrer, S. 2001. The potential of positively-charged cellulose sponge for malolactic fermentation of wine, using *Oenococcus oeni*. In: *Enzyme and Microbial Technology*, 8, 415-419.
3. Kourkoutas, Y.; Bekatorou, A.; Banat, I.M.; Marchant, R.; Koutinas, A.A. 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production. In: *Food Microbiology*, 21, 377-397.
4. Maicas, S.; González-Cabo, P.; Ferrer, S.; Pardo, I. 1999. Production of *Oenococcus oeni* biomass to induce malolactic fermentation in wine by control of pH and substrate addition. In: *Biotechnology Letters* 21, 349±353.
5. Zhang, D.; Lovitt, R. W. 2006. Strategies for enhanced malolactic fermentation in wine and cider maturation. In: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81 (7), 1130–1140.
6. Coradin, T.; Mercey, E.; Lisnard L.; Livage, J. 2001. Design of silica-coated microcapsules for bioencapsulation. In: *Chemical communications*, 2496–2497.
7. Callone, E.; Campostrini, R.; Carturan, G.; Cavazza, A.; Guzzon, R. 2008. Immobilization of yeast and bacteria cells in alginate microbeads coated with silica membranes: procedures, physico-chemical features and bioactivity. In: *Journal of Materials Chemistry*, 18(40), 4839.
8. Guzzon, R.; Carturan, G.; Krieger-Weber, S.; Cavazza, A. 2011. Use of organo-silica immobilized bacteria produced in a pilot scale plant to induce malolactic fermentation in wines that contain lysozyme. In: *Annals of Microbiology*, 62(1), 381–390.
9. Coradin, T.; Allouche, J.; Boissière M.; Livage, J. 2006. Sol-gel biopolymer/silica nanocomposites in biotechnology. In: *Current Nanoscience*, 2, 1-11.
10. Trivedi. U. J.; Bassi, A. S.; Zhu J. 2006. Investigation of phenol removal using sol-gel/alginate immobilized soybean seed hull peroxidase. In: *Canadian Journal Chemistry Engineering*, 84, 239–247.
11. Serp, D.; Cantana, E.; Heinzen, C.; Von Stockar U.; Marison, I.W. 2000. Characterization of an encapsulation Device for the Production of Monodisperse Alginate Beads for Cell Immobilization. In: *Biotechnology & Bioengineering*; 70 (1), 41-53.
12. Gamazo, C.; López, I.; Díaz, R. 2005. Manual práctico de microbiología. In: Editorial Elsevier Masson.
13. Liu, W.; Selomulya, C.; Wu, W. D.; Gengenbach, T. R.; Williams, T.; Dong Chen, X. C. 2013. On the formation of uniform alginate-silica microcomposites with ordered hierarchical structures. In: *Journal of Food Engineering*, 119 (2), 299–307.
14. Riberau Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donéche, B.; Lonvaud, A. 2003. Tratado de Enología. 1. Microbiología del vino. Vinificaciones. In: Ediciones Mundi-Prensa.
15. Perullini, A. M. 2009. Síntesis de materiales inorgánico con porosidad controlada para la inmovilización de células. Aplicaciones en biorreactores. In: Universidad de Buenos Aires, Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen a la empresa LALLEMAND Oenology Division por el suministro de la cepa de bacteria.

M22 - SÍNTESIS Y APLICACIÓN DE NUEVAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA BIOCOMPATIBLES PARA EL CONTROL DEL CRECIMIENTO DE BACTERIAS LÁCTICAS Y ACÉTICAS EN VINOS

**A. García-Ruiz¹, J. Crespo², J.M. López-de-Luzuriaga², M.E. Olmos², M. Monge²,
M.P. Rodríguez-Alfaro¹, P.J. Martín-Álvarez¹, B. Bartolome¹, M.V. Moreno-Arribas¹**

¹Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC-UAM, Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos, c/ Nicolás Cabrera 9, 28049, Madrid, ²Universidad de La Rioja, Departamento de Química, c/ Madre de Dios 51, 26004, Logroño, La Rioja.
victoria.moreno@csic.es

RESUMEN:

Es bien conocido que la plata tiene propiedades antimicrobianas muy potentes. Actualmente, la nanoplata es el nanomaterial más utilizado, representando aproximadamente la cuarta parte de todos los nanomateriales comercializados en el mercado. El presente trabajo tiene por objetivo explorar la potencial utilización de nuevas nanopartículas de plata como agentes antimicrobianos en enología, como una alternativa al empleo de los sulfitos. En primer lugar, se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización de dos materiales de plata: *PEG-Ag NPs 1*, nanopartículas sólidas soportadas sobre polietilenglicol, y *GSH-Ag NPs 2*, nanopartículas en solución soportadas sobre glutatión. A continuación, se ha evaluado su actividad antimicrobiana frente a un total de 11 especies, que incluyen bacterias lácticas y bacterias acéticas. Se han establecido los parámetros de inhibición bacteriana, comprobándose que los nanomateriales con recubrimientos a base de ambos polímeros solubles (polietilenglicol y glutatión), son capaces de inhibir el crecimiento de ambos tipos de bacterias, y en concreto, el efecto inhibidor sobre las bacterias acéticas, fue superior al del metabisulfito potásico. También se ha estudiado el mecanismo de acción antimicrobiano de las nanopartículas de plata, en el que parece que están implicados cambios en la membrana plasmática de la célula bacteriana con pérdida de la viabilidad celular y de las funciones vitales de la célula.

Palabras clave: Nanopartículas de plata biocompatibles, actividad antimicrobiana, bacterias lácticas, bacterias acéticas, alternativas al SO₂

1. Introducción

El anhídrido sulfuroso o dióxido de azufre (SO₂) presenta múltiples propiedades como conservante en la elaboración de los vinos, entre las que se pueden destacar los efectos antioxidante y antimicrobiano, éste último selectivo especialmente frente a bacterias lácticas (BAL). Por ello, hoy en día constituye un tratamiento indispensable en la tecnología de elaboración y conservación de los vinos. Sin embargo, el empleo de este aditivo está estrictamente regulado debido a que a dosis elevadas puede dar lugar a modificaciones organolépticas en el producto final, y fundamentalmente al potencial riesgo para la salud humana. Esto, ha promovido la investigación de nuevas alternativas en enología que puedan sustituir o complementar la acción del SO₂ [1].

El efecto antimicrobiano de la plata frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas se conoce desde la antigüedad, pero ha sido recientemente cuando se ha promovido el empleo de nanopartículas de plata (NP Ags) como agentes antimicrobianos en diferentes áreas, y en la

actualidad se considera que las NP Ag son el nanomaterial más utilizado en los productos de consumo, representando alrededor de una cuarta parte de todos los nanomateriales comercializados. A pesar del gran interés en las aplicaciones de estos nanomateriales en el campo de la enología, los estudios que han investigado el uso de NP Ag como agente antimicrobiano durante la vinificación son muy escasos [2,3], y no hay información disponible sobre el efecto de estas NP Ags sobre el crecimiento de diversos microorganismos del vino y su modo de acción. Es por ello, que el objetivo del presente trabajo es explorar la potencial utilización de nuevas NP Ags como agentes antimicrobianos en enología, específicamente para el control del crecimiento de las especies de bacterias lácticas y acéticas representativas del vino.

2. Material y métodos

2.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata

La síntesis de nanopartículas de plata estabilizadas con polietilenglicol (PEG-Ag NPs 1) se llevó a cabo mediante un proceso "in situ" del precursor de plata(I) [Ag(C6F5)] por reacción de $\text{NBu}_4[\text{Ag}(\text{C}_6\text{F}_5)_2]$ y AgClO_4 en relación molar 1:1 y empleando Et₂O como disolvente. La evaporación del disolvente a sequedad lleva la generación de PEG-Ag NPs 1 como un sólido negro. PEG-Ag NPs 1 tiene un contenido final de plata de 200 mg/g. Para la síntesis de nanopartículas de plata estabilizadas con glutatión (GSH-Ag NPs 2), se eligió un método clásico basado en la reducción de una disolución acuosa de tetrafluoroborato de plata (AgBF_4) de concentración 1.9×10^{-3} M con el agente reductor NaBH_4 y posterior estabilización con glutatión en su forma reducida, lo que dió lugar a la formación de una disolución coloidal amarilla de nanopartículas de plata muy estable en el tiempo, lo que las hace indicadas para su estudio en disolución. GSH-Ag NPs 2 tiene un contenido de plata de 0,197 mg/mL.

Estas muestras se han caracterizado mediante Plasma ICP y microscopía de transmisión electrónica (TEM). La técnica Plasma ICP ha permitido obtener el porcentaje en peso de plata en las muestras y compararlo con el teórico. Los espectros de absorción de las soluciones que contienen las NPs Ag (PEG-Ag NP 1 y GSH-Ag NP 2) se registraron en un espectrofotómetro de diodos UV-Visible Hewlett Packard 8453. Se recogieron las imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) en un microscopio JEOL JEM 1011 y JEOL JEM 2100.

2.2. Cepas bacterianas y medios de cultivo

Las BAL seleccionadas para este estudio (*Pediococcus pentosaceus* (n=4), *Lactobacillus casei* (n=3), *L. plantarum* (n=1) y *Oenococcus oeni* (n=3) pertenecen a la Colección de BAL del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), y han sido previamente aisladas de mostos y vinos. Las bacterias acéticas del estudio (*Acetobacter aceti* CECT-298 y *Gluconobacter oxydans* CECT-360) pertenecen a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Los medios de cultivo empleados fueron el medio MRS para las cepas BAL no *O. oeni*, el medio MRS málico-fructosa para las cepas de *O. oeni*, y el medio YG para las bacterias acéticas.

2.3. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los materiales frente a las distintas bacterias se ha evaluado siguiendo la metodología de García-Ruiz et al., [4, 5] como: a) inhibición del crecimiento bacteriano a través del parámetro IC₅₀ (concentración que inhibe el crecimiento bacteriano al 50%), y b) inactivación bacteriana a través del parámetro de supervivencia MBC (concentración mínima bactericida; concentración más baja que es capaz de inactivar al 99,9% de los microorganismos presentes en el inóculo inicial). Los estudios se han realizado en medios de

cultivo de laboratorio adicionados de etanol al 6%, con el objetivo de simular condiciones próximas a las del vino. Además se ha evaluado la actividad antimicrobiana del metabisulfito potásico (SO₂) frente a las mismas bacterias, para poder establecer una comparativa de la eficacia de los materiales de plata como alternativa al empleo de este agente antimicrobiano en enología.

2.4. Microscopía de fluorescencia

Se empleó un microscopio de epifluorescencia Leica DM2500 (Leica, Heerbrugg, Switzerland). El kit LIVE/DEAD BacLight de viabilidad bacteriana L7012 (Invitrogen, Oregon, EEUU) se utilizó para los ensayos de integridad de membrana por tinción selectiva del ácido nucleico.

3. Resultados

Se ha abordado la síntesis de nanomateriales basados en nanopartículas de plata y estabilizados por agentes químicos (polímeros o moléculas) que fueran biocompatibles. Así, se eligieron el polímero polietilenglicol y la molécula glutatión como agentes estabilizantes de las nanopartículas. Posteriormente estas muestras se han caracterizado mediante Plasma ICP y microscopía de transmisión electrónica (TEM). En las muestras de PEG-Ag NPs 1, la población principal consta de Ag NPs con un diámetro medio de entre 3 y 5 nm como se observa en las micrografías TEM (Figura 1A-1B). Por otro lado, las micrografías TEM de las muestras de GSH-Ag NPs 2 mostraron una amplia gama de diámetros entre 10 y 50 nm (Figura 1C-1D).

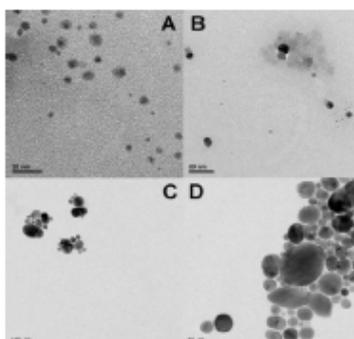


Figura 1. Imágenes de microscopía de transmisión electrónica de las nanopartículas PEG-Ag NPs 1 (A–B) y GLU-Ag NPs 2 (C–D). Barras de escala de 20 (A), 50 nm (B), 100 (C) y 50 (D).

A continuación se evaluó la actividad antimicrobiana de PEG-Ag NPs 1 y GSH-Ag NPs 2 frente a las principales especies de bacterias lácticas y acéticas presentes en el vino mediante la determinación del parámetro IC₅₀ (Tabla 1). Con el fin de facilitar la comparación entre las nanopartículas, la concentración se expresa en g de Ag por ml. Los valores de IC₅₀ para las bacterias lácticas oscilaron entre 86 mg Ag/ml (*P. pentosaceus* CIAL-49) y 470 g de Ag/ml (*P. pentosaceus* CIAL-85) para la nanopartícula PEG-Ag NP 1, mientras que para GSH-Ag NP 2, los valores de IC₅₀ oscilaron entre 1.2 µg Ag/ml (*O. oeni* CIAL-118) y 70 g de Ag/ml (*P. pentosaceus* CIAL-49). Para todas las cepas de LAB, la susceptibilidad bacteriana fue mayor (menores valores de IC₅₀) frente a GSH-Ag NP 2 que a PEG-Ag NP 1, destacando la alta susceptibilidad de las cepas de *O. oeni* a GSH-Ag NP 2 (IC₅₀ ~ 1 g / ml) (Tabla 1). Sin embargo, en los ensayos relativos a las cepas de bacterias acéticas, éstas mostraron una susceptibilidad similar a ambas nanopartículas (PEG-Ag NPs 1 y GSH-Ag NPs 2), con valores de IC₅₀ de alrededor de 30 mg/ml (Tabla 1). Para las bacterias acéticas (*A. aceti* y *G. oxydans*), los materiales de plata estudiados (PEG-Ag NPs 1 y GSH-Ag NPs 2) mostraron un efecto inhibitor -

expresado como IC50- superior al del metabisulfito potásico, si bien, en general, las bacterias lácticas, y especialmente la especie *O. oeni*, mostraron menor sensibilidad a los materiales de plata que al metabisulfito potásico. Mediante microscopía de epifluorescencia, se ha confirmado la capacidad de los nanomateriales de plata de inhibir el crecimiento y la viabilidad celular de cepas de bacterias lácticas y acéticas del vino, y se ha corroborado la mayor sensibilidad de las bacterias acéticas a la exposición de materiales de plata que de las bacterias lácticas, lo que puede explicarse por las diferencias en la estructura de la pared celular.

Tabla 1. Actividad antimicrobiana (IC₅₀, MBC) de los nanomateriales de plata y el metabisulfito potásico frente a las cepas de bacterias lácticas y acéticas estudiadas

	IC ₅₀ (Ag concentration, µg/mL)				IC ₅₀ (µg/mL)
	PEG-Ag NPs 1		GLU-Ag NPs 2		K ₂ S ₂ O ₅
	IC ₅₀	MBC	IC ₅₀	MBC	IC ₅₀
Bacterias Lácticas		400		> 100	
<i>P. pentosaceus</i> CIAL-16	120	400	62	> 100	590
<i>P. pentosaceus</i> CIAL-49	86	400	70	> 100	610
<i>P. pentosaceus</i> CIAL-65	470	400	50	> 100	550
<i>P. pentosaceus</i> CIAL-86	410	400	69	> 100	600
<i>L. casei</i> CIAL-51	232	400	65	> 100	540
<i>L. casei</i> CIAL-52	380	200	46	> 25	310
<i>L. casei</i> CIAL-92	370	200	17	> 25	820
<i>L. plantarum</i> CIAL-121	88	200	61	> 25	540
<i>O. oeni</i> CIAL-117	208		1.7		360
<i>O. oeni</i> CIAL-118	202	200	1.2	> 100	440
<i>O. oeni</i> CIAL-119	210	200	2.4	> 100	560
Bacteria Acéticas					
<i>A. aceti</i> CECT-298	30	200	29	> 100	480
<i>G. oxydans</i> CECT-360	32	200	30	> 100	470

4. Conclusiones

Estos resultados muestran la efectividad de los nanomateriales de plata específicamente sintetizados para este estudio, para inhibir el crecimiento de las principales especies de bacterias lácticas y acéticas del vino, como una alternativa al empleo de sulfitos en enología, aunque son necesarios más estudios para asegurar su aplicabilidad en bodega.

5. Bibliografía

1. Santos, M.C., Nunes, C., Saraiva, J.A., Coimbra, M.A. (2012). *Eur. Food Res. Technol.*, 234, 1-12
2. Izquierdo-Cañas, P.M., García-Romero, E., Huertas-Nebreda, B., Gómez-Alonso, S. (2012) *Food Control*, 23, 73-81
3. Garde-Cerdán, T.; López, R., Garijo, P., González-Arenzana, L., Gutiérrez, A. R., López-Alfaro, I., Santamaría, P. (2014) *Aust. J. Grape Wine Res.*, 20, 51-61
4. García-Ruiz, A., Moreno-Arribas, M.V., Martín-Álvarez, P.J., Bartolomé, B. (2011) *Int. J. Food Microbiol.*, 145, 426–431
5. García Ruiz A., Crespo, J. M. López-de-Luzuriaga, J. M; Olmos, M. E., Monge, M., Rodríguez-Álfaro; M.P., Martín-Álvarez, P.J., B.Bartolomé, B., Moreno-Arribas. M.V. (2015). *Food Control*, 50, 613-619

6. Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación recibida del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) a través de los proyectos PRI-PIBAR-2011-1358 y AGL2012-40172-C02-01.

M23 - PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS VARIETALES POR CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS AUTÓCTONAS A PARTIR DE UN EXTRACTO DE PRECURSORES GLICOSILADOS DE UVA BLANCA

**Testa, B.¹, Muñoz-González, C.², García-Ruiz, A.²; Pozo-Bayón, M.A.², Lombardi, S.J.¹,
Iorizzo, M.¹, Moreno-Arribas M. V.²**

¹University of Molise, Department of Agricultural Environmental and Food Sciences, De Sanctis avenue snc 86100 Campobasso, Italy. ²Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) (CSIC-UAM), Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos, C/Nicolás Cabrera 9, 28049, Madrid.
victoria.moreno@csic.es

RESUMEN:

Los precursores glicosídicos del aroma son compuestos inodoros que se encuentran de forma natural en las uvas y que representan un reservorio natural de moléculas odorantes en el vino. Durante la elaboración del vino, se busca la liberación de las correspondientes agliconas (volátiles y odorantes), que se caracterizan por tener bajos umbrales de percepción y propiedades sensoriales muy interesantes, características de la variedad. En este trabajo, se ha evaluado la capacidad de 11 cepas de bacterias lácticas enológicas (*Lactobacillus plantarum*) de liberar compuestos aromáticos varietales a partir de precursores glicosidos de la uva. Las cepas bacterianas se han aislado de vinos tintos y tipificado mediante el uso de técnicas moleculares (PFGE, RAPD y secuenciación 16S rRNA) y de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF-MS, comprobándose además la no producción de aminas biógenas. Se ha comprobado la actividad glicosidasa de estas cepas mediante el empleo de un glicósido comercial n-octilglicósido, siendo dicha actividad de aproximadamente el 100% desde el mismo momento de inoculación (tiempo 0) de las cepas bacterianas con el glicósido. La potencial eficacia tecnológica de estas bacterias se ha confirmado sobre un extracto de precursores glicosidos obtenido a partir de uva blanca, demostrándose para la cepa *L. plantarum* CIAL-M28 valores de actividad glicosidasa superiores al 80% en tiempos muy cortos.

Palabras clave: *Lactobacillus plantarum*, vino, fermentación maloláctica, aroma, uva, compuestos volátiles varietales, precursores glicosilados, aromas frutales, terpenos

1. Introducción

En las uvas, los compuestos del aroma se encuentran fundamentalmente como glicosídicos conjugados con azúcares, es decir, no están en forma libre y, por lo tanto, no son odorantes. Se estima que la concentración de estos precursores del aroma glicosilados es entre dos y ocho veces mayor que la de sus homólogos libres y, aunque su distribución en la baya de uva puede cambiar durante la madurez, están presentes en mayor cantidad en la piel de las uvas. Durante la elaboración del vino, se busca la liberación de las correspondientes agliconas (volátiles y odorantes), que son compuestos muy relevantes para las características de los vinos (i.e. monoterpenos, norisoprenoides, compuestos benzenoides, etc) ya que se caracterizan por tener bajos umbrales de percepción y propiedades sensoriales muy

interesantes, que confieren a los vinos aromas característicos de la variedad de uva (i.e. aromas frutales).

Las enzimas responsables de la hidrólisis enzimática de los glicósidos son las glicosidasas. En el vino, las bacterias lácticas son responsables del proceso de fermentación maloláctica, y aunque la principal especie implicada es *Oenococcus oeni*, en la actualidad existe un interés creciente en la selección y caracterización de las propiedades metabólicas de cepas de la especie *Lactobacillus plantarum*. Actualmente, las glicosidasas comerciales más empleadas en enología proceden del hongo *Aspergillus niger*. Estas glicosidasas comerciales se caracterizan por mostrar poca inhibición en presencia de azúcares (glucosa), pero manifiestan problemas derivados de actividades enzimáticas colaterales (antocianinas, polifenol-oxidasas).

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el potencial de las bacterias lácticas del vino, y más concretamente de cepas de la especie *L. plantarum*, para hidrolizar precursores glicosídicos de la uva y liberar las correspondientes agliconas aromáticas y con ello, la consiguiente mejora de la calidad sensorial del vino.

2. Material y métodos

Se han estudiado un total de 65 cepas de *L. plantarum* aisladas de 28 vinos, incluyendo vinos españoles y procedentes del sur de Italia, durante la fermentación maloláctica (FML) espontánea. Las cepas bacterianas pertenecen a la colección del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) y al Departamento de Agricultura y Ciencias de Alimentos de la Universidad de Molise, y se han tipificado mediante el uso de técnicas moleculares (PFGE, RAPD y secuenciación 16S rRNA), y de espectrometría de masas, MALDI TOF/TOF-MS.

El primer panel de selección, se realizó en el medio sintético propuesto por Carreté et al. [1] (4 gL⁻¹ de extracto de levadura, 2 gL⁻¹ de glicerol, 6 gL⁻¹ de ácido D,L-málico) en presencia de 14% (v/v) de etanol a pH 3,5 (medio SW) Las células cultivadas en fase exponencial en MRS durante 48 h a 28 °C, se lavaron con solución fisiológica y se resuspendieron en medio SW a la concentración final de 108 CFU mL⁻¹. El número de células viables se midió en placas a diferentes tiempos (5, 10, 15 días) de incubación a 30 °C. Se seleccionaron 11 cepas que mostraron las mejores características, que se evaluaron en un segundo panel de selección, para determinar su capacidad de crecer y llevar a cabo la FML en vinos. Los recuentos de células se controlaron a cuatro etapas diferentes durante la FML (0, 10, 15, 20 días) mediante la realización de recuentos de placas en placas de agar MRS que se incubaron a 30 °C. La concentración de ácido L-málico se determinó mediante un kit enzimático (Steroglass, Italia). Durante la incubación a 30 °C durante 15 días, se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo y el número de células viables se determinó en placas a partir de alícuotas del medio SW diluidas en medio agar MRS.

La capacidad de hidrolizar precursores glicosídicos de estas cepas, se evaluó mediante el empleo de un glicósido comercial n-octilglicósido (5 ppm) y evaluación de la aglicona correspondiente, 1-octanol, y un extracto de precursores glicósidos obtenido a partir de uva blanca siguiendo la metodología descrita por Rodríguez-Bencomo et al. [2]. Los caldos de cultivo overnight de *L. plantarum* se inocularon con el extracto y se incubaron a 30° C. Para aislar las agliconas odorantes, se llevó a cabo una extracción y concentración empleando la técnica de microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME), y los compuestos odorantes se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS). A los resultados obtenidos se les aplicaron diferentes tratamientos estadísticos.

La capacidad de producir aminas biógenas (histamina, metilamina, etilamina, tiramina, feniletilamina, putrescina y cadaverina) de las cepas de *L. plantarum* seleccionadas se determinó por RP-HPLC siguiendo el método descrito por Marcobal et al. [3] en experimentos

en medio de cultivo MRS conteniendo los aminoácidos precursores correspondientes. Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

3. Resultados

En una primera etapa, 65 aislados de *L. plantarum* se sometieron a un ensayo de cribado, primero para evaluar su resistencia usando un medio sintético similar al vino, vino sintético (SW), con un pH de 3.5 y un contenido de etanol de 14% (v/v). Posteriormente se seleccionaron las cepas más resistentes a estas condiciones, que se evaluaron en un ensayo comparativo de rendimiento en la fermentación maloláctica a escala de laboratorio (microvinificaciones) utilizando el mismo medio, el vino sintético, pero con diferente valor de pH y concentración de etanol. Esto permitió seleccionar 11 cepas de *L. plantarum* que mostraron una buena capacidad de degradar el ácido L-málico en poco tiempo (entre 5 y 20 días) (Figura 1), la prueba más significativa se obtuvo en el vino sintético a pH 3.2 con un contenido en etanol de 13% (v/v).

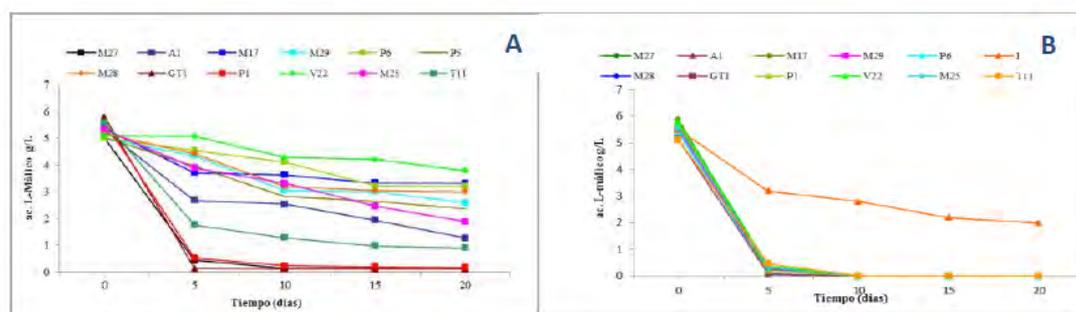


Figura 1. Degradación del ácido málico por las cepas de *L. plantarum* estudiadas. a) vino sintético a pH 3.2 y 13 % etanol (v/v), b) vino sintético a pH 3.5 y 13 % etanol (v/v)

A continuación se evaluó la actividad glicosidasa de estas cepas mediante el empleo de un glicósido comercial n-octilglicósido, evaluándose la actividad mediante la liberación de la aglicona correspondiente (1-octanol). Como se muestra en la tabla 1, todas las bacterias producen hidrólisis del glicosido comercial, siendo las cepas M17 y M28 las mayores productoras de 1-octanol. Posteriormente, la potencial eficacia tecnológica de estas bacterias se ha confirmado sobre un extracto de precursores glicosídicos obtenido a partir de uva blanca. Los resultados obtenidos con el extracto glicosídico de uva, mostraron que, en general, todas las bacterias estudiadas eran capaces de hidrolizar los precursores glicosídicos, liberando diferentes familias de agliconas aromáticas, que incluían terpenos, derivados bencénicos y alcoholes. En general, la liberación de agliconas es dependiente de la cepa bacteriana, comprobándose que *L. plantarum* CIAL-M28 es la mayor liberadora de terpenos como el linalol, relacionado con notas florales en los vinos, con valores de actividad glicosidasa superiores al 80% en tiempos muy cortos (resultados no mostrados).

Finalmente, en las 11 cepas seleccionadas de *L. plantarum* se evaluó la capacidad para producir aminas biogénas mediante RP-HPLC, comprobándose que ninguna de las cepas estudiadas producía las aminas histamina, metilamina, etilamina, tiramina, feniletilamina, putrescina y cadaverina, un aspecto fundamental en relación a la seguridad y protección de la salud de los consumidores, con vistas a la producción de un posible starter de bacterias lácticas para ser utilizado como iniciador de la fermentación maloláctica.

Tabla 1. Media y SD del 1-octanol (áreas absolutas) liberado por las diferentes cepas de *L. plantarum* tras la incubación con el glucósido comercial (n-octilglucósido)

Cepas	Mean	SD
control	0	0,00
A1	1374998	182665
GT1	1470788	223690
M17	1829973	99960
M25	1553906	18674
M27	1008713,5	29482
M28	1968063	2923
M29	1251022,5	71640
P1	947318	78966
P5	1291737	80423
P6	1605336	39610
T1	1260149,5	30652

4. Conclusiones

Los estudios de la caracterización tecnológica han demostrado la capacidad de las once cepas de *L. plantarum* seleccionadas para adaptarse y desarrollarse en el vino a valores bajos de pH; así como su alta tolerancia al etanol. Los estudios del metabolismo han puesto de manifiesto la notable capacidad de algunas cepas de degradar el ácido L-málico de una manera completa y en un tiempo muy corto. Otro aspecto importante destacado de este trabajo es que ninguna de las cepas estudiadas produce aminas biógenas. Los resultados de actividad glicosidasa mostraron que todas las cepas son capaces de hidrolizar glicósicos precursores de aroma presentes en las uvas, liberando diferentes compuestos odorantes que se caracterizan por presentar notas aromáticas agradables y bajos umbrales de percepción. Esta actividad es especialmente relevante en la cepa *L. plantarum* CIAL-M28. En conjunto, los resultados obtenidos permiten disponer de una colección de cepas enológicas con potencial como iniciadores malolácticos y con propiedades que contribuyen a la mejora de la composición y la calidad del vino, específicamente en lo referente a la liberación de monoterpenos volátiles muy importantes para potenciar las características sensoriales de los vinos.

5. Bibliografía

1. Carrete, R., Vidal, M.T., Bordons, A. (2002). Inhibitory effect of sulphur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 211, 155-159
2. Rodríguez-Bencomo, J. J., Selli, S., Muñoz-González, C., Martín-Álvarez, P. J., Pozo-Bayón, M. A. (2013). Application of glycosidic aroma precursors to enhance the aroma and sensory profile of dealcoholised wines. *Food Res. Int.* 51, 450-457
3. Marcobal, A.; Polo, M.C.; Martín-Álvarez, P.J.; Moreno-Arribas, M.V. (2005) Biogenic amines content of red Spanish wines. Comparison of a Direct ELISA and an HPLC method for the determination of histamine in wines. *Food Res Int.* , 38, 387-394

6. Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación recibida del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) a través de los proyectos PRI-PIBAR 2011-1358 y AGL2012-40172-C02-01.

M24 - EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADICIÓN DE VELCORIN® SOBRE LA PARADA DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

Sara Callejón¹, Nicolás Sánchez², Sergi Ferrer¹, Manfred Hoffmann³, Isabel Pardo¹

¹ENOLAB-ERI-ISIC BioTecMed/MCI IViSoCa, Universidad de Valencia, Dr. Moliner, 50, 46100, Burjassot, Valencia.

²Escuela de Viticultura y Enología, Plaza Pascual Carrión, 5, 46340 Requena, Valencia, España.

³ LANXESS Deutschland GmbH, Kennedyplatz 1, 50569, Köln, Deutschland Alemania.

Isabel.Pardo@uv.es

RESUMEN:

Se evaluó el efecto del Velcorin® (dicarbonato de dimetilo), adicionado sólo o en combinación con anhídrido sulfuroso (SO₂), sobre la reducción de la concentración de levaduras en distintos momentos de la fermentación de un mosto Merseguera. Se realizaron ensayos para determinar la sensibilidad al producto de dos levaduras comerciales y de las levaduras autóctonas. Los tratamientos que se aplicaron fueron: 100 y 200 mg/L de Velcorin® y 200 mg/L de Velcorin + 50 mg/L SO₂. El Velcorin® fue capaz de reducir los recuentos de levaduras entre 1,53 a 7,17 unidades logarítmicas en función de la concentración usada y del tipo de levadura empleada. El tratamiento combinado de Velcorin® y SO₂ lograba las mayores reducciones en la viabilidad de las levaduras. En todos los casos la reducción de levaduras viables era del 99% o superior.

Palabras clave: Velcorin®, Merseguera, Fermentación alcohólica, levaduras, *Saccharomyces cerevisiae*.

1. Introducción

Actualmente, la estabilidad microbiológica de los vinos se logra principalmente mediante el uso de SO₂ o mediante procesos de filtración, aunque la OIV admite también otros procedimientos de estabilización, como la adición de ácido sórbico o de dimetil dicarbonato (DMDC). El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la capacidad del Velcorin® (preparación comercial que contiene dimetil dicarbonato)¹ sólo o en combinación con SO₂, para disminuir el número de levaduras viables y detener así la fermentación de un mosto Merseguera. Las variables consideradas en este estudio han sido: a) la fase de fermentación, b) las dosis de Velcorin® y SO₂ empleadas, y c) el tipo de levadura responsable la fermentación.

2. Material y métodos

2.1 Mosto empleado

Se emplearon 400 L de mosto blanco de la variedad Merseguera, desfangado con la ayuda de enzimas pectolíticos (10 mg/L) y del SO₂, añadido a razón de 50 mg/L. Las características físico-químicas de este mosto se muestran en la Tabla 1. Con este mosto se rellenaron 3 depósitos de 100 L, que se nombraron como Depósito 1, Depósito 2 y Depósito 3.

Brix	Densidad 20/20	Alcohol probable °	Acidez total g/L	pH	SO ₂ libre mg/L	SO ₂ total mg/L
19	1080	10.7 °	2.6	3.42	5.12	5.12

Tabla 1: Características físico-químicas del mosto utilizado en las experiencias

2.2 Inoculación de las levaduras

El mosto del Depósito 1 (utilizado como control) se dejó fermentar con su microbiota autóctona. Para acelerar el inicio de la fermentación alcohólica tras el desfangado, se inoculó con 200 mL de sus propias lías obtenidas en el desfangado. El Depósito 2 se inoculó con la levadura comercial ENARTIS FERM SB (*S. cerevisiae bayanus* SB) y el Depósito 3 con la levadura comercial ENARTIS FERM ES 401 (*S. cerevisiae* ES 401), a razón de 200 mg/L de levaduras seca activa en ambos casos. Las levaduras comerciales se hidrataron adicionando 20 g de cada levadura comercial a una mezcla de 140 ml del agua de bodega a 30 °C y 60 ml del mosto. Con este volumen de suspensión cada una de las levaduras se inoculó en los mostos de los Depósitos 2 y 3.

2.3 Adición de Velcorin® en distintos momentos de la vinificación y estimación de su efecto sobre la viabilidad de las levaduras

Se dejaron fermentar los mostos de los tres depósitos y a las 4 horas, 7, 14, 21 y 30 días, de cada uno de ellos, se tomaron 9 volúmenes de 500 mL de mosto o vino en botellas estériles. A 3 de los 9 volúmenes se les añadió Velcorin® para conseguir una concentración de 100 mg/L (40 µL), a otros 3 volúmenes se les añadió la cantidad suficiente para obtener una concentración de 200 mg/L (80 µL), a los 3 volúmenes restantes no se les añadió nada (controles). En el caso de las muestras correspondientes a los 14 días de fermentación, además de los volúmenes ya descritos, se tomó un volumen más de 500 mL (por depósito) al que se le añadieron 200 mg/L de Velcorin® y 100 mg/L de metabisulfito potásico para conseguir una dosis de 50 mg/L de SO₂. La homogenización de estos productos se llevó a cabo por agitación invirtiendo las botellas. Estas se incubaron a 20 °C durante 24 h.

El efecto antiséptico del Velcorin® solo o en combinación con SO₂ se evaluó tras dejarlos actuar 24 horas. Para ello se determinó la concentración de levaduras viables tanto en las muestras tratadas como en las no tratadas (controles). El recuento de levaduras se realizó por siembra de 100 µL de las diluciones seriadas adecuadas en medio YPD². Las placas sembradas se incubaron a 28 °C durante 48 h, periodo tras el cual se procedió al recuento de las colonias crecidas. Los resultados se expresaron como n° unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/mL).

2.4 Análisis físicoquímicos:

Se realizaron análisis físico-químicos del mosto inicial. Los parámetros analizados fueron: análisis de la Densidad 20/20 (densímetro Dujardin Salleron), análisis de contenido en anhídrido sulfuroso mediante medición de la variación del potencial redox con electrodo (Marca TDI), estimación de alcohol probable por cálculo a partir de la determinación grados Brix mediante refractómetro (VWR), determinación de la acidez total (expresada en g/L de

ácido tartárico) mediante valoración ácido-base hasta neutralidad (pH=7)³ y medición de pH: mediante aparato medición pH calibrado de 4-10.

3. Resultados

Los recuentos de levaduras viables en las muestras correspondientes a diferentes momentos de las fermentaciones (tratadas y no tratadas) llevadas a cabo por distintas levaduras se muestran en las Figuras 1, 2 y 3.

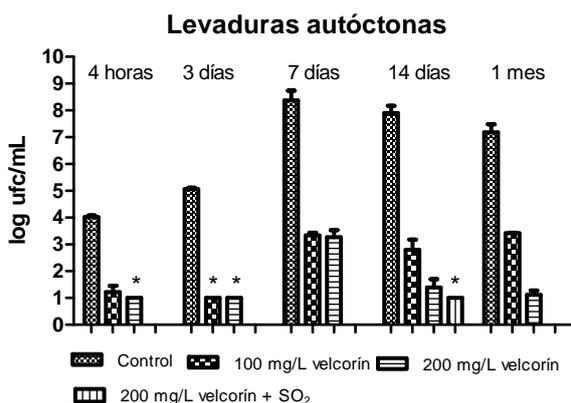


Figura 1: Recuentos de levaduras viables en muestras tomadas en distintos momentos de la fermentación, tratadas y no tratadas. La fermentación se ha realizado con levaduras autóctonas. *valores por debajo del límite de detección.

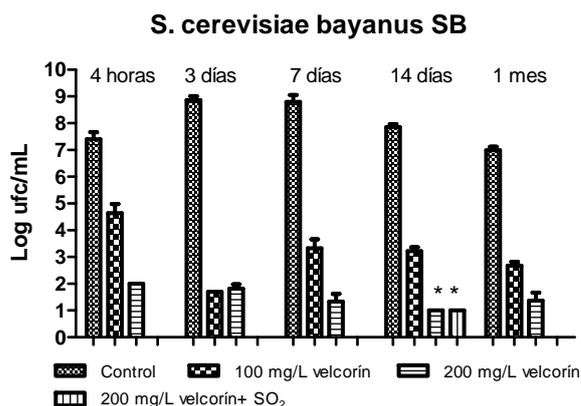


Figura 2: Recuentos de levaduras viables en muestras tomadas en distintos momentos de la fermentación, tratadas y no tratadas. La fermentación se ha realizado con *S. cerevisiae bayanus* SB *valores por debajo del límite de detección.

En el Depósito 1 en el que el mosto fermentó con las levaduras autóctonas (Figura 1), se observan reducciones en la concentración de levaduras indígenas que van desde 2.8 hasta 6.5 unidades logarítmicas (u.l.). En el Depósito 2, en el que se inoculó con *S. bayanus* SB (Figura 2), las reducciones oscilan entre 2.7 y 7.3 u.l., y en el Depósito 3, inoculado con *S. cerevisiae* ES 401, (Figura 3) entre 1.5 y 5.5 u.l. En todos los casos, estas reducciones suponen una mortalidad de 99.9 % o superior.

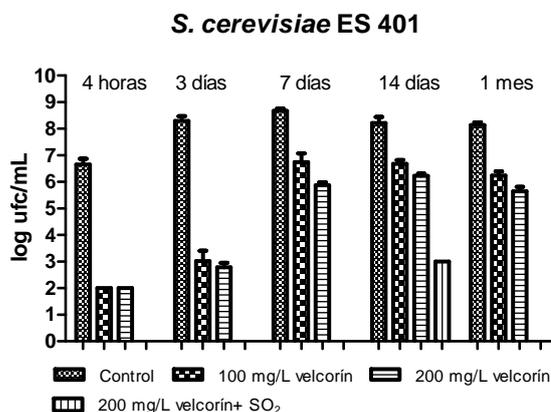


Figura 3: Recuentos de levaduras viables en muestras tomadas en distintos momentos de la fermentación, tratadas y no tratadas. La fermentación se ha realizado con *S. cerevisiae* ES 401.

La reducción de la concentración de levaduras viables tras los tratamientos parece estar relacionada con la concentración inicial de levaduras presentes en los mostos; esta concentración es del orden de 1×10^4 en el Depósito 1, de 2.5×10^7 en el Depósito 2 y de 4.5×10^6 en el Depósito 3. Según los resultados obtenidos cuanto menor es la concentración inicial de levadura, menor es el número de levaduras viables tras los tratamientos. Además cuanto mayor es la concentración Velcorin®, menor es el número de levaduras supervivientes. El mejor tratamiento para eliminar las levaduras ha sido la combinación de 200 mg/L de Velcorin® y 50 mg/L de SO₂. De las Figuras 1-3 se puede deducir que las levaduras autóctonas y *Saccharomyces cerevisiae bayanus* SB fueron más sensibles que *S. cerevisiae* ES 401 a los tratamientos aplicados. Además, en el caso de esta última levadura, parece que las células de levadura más viejas son más resistentes al Velcorin® que las células que están en fase de crecimiento temprano. Para que los tratamientos aplicados garanticen una parada completa y permanente de la fermentación alcohólica, la concentración de levaduras viables presentes en los mostos antes de ser tratados no debe ser superior a 10^5 ufc/mL.

4. Conclusiones

1. En todas las muestras el Velcorin® fue capaz de eliminar al menos 99.9% de las levaduras viables.
2. El efecto del Velcorin® aumenta cuando se combina con SO₂.
3. La eficacia del tratamiento depende de la dosis empleada, del tipo de levadura y de la concentración y fase de crecimiento de ésta.

5. Bibliografía

1. Velcorin brochure 'Oenology energized by Lanxess' (2013).
2. Ausubel, B., Kingston, M., Seidman, S. and Struhl. 1994. Current protocols in molecular biology. *In: Current Protocols*, Brooklyn, N.Y.
3. García-Barceló, J; 1976. Metodología de análisis de vinos y derivados. *In: Ediciones SEPSA*. Vilafranca del Penedes, pp. 92.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen a SEPSA-Enartis la cesión gratuita de las levaduras ENARTIS FERM SB y ENARTIS FERM ES 401.

M25 - DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN RÁPIDA DE *Brettanomyces bruxellensis* EN VINO MEDIANTE LAMP

Verónica Soares-Santos, Isabel Pardo, Sergi Ferrer

ENOLAB, ERI-ISIC BioTecMed / MCI IVISOCA. Universitat de València. C/ Dr. Moliner 50. 46100 Burjassot-València
Sergi.Ferrer@uv.es

RESUMEN:

Brettanomyces bruxellensis es una levadura alterante cuya presencia conlleva el detrimento de las características organolépticas del vino. La posibilidad de detectar estas levaduras en estadios tempranos del proceso de vinificación permite tomar medidas correctivas a tiempo, reduciendo la posibilidad de deterioro del vino. En el presente estudio se ha adaptado la metodología de LAMP para detectar e identificar *B. bruxellensis* en vino de una forma rápida, específica y sencilla. Para ello se han utilizado 5 cebadores específicos de esta especie y muestras de mostos y vinos blancos y tintos. Los ensayos realizados confirman que esta metodología es muy rápida, sensible y específica, obteniéndose resultados en 1 hora.

Palabras clave: Detección, Identificación, *B. bruxellensis*, Vino, LAMP

1. Introducción

Brettanomyces bruxellensis es responsable de cuantiosas pérdidas económicas de la industria enológica en todos los países productores del mundo. Esta levadura ha sido aislada de la piel de la uva y tierra del viñedo, y en bodega, además de en el vino, de las barricas de roble o incluso del aire [1]. La contaminación se manifiesta normalmente al final de la fermentación alcohólica o maloláctica y sobre todo durante el envejecimiento en bodega [2]. Desde un punto de vista organoléptico su desarrollo contribuye a la aparición en el vino de aromas particulares, casi siempre desagradables, definidos como sudor de caballo, establo, cuero, plástico quemado, barniz o solvente, capaces de enmascarar los aromas afrutados y florales del vino y como consecuencia de disminuir su calidad. Estos olores están relacionados, por lo menos en parte, con la formación de fenoles volátiles como el 4-etil fenol y 4-etil guaiacol a partir de los ácidos hidroxicinámicos de la uva [3].

Los métodos tradicionales para detectar e identificar estas levaduras se basan en el cultivo en placa. Esta técnica resulta tediosa (1-2 semanas) y conduce a resultados inconsistentes, ya que depende de la condición fisiológica de los microorganismos [6]. Como alternativa se han desarrollado diferentes técnicas moleculares (como qPCR y otras) que disminuyen el tiempo de identificación y aumentan la especificidad y la sensibilidad. Sin embargo, estas técnicas son muy costosas y complejas, y requieren de un equipo especial y personal cualificado, por lo que es difícil ponerlas en práctica en la mayoría de las bodegas.

La amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP) es una técnica molecular que puede resultar aplicable a la industria enológica. Esta técnica novedosa permite la amplificación de ADN en condiciones isotérmicas, con una elevada especificidad, eficiencia, rapidez y facilidad. Para llevar a cabo esta metodología se utiliza una polimerasa con capacidad para desplazar la doble cadena de ADN y un conjunto de 4 a 6 cebadores que reconocen un total de 6 a 8 secuencias de la región diana [4]. El seguimiento de la reacción de LAMP puede ser realizado mediante turbidez, fluorimetría o electroforesis. La turbidez es consecuencia de

la precipitación por la unión del magnesio presente en la mezcla de reacción con los iones de pirofosfato que son liberados con la incorporación de los dNTPs a la nueva cadena. Por tanto, es indicación de una reacción positiva. El seguimiento por fluorimetría es llevado a cabo añadiendo a la mezcla de reacción fluoróforos como el SYBR Green I o el SYTO-9, que emiten fluorescencia cuando sometidos a luz UV. La electroforesis en gel de agarosa permite visualizar los productos de amplificación obtenidos, en la cual se observan distintas bandas debido a la formación de amplificadores con distintos tamaños (aunque todos ellos son específicos). Mediante esta técnica se puede tanto detectar como cuantificar los microorganismos de interés. La detección puede realizarse por observación directa de turbidez, observación de fluorescencia en el caso de que se añada fluoróforos a la mezcla de reacción, y por realización de una electroforesis. La cuantificación puede ser llevada a cabo en turbidímetros que permiten hacer el seguimiento de la turbidez obtenida durante reacción de LAMP mediante lectura de absorbancia, obteniéndose curvas de absorbancia a lo largo del tiempo. Ello posibilita no sólo la detección sino la cuantificación de células. La medida de la intensidad de fluorescencia a tiempo real también permite cuantificar células mediante la obtención de curvas de fluorescencia a lo largo de la reacción, y puede ser llevada a cabo en los termocicladores de PCR a tiempo real.

En el presente estudio nos hemos propuesto adaptar la metodología de LAMP a la detección identificación rápida y sencilla de *B. bruxellensis* directamente en muestras de mostos y vinos blancos y tintos.

2. Material y métodos

Cepas utilizadas y preparación de las suspensiones celulares. La cepa de *B. bruxellensis* DSMZ 70726 se cultivó en medio de cultivo GPYA (40 g/L glucosa (Panreac), 5 g/L de peptona micológica (Pronadisa) 5 g/L de extracto de levadura (Scharlab)), en mostos y vinos blancos y tintos comerciales previamente esterilizados por filtración. Los microorganismos se inocularon en todos los casos a una concentración final de 2×10^6 células/mL y se cultivaron a 28 °C hasta alcanzar una concentración final aproximada de 1×10^8 células/mL. Para preparar las suspensiones celulares, se centrifugaron 500 µL de los cultivos en una centrífuga Prismr (Labnet International Inc.) a 12000 rpm durante 10 min. El sedimento se resuspendió en 500 µL de agua milliU (Milipore). En las muestras procedentes de vino se adicionó un lavado previo con tampón TEN 10% (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5, EDTA 0,05 M, NaCl 0,8 M).

Extracción de DNA. La extracción de DNA de las suspensiones celulares se realizó con el kit de extracción Ultra Clean® Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO).

LAMP. Se utilizaron 5 cebadores específicos de *B. bruxellensis* previamente descritos por [5]. La mezcla de reacción (25 µL) contenía 1,6 µM de cada uno de los cebadores internos, 0,2 µM de cada uno de los cebadores externos, 0,8 µM del cebadores bucle, 1,4 mM de cada dNTP, 1X tampón de amplificación (New England BioLabs), 8 mM MgCl₂ (Invitrogen), 0,4 U/µL *Bst* polimerasa 2.0 (New England BioLabs) y 2,5 µL de DNA extraído. Para la amplificación se usó un termociclador Mastercycle Personal 5332 (Eppendorf), el cual fue programado para mantener la muestra a 62 °C durante 1 h. Tras la amplificación se observó la presencia/ausencia de turbidez de las muestras.

Para comprobar la amplificación, se tomaron 10 µL de cada uno de los productos y se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % (p/v) SeaKem® LE agarosa (FMC) en TBE 0.5X a 80 V durante 2 horas. Se utilizó 1 Kb Plus (Invitrogen) como marcador de peso molecular. Las imágenes obtenidas fueron digitalizadas con el sistema de captación de imagen GelPrinter Plus (TDI).

Límite de detección del método de LAMP en vino blanco y tinto.

A partir de las soluciones celulares obtenidas en vino blanco y tinto (1×10^8 células/mL) se realizaron diluciones seriadas, utilizando la misma matriz de origen como diluyente (vino

blanco o vino tinto), con el fin de obtener concentraciones celulares desde 1×10^2 hasta 1×10^8 células/mL. A continuación se extrajo el ADN y se aplicó la técnica de LAMP a todas las muestras con el fin de obtener el límite de detección de la técnica.

3. Resultados

Comprobación de la validez del método. Se evaluó la validez de la técnica de LAMP para detectar e identificar células de *B. bruxellensis*. Para ello se utilizaron muestras de medio de cultivo y de mosto y vino blancos y tintos inoculadas con *B. bruxellensis*. Una vez transcurrida la reacción de LAMP, a partir de cada una de las matrices en estudio, se observó la presencia/ausencia de turbidez de las muestras amplificadas (Figura 1). Los resultados demostraron que la técnica de LAMP puede ser aplicada a partir de diferentes matrices, evitando eficazmente la presencia de inhibidores propios de mostos y vinos, tanto blancos como tintos.



Figura 1- Evaluación de la validez del método LAMP a partir de células de *B. bruxellensis* contenidas en diferentes matrices. Tubos 1, medio de cultivo GPYA; 2, mosto blanco; 3, mosto tinto; 4, vino blanco; 5, vino tinto; B, control negativo.

Además, las reacciones de amplificación fueron resueltas mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 2). El resultado obtenido fue equivalente al obtenido mediante la observación de turbidez, ya que se observaron bandas en todas las muestras positivas y ausencia de amplificación en el control negativo.

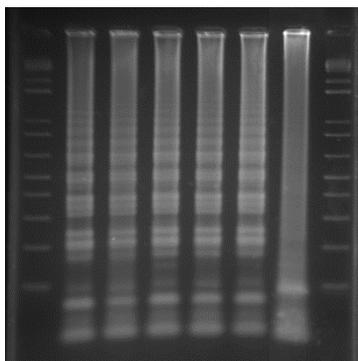


Figura 2- Amplificaciones por LAMP a partir de diferentes matrices. Carrillos 1, medio de cultivo; 2, mosto blanco; 3, mosto tinto; 4, vino blanco; 5, vino tinto; B, control negativo; M, marcador de peso molecular (1 Kb Plus, Invitrogen).

Límite de detección del método en muestras de vinos blanco y tinto. Tras confirmar la aplicabilidad del método de LAMP en muestras de vinificaciones se evaluó el límite de detección del mismo. Para ello se llevaron a cabo reacciones de LAMP añadiendo a la mezcla de reacción diferentes concentraciones (desde 1×10^2 hasta 1×10^8 células/mL) provenientes de vino blanco y vino tinto. Como ejemplo, en la figura 3 se pueden apreciar los resultados de LAMP obtenidos mediante la observación de turbidez y de la electroforesis a partir de muestras de vino blanco. En ambos casos se observaron reacciones positivas para todas las concentraciones evaluadas.

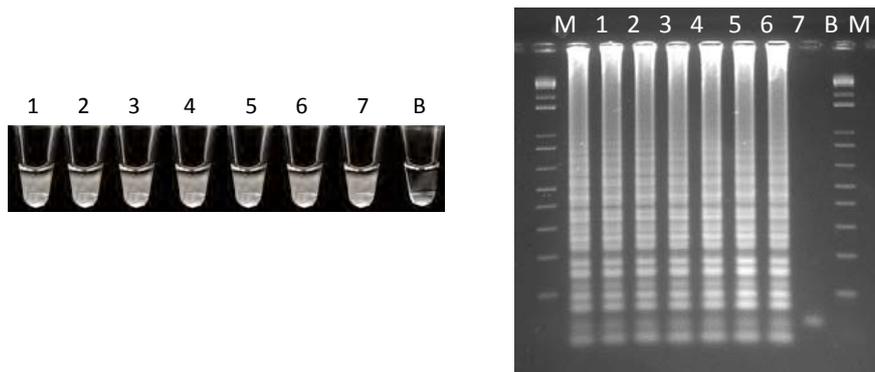


Figura 3- Evaluación del límite de detección del método de LAMP a partir de muestras de vino blanco con diferentes concentraciones de células. **1**, 1×10^8 células/mL; **2**, 1×10^7 células/mL; **3**, 1×10^6 células/mL; **4**, 1×10^5 células/mL; **5**, 1×10^4 células/mL; **6**, 1×10^3 células/mL; **7**, 1×10^2 células/mL, **B**, control negativo; **M**, marcador de peso molecular (1 Kb Plus, Invitrogen).

Estos resultados constataron un rango de detección desde 1×10^2 hasta 1×10^8 células/mL en muestras de vino blanco y tinto, equivalentes a 1 hasta 1×10^6 células por tubo de reacción.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos han demostrado que la técnica permite en 1 hora detectar e identificar células de *B. bruxellensis* en concentraciones desde 1 hasta 1×10^6 células/tubo, y que puede ser empleada directamente a partir de muestras de mostos y vinos, superando la presencia de los inhibidores característicos de estos sustratos como el etanol y los polifenoles.

5. Bibliografía

1. Connell L, Stender H and Edwards CG. 2002. Rapid detection and identification of *Brettanomyces* from winery air samples based on peptide nucleic acid analysis. *In: American Journal of Enology and Viticulture* 53, 322-324.
2. Chatonnet, P., Dubourdieu, D., y Boidron, J-N. 1995. The Influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. Yeasts and Lactic Acid Bacteria on the Ethylphenol Content of Red Wines. *In: American Journal of Enology and Viticulture*. 46, 463-468.
3. Chatonnet, P. y col. 1992. The origin of ethylphenols in wines. *In: Journal of the Science of Food and Agriculture*. 60, 165-178.
4. Notomi, T. y col. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *In: Nucleic Acids Research*. 28, ed 63.
5. Hayashi, N. y col. 2007 Detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts with a loop-mediated isothermal amplification method. *In: Food Microbiology*. 24, 778-785.
6. Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. *In: Kurtzman, C. P., J. W. (Eds.), The Yeasts, A Taxonomic Study*, fourth ed. Elsevier Science BV, Amsterdam, pp. 77-100.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto AGL2011-28412, FEDER y Ministerio de Economía y Competitividad.

M26 - EFECTO DEL ANHÍDRIDO SULFUROSO, LA LISOZIMA Y EL DESCENSO DEL pH SOBRE LA MICROBIOTA LÁCTICA AUTÓCTONA EN VINOS DE RIBERA DEL DUERO

Patricia Benítez, Lucía Polo, Eduardo Sánchez, Isabel Pardo, Sergi Ferrer

ENOLAB, ERI-ISIC BioTecMed / MCI IVISOCA. Universitat de València. c/ Dr. Moliner 50. 46100 Burjassot-València
Sergi.Ferrer@uv.es

RESUMEN:

La adición de la lisozima, el anhídrido sulfuroso y la bajada de pH combinados o individualmente pueden ser estrategias para limitar el desarrollo de microorganismos en vinos, ya que inhiben o controlan su crecimiento. Las bacterias lácticas están presentes a lo largo de toda vinificación y crianza, y las poblaciones más altas se detectan tras la fermentación alcohólica y durante la maloláctica. Las aminas biógenas pueden estar presentes de forma natural en el mosto, pero también pueden formarse por las bacterias lácticas como consecuencia de la descarboxilación de los aminoácidos presentes en el mosto o en el vino. Por ello es importante limitar el crecimiento de bacterias lácticas autóctonas posibles responsables de la producción de aminas biógenas.

Frecuentemente se encuentra que la generación de aminas biógenas es más importante en la fase de crianza en barrica, y que este incremento se puede limitar con el uso de bacterias seleccionadas y tratamientos que limiten el crecimiento y metabolismo bacteriano como la adición de anhídrido sulfuroso o lisozima, y la bajada del pH. El objetivo de nuestro trabajo ha sido ver la influencia de la adición de la lisozima, el anhídrido sulfuroso y el descenso de pH del vino sobre el control de la microbiota láctica y la formación de aminas biógenas en el periodo de crianza en barricas.

Palabras clave: SO₂, lisozima, pH, aminas biógenas, bacterias lácticas, estabilidad microbiológica del vino.

1. Introducción

El empleo de la lisozima es interesante para vinificaciones tradicionales y para maceración carbónica, especialmente en uvas de pH elevado donde el SO₂ no es muy efectivo. La lisozima se puede utilizar para retrasar la fermentación maloláctica (FML) durante un periodo de tiempo, y su efectividad depende del nivel de la población de bacterias lácticas (BL), el pH de los vinos, y el momento de la adición. La aplicación de la lisozima para limitar el desarrollo de las bacterias lácticas ha mostrado resultados variables [1, 2]. El SO₂ utilizado en vinificación actúa como antioxidante e inhibiendo el crecimiento de bacterias. Finalmente, el descenso del valor de pH tiene un efecto directo sobre las poblaciones de microorganismos de los vinos, pero también indirecto al influir en otros parámetros como el efecto del SO₂ o la lisozima. En el presente trabajo se ha estudiado la influencia de la adición de la lisozima, el anhídrido sulfuroso y el descenso de pH del vino sobre el control de la microbiota láctica y la formación de aminas biógenas en el periodo de crianza en barricas.

2. Material y métodos

2.1. Esquema de trabajo

Se estudió el efecto del recipiente (barrica nueva y barrica vieja), la inoculación con cepas de *O. oeni* (previamente seleccionadas de la bodega en la vendimia anterior), la bajada del pH, y la adición de sulfuroso y lisozima siguiendo el esquema de la Figura 1.

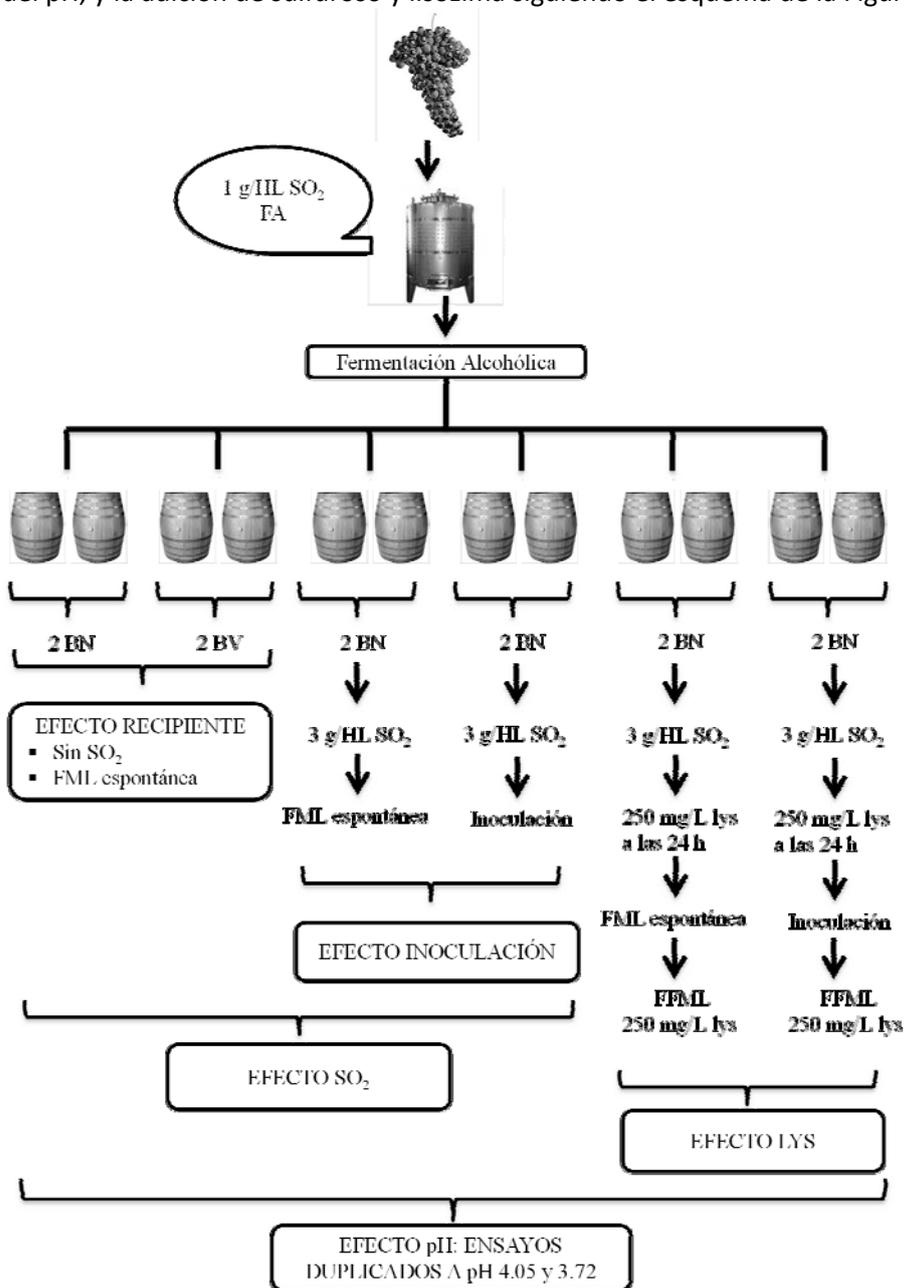


Figura 1. Esquema de trabajo utilizado en el presente ensayo. Momentos y concentraciones de las adiciones de sulfuroso y lisozima. Los ensayos se realizaron por duplicado a pH 4.05 y 3.72.

2.2. Muestreo y cuantificación de aminas biógenas

Las BL se sembraron en MRS para *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*, y MLO para *O. oeni*. A ambos medios se les adicionaron 0.075 g/L de natamicina para inhibir el crecimiento de levaduras. Las placas se incubaron a 28°C durante 7 días hasta observar la

aparición de colonias aisladas. Los tiempos de muestreo fueron: inicio, mitad y final de la FML. La cuantificación de aminas biógenas se llevó a cabo mediante HPLC [3].

3. Resultados

En todos los ensayos realizados se llevó a cabo la FML. La concentración de histamina en barrica nueva con fermentación espontánea, es un 27 % más baja que en la barrica vieja, sin embargo con la putrescina ocurre lo contrario, aumentando en barrica nueva un 9 % (tablas 1 y 2). Con la inoculación controlada en barrica nueva, se consiguió disminuir la putrescina en un 15 % y la histamina en un 42 % (Tabla 2). Los ensayos inoculados con cepas no productoras y con la adición de anhídrido sulfuroso fueron capaces de disminuir la concentración de putrescina en un 76 % y la histamina en un 85 % (Tabla 3). Se observó un menor contenido de histamina y putrescina en los ensayos en los cuales se habían adicionado sulfuroso, lisozima y se habían inoculado con bacterias lácticas seleccionadas de la vendimia anterior (Tablas 4 y 5). La aplicación de sulfuroso y lisozima consiguen disminuir la producción de putrescina entre un 47 y un 56 %, y si sumamos a éstos la inoculación con cepas no productoras de aminas, conseguimos bajar hasta un 62 % dicha síntesis (Tablas 4 y 5). Cuando se unió la adición de SO₂ y lisozima a la acidificación de los vinos (Tabla 6), se observó un neto efecto sinérgico, facilitando la bajada de pH enormemente la actuación de los agentes antimicrobianos. Este efecto de acidificación fue mayor para el SO₂ que para la lisozima. Las cantidades observadas de aminas biógenas en todos los casos anteriores se vieron correlacionadas con los niveles de BL viables que permanecían en los vinos tras los respectivos tratamientos (datos no mostrados).

Tiempo	Bvj + SO ₂		Bvj	
	Histamina	Putrescina	Histamina	Putrescina
FFML	2.4	2.5	0.9	1.8
FFML + SO ₂	2.4	2.5	-	-
15 días FFML	4.0	3.4	2.8	3.4
1 mes FFML	3.8	3.8	5.2	4.8

Tabla 1. Concentración en mg/L de histamina y putrescina en barrica vieja (Bvj) con y sin sulfuroso a distintos tiempos de muestreo.

Tiempo	Bnv		Bnv + Inoc.	
	Histamina	Putrescina	Histamina	Putrescina
FFML	1.1	2.0	ND	1.6
FFML + SO ₂	1.3	2.3	0.9	2.1
15 días FFML	2.3	3.0	1.4	3.1
1 mes FFML	3.8	5.3	2.2	4.5

Tabla 2. Concentración en mg/L de histamina y putrescina en barrica nueva (Bnv) inoculada y sin inocular a distintos tiempos de muestreo.

Tiempo	Bnv + SO ₂		Bnv + SO ₂ + Inoc.	
	Histamina	Putrescina	Histamina	Putrescina
FFML	0.8	2.2	ND	1.5
15 días FFML	3.6	4.9	ND	1.9
1 mes FFML	5.4	9.6	0.7	2.4
1 1/2 mes FFML	7.8	14.0	1.1	3.3

Tabla 3. Concentración en mg/L de histamina y putrescina en barrica nueva (Bnv) con 3 g/hL de sulfuroso, inoculada y sin inocular a distintos tiempos de muestreo.

Tiempo	Histamina	Putrescina	Histamina	Putrescina
½ FML	3.4	2.0	2.8	2.0
FFML	5.9	2.2	7.4	2.1
15 días FFML	7.4	2.5	7.5	2.2
1 mes FFML	6.6	2.8	6.7	2.3

Tabla 4. Concentración en mg/L de histamina y putrescina en dos barricas nuevas (Bnv) con adición de 3 g/hL de sulfuroso y 250 mg/L de lisozima a distintos tiempos de muestreo.

Tiempo	Bnv + SO ₂ + Lys + Inoc. 1		Bnv + SO ₂ + Lys + Inoc. 2	
	Histamina	Putrescina	Histamina	Putrescina
½ FML	1.0	1.7	ND	1.5
FFML	6.5	1.8	0.7	1.6
15 días FFML	7.4	1.7	1.9	1.8
1 mes FFML	7.9	2.0	5.4	2.0

Tabla 5. Concentración en mg/L de histamina y putrescina en dos barricas nuevas (Bnv) e inoculadas, con adición de 3 g/hL de sulfuroso y 250 mg/L de lisozima a distintos tiempos de muestreo.

	pH 4.0	pH 3.7 + SO ₂	pH 3.7 + Lys	pH 3.7 + SO ₂ + Lys
Histamina	12.0	3.2	6.4	1.5
Putrescina	12.5	5.5	7.1	4.5

Tabla 6. Efecto de la acidificación y adición de SO₂ y lisozima en la síntesis de aminas biógenas. Datos de vinos finales tras crianza.

4. Conclusiones

La FML se realizó en todos los casos tanto barricas inoculadas como no inoculadas.

La condición de barrica nueva o vieja afecta en la concentración de aminas.

La acidificación, y adición de SO₂ y lisozima disminuyen la población de bacterias lácticas de forma sensible.

Las concentraciones de aminas biógenas son más bajas en los ensayos con acidificación, adición de lisozima, sulfuroso e inoculación.

5. Bibliografía

1. Gerbaux V., et al. 1997. Use of lysozyme to inhibit malolactic fermentation and to stabilize wine after malolactic fermentation. *In: Am. J. Enol. Vitic.* 48:49-54.
2. Siegel, A. 2005. Empleo de lisozima para postergar la fermentación maloláctica en vino Carménère. *In: Proyecto título Ingeniero Agrónomo, Pontificia Universidad Católica de Chile.*
3. Landete, J.M.; Ferrer, S.; Pardo, I. 2005 Which lactic acid bacteria are responsible of histamine production in wine? *In: Journal of Applied Microbiology.* 99, 580-586.

6. Agradecimientos

Trabajo financiado parcialmente por IDI-20130300 – CDTI.

M27 - SELECCIÓN DE CEPAS DE *Lactobacillus* PARA LA INDUCCIÓN DE ACIDIFICACIÓN BIOLÓGICA EN VINOS DE PH ELEVADO

Olga Lucio¹, Isabel Pardo, José María Heras², Sibylle Krieger², Sergi Ferrer

¹ENOLAB-ERI-ISIC BioTecMed/MCI IViSoCa, Universidad de Valencia, Dr. Moliner, 50, 46100, Burjassot, Valencia.

²Lallemand Bio, C/ Zurbano, 71, 28010, Madrid

sergi.ferrer@uv.es

RESUMEN:

Se ha llevado a cabo un programa de selección de cepas de *Lactobacillus* para su aplicación en un proceso de acidificación biológica en vinos de pH elevado. Para ello, se ha realizado una selección de cepas de diferentes especies utilizando diferentes criterios como la capacidad de crecer en mosto, de producir elevadas cantidades de ácido láctico, de hacer descender el pH del mosto y de realizar la fermentación maloláctica. Además se ha considerado la capacidad de resistir a los efectos de la lisozima y del anhídrido sulfuroso. En base a estos criterios se seleccionaron dos cepas de la especie *Lactobacillus plantarum* como las más adecuadas para ser utilizadas como cultivos iniciadores para aumentar la acidez de los vinos.

Palabras clave: *Lactobacillus*, vino, mosto, pH elevado, ácido láctico

1. Introducción

En la actualidad se están observando las consecuencias del cambio climático en la vitivinicultura. Una de ellas es el descenso en la acidez de los mostos, sobre todo en aquellas regiones de clima cálido. Las altas temperaturas observadas durante la época de maduración causan un desequilibrio entre la madurez fenólica e industrial de las uvas, generando cosechas con bajos valores de acidez total, baja concentración de ácido málico y alto contenido en azúcar. Los mostos con baja acidez y elevado pH, característicos de este tipo de uvas, presentan alteraciones organolépticas además de resultar altamente susceptibles a alteraciones microbianas.

Para paliar este problema la técnica más comúnmente utilizada por los enólogos es la acidificación química que consiste en la adición al mosto o al vino de ácidos orgánicos autorizados como el ácido málico, el tartárico o el láctico [1]. Otra posibilidad es la acidificación física que emplea métodos tales como el intercambio catiónico [2] o la electrodiálisis [3]. Estas estrategias presentan la desventaja de que están sujetas a una estricta legislación. Como alternativa a los métodos físico-químicos está la acidificación biológica, que presenta como ventajas respecto a las anteriores el que no está sometida a regulación y que además resulta aplicable a la elaboración de vinos ecológicos, ya que no se basa en la utilización de compuestos químicos [4].

La selección de bacterias lácticas se enfoca principalmente hacia su uso para llevar a cabo la FML. La selección de estas cepas bacterianas para su inoculación en vino esta esencialmente basada en criterios como la supervivencia de las cepas en vino y el consumo del ácido málico por las mismas. Sin embargo, para inducir acidificación biológica en vinos se

tienen que tener en cuenta otras propiedades, tales como la síntesis de ácido láctico a partir de los azúcares del mosto y la capacidad para hacer descender el pH del vino, además de la elevada resistencia a la lisozima y al anhídrido sulfuroso, criterios estos últimos también aplicados a las bacterias malolácticas.

Las bacterias del género *Lactobacillus* se aíslan en diferentes etapas de la vinificación. Estas bacterias sintetizan ácido láctico a partir de los azúcares del mosto mediante la fermentación láctica, provocando un descenso del pH del vino [5]. Una ventaja que presentan las cepas del género *Lactobacillus* es que pueden llevar a cabo la FML con mayor efectividad que *Oenococcus oeni* en vinos de pH elevado [6]. De este modo, el aumento de pH generado como consecuencia de la FML puede ser rápidamente compensado por la producción de ácido láctico mediante fermentación láctica. Aunque la FML supone una pérdida de acidez y un pequeño aumento del pH, la mejora del gusto del vino que supone la transformación del ácido málico en láctico aconseja que ésta se lleve a cabo.

El objetivo de este trabajo ha sido la selección de cepas del género *Lactobacillus* para llevar a cabo la acidificación biológica en vinos de pH elevado. Para ello se han utilizado criterios de selección de primer y segundo orden.

2. Material y métodos

2.1. Cepas utilizadas y medio de cultivo

Se han utilizado 31 cepas del género *Lactobacillus* de la colección Enolab (Universitat de València). Estas cepas habían sido aisladas previamente de vinificaciones espontáneas y fueron identificadas como pertenecientes a las especies *L. mali*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. pantheris*, *L. satsumensis* y *L. vini* (Tabla 1).

Los ensayos de acidificación se llevaron a cabo en medio MC. Este se preparó diluyendo mosto concentrado de la variedad Airén con agua destilada en proporción 1:4 (v/v), y se suplementó con 0.3 g/L de Nutrient VitEnd® (Lallemand). La composición del medio MC fue: 106 g/L de glucosa, 106 g/L de fructosa, 2.86 g/L de ácido málico, 0.4 g/L de ácido cítrico y 1.65 g/L de ácido tartárico. Finalmente, se ajustó el pH a 3.5 y se esterilizó a 115°C durante 30 minutos.

Tabla 1. Cepas de *Lactobacillus* sometidas al programa de selección

ESPECIE	CEPAS
<i>L. mali</i>	E4634, E4636, E4637, E4673
<i>L. pantheris</i>	E4635, E4638
<i>L. paracasei</i>	E4539, E4540, E4541, E4542
<i>L. plantarum</i>	E4538, E4606, E4607, E4608, E4609, E4610, E4611, E4612, E4613, E4614, E4615, E4616, E4617, E4618, E4619, E4620, E4639, E4672, E4674
<i>L. satsumensis</i>	E4555
<i>L. vini</i>	E4323

2.2. Procedimiento utilizado para la selección de cepas

2.1.1. *Determinación del crecimiento de las bacterias en medio MC*

Para llevar a cabo la selección se realizaron cultivos de las cepas en microplacas de 96 pocillos (Falcon™ Microplates, BD). Las cepas se inocularon al 1% en 200 µL de medio MC distribuidos en los pocillos. El medio no inoculado se estableció como control. Las microplacas se incubaron a 28°C durante 7 días y los ensayos se llevaron a cabo por triplicado. El crecimiento de las cepas en medio MC se determinó mediante la medida de la D.O a 600 nm a

lo largo del tiempo. Las lecturas se realizaron en un equipo FLUOstar Optima Microplate Reader (BGM LABTECH, GmbH). A partir de los datos obtenidos se realizaron las curvas de crecimiento de las cepas y se calculó el parámetro ABC de las mismas mediante el método de los trapecios [7].

2.1.2. *Determinación de la actividad maloláctica y de la síntesis de ácido láctico de las cepas*

Para determinar las concentraciones de ácido málico y ácido láctico en los cultivos a las 48 horas, éstos fueron analizados por HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), siguiendo la metodología descrita por Lucio et al., 2014 [7].

2.1.3. *Determinación de la acidificación del medio*

Para evaluar la acidificación del medio se cuantificó la diferencia entre el pH del medio control y el de los diferentes cultivos al final del ensayo. El pH se midió con un electrodo SLIMTRODE (Hamilton) acoplado a un pHmetro pH330i (WTW).

2.1.4. *Determinación de la resistencia a la lisozima y al anhídrido sulfuroso*

Se realizaron ensayos equivalentes al descrito en el Apartado 2.1.1, utilizando el medio MC suplementado con 0.2 mg/mL de lisozima (Roche) o con 0.5 mg/mL de anhídrido sulfuroso (Agrovin).

2.1.5. *Selección de cepas*

La selección de cepas se basó en criterios de primer orden y de segundo orden, a los cuales se les adjudicó una puntuación numérica. Se consideraron criterios de primer orden el que las cepas exhibiesen un buen crecimiento en medio MC, el que realizaran la FML durante el periodo de crecimiento (48 primeras horas), el que disminuyeran el pH en el medio MC y el que dieran lugar a elevada producción ácido láctico por fermentación láctica. Así, se otorgó 10 puntos por prueba a todas aquellas cepas que presentaron un valor del parámetro Área Bajo la Curva (ABC) superior a 70 U.A. (unidades arbitrarias), a las que generaron un descenso de pH en el medio MC mayor a 0.35 unidades, a las que completaron la FML durante su periodo de crecimiento, y a las que sintetizaron una cantidad superior a 12 g/L de ácido láctico a partir de los azúcares. Como criterios de segundo orden se consideraron la resistencia a la lisozima y al anhídrido sulfuroso. Sólo aquellas cepas que mostraron los mejores resultados para los criterios de primer orden fueron evaluadas en base a los criterios de segundo orden. Las cepas que mostraron un mayor valor de ABC en presencia de estos inhibidores fueron puntuadas con 5 puntos. La selección final se realizó tras el sumatorio de puntos obtenido para cada cepa.

3. Resultados

Los resultados obtenidos al evaluar el crecimiento en medio MC revelaron que 10 de las 31 cepas de *Lactobacillus* sometidas al programa de selección presentaron valores de ABC superiores a 70 U.A., siendo éstas E4607, E4608, E4609, E4610, E4613, E4614, E4619, E4620, E4639, E4672, todas ellas pertenecientes a la especie *L. plantarum*. Estas cepas se puntuaron con 10 puntos en la selección final.

La mayoría de cepas analizadas realizaron la FML durante la fase de crecimiento, con la excepción de las cepas E4323, E4539, E4541, E4636, E4637 y E4638. Todas las que la llevaron a cabo pertenecían a las especies *L. plantarum* y *L. satsumensis* y fueron puntuadas con 10 puntos en la selección final. Las cepas que fueron incapaces de realizarla pertenecían a las especies *L. paracasei*, *L. mali* y *L. pantheris*.

Las cepas E4607, E4608, E4610, E4613, E4615, E4618 y E4619, todas pertenecientes a la especie *L. plantarum*, produjeron cantidades superiores a 12 g/L de ácido láctico. Estas cepas se puntuaron con 10 puntos en la selección final.

Solo 6 cepas de las analizadas fueron capaces de disminuir el pH en 0.35 unidades o más, siendo estas E4606, E4607, E4608, E4609, E4617 y E4618, todas pertenecientes a la especie *L. plantarum*. Estas cepas se puntuaron con 10 puntos en la selección final.

En la mayoría de los casos no se observó correlación entre la mayor síntesis de ácido láctico y la mayor disminución del pH del medio. Esto pudo ser debido a la degradación de otros ácidos existentes en el medio como el málico y el cítrico, que contribuyeron a aumentar el pH del mismo.

Tras analizar la resistencia a la lisozima y al anhídrido sulfuroso de las cepas se observó que las que presentaban mayor resistencia a la primera fueron E4608, E4609, E4610, E4611 Y E4613 y las que presentaban mayor resistencia al SO₂ fueron E4607, E4609, E4610, E4617 y E4618, perteneciendo todas ellas a la especie *L. plantarum*. Estas cepas se puntuaron con 5 puntos en la selección final.

Las cepas con mayor puntuación fueron E4607 y E4608, ambas con 45 puntos y ambas pertenecientes a la especie *L. plantarum*.

4. Conclusiones

Se han seleccionado las cepas E4607 y E4608 de *L. plantarum* como las más adecuadas para llevar a cabo la acidificación biológica en vinos de pH elevado. Ambas cepas son capaces de crecer de manera rápida en mosto, de hacer descender el pH mediante la producción de ácido láctico por fermentación láctica y de realizar la FML durante el periodo de crecimiento. Además, resultaron más resistentes que otras cepas sometidas al programa de selección a inhibidores de bacterias lácticas utilizados en vinificación como la lisozima y el anhídrido sulfuroso.

5. Bibliografía

1. Carvalho, E., Costa, S., Franco, C., Curvelo-Garcia, A. 2001. Acidification of musts and wines. Application of L-tartaric, L-lactic and DL-malic acids. *In: Bulletin de la O.I.V.* 74 (849-850), 743-751.
2. Minguez, S. 2003. Las resinas de intercambio de uso en enología. *In: ACE: Revista de Enología.* 32.
3. Ochoa, J.R., Valle, B., Hilera, R., Belaustegui, Y. Elejalde, E. 1999. La estabilización del vino tinto mediante la técnica de electrodiálisis. *In: Alimentación, Equipos y Tecnología.* 65-69.
4. Val, P., Ferrer, S. Pardo, I. 2002. Acidificación biológica de vinos con bajo contenido en ácidos. *In: Enólogos.* 20, 35-42.
5. Pardo, I. 2003. Metabolismo de sustratos del mosto y vino por bacterias lácticas y sus implicaciones en la calidad del vino. *In: ACE: Revista de Enología.* 36.
6. Pahl, C. 1989. La décarboxylation de l'acide L-malique dans le moût par l'ensemencement de lactobacilles homofermentatives. *In: Revue des Oenologue.* 54, 13-17.
7. Lucio, O. 2014. Acidificación biológica de vinos de pH elevado mediante la utilización de bacterias lácticas. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CENIT-DEMETER CEN20081002 y Lallemand Inc.

M28 - DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN RÁPIDAS DE *Brettanomyces bruxellensis* EN VINOS MEDIANTE qPCR y FISH-CF

Olga Lucio, Verónica Soares-Santos, Isabel Pardo, Sergi Ferrer

¹ENOLAB-ERI-ISIC BioTecMed/MCI IViSoCa, Universidad de Valencia, Dr. Moliner, 50, 46100, Burjassot, Valencia.

sergi.ferrer@uv.es

RESUMEN:

Brettanomyces bruxellensis es la principal levadura alterante del vino y otras bebidas alcohólicas. Por ello, es importante detectar a tiempo su presencia y concentración en los procesos de elaboración, para evitar la formación de fenoles volátiles que proporcionan olores desagradables y merman la calidad del vino. Los métodos tradicionales para la detección de esta levadura se basan en técnicas de cultivo en placa, las cuales son tediosas y conducen a resultados inconsistentes, ya que dependen de la condición fisiológica de los microorganismos. En este trabajo hemos optimizado el uso de técnicas rápidas para la detección y cuantificación de esta levadura en vino, con el fin de poder realizar un control rápido y eficiente de posibles alteraciones.

Palabras clave: *Brettanomyces bruxellensis*, qPCR, FISH, citometría de flujo, vino.

1. Introducción

Brettanomyces bruxellensis es una levadura alterante aislada de vino y otras bebidas alcohólicas [1]. Se puede encontrar en bajas concentraciones en las uvas, en el equipamiento de bodega o en las barricas [2], pero puede aumentar su población durante la crianza del vino [3]. El desarrollo de la población de esta levadura resulta peligroso, ya que es la principal responsable de la formación de fenoles volátiles como el 4-etilfenol y el 4-etilguayacol que proporcionan a los vinos un desagradable olor a cuadra.

Los métodos tradicionales para la detección de *B. bruxellensis* en vinos se basan en el cultivo en placa, utilizando un medio selectivo que contiene cicloheximida e incubando durante 1 o 2 semanas [4]. Estas técnicas son tediosas y conducen a resultados inconsistentes, ya que dependen de la condición fisiológica de los microorganismos. Además, la capacidad de esta levadura de entrar en estado viable no cultivable puede generar una infracuantificación de la población de este microorganismo en el vino [5].

La detección y cuantificación rápida de esta levadura en los vinos resulta importante para los enólogos, ya que permite la aplicación inmediata de medidas correctivas y evita la alteración y la pérdida de calidad de los vinos. Por ello, en este trabajo se han desarrollado métodos moleculares que no precisan del cultivo en placa y que permiten detectar, identificar y cuantificar *B. bruxellensis* directamente en vino.

2. Material y métodos

2.1. Microorganismos e inóculo.

Se utilizó la cepa DMSZ 70726 de *B. bruxellensis*. Para la obtención de inóculo se llevó a cabo un cultivo de la levadura en medio GPYA (40 g/L de glucosa (Panreac), 5 g/L de peptona micológica (Pronadisa), 5 g/L de extracto de levadura (Scharlab)).

2.2. Cultivos de *B. bruxellensis* en vino blanco

A partir del precultivo de la cepa DSMZ 70726, la levadura se inoculó al 1 % en 200 mL de vino blanco previamente filtrado. Los cultivos se incubaron en agitación a 28°C durante 11 días. La concentración de levaduras fue monitorizada a lo largo del tiempo mediante recuento de totales al microscopio, recuento en placa, qPCR y FISH-FC (*Fluorescence in situ hybridization* acoplada a citometría de flujo). Para ello se extrajeron muestras del cultivo a lo largo del tiempo, por triplicado, y se analizaron mediante las distintas técnicas.

2.3. FISH-FC

Se llevó a cabo una hibridación en líquido de las muestras de vino con la sonda específica 26S-D.bruX.5.1 [6] marcada con el fluoróforo 6-Fam. Para ello se siguió el protocolo descrito por Xufre, 2006 [7]. Las muestras hibridadas se analizaron en un citómetro de flujo BD FACSVersé™, equipado con láser de 488 nm y detectores de *side scatter* (SSC) y *forward scatter* (FSC).

2.4. qPCR

Previamente a las amplificaciones se llevaron a cabo extracciones de DNA a partir de las muestras de vino usando el kit UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (MOBIO). Para llevar a cabo la qPCR se utilizaron los cebadores DBRUXF y DBRUXR [8], siguiendo las mismas condiciones de amplificación descritas por estos autores. Para la amplificación se usó un termociclador C100™ Thermal Cycler, CFX96™ RealTime System (BioRad) y los valores de *cycle threshold* (Ct) se calcularon mediante el *software* BioRadCFX Manager versión 2.1 (BioRad).

2.5. Recuento en placa

Para realizar el recuento de levaduras viables en placa, las diluciones adecuadas de las muestras de vino se sembraron en césped en placas de GPYA. Las placas se incubaron a 28°C durante 7 días para llevar a cabo el recuento de colonias aisladas.

2.6. Recuento al microscopio

Se realizó un recuento al microscopio en Cámara de Thoma de las muestras de vino para cuantificar la concentración de levaduras totales en las mismas.

2.7. Construcción de rectas patrón

Para la construcción de rectas patrón se añadieron al vino blanco concentraciones celulares conocidas de la levadura (desde 10^2 hasta 10^7 células/mL). Estas suspensiones celulares se analizaron por triplicado mediante qPCR y FISH. Con el fin de comprobar la validez y linealidad del método de cuantificación, con los datos obtenidos se realizaron análisis de regresión entre las concentraciones celulares determinadas por recuento al microscopio y por qPCR y FISH-FC, respectivamente.

3. Resultados

3.1. Comprobación de la validez de cuantificación de *B. bruxellensis* en vino blanco de los métodos qPCR y FISH-FC

Tras la construcción de la recta patrón para la cuantificación por qPCR se observó que los de Ct para las diferentes concentraciones de células oscilaban entre 15 y 30, obteniéndose una linealidad adecuada ($R^2=0.99$) en la cuantificación de concentraciones celulares entre 1×10^2 y 1×10^8 células/mL (Figura 1A). En la recta patrón construida para citometría de flujo se observó una linealidad adecuada ($R^2 = 0.96$) en la cuantificación de concentraciones entre $1 \times$

10^5 y 1×10^8 células/mL (Figura 1B). Sin embargo, el límite de detección de esta levadura en vino blanco mediante citometría se estableció en 1×10^2 células/mL.

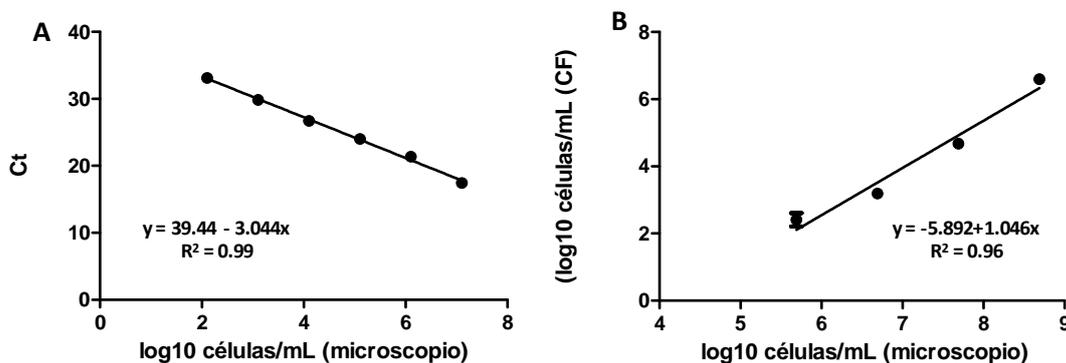


Figura 2. Rectas patrón obtenidas por análisis de regresión para determinar la validez de la cuantificación de *B. bruxellensis* en vino mediante (A) qPCR y (B) FISH-FC.

3.2. Efectividad de la monitorización del crecimiento de *B. bruxellensis* en vino mediante técnicas rápidas: qPCR y FISH-FC

La monitorización del crecimiento de *B. bruxellensis* en vino mediante el recuento de la población de la levadura a lo largo del tiempo resultó muy similar por todos los métodos. Estos resultados mostraron que la utilización de métodos rápidos como la qPCR y la FISH-FC resultó tan fiable como la utilización de métodos tradicionales.

Además, estas técnicas presentan numerosas ventajas con respecto a las tradicionales. Mediante el recuento al microscopio no es posible la identificación de la levadura, por tanto no es posible el recuento de *B. bruxellensis* en vinos que contienen otras especies. En cambio, tanto la qPCR como la FISH-FC resultan altamente específicas, ya que sólo se genera amplificación o hibridación con la especie diana, y por ello permiten la cuantificación exclusiva de ésta. Otra ventaja añadida es el límite de detección, ya que para la observación al microscopio no es posible observar con facilidad concentraciones inferiores a 1×10^6 células/mL. En cambio, tanto mediante qPCR como mediante FISH-FC es posible detectar 1×10^2 células/mL de esta levadura y cuantificar desde concentraciones de 1×10^2 hasta 1×10^8 células/mL. Dado el volumen de muestra real empleado (en ocasiones $10 \mu\text{L}$ por reacción), al usar estas técnicas se llega pues a detectar realmente una sola célula.

En comparación con la cuantificación en placa, se obtuvieron valores más elevados mediante qPCR y FISH-FC. Esto pudo ser debido a que el crecimiento en placa de las levaduras depende del estado fisiológico de las mismas, infraestimándose con esta técnica la concentración de las presentes en el vino. Además, este resultado aunque puede ser específico añadiendo cicloheximida al medio de cultivo, tarda en revelarse al menos una semana mientras que mediante qPCR y FISH-FC podemos obtener el resultado en el mismo día. Por otro lado esta cicloheximida puede también inhibir parcialmente el crecimiento *Brettanomyces*.

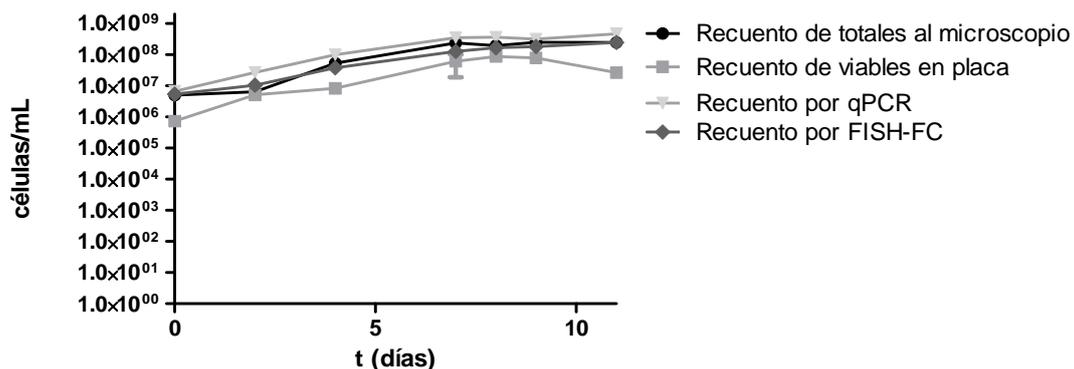


Figura 3. Monitorización de la cinética de crecimiento de *B. bruxellensis* en vino blanco mediante recuento al microscopio, recuento en placa, qPCR y FISH-FC.

4. Conclusiones

Se han optimizado sistemas rápidos de cuantificación de la levadura alterante de vino *B. bruxellensis* (qPCR y FISH-FC) con importantes ventajas sobre los métodos tradicionales. Estos métodos aumentan la rapidez, estandarización, automatización y precisión de la detección, identificación y cuantificación de *B. bruxellensis* en vino, siendo las estimaciones perfectamente comparables con los métodos tradicionales.

5. Bibliografía

1. Deak, T., Beuchat, L. 1996. *In: Handbook of food spoilage yeasts.* CRC Press, New York.
2. Renouf, V., Lonvaud-Funel, A. 2006. Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage yeast, on the surface of grape berries. *In: Microbiology Research.* 162, 154-167.
3. Gerbaux, V., Jeudy, S., Monamy, C. 2000. Study of phenol volatiles in Pinot noir wines in Burgundy. *In: Bulletin de l'OIV.* 73.
4. Boekhout, T., Robert, V. 2003. *In: Yeasts in food: beneficial and detrimental aspects,* New York.
5. Divol, B., Lonvaud-Funel, A. 2005. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *In: Journal of Applied Microbiology.* 99, 85-93.
6. Röder, C., König, H., Fröhlich, J. 2007. Species-specific identification of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts by fluorescently labeled DNA probes targeting the 26S rRNA. *In: FEMS Yeast Research.* 7, 1013-1026.
7. Xufre, A., Albergaria, H., Inácio, J., Spencer-Martins, I., Gírio, F. 2006. Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *In: International Journal of Food Microbiology.* 108, 376-384.
8. Phister, T. G., Mills, D. A. (2003) Real-Time PCR assay for detection and enumeration of *Dekkera bruxellensis* in wine. *In: Applied Environmental Microbiology.* 69, 7430-7434.

6. Agradecimientos

Trabajo financiado por el proyecto AGL2011-28412. Los análisis de citometría de flujo han sido realizados en la sección de Citometría de Flujo del SCSIE (Universitat de València).

M29 - SELECCIÓN DE CEPAS DE *Oenococcus oeni* PARA SU USO COMO CULTIVO INICIADOR MIXTO BIODINÁMICO

Lucía Polo, Patricia Benítez, Carmen Berbegal, Laura Curiel, Isabel Pardo, Sergi Ferrer

ENOLAB, ERI-ISIC BioTecMed / MCI IVISOCA. Universitat de València. c/ Dr. Moliner 50. 46100

Burjassot-València

Sergi.Ferrer@uv.es

RESUMEN:

La realización de la Fermentación Maloláctica (FML) es importante para la calidad del vino, especialmente en vinos tintos. Existen varias estrategias para controlar la fermentación de forma adecuada. Una de ellas consiste en la inducción de ésta con la inoculación de bacterias lácticas seleccionadas, principalmente con cepas de *Oenococcus oeni*. En este trabajo se ha abordado el aislamiento, identificación, tipificación, caracterización y selección de bacterias lácticas provenientes de viñedos y bodega biodinámicas, con la finalidad de disponer de un cultivo propio, formado por distintas cepas de *O. oeni*, las cuales han constituido el cultivo iniciador mixto empleado con éxito en la pasada vendimia.

Palabras clave: Fermentación Maloláctica. *Oenococcus oeni*. Selección. Cultivo iniciador mixto biodinámico.

1. Introducción

La agricultura biodinámica (*bios*, vida y *dynamis*, fuerza) utiliza de forma responsable los recursos naturales, sin emplear sustancias químicas como fertilizantes, pesticidas o transgénicos. Estos procesos tienen su continuidad también en bodega, donde la elaboración del vino se lleva a cabo con procesos naturales. Una transformación de gran relevancia es la fermentación maloláctica (FML), ya que es esencial para la calidad del vino, fundamentalmente en el vino tinto. En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio de la biodiversidad y caracterización tecnológica de la microbiota láctica autóctona presente durante la FML de vinos tintos de la D.O. Ribera del Duero, con el fin de seleccionar cepas autóctonas para producir un cultivo mixto de bacterias lácticas autóctonas biodinámicas capaces de realizar la FML, que presenten las mejores propiedades tecnológicas manteniendo la diversidad y tipicidad del vino.

2. Material y métodos

2.1. Aislamiento

Durante las vendimias 2012 y 2013, se recogieron 2200 aislados de bacterias lácticas pertenecientes a muestras de vino de cuatro depósitos de acero inoxidable y 2 tinos de madera. Las muestras fueron tomadas al inicio de la fermentación maloláctica (FML), a mitad y final de la misma, y durante la crianza a un mes, dos y tres meses.

2.2. Tipificación mediante RAPD y VNTR

La tipificación se llevó a cabo mediante RAPD-M13 y VNTR. Los geles se analizaron con el programa BioNumerics 6.6 (Applied Maths). El análisis de similitud de los perfiles de Rapd's

y VNTR se llevó a cabo utilizando el coeficiente de Pearson y el método de agrupamiento UPGMA.

2.3. Selección

La selección de cepas en base a los criterios de evaluación del crecimiento, capacidad maloláctica, resistencia al anhídrido sulfuroso y crecimiento a pHs distintos se realizó en vino tinto de la variedad Tempranillo. Las características físico-químicas del mismo fueron: ácido málico 2.05 g/L, ácido láctico 0.18 g/L, sin azúcares residuales, 15° (v/v) y pH de 3.7. Las cepas previamente crecidas en OPM (medio de pre-adaptación al vino [1]), se inocularon a una concentración de 2×10^6 UFC/mL en vino. La **capacidad** de las cepas para **crecer** en vino se determinó mediante el recuento de bacterias viables en placa durante 15 días. Para determinar la **capacidad maloláctica** de los cultivos se llevó a cabo inoculando las cepas de manera individual, y los tubos se incubaron durante 21 días a 28 °C, cuantificando las concentraciones finales de ácido láctico y málico mediante HPLC. Para el estudio de **crecimiento a diferentes pHs**, las cepas se inocularon en el vino a pH 3.5 y a 4 y se incubaron a 28 °C durante 15 días. Se evaluó el crecimiento durante 15 días. Para la determinación del crecimiento **con anhídrido sulfuroso**, las cepas previamente crecidas en medio OPM suplementado con las dos concentraciones de anhídrido sulfuroso total (25 mg/L y 50 mg/L), se inocularon a una concentración final de 2×10^6 UFC/mL en vino y se incubaron a 28 °C durante 15 días. Se evaluó el crecimiento mediante recuentos de bacterias viables en placa cada tres días.

Las **aminas producidas** se cuantificaron mediante la técnica de HPLC. Las cepas se crecieron previamente en medio MDBmod [2] y se inocularon en tampón acetato 50 mM pH 4.8 con los precursores de las aminas (histidina precursor de la histamina, arginina y ornitina precursores de la putrescina), se incubaron a 28 °C durante 3 días. La cuantificación de aminas biógenas se llevó a cabo mediante HPLC [2].

3.4. Producción, escalado e inoculación en bodega

Las cepas se sembraron en OPM para su siembra directa en bodega como cultivo iniciador mixto (Figura 1). Las cepas de *O. oeni* se crecieron en 50 mL de medio OPM y tras cuatro días de incubación se reinocularon al 10% en un volumen de 500 mL y posteriormente en 10 L de OPM.

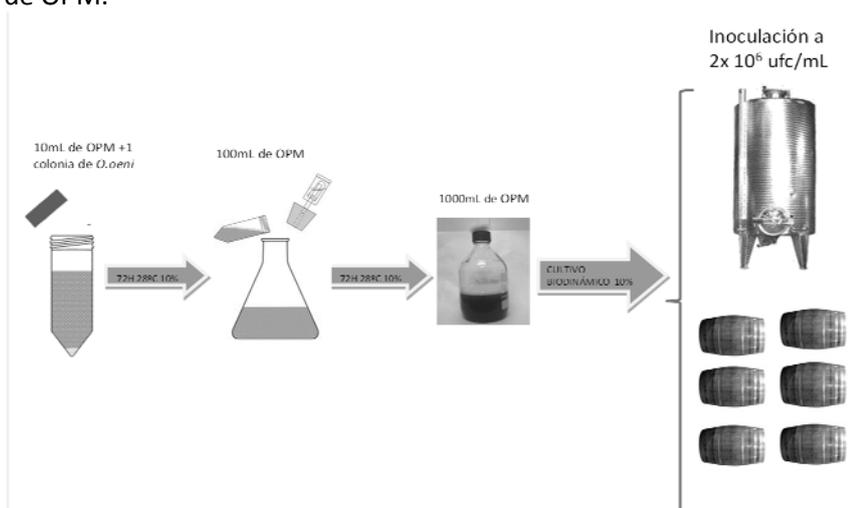


Figura 1. Escalado de la producción de biomasa de las cepas de *O. oeni* por separado para posterior inoculación en bodega

Una vez obtenida la biomasa que componía el cultivo mixto biodinámico, se inoculó a una concentración final de 2×10^6 ufc/mL en un depósito de acero inoxidable de 4000 L y 6 barricas de roble de 225 L para llevar a cabo la FML (Figura 1). Se muestrearon a tiempo cero, mitad y final de la FML para comprobar la implantación de las mismas. Se dejaron un par de barricas y un depósito de acero sin inocular como controles. El seguimiento de los parámetros físico-químicos para establecer la mitad y el final de la fermentación se llevaron a cabo mediante FTIR y determinación enzimática del ácido málico.

3. Resultados

El siguiente paso tras los aislamientos de las cepas identificadas como *O. oeni* fue la tipificación mediante la técnica de RAPD y VNTR. El dendrograma obtenido se obtuvo mediante un análisis conjunto de ambas técnicas. Los perfiles se distribuyeron en 65 grupos distintos correspondientes a 65 cepas distintas. Tras el proceso de selección, basándose como criterio no ser productoras de aminas biógenas, se eligieron 8 cepas para continuar con los siguientes análisis del proceso de selección, y cuyos resultados se muestran a continuación.

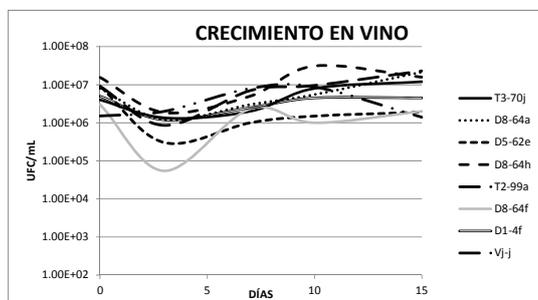


Figura 2. Crecimiento de las cepas de *O. oeni* en vino Tempranillo

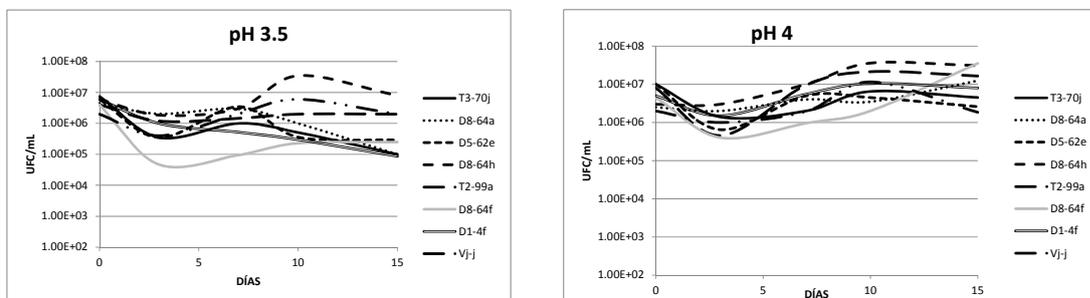


Figura 3. Crecimiento de las cepas de *O. oeni* en vino Tempranillo a pHs de 3.5 y 4.0

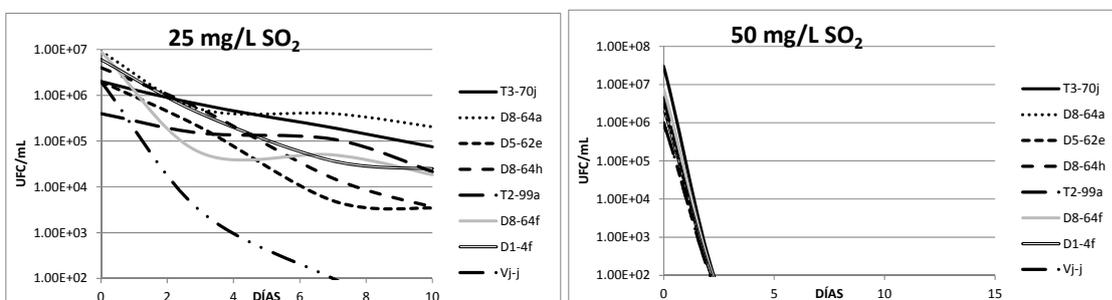


Figura 4. Crecimiento de las cepas de *O. oeni* en vino Tempranillo a pHs de 3.5 y 4.0

A partir de estas cepas, se elaboró el cultivo mixto biodinámico, tal como se describe en Material y métodos, y se inoculó en un depósito de acero inoxidable de 4000 L y 6 barricas de roble de 225 L para llevar a cabo la FML, manteniendo otros depósitos y barricas sin inocular como controles. Todos los depósitos y barricas, tanto inoculados como no inoculados, acabaron completamente la FML. Los cultivos iniciadores se implantaron en porcentajes altos tanto en depósito como en barricas. Se ha demostrado una notable diferencia en los contenidos finales de aminas biógenas en los de depósitos y barricas inoculados frente a los no inoculados:

		3 MESES CRIANZA	
		HISTAMINA	PUTRESCINA
BARRICA	FML ESPONTÁNEA	11,6	16,4
	FML CULTIVO INICIADOR	2,6	4,5
DEPÓSITO	FML ESPONTÁNEA	11,9	12,1
	FML CULTIVO INICIADOR	1,1	3,9

Tabla1. Evolución de las aminas biógenas (en mg/L) a los tres meses de crianza

4. Conclusiones

En este trabajo se ha abordado el aislamiento, identificación, tipificación, caracterización y selección de bacterias lácticas provenientes de viñedos y bodega biodinámicas, con la finalidad de disponer de un cultivo propio formado por distintas cepas de *O. oeni*, las cuales han constituido el cultivo iniciador mixto empleado con éxito en la pasada vendimia. Las cepas se han implantado correctamente, disminuyendo enormemente los niveles finales de aminas biógenas tras crianza. Con ello se consiguen vinos de mayor calidad, más seguros para el consumidor, y que al tiempo presentan más facilidades para su exportación y distribución al contener valores muy bajos de aminas biógenas.

5. Bibliografía

1. Berbegal, C.; Benavent-Gil, Y.; Pardo, I.; Ferrer, S. 2015. A novel culture medium for *Oenococcus oeni* malolactic starter production. *In: LWT - Food Science and Technology. In press.*
2. Landete, J.M.; Ferrer, S.; Pardo, I. 2005 Which lactic acid bacteria are responsible of histamine production in wine? *In: Journal of Applied Microbiology.* 99, 580-586.

6. Agradecimientos

Trabajo financiado parcialmente por IDI-20130300 – CDTI.

M30 - DESARROLLO DE ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA IMPLANTACIÓN DE UNA LEVADURA ECOLÓGICA SELECCIONADA

Lucía Polo, Pedro Mayoral, Sergi Ferrer, Isabel Pardo

ENOLAB, ERI-ISIC BioTecMed / MCI IVISOCA. Universitat de València. c/ Dr. Moliner 50. 46100

Burjassot-València Isabel.Pardo@uv.es

RESUMEN:

En este trabajo se ha estudiado, a lo largo de cuatro vendimias, la capacidad de implantación de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* 55A, una levadura aislada de vinificaciones ecológicas y seleccionada con anterioridad. Se ensayaron distintas concentraciones de inóculo, distintos tratamientos enológicos y distintos volúmenes de fermentación con el fin de determinar qué estrategia era la más adecuada para mejorar la implantación de la misma. Los resultados han demostrado que valores más altos de la relación levaduras inoculadas frente a autóctonas aumentan el grado de implantación y que la aplicación de Velcorin® ayuda a hacer mayor esta relación.

1. Introducción

La posibilidad de disponer de levaduras propias ecológicas representa una herramienta muy útil para aquellas bodegas que deseen combinar tipicidad y control de la fermentación alcohólica (FA) en la producción de sus vinos ecológicos. En la vendimia 2008-2009 se recogieron 64 aislados de levaduras pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae* procedentes de vinificaciones ecológicas de la bodega Sierra Norte, ubicada en Camporrobles (D.O Utiel-Requena). Se realizó un proceso de selección de las mismas en base a criterios bioquímicos y tecnológicos, tras el cual se retuvieron tres cepas (110A, 80A y 55A). El objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad de implantación de una de estas cepas, la 55A, y desarrollar estrategias para mejorar la implantación de la misma durante la fermentación de mostos de la variedad Bobal.

2. Material y métodos

2.1 Condiciones de ensayo e inoculación.

Se estudió, a lo largo de cuatro vendimias, la implantación de la levadura 55A en vinificaciones de mostos tintos de la variedad Bobal. Se ensayaron distintas concentraciones de inóculo, distintos tratamientos enológicos y distintos volúmenes de fermentación (Tabla 1).

Vendimia	Nivel de inóculo x 10 ⁶ (UFC/mL)	Volumen fermentación (L)	Tratamientos
2010-11	2	50	3 g/hL SO ₂
2011-12	2	1500	3 g/hL SO ₂
2013-14	2	50	3 g/hL SO ₂
	20		
2014-15	6	1500	3 g/hL SO ₂ + 25 g/hL Velcorin®

Tabla1. Especificaciones de los tratamientos, niveles de inóculo y volúmenes de fermentación utilizados en las distintas vendimias.

En las tres primeras vendimias se adicionaron 3 g/hL de anhídrido sulfuroso (SO₂) para controlar el crecimiento de las cepas autóctonas. En la vendimia 2014-15 se utilizaron, además

de 3 g/hL de SO₂, 25 g/hL de Velcorin®, que se añadieron 24 h después del SO₂. Transcurridas 24 horas, se inoculó la levadura 55A hasta alcanzar los niveles de inóculo indicados en la Tabla 1. Para conseguir el volumen de inóculo adecuado, se realizó un crecimiento escalado de la cepa 55A en medio de cultivo YPD, en mosto estéril y en mosto natural, en algunos casos, antes de su inoculación en los volúmenes de ensayo (Figura 1).

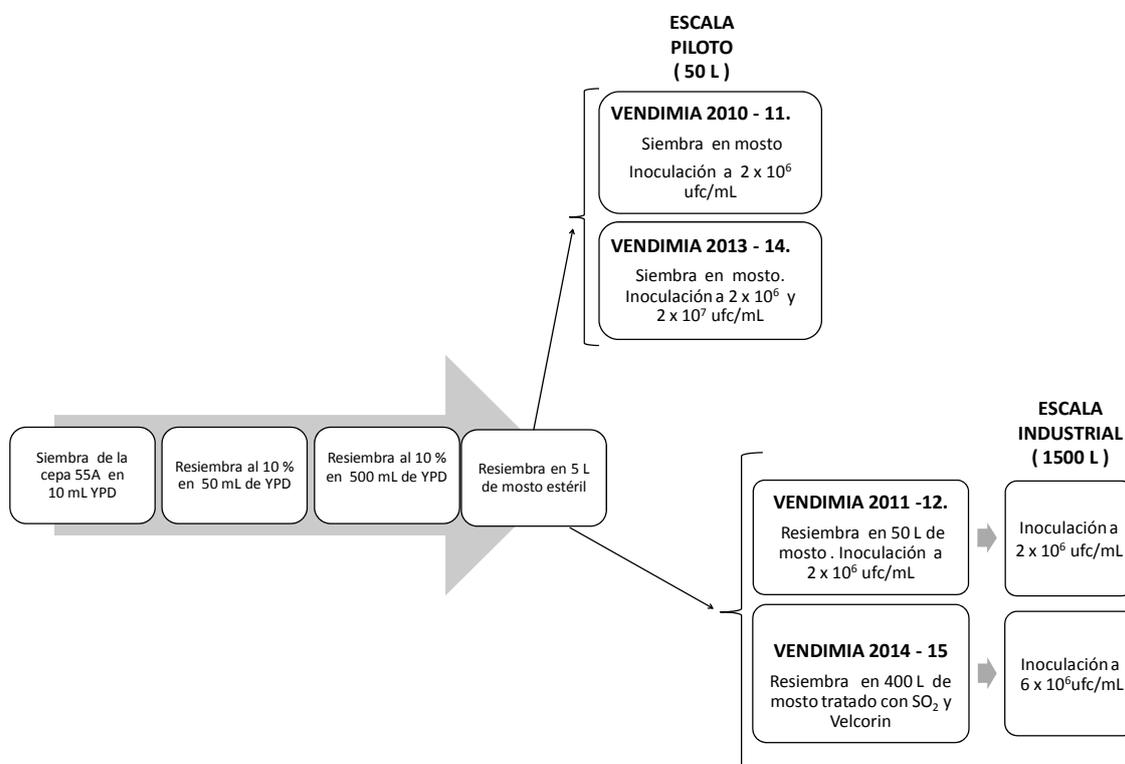


Figura 1. Diagrama de flujo del escalado seguido para la producción del inóculo de la cepa 55A utilizado en las fermentaciones de los mostos en las distintas vendimias.

2.2 Determinación de la concentración de levaduras autóctonas en mostos

Se realizó un recuento de levaduras viables autóctonas en mostos, antes de que éstos fuesen inoculados con la levadura 55A. Para ello, muestras de los mostos, convenientemente diluidas en solución salina, se sembraron en placas de YPD y se incubaron en estufa a 28°C durante 4-5 días. Tras la incubación se realizó el recuento.

2.3 Determinación del grado de implantación de la levadura 55A a lo largo de la vinificación

El grado de implantación de la levadura se determinó tomando muestras a mitad y al final de la fermentación alcohólica. Las muestras correspondientes a mitad y final de FA se sembraron en placas de YPD y se incubaron en las condiciones que se han descrito en el apartado 2.2. Se aislaron 10 colonias tomadas al azar de las placas, se identificaron y se determinó el perfil genético de aquellas pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*.

2.4 Identificación y tipado moleculares de las levaduras aisladas

Las colonias aisladas a partir de las vinificaciones se identificaron mediante análisis de tamaño del *Intergenic Transcribed Spacers* (ITS) [1] y se caracterizaron a nivel de cepa (tipado molecular) mediante análisis del DNA mitocondrial digerido con *HinfI* [2]. Ambos tipos de perfiles se introdujeron en el programa informático BioNumerics versión 6.5 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) para llevar a cabo un análisis de agrupamiento, utilizando el método Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) y los coeficientes de similitud de Dice y de Pearson's Product-Moment Coefficient para el análisis de los fragmentos de amplificación del ITS y de los perfiles de digestión del DNA mitocondrial, respectivamente.

3. Resultados y discusión

Los recuentos de levaduras autóctonas en mosto y los resultados de implantación de la levadura 55A en los experimentos realizados durante las sucesivas vendimias se muestran en la Tabla 2.

Vendimia	Concentración levaduras en mosto ^a (UFC/mL)	Nivel de inóculo x 10 ⁶ (UFC/mL)	Mitad FA		Final FA	
			Grado Implantación (%)	Nº cepas autóctonas	Grado Implantación (%)	Nº cepas autóctonas
2010-11	7,20 x 10 ⁴	2	60	4	70	3
2011-12	2,80 x 10 ⁵	2	50	4	20	7
2013-14	2,78 x 10 ⁶	20	66	4	55	7
		20	87	3	90	1
2014-15	4.75 x 10 ⁵	6	90	1	100	1

Tabla 2. Concentración inicial y tipos de levaduras autóctonas, niveles de inóculo y porcentajes de implantación de la cepa 55A durante la fermentación alcohólica a lo largo de 4 vendimias. ^a Levaduras autóctonas presentes en los mostos antes de ser inoculados con la cepa 55A. ^b El número de cepas autóctonas diferentes se determinó en base al perfil del DNA mitocondrial.

Se puede observar que la concentración de levaduras autóctonas en el mosto varía de año a año, siendo los mostos de la vendimia 2010-11 los que presentan los valores más bajos y los de la vendimia 2013-14 los más altos. Estas diferencias se explican por el grado de madurez de las uvas, por las condiciones climatológicas y por las condiciones sanitarias de la uva en el momento de la vendimia. Se puede deducir de los datos de la Tabla 2 que los mejores porcentajes de implantación se consiguen cuanto más baja es la población inicial de levaduras autóctonas.

En la Tabla 2 se aprecia que los porcentajes de implantación de la levadura 55A fueron relativamente buenos en la vendimia del 2010-2011 pero bajos en la de 2011-2012, a pesar de que se había utilizado el mismo nivel de inóculo en ambos casos. Los ensayos realizados en 2013-2014 mostraron niveles de implantación a mitad de FA semejantes a los conseguidos en el 2010-2011 y algo más bajos al final de FA, cuando se trabajaba a los mismos niveles de inóculo (2 x 10⁶ UFC/mL), pero niveles notablemente superiores cuando se trabajaba con niveles de inóculo 10 veces superiores. Los ensayos realizados en 2014-2015 en 1500 L mostraron niveles de implantación superiores al ≥ 90% a lo largo de toda la FA.

También se aprecia que los tratamientos aplicados al mosto (SO₂ y Velcorin®) en la vendimia 2014-2015 mejoraron notablemente la implantación de la levadura 55A. Ello se debió a la disminución de la concentración de levaduras autóctonas en un 97%. Este efecto se produjo fundamentalmente por la aplicación del Velcorin®, ya que el SO₂ no afectó en absoluto la viabilidad de las levaduras (datos no mostrados).

También se puede observar que a medida que los porcentajes de implantación de la levadura 55A son menores, mayor número de cepas autóctonas coexisten con ella durante la FA, lo que indica que la misma no es llevada a cabo por una única levadura en estos casos.

4. Conclusiones

El grado de implantación de la levadura 55A depende de la concentración inicial de levaduras autóctonas

Se ha conseguido aumentar el porcentaje de implantación al aumentar la concentración de levaduras en las inoculaciones de los mostos de Bobal.

La adición de Velcorin® consiguió disminuir la concentración inicial de levaduras, pero no el SO₂.

La cepa 55A fue capaz de implantarse a niveles $\geq 90\%$ utilizando la combinación de estrategias de Velcorin®+ anhídrido sulfuroso y aumento de la concentración de inóculo.

5. Bibliografía

1. Guillamón, J.M.; Sabaté, J.; Barrio, E.; Cano, J. & Querol, A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *In: Arch. Microbiol.* 169: 387-392.
2. Querol, A.; Barrio, E.; and Ramón, D. 1992. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *In: Syst. Appl. Microbiol* 15: 439-446.

6. Agradecimientos

Trabajo financiado parcialmente por CENIT-DEMETER CEN20081002 e ITISOST 2013-CDTI.

M31 - INMOVILIZACIÓN DE *O. OENI* EN GELES RECUBIERTOS CON SÍLICE PARA LA GESTIÓN DE LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA EN VINOS TINTOS

Guillermo Simó¹, Josefina Vila-Crespo², Encarnación Fernández-Fernández¹, José M. Rodríguez-Nogales¹

¹Universidad de Valladolid, Dpto. Ing. Agrícola y Forestal, Avda. Madrid 57, 34004 Palencia, España. E-mail: rjosem@iaf.uva.es

² Universidad de Valladolid, Área de Microbiología, Avda. Madrid 57, 34004 Palencia, España. Correo electrónico: rjosem@iaf.uva.es

RESUMEN:

El objetivo del presente estudio fue desarrollar una estrategia para la inmovilización de *O. oeni* en esferas de alginato-sílice, y su posterior empleo en el desarrollo de la fermentación maloláctica de vinos tintos. Las condiciones de inmovilización fueron optimizadas atendiendo a la concentración de 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) (0-3%), tiempo de inmersión de las esferas en éste (0-90 min), y pH de la mezcla (4-7). Los factores evaluados fueron: (i) degradación de ácido málico durante el desarrollo de la fermentación maloláctica, (ii) capacidad de la matriz para retener las bacterias lácticas inmovilizadas y (iii) resistencia mecánica de la matriz de alginato-sílice.

Palabras clave: *Oenococcus oeni*, encapsulación, ácido málico, APTES, alginato.

1. Introducción

La fermentación maloláctica (FML) es la transformación del ácido málico contenido en el vino con producción final de ácido láctico. Los agentes que desarrollan la FML son las bacterias lácticas (BAL) y en especial la especie *Oenococcus oeni* [1]. La consecuencia principal de este proceso es una importante caída de la acidez total del vino, junto a otra serie de modificaciones que deberán ser consideradas para determinar la idoneidad o no del proceso en cada caso. Habitualmente se desarrolla tras la fermentación alcohólica, siendo necesarias poblaciones de bacterias de alrededor de 10⁶ UFC/ml de vino para que la FML de comienzo [2].

La FML es difícil de controlar y el desarrollo de las BAL en el vino es complicado ya que se trata de un sustrato poco favorable para su crecimiento. Además, el cambio climático da lugar a vinos desequilibrados con un mayor grado alcohólico [3] por lo que las BAL responsables de FML tienen aún mayores dificultades para realizarla [4]. Debido a estas circunstancias surge la necesidad de mejorar las condiciones de adaptación de *O. oeni* a este ambiente estresante. Una manera de realizarlo es mediante la microencapsulación de BAL en geles de alginato. Este sistema permite emplear altas poblaciones bacterianas, facilitando así un desarrollo rápido y eficaz de la FML en vinos tintos. Además, la eliminación de las bacterias al acabar el proceso es simple y se reducen los riesgos de alteraciones microbianas. Sin embargo, para mejorar su aplicabilidad industrial puede resultar interesante mejorar sus propiedades mecánicas y su estabilidad [5-7] mediante la inmovilización de las BAL en matrices híbridas de alginato-sílice.

Recientemente se ha diseñado una nueva ruta acuosa que permite un recubrimiento directo de las esferas de alginato, sin la necesidad del uso de costosos intermediarios químicos, como son los polielectrolitos catiónicos. Se basa en el uso de un alcóxido de silicio

que contiene un grupo amino (3-aminopropiltriétoxilano, APTES) cargado positivamente que puede interactuar electrostáticamente con el grupo carboxilo negativo del alginato [8]. Este método se ha empleado con éxito para la inmovilización de levaduras obteniéndose soportes activos con mayor resistencia mecánica [11]. En el presente trabajo se utilizará, por primera vez, APTES para formar una capa externa de sílice sobre geles esféricos de alginato conteniendo BAL.

2. Material y métodos

2.1. Inmovilización de BAL en geles APTES-alginato.

Para la inmovilización de las bacterias se optimizó el método multicapa propuesto por Kurayama *et al.* [8] basado en la formación de esferas por gelificación de alginato de sodio en presencia de CaCl₂, y su posterior recubrimiento con APTES. Se utilizó alginato de sodio (Panreac) al 2% en solución acuosa, a la que se le añadieron las BAL (*O. oeni* LALVIN VP 41 MBR, Lallemand) con una densidad bacteriana de 8·10⁸ UFC/g de gel [9].

Las esferas fueron suspendidas en soluciones de APTES (Sigma-Aldrich, previamente hidrolizado a una concentración 1:10) a diferentes concentraciones (0-3%), pH (4-7) y tiempos de reacción (0-90 min). Los valores ensayados para cada variable se establecieron a partir de un diseño de experimentos de compuesto central: 2²+estrella (Ver Tabla 1).

2.2. Desarrollo de la FML

Para la realización de la FML se adicionaron 20 esferas de cada tipo de muestra en 10 ml de vino (~10⁷ UFC/ml de vino) de la variedad Tinta de Toro con una concentración de 3 g/l de ácido málico, pH de 3,6 y un grado alcohólico de 14,2% (v/v), que fue esterilizado mediante filtración. Se añadió un activador de la FML (ACTIML, Lallemand) a una concentración de 20g/hl. Las muestras se mantuvieron en agitación a 165 rpm y 22°C. La medida de la capacidad de degradación de ácido málico se efectuó a los 8 días.

2.3. Métodos analíticos

Para la determinación de la concentración de ácido málico de las muestras se empleó un kit enzimático (TDI, España). Para evaluar la resistencia mecánica de las esferas se utilizó el procedimiento descrito por Serp *et al.* [10] consistente en un ensayo TPA (Texture Profile Analysis) de doble compresión, efectuado tras 48 horas en agitación en CaCl₂ 0,2 M, empleando para ello un texturómetro Texture Analyser Plus-Upgrade (Stable Microsystems, Reino Unido) con sonda cilíndrica de 6 mm de diámetro. La capacidad de la matriz para retener las BAL inmovilizadas se realizó mediante recuento de la población de BAL en el vino tras 24 h, empleando para ello el método descrito por Gamazo *et al.* [12].

Tabla 1. Degradación de ácido málico a los 8 días en función de las variables de estudio.

	APTES hidrolizado (%)	pH	Tiempo (min)	Ácido málico degradado (%)
1	1,5	5,5	45,3	33,46
2	2,4	6,4	18,5	56,8
3	1,5	7,0	45,3	40,99
4	3,0	5,5	45,3	46,03
5	1,5	5,5	45,3	31,96
6	1,5	5,5	45,3	30,44
7	2,4	4,6	72,0	29,28
8	1,5	5,5	45,3	36,25
9	0,6	4,6	72,0	30,06
10	1,5	5,5	45,3	32,41
11	1,5	5,5	45,3	34,09
12	0,6	4,6	18,5	61,83
13	0,6	6,4	18,5	56,57
14	1,5	5,5	0,3	57,32
15	1,5	5,5	45,3	40,67
16	0,0	5,5	45,3	30,05
17	1,5	4,0	45,3	29,32
18	2,4	4,6	18,5	48,59
19	0,6	6,4	72,0	23,63
20	1,5	5,5	90,2	28,59
21	1,5	5,5	45,3	42,57
22	2,4	6,4	72,0	30,41

2.4. Tratamiento estadístico

Se creó un diseño de experimentos de compuesto central: 2^2 +estrella de tres factores (concentración de APTES, pH y tiempo de inmersión) con 8 puntos centrales mediante el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI.II. A partir de éste, se realizó una optimización de los factores “Degradación de ácido málico”, “Resistencia mecánica” y “Capacidad de retención de las BAL por la matriz”.

3. Resultados

Los resultados de la degradación del ácido málico para cada muestra pueden observarse en la Tabla 1. Al realizar el tratamiento estadístico de los datos se observó que de las tres variables estudiadas (concentración de APTES hidrolizado, tiempo de reacción y su interacción doble tuvieron significancia estadística ($\alpha=0,05$).

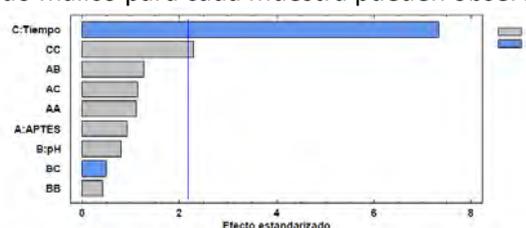


Figura 1. Diagrama de Pareto estandarizada para la degradación del ácido málico.

Se observó que a mayor tiempo de contacto del reactivo APTES con el gel de alginato, menor fue la degradación de ácido málico obtenido (Figura 1). Este hecho probablemente se deba a la toxicidad que suponga el APTES para las bacterias. Estos resultados parecen ir en la línea de lo establecido por Ylitervo et al. [11] que observaron que concentraciones de APTES superiores al 3% influían notoriamente en la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae*. Puesto que las BAL son muy sensibles a tóxicos, incluso a concentraciones tolerables para levaduras [5], éste puede ser el motivo de que, independientemente de la concentración de APTES ensayada, cuanto mayor fue el tiempo de contacto con las BAL, menor fue la capacidad fermentativa de éstas.

Por otro lado, se obtuvieron valores de 70-72 g para la resistencia mecánica de los distintos geles mixtos, y en contra de lo que cabía esperar, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0,05$) entre las diferentes muestras ensayadas, lo cual probablemente se deba a que el método TPA de doble compresión no sea efectivo para detectar diferencias significativas entre las muestras.

Puesto que la fuga de BAL de la matriz fue en todos los casos inferior al 0,003%, se consideró ésta como inexistente en la práctica, estableciéndose por tanto que el método de inmovilización puesto en práctica permite la retención de la totalidad de biomasa bacteriana.

4. Conclusiones

Puesto que las esferas de alginato (0% de APTES) ya mostraron una retención máxima de BAL, puede establecerse que el empleo de APTES para la inmovilización no mejoró la capacidad de retención de la matriz. A su vez tampoco se produjo una mejoría en las propiedades mecánicas de las esferas. Por otra parte, el tiempo de reacción de las esferas en la solución de APTES mostró una influencia negativa en la viabilidad de las BAL, debiéndose probablemente a su carácter tóxico sobre *Oenococcus oeni*.

5. Bibliografía

1. Bauer, R.; Dicks, L. M. 2004. Control of Malolactic Fermentation in Wine. A Review. In: South African Journal for Enology and Viticulture, 25, N°. 2.
2. Blouin, J.; Peynaud, E. 2004. Enología práctica: conocimiento y elaboración del vino. In: Editorial Mundi-prensa libros, S.A.
3. Vila-Crespo, J.; Rodríguez-Nogales, J.M.; Fernández-Fernández E.; Hernández-Moral, M.C. (2006). Strategies for the enhancement of malolactic fermentation in the new climate conditions. In: Editorial Formatex.
4. Reguant, C.; Rozès, I.; Olguín, N.; Bordas, M.; Bordons, A. 2010. Nuevos retos para *Oenococcus oeni* como consecuencia del cambio climático. In: Acenología.
5. Callone, E.; Campostrini, R.; Carturan, G.; Cavazza, A.; Guzzon, R. 2008. Immobilization of yeast and bacteria cells in alginate microbeads coated with silica membranes: procedures, physico-chemical features and bioactivity. In: Journal of Materials Chemistry, 18(40), 4839.
6. Coradin, T.; Nassif, N.; Livage, J. 2003. Silica-alginate composites for microencapsulation. In: Applied microbiology and biotechnology, 61(5-6), 429–34.
7. Guzzon, R.; Carturan, G.; Krieger-Weber, S.; Cavazza, A. 2011. Use of organo-silica immobilized bacteria produced in a pilot scale plant to induce malolactic fermentation in wines that contain lysozyme. In: Annals of Microbiology, 62(1), 381–390.
8. Kurayama, F.; Suzuki, S.; Oyamada, T.; Furusawa, T.; Sato, M.; Suzuki, N. 2010. Facile method for preparing organic/inorganic hybrid capsules using amino functional silane coupling agent in aqueous media. In: Journal of Colloid and Interface Science, 349 (2010), 70-76.
9. Zhang, D.; Lovitt, R. W. 2006. Strategies for enhanced malolactic fermentation in wine and cider maturation. In: Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 81 (7), 1130–1140.
10. Serp, D.; Cantana, E.; Heinzen, C.; Von Stockar U.; Marison, I.W. 2000. Characterization of an encapsulation Device for the Production of Monodisperse Alginate Beads for Cell Immobilization. In: Biotechnology & Bioengineering; 70 (1), 41-53.
11. Ylittervo, P.; Franzén, C. J.; Taherzadeh M. J. 2013. Mechanically robust polysiloxane-ACA capsules for prolonged ethanol production. In: Journal of Chemical Technology & Biotechnology. Volume 88, Issue 6, 1080–1088.
12. Gamazo, C.; López, I.; Díaz, R. 2005. Manual práctico de microbiología. In: Editorial Elsevier Masson.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen a la empresa LALLEMAND Oenology Division por el suministro de la cepa de bacteria.

M32 - LEVADURAS COMO FUENTE DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS. ESTUDIO POBLACIONAL, ENZIMÁTICO Y APLICACIÓN EN FERMENTACIONES INDUSTRIALES

Ignacio Belda¹, Eva Navascués^{1,2}, Javier Ruiz¹, Alejandro Alonso¹, Domingo Marquina¹, Antonio Santos¹

¹Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Microbiología III, José Antonio Nováis 12, 28040-Madrid

²Agrovin S.A. Avenida de los Vinos, 13600-Alcázar de San Juan (Ciudad Real)

ignaciobelda@ucm.es

RESUMEN:

Las enzimas pectinolíticas presentan un gran interés en la mejora de ciertos aspectos tecnológicos y sensoriales en la elaboración de vino. El presente trabajo aborda la búsqueda de levaduras no-*Saccharomyces* con actividad poligalacturonasa. Tras el aislamiento y estudio de 462 levaduras se concluye que tan solo ciertas especies del género *Metschnikowia* y *Aureobasidium pullulans* presentan dicha actividad del conjunto de especies identificadas. Tras ello pudo validarse la influencia de la actividad poligalacturonasa de *M. pulcherrima* en fermentación combinada con *Saccharomyces cerevisiae* sobre los parámetros de intensidad de color, índice de polifenoles totales, antocianos, turbidez y filtrabilidad, con resultados significativos tanto en microvinificaciones como a escala industrial.

Palabras clave: No-*Saccharomyces*, *Metschnikowia pulcherrima*, poligalacturonasa,

1. Introducción

La investigación en Microbiología enológica presenta como uno de sus pilares actuales la búsqueda de cepas innovadoras de levaduras no-*Saccharomyces* para el aumento de complejidad de los vinos (Jolly et al. 2014). Una de las virtudes atribuidas a las levaduras no-*Saccharomyces*, y que justifican su interés, es la riqueza en enzimas hidrolíticas que presentan y que contribuyen al aumento en la complejidad aromática y sensorial de los vinos (Maturano et al., 2012).

Las enzimas pectinolíticas presentan un gran interés en la mejora de ciertos aspectos tecnológicos y sensoriales en la elaboración de vino, influyendo en el proceso de clarificación y en la filtrabilidad de mostos y vinos así como en la liberación de compuestos aromáticos y de color retenidos en la uva (Fernández-González et al., 2005). Tradicionalmente, los complejos enzimáticos de origen fúngico con actividad pectinolítica, son aplicados tanto en etapas prefermentativas como postfermentativas (Kashyap et al., 2001). Dado que la actividad pectinolítica de *Saccharomyces cerevisiae* no es suficiente para abordar la mejora de los parámetros citados anteriormente y que el uso de enzimas supone un coste significativo para la industria enológica, el presente trabajo aborda la búsqueda de levaduras no-*Saccharomyces* con actividad poligalacturonasa con potencial aplicación en fermentaciones combinadas con *S. cerevisiae* que permitan obtener los beneficios del uso de las enzimas pectinolíticas a través del control directo del propio proceso de fermentación.

2. Material y métodos

Se realizó el aislamiento de 462 levaduras no-*Saccharomyces* procedentes de uvas de la variedad Tempranillo de la D.O. Ribera del Duero durante las vendimias de 2013 y 2014. Para su aislamiento se hizo uso del medio de cultivo agar lisina, selectivo para levaduras no-*Saccharomyces*, mediante la siembra de una dilución adecuada del mosto fresco. El conjunto de levaduras aisladas fue identificado mediante secuenciación parcial del gen rRNA 26S de las levaduras.

Para el estudio de la presencia de actividad poligalacturonasa en las levaduras, éstas fueron crecidas en placas de medio sólido “agar ácido poligalacturónico” (1,25% ácido poligalacturónico, 0,67% yeast nitrogen base (YNB, Difco), 1% glucosa y 2% agar, pH 3,5) a 28°C durante 5 días. Tras esto, las placas fueron lavadas con agua destilada y posteriormente teñidas con rojo de rutenio (0,1%). Las colonias que mostraron un halo púrpura alrededor fueron identificadas como positivas.

Se realizó un estudio de la repercusión de la actividad poligalacturonasa de cepas identificadas como productoras de dicha actividad (*Metschnikowia pulcherrima* NSEM-34 y *Aureobasidium pullulans* NSO-82) en microvinificaciones con inoculación secuencial con *S. cerevisiae* RVA (Agrovin S.A.). *Kluyveromyces thermotolerans* NSG-32 fue utilizado como control negativo para la actividad poligalacturonasa para las fermentaciones combinadas y adicionalmente se valoró el efecto de dos complejos enzimáticos con actividad pectinolítica (Enovyn Clar y Enozym Lux, Agrovin S.A.). Se comparó el efecto de la maceración prefermentativa (12°C - 48 horas, coincidentes con el tiempo de actuación del inóculo de no-*Saccharomyces*, seguido de fermentación a 25°C tras la inoculación de *S. cerevisiae*) y la fermentación a temperatura constante (25°C). Los posteriores ensayos a escala semi-industrial fueron desarrollados en depósitos de PVC con 700 kg de uva Tempranillo a temperatura de bodega. Se desarrollaron fermentaciones combinadas mediante inoculación secuencial de *M. pulcherrima* NSEM-34 con 3 cepas diferentes de *S. cerevisiae* (*S. cerevisiae* CYC-CVA y CYC-VRI, Complutense Yeast Collection y RVA, Agrovin S.A.) así como las correspondientes fermentaciones con cada una de las cepas utilizadas como inóculo único.

El conjunto de parámetros analizados fue valorado de acuerdo a las especificaciones determinadas en el “Compendio internacional de métodos de análisis de mostos y vinos (OIV, 2014).

3. Resultados

De los 462 aislamientos analizados para su actividad poligalacturonasa, en los que fueron identificadas 9 especies distintas, 91 cepas mostraron actividad poligalacturonasa, todas ellas pertenecientes tan solo a 3 especies: *M. pulcherrima* (88% positivas de los 60 aislamientos de dicha especie), *M. fructicola* (89 % positivas de los 18 aislamientos de dicha especie) y *A. pullulans* (100% positivas de los 22 aislamientos de dicha especie).

La tabla 1 muestra los resultados obtenidos en las distintas microvinificaciones aplicando maceración prefermentativa. En ella puede observarse la incidencia de *M. pulcherrima* sobre el conjunto de parámetros analizados. A excepción del contenido en antocianos en los que las diferencias establecidas con el control inoculado exclusivamente con *S. cerevisiae* no son estadísticamente significativas, aunque si notables, *M. pulcherrima* muestra los mayores valores de IC (Índice de Color) e IPT (Índice de Polifenoles Totales) así como una incidencia muy marcada sobre la filtrabilidad y turbidez de los vinos. Los valores

mostrados por *M. pulcherrima* superan incluso los obtenidos por *A. pullulans* cuya actividad poligalacturonasa *in vitro* fue mayor. Esto puede ser atribuido al nulo poder fermentativo de *A. pullulans* que restringe casi por completo su incidencia a lo largo del proceso fermentativo. La influencia de los complejos enzimáticos utilizados (Clar y Lux) se observa fundamentalmente sobre los parámetros de filtrabilidad y turbidez, no así sobre el incremento de IC, IPT o AC.

Tabla 1. Resultados analíticos de las microvinificaciones llevadas a cabo aplicando maceración prefermentativa (12°C+25°C).

Los resultados muestran el valor medio y la desviación estándar de tres réplicas. Los valores en la

Ensayos	IC	IPT	AC	Filtrabilidad (tiempo de retención s/mL)	Turbidez (NTU)
Sc	9,97±0,42 ^b	70,13±2,76 ^b	38,40±1,84 ^a	125,92±8,56 ^a	42,97±5,33 ^a
Ap	10,57±0,40 ^{ab}	72,57±4,50 ^{ab}	41,20±6,34 ^a	65,53±2,79 ^c	24,00±2,69 ^b
Mp	11,23±0,71 ^a	75,53±0,59 ^a	41,57±2,22 ^a	79,74±11,61 ^{bc}	11,28±7,76 ^c
Lt	10,43±0,38 ^b	72,83±3,43 ^{ab}	42,13±5,03 ^a	89,35±18,43 ^b	2,83±0,70 ^d
Clar	10,33±0,35 ^b	73,97±3,63 ^{ab}	39,17±2,99 ^a	26,99±0,88 ^d	3,79±2,8 ^{cd}
Lux	9,97±0,25 ^b	69,23±0,50 ^b	37,90±1,40 ^a	88,64±19,00 ^b	2,23±0,81 ^{cd}

misma columna identificados con la misma letra denotan la ausencia de diferencias significativas ($s < 0.05$). Ap: *A. pullulans* seguido de *S. cerevisiae* RVA; Mp: *M. pulcherrima* seguido de *S. cerevisiae* RVA; Lt: *L. thermotolerans* seguido de *S. cerevisiae* RVA; Sc: *S. cerevisiae* RVA; Clar: *S. cerevisiae* RVA tratado previamente con Enovin Clar; Lux: *S. cerevisiae* RVA tratado previamente con Enozym Lux

La supresión de la temperatura controlada a 12°C durante el tiempo de actuación de las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* causó una notable homogeneización del conjunto de datos, disminuyendo las diferencias obtenidas entre cepas no-*Saccharomyces* así como entre éstas y el correspondiente control inoculado con *S. cerevisiae* exclusivamente (datos no mostrados). Esto puede ser explicado por la limitación en el tiempo de actuación de las levaduras no-*Saccharomyces* conforme aumenta la temperatura y, por tanto, se facilita el desarrollo *S. cerevisiae* y el inicio de la fermentación tumultuosa que causa la rápida supresión de la inmensa mayoría de levaduras no-*Saccharomyces*. La realización de ensayos a escala semi-industrial de fermentación secuencial de *M. pulcherrima* NSEM-34 con 3 cepas diferentes de *S. cerevisiae* (CVA, VRI y RVA) permitió comprobar que su uso en bodega conlleva la obtención de vinos analíticamente distinguibles, considerando un amplio grupo de parámetros.

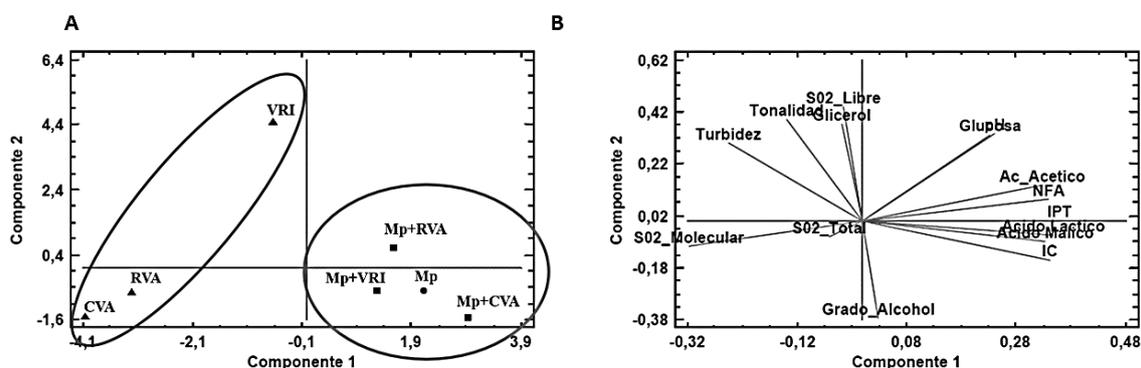


Figura 1. Análisis de componentes principales de los parámetros analíticos de los vinos. A) Diferencias existentes en la composición analítica general de los vinos estudiados. B) Contribución e importancia de los distintos parámetros analíticos evaluados en la diferenciación de las muestras.

La figura 1 muestra cómo la consideración estadística del conjunto de parámetros analizados permite, mediante un análisis de componentes principales, diferenciar de forma muy patente los vinos fermentados con inóculo inicial de *M. pulcherrima* de los vinos fermentados exclusivamente con *S. cerevisiae*. En el gráfico situado a la derecha puede comprobarse que parámetros como IC, IPT o la turbidez son en gran parte responsables de las diferencias analíticas entre los vinos contribuyendo en gran medida al peso de la primera componente principal del análisis estadístico.

El análisis estadístico individualizado del conjunto de parámetros analizados: ácido málico, ácido láctico, glicerol, amonio, NOPA, NFA, azúcares residuales, ácido acético, grado alcohólico, pH, SO₂ libre, SO₂ total, SO₂ molecular, IC, IPT y turbidez, concluye que tan sólo estos tres últimos parámetros muestran diferencias significativas entre los vinos fermentados exclusivamente con *S. cerevisiae* y aquellos con inoculación secuencial con *M. pulcherrima*.

4. Conclusiones

La actividad pectinolítica en levaduras está restringida a tan sólo unas pocas especies entre las que se encuentra *M. pulcherrima*. La incidencia de la actividad poligalacturonasa de *M. pulcherrima* genera diferencias significativas sobre ciertos parámetros analíticos del vino tanto a escala de laboratorio como semi-industrial con respecto a las fermentaciones con inoculación exclusiva con *S. cerevisiae* mostrándose como importante el mantenimiento de temperaturas bajas durante las primeras etapas de la fermentación, coincidiendo con el tiempo de actuación de *M. pulcherrima*.

Estos resultados abren la puerta al uso de cepas seleccionadas de *M. pulcherrima* para el incremento de la calidad sensorial y tecnológica de vinos tintos.

5. Bibliografía

1. Jolly, N.P., Varela, C., Pretorius, I.S. 2014. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *In: FEMS Yeast Research* 14, 215–237.
2. Maturano, Y.P., Rodríguez Assaf, L.A., Toro, M.E., Nally, M.C., Vallejo, M., Castellanos de Figueroa, L.I., Vazquez, F. 2012. Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *In: International Journal of Food Microbiology* 155, 43–50.
3. Fernández-González M., Úbeba J.F., Cordero-Otero R.R., Thanvanthri G.V., Briones A.I. 2005. Engineering of an oenological *Saccharomyces cerevisiae* strain with pectinolytic activity and its effect on wine. *In: International Journal of Food Microbiology* 102, 173–183.
4. Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra S., Tewari R. 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *In: Bioresource Technology* 77, 215–227.
5. OIV. 2014. Compendium of international methods of wine and must analysis. *In: www.oiv.int/oiv/info/enmethodesinternationalesvin.*

M33 - SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS AUTÓCTONAS DE UVAS Y VINOS DEL PRIORAT

Judit Franquès, Bet Palahí, Isabel Araque, Cristina Reguant, Albert Bordons

Grup de Biotecnologia Enològica, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Campus Sescelades N4, 43007 Tarragona.

Correo electrónico: juditfranques@gmail.com

RESUMEN:

En este trabajo se han identificado y caracterizado bacterias lácticas (BL) autóctonas de la DOC Priorat. Para ello, se tomaron muestras de uva de las variedades garnacha y cariñena de las vendimias 2012 y 2013 de ocho fincas de dicha DOC, así como también de vinos realizados con las mismas uvas. De todas las muestras se obtuvieron 1900 aislados de BL. Muchos de ellos, tanto de vinos como algunos de uvas, se confirmaron como *Oenococcus oeni*, obteniéndose 180 perfiles diferentes. En el caso de los bacilos y otros cocos, se identificaron seis especies. Se han seleccionado un total de 50 cepas diferentes de BL y se han caracterizado. Finalmente, se han seleccionado las tres mejores cepas de *O. oeni* y se han utilizado con éxito en bodega como estárters de FML.

Palabras clave: Bacterias lácticas autóctonas, Fermentación maloláctica, *Oenococcus oeni*, Priorat.

1. Introducción

En los últimos años el cambio de preferencias de los consumidores hacia vinos más ecológicos ha propiciado nuevas oportunidades para las zonas vitivinícolas con terroirs peculiares y de tradición. Esto ha planteado estrategias nuevas, tales como el uso de bacterias lácticas (BL) autóctonas como inóculo para la fermentación maloláctica (FML). Por ello el objetivo de este trabajo ha sido aislar, seleccionar y caracterizar cepas autóctonas de BL de fincas y bodegas de la DOC Priorat, zona vitivinícola catalana de prestigio y de especial suelo y microclima. Además, en la mayoría de bodegas de esta zona se da un tratamiento muy minimizado de pesticidas, con lo cual la mayoría de los vinos producidos tienen características ecológicas. Asimismo, en estas bodegas no se inoculan BL y en algunos casos, tampoco se inoculan levaduras. El actual cambio climático es patente en el Priorat, ya que con la temperatura la concentración de azúcares cada vez es mayor y con ello el etanol, con niveles superiores al 14%, y menor acidez. Todos estos factores dificultan la realización de la FML lo que hace más necesario la selección de cepas de BL autóctonas, su estudio y prospección como estárters de estos vinos.

2. Material y métodos

Muestreo. Se tomaron asépticamente 26 muestras de uvas garnacha y cariñena y 47 muestras de vinos de las mismas viñas, durante las vendimias 2012 y 2013 en diferentes fincas de la DOC Priorat. Se había efectuado un tratamiento minimizado de pesticidas y en las bodegas no se habían utilizado cepas comerciales de BL. Los vinos tenían un grado alcohólico alto (13.5-16%) y un pH de 3.4-3.6.

Aislamiento y condiciones de crecimiento. Las muestras de uvas se homogenizaron (Stomacher-400 Circulator Seward) a 2500 rpm durante 2.5 min, y se recogió tanto el mosto así obtenido, como la pulpa y las uvas enteras. Estas muestras se sembraron en medio líquido MRSm3, que es MRS [1] suplementado con L-málico (3 g/L), fructosa (5 g/L), nistatina (100 mg/L), azida sódica (25 mg/L), L-cisteína (0.5 g/L) y zumo de tomate (100 mL/L), a pH 5. Se incubó 7-15 días en anaerobiosis a 27°C. Cuando se observó crecimiento, se sembró en medio sólido MRSm3 (20 g/L agar). Tras 7-15 días de crecimiento en anaerobiosis a 27°C, se tomaron 30 colonias al azar de cada muestra y se sembraron en el mismo medio sin agar. Estos aislados, una vez confirmados como BL (morfología, Gram +, catalasa -), se guardaron a -20°C con glicerol. Las muestras de vinos se sembraron directamente en medio sólido MRSm3, siguiendo luego el mismo protocolo que con las muestras de uva.

Identificación y tipificación de cepas. Los aislados con características similares a *Oenococcus* se confirmaron como *O. oeni* por PCR específica [2]. Posteriormente se tipificaron utilizando la técnica de *Variable Number Tandem Repeat* (VNTR) según [3]. Los otros aislados fueron identificados como lactobacilos mediante el método 16S-ARDRA y posterior digestión con *MseI* de acuerdo con [4]. La extracción del DNA se hizo según [5]. Los productos de PCR fueron resueltos por electroforesis en 1.5% (w/v) en geles de agarosa con tampón TBE 1x (100V, 2h30), y teñidos con bromuro de etidio. Se utilizaron marcadores de 100 bp (Roche Diagnostics). Los diferentes perfiles obtenidos se confirmaron por secuenciación del fragmento 16S. Posteriormente, estos se tipificaron utilizando la técnica rep-PCR con GTG5 [6].

Degradación de L-málico por los aislados en vino simulado. Se utilizó el *Wine Like Medium* (WLM) de acuerdo con [7], con 2 g/L L-málico. Las cepas se crecieron en medio líquido MRSm3 hasta A600nm = 1.6. El pellet obtenido se inoculó (2%) en 50 mL de WLM al 12 y 14% de etanol, por duplicado para cada cepa, a 20°C. El L-málico se midió enzimáticamente (Miura One, TDI S.A.) y se calculó el L-málico consumido y la velocidad fermentativa.

Caracterización fenotípica y genotípica de las mejores cepas. Se realizaron tests de resistencia de las mejores cepas a lo largo del crecimiento en WLM combinando diferentes pHs (2.8, 3, 3.3, 3.6 y 4) y cantidades de etanol (6, 12, 14 y 16%) durante 3 semanas, siguiendo [8]. Para descartar las posibles cepas productoras de aminos biógenas, con el DNA extraído se efectuó la detección de los genes histidina descarboxilasa (*hdc*), tirosina descarboxilasa (*tdc*) y ornitina descarboxilasa (*odc*), mediante PCR específicas con la metodología descrita en [9]. También se analizaron las diferentes cepas mediante la técnica de polimorfismo de nucleótido simple (SNPs) para obtener la relación filogenética entre ellas, siguiendo [8].

Utilización de estárter en bodega. Se seleccionaron las tres mejores cepas de *O. oeni* respecto a sus resultados de degradación de L-málico y de caracterización y se utilizaron como cultivo estárter para inocular un total de 4 vinos (dos de garnacha y dos de cariñena) en bodega. Para cada vino, las cepas se crecieron por separado en 1.5 L de medio líquido MRSm3 hasta A600nm = 1.6. El pellet obtenido total se inoculó (2%) en 225 L de vino. El consumo de L-málico se siguió en bodega. Se tomaron muestras de final de FML para confirmar la presencia de las bacterias inoculadas.

3. Resultados

De todas las muestras se obtuvieron 1904 aislados de BL (Tabla 1). La gran mayoría se confirmó mediante PCR específica que eran *O. oeni*. En el caso de los bacilos y otros cocos se encontraron especies de BL habituales en uvas y vinos como *Lactobacillus mali*, *L. plantarum*,

L. sanfranciscensis y *Pediococcus pentosaceus* y otros menos habituales como *L. lindneri* y *Fructobacillus tropaeoli*.

Tabla 1: Número de aislados de las muestras de uva y vino

Bacterias lácticas	Uva	Vino	Total
Bacilos y otros cocos	413	62	475
<i>Oenococcus oeni</i>	111	1318	1429
Total de aislados	524	1380	1904

Los aislados identificados de *O. oeni* se tipificaron mediante VNTR, obteniéndose 180 perfiles (o sea cepas) diferentes. Los bacilos y otros cocos se tipificaron mediante la técnica rep-PCR con GTG5, obteniéndose una gran variedad de perfiles. Las 50 cepas predominantes, tanto de *O. oeni* como de bacilos y otros cocos, se caracterizaron por su eficiencia de degradación de L-málico en vino simulado y por su velocidad fermentativa (Tabla 2).

Tabla 2: Bacilos y otros cocos, se caracterizaron por su eficiencia de degradación de L-málico).
Abreviaturas: *O.*, *Oenococcus*; *F.*, *Fructobacillus*; *L.*, *Lactobacillus*.

Especie	Proporción de cepas (%)	% L-málico consumido		Velocidad FML (mg/L/h)	
		12 g/L Etanol	14 g/L Etanol	12 g/L Etanol	14 g/L Etanol
<i>O. oeni</i>	64	100	100	25-40	20-28
	12	100	80-100	13-17	3-6
	4	100	<50	18	2
	4	80-100	80-100	4	4
<i>F. tropaeoli</i>	4	100	66	15	3
<i>L. mali</i>	4	100	73	15	3
<i>L. lindneri</i>	4	100	51	15	2
<i>L. plantarum</i>	4%	36	33	4	1

En base a los resultados de los test de resistencia a diferentes pH y etanol y a su velocidad fermentativa se seleccionaron las mejores cepas. No se detectaron genes de tres aminas biógenas en ninguna de las cepas estudiadas, lo que contribuye positivamente a su posible utilización como cepas estárter de FML. Por otro lado, los resultados de SNPs sugieren que la mayoría de las cepas estudiadas de *O. oeni* están agrupadas en un mismo clúster filogenético.

El inóculo que se preparó con las tres cepas con las mejores características realizó con éxito la FML en dos vinos de garnacha (1 semana) y dos de cariñena (1 mes), y se confirmó la imposición de dos de las cepas inoculadas en dicha FML.

4. Conclusiones

Se han aislado cepas de diversas especies de *Lactobacillus* de uva y de principio de FML, y una cantidad importante de cepas de *Oenococcus oeni* aisladas de FML, que son una fuente importante de estudio para la selección de estériles autóctonos del Priorat. En este trabajo se ha conseguido aislar *O. oeni* directamente de uva, hecho no referenciado hasta ahora. Esto ha sido posible gracias al exhaustivo muestreo, y sobretodo al uso de medios mucho más enriquecidos y de tiempos de incubación más prolongados. Además, se ha llevado a cabo la FML en garnacha y cariñena con éxito en bodega, utilizando como inóculo las tres cepas con mejores características.

5. Bibliografía

1. De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *In: J. Appl. Bacteriol.* 23:130-135.
2. Zapparoli, G., Torriani, S., Pesente, P., Dellaglio, F. 1998. Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *In: Lett. Appl. Microbiol.* 27:243-246.
3. Claisse, O., Lonvaud-Funel, A. 2014. Multiplex variable number of tandem repeats for *Oenococcus oeni* and applications. *In: Food Microbiol.* 38:80-86.
4. Rodas, A.M., Ferrer, S., Pardo, I. 2003. 16S-ADRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *In: System Appl. Microbiol.* 26:412-422.
5. Ruiz-Barba, J.L., Maldonado-Barragán, A., Jiménez-Díaz, R. 2005. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *In: Anal. Biochem.* 347:333-335.
6. Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., Rozès, N. 2010. Evaluation of a single and combined inoculation of a *Lactobacillus pentosus* starter for processing cv. *Arbequina* natural green olives. *In: Food Microbiol.* 27, 731-740.
7. Bordas, M., Araque, I., Alegret, J.O., El Khoury, M., Lucas, P., Rozès, N., Reguant, C., Bordons, A. 2013. Isolation, selection, and characterization of highly ethanol-tolerant strains of *Oenococcus oeni* from south Catalonia. *In: Inter. Microbiol.* 16:113-123.
8. El Khoury, M. 2014. Étude de la diversité des souches d'*Oenococcus oeni* responsables de la fermentation malolactique des vins dans différentes régions vitivinicoles, Thèse doctorale. Université de Bordeaux.
9. Nannelli, F., Claisse, O., Gindreau, E., De Revel, G., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P.M. 2008. Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. *In: Lett. Appl. Microbiol.* 47:594-599.

6. Agradecimientos

Se agradece la financiación del proyecto europeo Wildwine FP7-SME-2012-315065, en el que participan el Consejo Regulador de la DOC Priorat y la bodega Ferrer-Bobet. También se agradece la colaboración de las otras bodegas y fincas de las que se han obtenido las muestras. Judit Franquès disfruta de una beca predoctoral de la URV.

M34 - EFECTO DE LA AERACIÓN Y TEMPERATURA SOBRE LA ACLIMATACIÓN DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* AL ETANOL PARA SU USO COMO INICIADOR DE LA SEGUNDA FERMENTACIÓN

E. Miró-Abella, A. Borrull, M. Poblet, R. Cordero-Otero y N. Rozès

Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Enología, Universidad Rovira y Virgili, Campus Sescelades, 43007 Tarragona

nicolasrozes@urv.cat

RESUMEN:

La aclimatación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* al etanol es un paso obligatorio para garantizar la realización de la segunda fermentación en la producción de vinos espumosos. Dos son los factores que tienen un papel importante para conseguir una buena aclimatación de la levadura, la temperatura y la oxigenación. Ambos factores influyen de manera importante en la composición lipídica celular de las levaduras aclimatadas en presencia del etanol. Los resultados confirman que una temperatura de 15°C durante la aclimatación permite el buen desarrollo de las levaduras en un vino base definido fermentando a a 25°C con o sin la presencia de oxígeno. Estas condiciones pueden ser inducidas por una baja acumulación celular de ROS (*Reactive Oxygen Species*) y una composición lipídica más adaptada a las condiciones de la segunda fermentación, concentración elevada de etanol y ausencia de oxígeno durante todo el proceso de elaboración

Palabras clave: Viabilidad, ROS, Ácidos grasos, Esteroles.

1. Introducción

Para la elaboración de vinos espumosos son necesarias dos fermentaciones consecutivas, realizadas por la misma levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, inoculada a tiempos diferentes. La obtención del vino base, primera fermentación, está efectivamente controlada mediante el uso de levaduras secas activas (LSA), mientras que la segunda fermentación en botella presenta otros problemas ya que la levadura es la misma pero en este caso inoculamos en vino, a diferencia de la primera fermentación, que se inocula en mosto. Para ello es necesario reactivar y aclimatar la levadura a las condiciones de etanol, pH y temperatura en las cuales se realiza la segunda fermentación. La industria del sector utiliza protocolos para la aclimatación de la levadura al etanol que permiten, a partir de una LSA, obtener un pie de cuba eficiente [1, 2], no obstante existe poca información sobre qué factores tienen influencia en el proceso de aclimatación

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto conjunto de la temperatura (15, 25 y 35°C) y la aireación durante el proceso de aclimatación de las levaduras al etanol. La cepa estudiada en este trabajo es *S. cerevisiae* EC1118 siguiendo el protocolo establecido en la industria de los vinos espumosos.

El efecto de los factores temperatura y aeración durante la aclimatación celular se ha caracterizado a partir de la evaluación de la viabilidad, la acumulación de ROS intracelular y la composición en ácidos grasos y esteroides. También se ha evaluado el crecimiento de las células aclimatadas en un vino base definido.

2. Material y métodos

La cepa utilizada en este estudio es la EC1118 *Saccharomyces cerevisiae* (Lallemand SA, Montreal, Canadá), rehidratada de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las levaduras se activan en 30 ml de medio basal (150 g/l de sacarosa, 4 g/l $\text{PO}_4(\text{NH}_4)_2$, 20% (v/v) de vino sintético) bajo agitación (150 rpm) durante 24 horas, lo que corresponde a la fase 1 (P1). Posteriormente se completa este medio con 120 ml de medio basal (50 g/l de sacarosa y 84% (v/v) de vino sintético) para permitir que las células de levadura se aclimaten al etanol durante tres días, lo que corresponde a la fase 2 (P2). En P2 se realizan las condiciones OXI, crecimiento de la levadura en aerobiosis (1/3 del volumen total del recipiente con agitación) y condición NOXI, crecimiento en semi-anaerobiosis (4/5 del volumen total del recipiente sin agitación). La temperatura de aclimatación es de 15, 25 y 35°C.

Se determina la viabilidad de las células mediante citometría de flujo utilizando el kit LIVE/DEAD Viabilidad (Molecular Probes Inc., EE.UU.) en el equipo CyFlow® (PARTEC GmbH, Alemania) equipado con un láser de iones de 22 mW para la excitación (488 nm) según el método de [3]. Para determinar las especies reactivas de oxígeno (ROS) al microscopio, las células fueron pre tratadas con DHE (Molecular Probes) [4]. El glucógeno fue determinado por el método descrito por [5]. Los esteroides y el escualeno se determinan utilizando el método descrito por [6]. El análisis de los ácidos grasos se realizó mediante una modificación del método descrito por [4].

3. Resultados

La elaboración de los vinos espumosos implica una aclimatación de *Saccharomyces cerevisiae* al etanol para permitir un inicio rápido reproducible y seguro de la segunda fermentación. La temperatura es también otro factor importante para realizar este proceso. Para ello, células de *S. cerevisiae* fueron aclimatadas al etanol a 15, 25 y 35°C en presencia o ausencia de oxígeno. Se puede observar en la figura 1A que la viabilidad de las células es muy baja cuando la aclimatación se realiza a 35°C con o sin oxígeno. Por otro lado las células aclimatadas a 15°C sin oxígeno conservan la misma viabilidad que las células iniciales, es decir levadura rehidratada 30 min a 37°C.

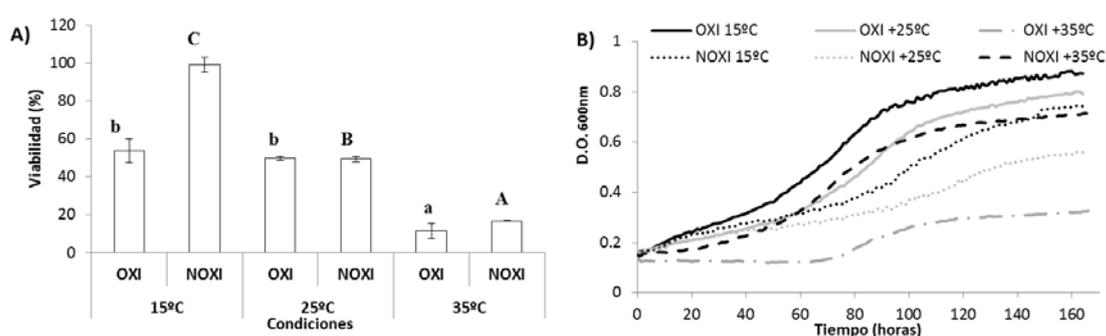


Figura 1. Viabilidad de las células después del proceso de aclimatación a 15, 25 y 35°C con o sin oxígeno (A) y crecimiento de las células aclimatadas en un vino base definido en presencia de 25 mg N/l a 25°C (B). OXI: cultivo en agitación constante; NOXI: cultivo sin agitación. Media \pm Error típico. Letras minúsculas y mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) para OXI y NOXI, respectivamente.

Se puede observar que el crecimiento de las células aclimatadas en un vino base depende de la temperatura de aclimatación (Fig. 1B). Parece ser que en estas condiciones (25°C, volumen muy pequeños, 250 μ l), la condición que permite un desarrollo rápido y alcanza una biomasa importante, es la aclimatación a 15°C en presencia de oxígeno. Por otro

lado las células aclimatadas a 35°C con oxígeno tuvieron una fase de latencia muy larga y un crecimiento débil.

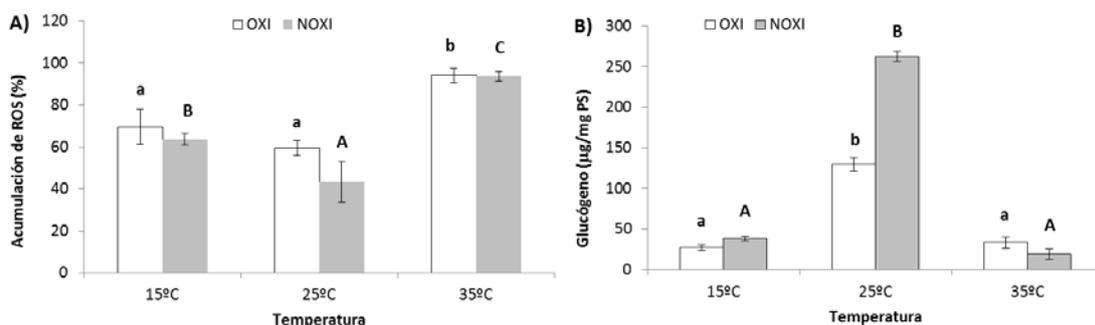


Figura 2. Acumulación de ROS (%) en las células después del proceso de aclimatación a 15, 25 y 35°C con o sin oxígeno (A) y concentración intracelular en glucógeno ($\mu\text{g}/\text{mg}$ Peso Seco) (B). OXI: cultivo en agitación constante; NOXI: cultivo sin agitación. Media \pm Error típico. Letras minúsculas y mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) para OXI y NOXI, respectivamente.

En la figura 2A se observa que la acumulación de ROS es significativamente más elevada a 35°C que en las otras temperaturas. Parece ser que el estrés oxidativo sea menor en las condiciones no oxigenadas. Cuanto al contenido intracelular de glucógeno (Fig. 2B), las células aclimatadas a la temperatura óptima tienen una concentración significativamente más elevada que a 15 y 35°C, independientemente de la oxigenación.

Se confirma que las células cultivadas en presencia de oxígeno tienen un grado de insaturación más elevado que en su ausencia (Fig. 3^a). También se puede observar un efecto significativo de la temperatura llevando a la levadura a una mayor proporción de insaturados a 15 y 35°C que a 25°C. El mismo efecto se observa cuando no hay oxígeno en el medio, condición NOXI: insaturación más elevada a 15 y 35 que a 25°C (Fig. 3^a). Por otra parte la longitud mediana de la cadena en ácido graso parece más larga a 15 y 35°C, en presencia o no de oxígeno, que a 25°C (Fig. 3B).

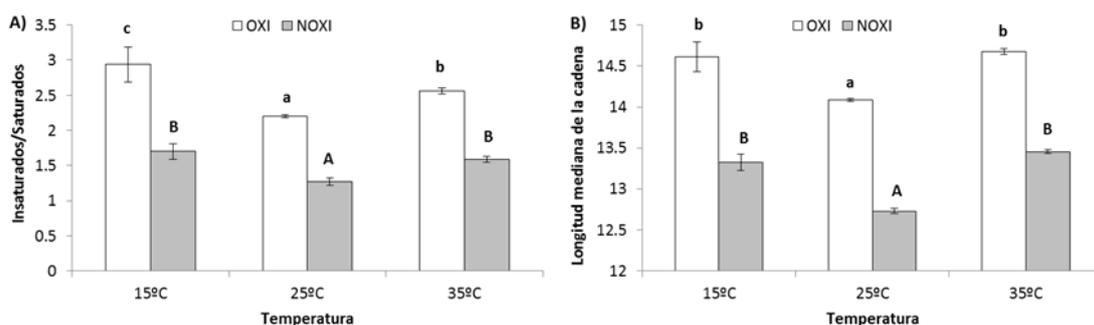


Figura 3. Efecto de la temperatura y aeración sobre el ratio insaturación/saturación (A) y la longitud mediana de la cadena en ácidos grasos (B). OXI: cultivo en agitación constante; NOXI: cultivo sin agitación. Media \pm Error típico. Letras minúsculas y mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) para OXI y NOXI, respectivamente.

En presencia de oxígeno la relación ergosterol/escualeno depende significativamente de la temperatura (Fig. 4A); más elevada es la temperatura, más se incrementa el ratio. En ausencia de oxígeno, este ratio es temperatura dependiente excepto en 35°C en la cual esta relación baja drásticamente. Además las células aclimatadas a 15°C con o sin oxígeno tienen un valor idéntico.

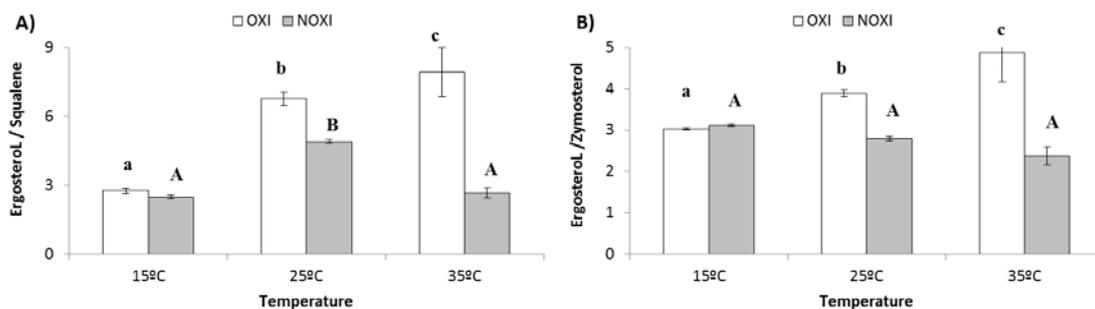


Figura 4. Efecto de la temperatura y aeración sobre el ratio ergosterol/escualeno (A) y ergosterol/zimosterol (B). OXI: cultivo en agitación constante; NOXI: cultivo sin agitación. Media \pm Error típico. Letras minúsculas y mayúsculas indican diferencias significativas ($P < 0.05$) para OXI y NOXI, respectivamente.

En la figura 4B, se puede observar la relación entre el contenido celular en ergosterol y zimosterol. El zimosterol es el principal esteroide de reserva de la levadura porque se encuentra en la célula en forma de éster de esteroide. Sin oxígeno, este ratio no se modifica significativamente por la temperatura de aclimatación. En presencia de oxígeno, la temperatura induce un incremento significativo de este ratio.

4. Conclusiones

Globalmente los resultados muestran que el efecto más perjudicial para obtener un buen desarrollo de las levaduras en el vino base, es la presencia de etanol a una temperatura de 35°C durante la aclimatación con o sin aeración. La aclimatación a 15°C parece dañar menos las células. Se tendría que confirmar este resultado para segundas fermentaciones realizadas a baja temperatura.

5. Bibliografía

1. Laurent, M., Valade, M., 1998. La propagation des levains de tirage. *Vignerons Champenois*. 3, 29-52.
2. Laurent, M., Valade, M., 2007. La préparation du levain de tirage à partir de levures sèches actives. *Vignerons Champenois*. 3, 75-95
3. López-Martínez, G., Borrull, A., Poblet, M., Rozès, N., Cordeo-Otero, R., 2014. Metabolomic characterization of yeast cells after dehydration stress. *Int. Microbiol.* 17, 131-139.
4. Borrull, A., Poblet, M., Rozès, N., 2015. New insights into the capacity of commercial wine yeasts to grow on sparkling wine media. Factor screening for improving wine yeast selection.
5. Quain DE, Tubb RS. A rapid and simple method for the determination of glycogen in yeast. *Journal of the Institute of Brewing*. 1983; 89:38-40. *Food Microbiol.*, 48, 41-48.
6. Quail, M.A., Kelly, S.L., 1996. The extraction and analysis of sterol from yeast. *Meth. Mol. Biol.* 53, 123-131.

6. Agradecimientos

AB quiere agradecer a la Universidad *Rovira i Virgili* para su beca de doctorado 2009BRDI / 12/13. EM quiere agradecer a la Universidad *Rovira i Virgili* para su beca de master DBB1AD1415.

M35 - INFLUENCIA DE LA INOCULACIÓN SECUENCIAL CON LEVADURAS No-*Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii*/*Metschnikowia pulcherrima*) y *Saccharomyces cerevisiae* SOBRE EL COLOR Y LA COMPOSICIÓN DEL VINO TINTO

Elena González-Royo¹, Francesca Fort¹, Carlos Suárez², José M^a Heras², Joan Miquel Canals¹ y Fernando Zamora¹

¹Universitat Rovira i Virgili/Facultat d'Enologia, departament de Bioquímica i Biotecnologia C/ Marcel·lí Domingo 1. 43007-Tarragona, España. fernando.zamora@urv.cat

²Lallemand Península Ibérica. C/ Zurbano, 71. Oficina 6. 28010. Madrid fernando.zamora@urv.cat

RESUMEN:

La utilización de levaduras No-*Saccharomyces* es un tema de candente actualidad en enología. Su empleo parece ser interesante ya que puede aportar a los vinos una mayor complejidad. El presente trabajo estudia la influencia de la inoculación secuenciada con dos levaduras No-*Saccharomyces*, *Torulaspora delbrueckii* y *Metschnikowia pulcherrima*, y *Saccharomyces cerevisiae* sobre el color y la composición del vino tinto. Los resultados indican que *T. delbrueckii* origina vino con mayor acidez total, con más glicerol y con una menor acidez volátil. Por su parte, *M. pulcherrima* origina vinos con mayor acidez total, con más glicerol, con un color y una concentración de antocianos algo inferior. En contrapartida generó una mayor concentración de Vitisina A y de polisacáridos.

Palabras clave: Inoculación secuenciada, No-*Saccharomyces*, *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, Vino tinto

1. Introducción

El empleo de levaduras No-*Saccharomyces* mediante cultivos mixtos o mediante inoculación secuenciada con *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los temas más de moda en la enología actual [1]. El objetivo es que el desarrollo controlado de especies de No-*Saccharomyces* en las primeras fases de la fermentación otorgue a los vinos algunas de las ventajas de la fermentación espontánea pero sin ninguno de sus inconvenientes [2,3]. Diversos estudios han demostrado que el desarrollo de levaduras No-*Saccharomyces* puede incrementar la producción de ciertos metabolitos deseables para la calidad del vino como serían los ésteres volátiles [4], el glicerol [5], los polisacáridos [6], e incluso disminuir la acidez volátil [7], la concentración de acetaldehído [8] o el rendimiento de producción de etanol [9]. Incluso recientemente se ha postulado que pueden ser útiles para mejorar la calidad y persistencia de la espuma en los vinos espumosos [10].

Actualmente existen en el mercado diversas levaduras No-*Saccharomyces* en forma de levadura seca activa a las que se les atribuyen diversos efectos positivos sobre la calidad del vino. No obstante, existen pocas referencias sobre su utilidad en la vinificación en tinto, especialmente en aquellos aspectos basados en su efecto sobre el color y los compuestos fenólicos. El objetivo del presente trabajo fue el de estudiar la influencia de la inoculación

secuenciada con dos levaduras No-*Saccharomyces*, *Torulaspota delbrueckii* y *Metschnikowia pulcherrima*, y *Saccharomyces cerevisiae* sobre el color y la composición del vino tinto.

2. Material y métodos

La experiencia se realizó con uvas de la variedad Cabernet Sauvignon procedentes del viñedo experimental de la Universidad Rovira i Virgili en Constantí (DO Tarragona). Con el fin de garantizar la homogeneidad entre los diferentes depósitos, los racimos fueron despalillados suavemente y los granos enteros recogidos en cestas. A continuación se llenaron 9 depósitos con 6 Kg de uvas cada uno. Esta operación se hizo manualmente a fin de mezclar las uvas de las diferentes cestas y conseguir de este modo una gran homogeneidad entre la materia prima de los diferentes depósitos. Las uvas fueron después estrujadas y ligeramente sulfitadas (2 g/hl). 3 tanques fueron inoculados con 25 g/hl de una cepa comercial de *S. cerevisiae* considerada como control (QA23[®], Lallemand Inc., Montreal, Canada). Otros 3 tanques se inocularon con 25 g/hl de *T. delbrueckii* (Biodiva[™], Lallemand Inc., Montreal, Canada) y 24 horas más tarde con 25 g/hl de la cepa de *S. cerevisiae* control. Finalmente, los tres depósitos restantes se inocularon con 25 g/hl de *M. pulcherrima* (Flavia[®], Lallemand Inc., Montreal, Canada), y 36 horas más tarde con la cepa de *S. cerevisiae* control. Las fermentaciones/maceraciones se desarrollaron a 27 °C mediante el método del sombrero sumergido [11]. Después de 15 días de maceración los vinos fueron descubados, sulfitados (4 g/hl) y estabilizados a 4 °C durante cuatro semanas.

Los parámetros estándar de los vinos se determinaron con los métodos recomendados por la OIV [12]. La intensidad colorante se determinó según lo descrito por Glories [13]. Los antocianos y pigmentos derivados se determinaron mediante HPLC–DAD [14]. Los polisacáridos se determinaron mediante HRSEC–RID [15].

3. Resultados

La Tabla 1 muestra el conjunto de los resultados obtenidos

Tabla 1. Parámetros analíticos de los diferentes vinos

Parámetro	<i>S. cerevisiae</i>		<i>T. delbrueckii</i> + <i>S. cerevisiae</i>		<i>M. pulcherrima</i> + <i>S. cerevisiae</i>	
	Valor	Letra	Valor	Letra	Valor	Letra
Etanol (% v/v)	14,3 ± 0,25	A	13,87 ± 0,29	A	14,5 ± 0,22	A
Acidez total tartárica (g/l)	5,9 ± 0,0	A	6,8 ± 0,2	B	6,3 ± 0,2	B
pH	3,62 ± 0,03	A	3,61 ± 0,01	A	3,64 ± 0,02	A
Acidez volátil (g/l)	0,41 ± 0,02	A	0,31 ± 0,02	B	0,40 ± 0,02	A
Glicerol (g/L)	8,7 ± 0,1	A	10,1 ± 0,7	B	9,7 ± 0,8	B
Intensidad colorante	22,7 ± 0,9	A	23,4 ± 0,7	A	21,1 ± 0,6	B
Antocianos monoglucosidos (mg/l)	279 ± 33	A	276 ± 21	A	252 ± 5	A
Antocianos acetilados (mg/l)	49 ± 5	A	50 ± 4	A	42 ± 2	A
Antocianos cumarilados (mg/l)	25 ± 3	A	25 ± 2	A	21 ± 1	A
Antocianos totales (mg/l)	377 ± 14	A	351 ± 27	A	315 ± 7	B
Vitisina A (mg/l)	8,29 ± 1,77	A	5,54 ± 1,13	A	11,72 ± 0,51	B
Vitisina B (mg/l)	3,17 ± 0,76	A	3,70 ± 0,51	A	3,64 ± 0,14	A
Polisacáridos totales (mg/l)	547 ± 46	A	571 ± 79	A	705 ± 40	B

Los vinos obtenidos mediante inoculación secuenciada con *T. delbreuckii* presentaron niveles de acidez total y glicerol significativamente mayores y una acidez volátil significativamente menor que su correspondiente control, siendo el resto de parámetros analizados similares. Los vinos obtenidos mediante inoculación secuenciada con *M. pulcherrima* presentaron también niveles de acidez total y glicerol también significativamente superiores a los fermentados únicamente con *S. cerevisiae*. Asimismo, presentaban una intensidad colorante y una concentración de antocianos totales algo inferior. En contraste su concentración en Vitisina A y en polisacáridos totales fue significativamente más alta.

4. Conclusiones

La inoculación secuenciada con las dos especies de levaduras No-*Saccharomyces* originó vinos ligeramente distintos de su control fermentado únicamente con *Saccharomyces cerevisiae*. Así tanto *Torulaspora delbrueckii* como *Metschnikowia pulcherrima* originaron vinos con mayor acidez total y una concentración de glicerol superior a su correspondiente control. Los vinos fermentados con *T. delbrueckii* presentaban una acidez volátil inferior. Los vinos fermentados con *M. pulcherrima* presentaban una intensidad colorante y una concentración de antocianos totales algo inferior, mientras que la concentración en Vitisina A y en polisacáridos totales fue superior.

5. Bibliografía

1. Jolly, N.P., Varela, C., Pretorius, I.S. 2014. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeast in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, 14, 215–237.
2. Ciani, M., Maccarelli, F. 1997. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 199–203.
3. Jolly, N.P., Augustyn, O.P.R., Pretorius, L.S. 2003. The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 24, 8–10.
4. Rojas, V., Gil, J., Piñaga, F., Manzanares, P. 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 181–188.
5. Sadineni-Naresh, V., Kondapalli, N., Obulam, V. 2012. Effect of co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima* on the aroma and sensory properties of mango wine. *Annals of Microbiology*, 62, 1353–1360.
6. Giovani, G., Rosi, I., Bertuccioli, M. 2012. Quantification and characterization of cell wall polysaccharides released by non-*Saccharomyces* yeast strains during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 160, 113–118.
7. Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D., Gallardo-Chacón, J.J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., Alexandre, H. 2012. Yeast–yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of sauvignon blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiology*, 32, 243–253.
8. Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., Dubourdieu, D. 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*–*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 312–320.
9. Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P.A., Chambers, P.J., Curtin, C., Varela, C. 2014. Evaluation of non-*Saccharomyces* yeast for the reduction of alcohol content in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 1670–1678.

10. González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Canals, J.M., Zamora, F. 2015. Oenological consequences of sequential inoculation with non-Saccharomyces yeasts (*Torulaspota delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *European Food Research and Technology* (2015) 240:999–1012.
11. Sampaio, T. L., Kennedy, J. A., Vasconcelos, M. C. 2007. Use of microscale fermentations in grape and wine research. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 534–539.
12. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (2014) *Methods of analysis of wines and must*. <http://www.oiv.int/oiv/info/enmethodesinternationalesvin>.
13. Glories, Y. 1984. *La couleur des vins rouges. 2ème partie: mesure, origine et interpretation*. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 18, 253–271.
14. Gil, M., Kontoudakis, N., González, E., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J.M., Zamora, F. 2012. Influence of Grape Maturity and Maceration Length on Color, Polyphenolic Composition, and Polysaccharide Content of Cabernet Sauvignon and Tempranillo Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60,7988–8001.
15. Ayestarán, B., Guadalupe, Z., Leon, D. 2004. Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Analytica Chimica Acta*, 513, 29-39.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la empresa Lallemand Bio,S.L.

M37 - CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD DE INCORPORACIÓN DE GLUTATIÓN Y DE SU EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO EN CEPAS DE *OENOCOCCUS OENI*

Mar Margalef, María Isabel Araque, Albert Bordons, Cristina Reguant

Universitat Rovira I Virgili, Dept. Bioquímica i Biotecnologia, C/ Marcel·lí Domingo, 1, 43007, Tarragona
mariadelmar.margalef@urv.cat

RESUMEN:

En este trabajo se evaluó la capacidad de incorporación de glutatión del medio en 30 cepas diferentes de *O. oeni*. Los resultados indican que todas las cepas tienen capacidad de incorporar GSH, aunque se observa una notable diversidad en la cantidad de GSH captado. Un 25% de las cepas estudiadas acumulan una cantidad de GSH intracelular unas cuatro veces superior que las cepas con menor capacidad de captación. También se evaluó el crecimiento con y sin GSH en condiciones de bajo pH y presencia de etanol. En todos los casos las cepas que podían captar el GSH presentaban un mayor crecimiento.

Palabras clave: *Oenococcus oeni*, GSH, captación, vino.

1. Introducción

El glutatión (GSH) es un tripéptido con carácter antioxidante, presente en todos los organismos vivos, asociado a la protección de la célula frente al estrés oxidativo. Tiene numerosas funciones metabólicas, como reducir los enlaces disulfuro de proteínas a cisteínas [1]. En procariontes se encuentra principalmente en Gram negativas. Las Gram positivas no pueden sintetizarlo, exceptuando *Streptococcus* y *Enterococcus* [2].

En *Oenococcus oeni*, la bacteria láctica principal responsable de la fermentación maloláctica (FML), se ha descrito que en condiciones de estrés asociadas al vino, la enzima glutatión reductasa (GshR), que reduce el GSH oxidado, aumenta su concentración [3]. También se vio un incremento de GshR en un estudio proteómico de células liofilizadas de *O. oeni* [4]. De estos resultados se deduce que el GSH participaría en el proceso de adaptación de *O. oeni* a las condiciones del vino. Como otras bacterias lácticas, *O. oeni* no posee la capacidad de sintetizar el GSH pero puede incorporarlo del medio [5]. El efecto antioxidante del GSH podría ayudar a las bacterias a mantener o mejorar su estado celular para desempeñar posteriormente la FML en el vino. Factores de estrés asociados al vino, como pH bajo y concentración elevada de etanol, dificultan la acción de *O. oeni* y ponen trabas a su supervivencia.

En este trabajo se evaluó la capacidad de incorporación de GSH del medio en 30 cepas de *O. oeni*. En base a los resultados obtenidos se seleccionaron dos cepas, 3P2 (con mayor capacidad de incorporación de GSH) y CECT 217^T con menor capacidad. En estas cepas se estudió el efecto de la adición de GSH sobre su crecimiento en diversas condiciones del vino.

2. Material y métodos

Entre las 30 cepas analizadas en este estudio se encuentra la cepa PSU-1, la cepa tipo CECT 217^T, cepas comerciales y algunas aisladas de vinos del Priorato y de Tarragona (Cataluña) de la colección propia. El medio de cultivo utilizado para los crecimientos fue MRS modificado con ácido D,L-málico y fructosa (4 y 5 g/l respectivamente), y se añadió 5mM de GSH al medio de cultivo. Los crecimientos celulares se realizaron en 50 ml y se siguieron hasta obtener la DO máxima a 600nm. Se centrifugaron dos muestras de 30 ml de cada cultivo y se lavaron con PBS1x en frío. Una de las muestras sirvió para la determinación del GSH total y la otra para la determinación del glutatión oxidado (GSSG), por lo cual se añadió un bloqueador del GSH reducido (2-vinil-piridina). Los pellets se guardaron a -80°C. Para la extracción se siguió el protocolo descrito para extraer el GSH por Glutathione Assay Kit (CatalogN.CS0260) con algunas modificaciones, rompiendo las células con perlas de vidrio. Los extractos se guardaron a -80°C. Para determinar la cantidad de GSH oxidado y reducido intracelular se usó el protocolo de fluorescencia de Collin et al. 2003. La intensidad fluorescente fue medida (485 excitación/520 emisión) en un lector de placas (Polarstar Omega de BMG Labtech). Las concentraciones de GSH medido fueron calculadas respecto al peso húmedo del pellet de la muestra, teniendo en cuenta el volumen final de extracto obtenido.

Algunas de las cepas posteriormente se utilizaron para ver el efecto del GSH a diferentes pH y en presencia de etanol. El medio de cultivo utilizado fue MRS modificado (con málico y fructosa) y con menos nitrógeno. La reducción de la concentración de compuestos proteicos se hizo para evitar precipitados indeseables durante el ensayo a diferentes pHs.

3. Resultados

En las 30 cepas de *O. oeni* analizadas se comprobó una gran variabilidad en la captación de GSH del medio. El GSSG no se detectó en todas las muestras, y en las muestras sin GSH añadido no se pudieron determinar los valores de GSH. El análisis reveló 4 cepas con una alta capacidad para captar el antioxidante (Fig. 1). Entre ellas el valor máximo se obtuvo en la cepa 3P2, aislada en vino del Priorat. También daban un valor alto una comercial (Alfa) y dos cepas de la colección propia (1P1 y UB51).

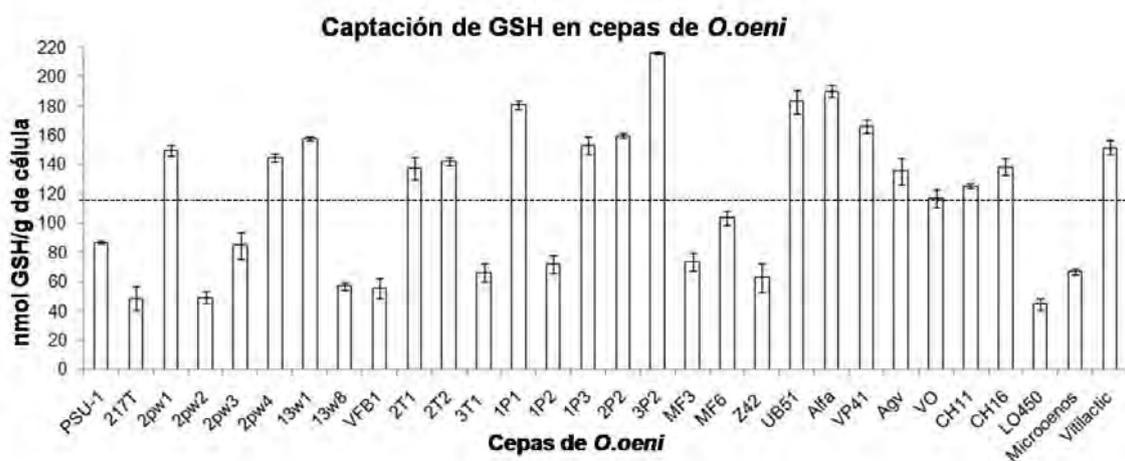


Fig.1 Captación de GSH intracelular en cepas de *O. oeni*. El gráfico muestra la cantidad en nmol de GSH reducido por g de célula detectado intracelularmente. La línea negra indica el valor medio de captación de las 30 cepas.

Como se observa, de las 9 cepas comerciales probadas, 6 dieron por encima de la media mientras que dos presentaron unos valores de hasta 4 veces inferiores a los valores

máximos. La cepa tipo CECT 217^T es una de las que presenta una captación menor, hecho que puede ser causa de su crecimiento lento.

Para evaluar el efecto protector del glutatión (GSH) sobre *O. oeni* se eligieron tres cepas (PSU-1, 3P2 y 217^T), con un comportamiento diferente en cuanto a la captación del GSH y se midió el crecimiento en diferentes condiciones de pH y concentración de etanol. En los cultivos sin etanol (control a pH 5) ya se apreciaron diferencias en el crecimiento de las tres cepas (DO_{max}) que alcanzaron en presencia de GSH, especialmente 3P2. En 6% de etanol la DO_{max} fue superior en las células con GSH. Con 12% de etanol el crecimiento fue prácticamente nulo con y sin GSH añadido.

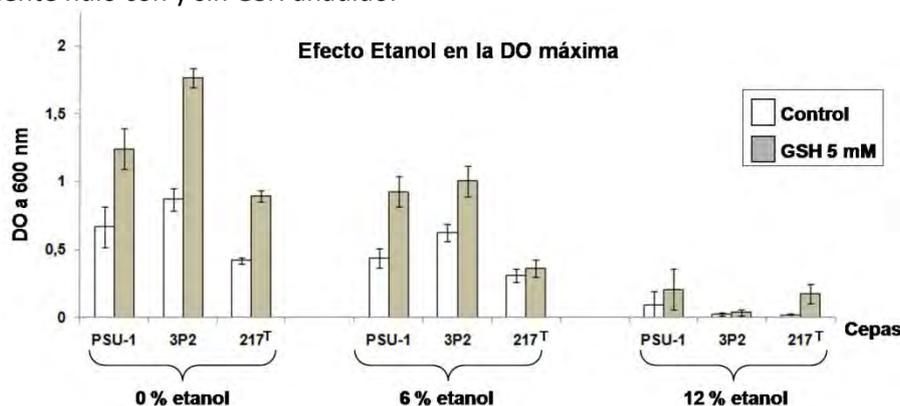


Fig.2 Efecto del etanol en el crecimiento de 3 cepas de *O. oeni*. Las barras blancas corresponden a los crecimientos de las 3 cepas sin GSH y las barras grises representan los crecimientos con 5mM de GSH en los diferentes medios con etanol. Los valores mostrados son las medias de los triplicados realizados.

Respecto al efecto del pH (Fig. 3), las diferencias observadas en la DO_{max} en la condición control (pH 5) se mantuvieron a pH 4 e incluso incrementaron para las cepas PSU-1 y 217^T. A pH 4, las diferencias de DO_{max} en los cultivos con GSH respecto a los que no tienen son notablemente más elevadas en las cepas PSU-1 (67 % más) y la cepa 217^T (54 % más), a pesar de que la cepa que presenta una DO_{max} superior es 3P2. El crecimiento se inhibe notablemente a pH 3,4 aunque sigue la misma tendencia de aumento de crecimiento cuando hay mayor captación de GSH por parte de la cepa analizada.

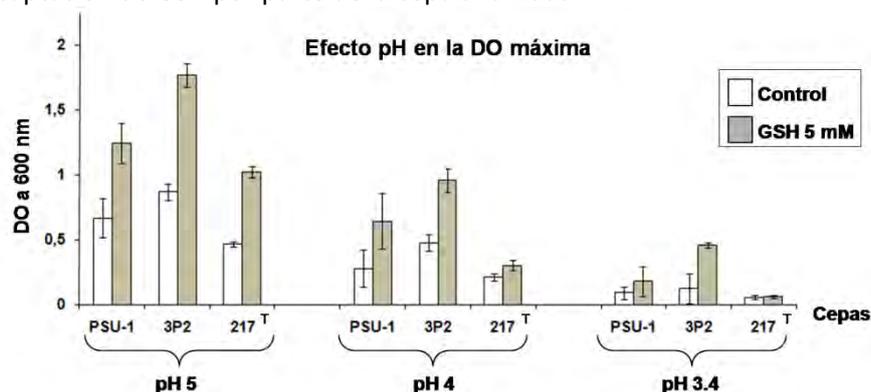


Fig.3 Efecto del pH en el crecimiento de 3 cepas de *O. oeni*. Las barras blancas corresponden a los crecimientos de las 3 cepas sin GSH y las barras grises representan los crecimientos con 5mM de GSH en los diferentes medios a diversos pHs. Los valores mostrados son las medias de los triplicados realizados.

4. Conclusiones

La captación de GSH por parte de las cepas de *O. oeni* analizadas fue muy diversa. Se pudieron identificar algunas cepas con una captación hasta 4 veces superior a las cepas con menor capacidad de incorporar GSH. En base a los resultados obtenidos, se han seleccionado tres cepas como modelo de estudio de la diferente capacidad de captación de GSH: 3P2 mayor, PSU-1 media y CECT 217^T menor. Además, estas cepas presentan una actividad maloláctica diferente. En las mismas condiciones, la cepa 3P2 realiza la fermentación maloláctica (FML) más rápido, mientras que las cepas PSU-1 y especialmente 217^T son más lentas. A pesar de ello, la relación entre una FML más rápida y una mayor capacidad de captación de GSH no se ha observado en todas las cepas estudiadas. Sin embargo sí se ha apreciado una relación positiva con la velocidad de crecimiento.

Los cultivos en los que se añadió GSH alcanzaron una mayor cantidad de biomasa que los cultivos sin GSH aunque hubiese algún factor de estrés. Por ello la adición de glutatión podría mejorar la preparación de preinóculos de *O. oeni* para vino.

5. Bibliografía

1. Masip L.; Veeravalli K. & Georgiou G. 2006. The many faces of glutathione in bacteria (Forum Review). *Antioxid. Redox Signal.* 8, 5, 753-762
2. Smimova G.V. & Oktyabrsky O.N. 2005. Glutathione in Bacteria. *Biochem-Moscow.* 70, 11, 1199-1211
3. Silveira M.G.; Baumgärtner M.; Rombouts F.M. & Abee T. 2004. Effect of adaptation to ethanol on cytoplasmic and membrane protein profiles of *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5, 2748-2755
4. Cecconi D., Milli A., Rinalducci S., Zolla L. & Zapparoli G. 2009. Proteomic analysis of *Oenococcus oeni* freeze-dried culture to assess the importance of cell acclimation to conduct malolactic fermentation in wine. *Electrophoresis.* 30, 2988-2995
5. Rathberger M., Araque I., Olgúin N., Bordons A. & Reguant C. 2009. Estudio de la capacidad de captación de glutatión por *Oenococcus oeni* en diferentes fases de crecimiento y su efecto sobre la respuesta al estrés oxidativo. *XXII Congreso Nacional de Microbiología SEM, Almería.*
6. Collin C., Viernes H., Krejsa C., Botta D. & Kavanagh T. 2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Analytical Biochemistry.* 318 (2):175-80.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación del proyecto AGL2012-34866 del MINECO. Maria del Mar Margalef disfruta de una beca predoctoral de la URV.

M38 - USO DE LA ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE TRANSFORMADA DE FOURIER- REFLECTANCIA TOTAL ATENUADA COMBINADA CON ANALISIS MULTIVARIANTE PARA EL ESTUDIO DE LEVADURAS EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE VINO

Miquel Puxeu¹, Anna Brull¹, Imma Andorrà¹, Sílvia de Lamo-Castellvi²

¹ Parc Tecnològic del Vi, Carretera de Porrera, Km.1, 43730 Falset, Spain

² Universitat Rovira i Virgili, Departament d'Enginyeria Química, Avinguda Països Catalans, nº26, 43007 Tarragona, Spain

silvia.delamo@urv.cat

RESUMEN:

La espectroscopia infrarroja de Transformada de Fourier - Reflectancia Total Atenuada (ATR-FTIR) permite obtener información acerca de los componentes celulares de los microorganismos. El objetivo del presente trabajo es mostrar el potencial de la técnica ATR-FTIR combinada con el análisis multivariante para i) discriminar diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y determinar qué cambios bioquímicos se producen durante sus diferentes etapas fisiológicas en un proceso de fermentación alcohólica, ii) evaluar el efecto de la adición de nitrógeno (orgánico e inorgánico) al principio del proceso de fermentación y iii) discriminar entre diferentes cepas autóctonas de *S. cerevisiae* y cepas de levaduras No-*Saccharomyces* aisladas de variedades de uva de cinco regiones españolas.

Palabras clave: ATR-FTIR, *Sacharomyces cerevisiae*, mosto, fermentación alcohólica.

1. Introduction

La técnica de espectroscopia infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR) ha sido ampliamente utilizada en el sector de la elaboración del vino como método rápido para determinar los parámetros de control tales como grado alcohólico, ácido acético, pH, y la acidez total (1). También ha sido utilizada para realizar una amplia variedad de análisis tales como la predicción de color, clasificar los vinos en función de su origen, y determinar compuestos fenólicos (2). Acoplada con la Reflectancia Total Atenuada (ATR-FTIR) puede ser utilizada para el análisis de microorganismos, proporcionando bandas relacionadas con sus componentes celulares, principalmente su membrana y pared celular permitiendo su clasificación (3). La técnica de ATR-FTIR se ha utilizado para detectar *Alicyclobacillus* en zumo de frutas, *Lactobacilli* en carne y queso, y *Salmonella* en jugo de manzana (4). En el campo de la enología, otros autores han estudiado la autólisis de *Saccharomyces cerevisiae* en vinos espumosos (5,6). La aplicación de ATR-FTIR para el estudio de microorganismos durante las diferentes etapas de elaboración sería de gran interés para el sector vitivinícola. La técnica ATR-FTIR presenta varias ventajas para ser utilizada como método rápido para investigar microorganismos, tales como tiempo de análisis cortos, mínima preparación de la muestra y baja formación del personal. El objetivo del presente trabajo es estudiar el potencial de la técnica de ATR-FTIR combinada con el análisis multivariante para i) discriminar las diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y determinar los cambios bioquímicos que experimentan en diferentes etapas fisiológicas durante un proceso de fermentación alcohólica, ii) evaluar el impacto de la adición de nitrógeno (inorgánico y orgánico) como nutriente a principio de la fermentación y iii) discriminar entre diferentes levaduras autóctonas *S. cerevisiae* y No-*Saccharomyces* aisladas de seis variedades de uva procedentes de cinco regiones españolas.

2. Materiales y métodos

El primer de los estudios la fermentación alcohólica se ha realizado utilizando 150ml de mosto clarificado de Garnacha blanca (Terra Alta, España) y Chardonnay (Costers del Serge, España). Se han utilizado tres cepas de levaduras *S. cerevisiae* (E491, ES454 y ES181). Todos los ensayos se han realizado por triplicado, realizando un total de 18 fermentaciones. Los tiempos de muestreo han sido 48, 120 y 198 h en el caso de la variedad Chardonnay y 172 y 344 h en el caso de Garnacha blanca. El segundo estudio se ha realizado utilizando una única levadura (*Zymaflore X5*), un único mosto de Garnacha blanca (Terra Alta, España) y dos nutrientes comerciales, el primero formado por nitrógeno orgánico (Nutristart OrganicQ) y el segundo formado por nitrógeno inorgánico (Thiazote). Igual que en el primer estudio, las fermentaciones se han realizado por triplicado, realizando un total de 6 fermentaciones y muestreos a 0, 18, 42 y 90 h. En el tercer y último estudio se han aislado 39 cepas de levaduras de seis variedades de uva procedentes de cinco regiones vitivinícolas españolas a partir de fermentaciones espontaneas. Las diferentes cepas han sido aisladas mediante cultivo en placa y caracterizadas mediante técnicas moleculares (identificación de elementos delta y rDNA-RFLP). Posteriormente, los cultivos puros han sido inoculados en mosto de tempranillo (Rioja, España) y analizados mediante ATR-FTIR a las 48h des de su inoculación. Igual que en los casos anteriores las fermentaciones se han realizado por triplicado con volúmenes de 5ml.

En los tres estudios las muestras se han preparado por centrifugación (15.900 g durante 5 min) y se han lavado tres veces usando 1 ml de solución salina (0,88% NaCl) con el fin de obtener pellets limpios y libres de polifenoles, antocianos, ácidos orgánicos y otros compuestos que pudieran actuar como interferentes en el espectros de infrarrojo. Después del proceso de limpieza, en los estudios 1 y 2 se depositó 1.5 μ l de pellet sobre el cristal de ZnSe, y en el estudio 3 1.5 μ l de pellet sobre el cristal de Diamante. Por cada muestra, se adquirieron un mínimo de seis espectros por experimento y día en la región del infrarrojo de 4000-800 cm^{-1} . Los espectros se exportaron al software de análisis multivariante Pirouette. Se utilizó Soft Independent Modeling Class of Analogues (SIMCA) para construir un modelo predictivo basado en la construcción de modelos de PCA separados para cada clase. Los modelos SIMCA fueron interpretados en base a proyecciones de clase (representación tridimensional de los clústeres basados en los scores de PCA) y poder de discriminación entre clases (variables con mayor efecto en la clasificación) y la distancia entre clases.

3. Resultados

En los tres estudios la técnica de ATR-FTIR aporta importante información sobre los cambios experimentados a nivel de composición de las levaduras. En el primer de los estudios, se diferencian las tres levaduras utilizadas entre ellas y entre los diferentes estados fisiológicos (fase exponencial temprana, exponencial y estacionaria) en ambas matrices. En la fase exponencial los principales compuestos de la pared celular fueron manoproteínas, glucanos y lípidos mientras que en la fase estacionaria fueron principalmente glucanos y manosas. En el segundo estudio, fue posible detectar los cambios en la pared celular en las fermentaciones con distinta adición de nutrientes. En la adición de nitrógeno orgánico los principales cambios durante la fase exponencial y estacionaria fueron producidos por ácidos nucleicos mientras que cuando se adicionó nitrógeno inorgánico los principales cambios fueron en las estructuras de proteínas en la fase exponencial y en los esterés de ácidos grasos en la fase estacionaria. En el tercer estudio se discriminaron entre las 30 cepas *Saccharomyces* aisladas de las diferentes regiones vitivinícolas de estudio. Las principales bandas de infrarrojo que permitieron la discriminación fueron las relacionadas con la vibración de los enlaces N-H y C-N de los grupos amidas secundarias de péptidos, vibraciones de C=O de los grupos amida primaria relacionadas con distintas estructuras de proteínas y enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ de β -glucanos.

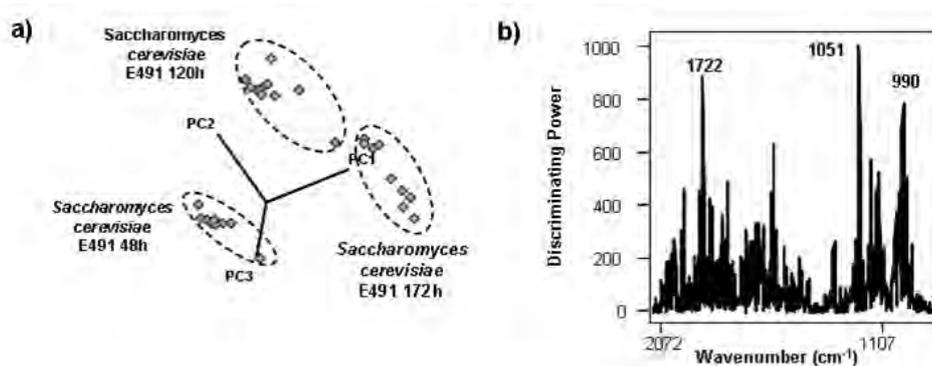


Figura 1. a) Proyección de clases y poder de discriminación para la cepa de *S. cerevisiae* a 48h (fase exponencial temprana), 120h (fase exponencial) y 172h (fase exponencial). b) Poder de discriminación

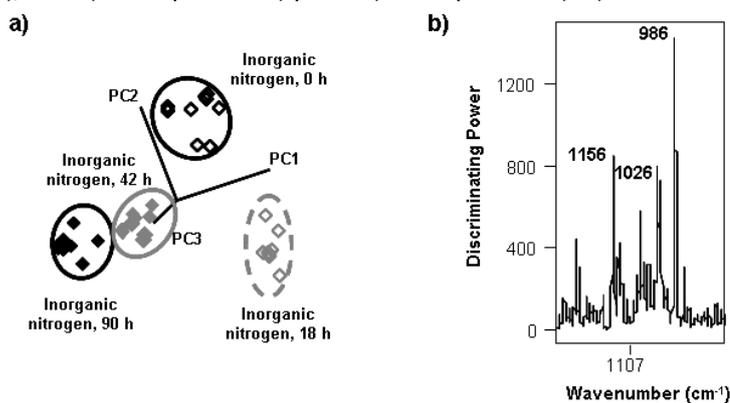


Figura 2. a) Proyección de clases y poder de discriminación para la cepa de *S. cerevisiae* a los diferentes tiempos de fermentación utilizando nitrógeno inorgánico. b) Poder de discriminación

En el caso de las especies *No-Saccharomyces* se discriminaron correctamente mediante la técnica ATR-FTIR siendo las bandas de infrarrojo responsables de la discriminación las relacionadas con los enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ de β -glucanos y enlaces de amidas primarias y secundarias. En la siguiente Figura 1, se muestra la proyección de clases (a) y el poder de discriminación (b) por la cepa E491 en mosto Chardonnay. Se observa una clara diferenciación entre los diferentes estados fisiológicos 48h, 120h y 198h. Los principales cambios a nivel de pared celular experimentados por la levadura que permiten la diferenciación entre fases se atribuyen a las bandas de infrarrojo 1051, 1722 y 990 cm^{-1} que están relacionadas con la vibración de los enlaces de manosas, estiramiento de los enlaces de C-O en esteres de lípidos y β -glucanos $\beta(1\rightarrow6)$ respectivamente, todos presentes en la pared celular. En el estudio de adición de nutrientes comerciales al inicio de fermentación el uso de la técnica ATR-FTIR, permitió detectar que los principales cambios a nivel de pared celular durante la fase exponencial y estacionaria cuando se utiliza nitrógeno orgánico, estaban relacionados con ácidos nucleicos y esteres de lípidos mientras que cuando la fuente de nitrógeno fue inorgánica los principales cambios durante la fase exponencial estaban relacionados con las estructuras de las proteínas y durante la fase estacionaria relacionadas con los esteres de lípidos. En la siguiente Figura 3 (a) se muestra el poder de discriminación de las 30 cepas *S. cerevisiae*. La técnica de estudio permitió crear dos modelos, uno por levaduras *Saccharomyces* y otro por *No-Saccharomyces* sin interferencias entre ellos. Se puede observar en la Figura 3 (a) como las principales bandas de infrarrojo responsables de la separación de las cepas *S. cerevisiae* son 1558, 1684, 1642 y 1032 cm^{-1} , estas están relacionadas con vibraciones de enlaces N-H y C-H de proteínas, vibración de C=O también de proteína y con estructuras de amidas primarias y glucanos $\beta(1\rightarrow4)$ respectivamente.

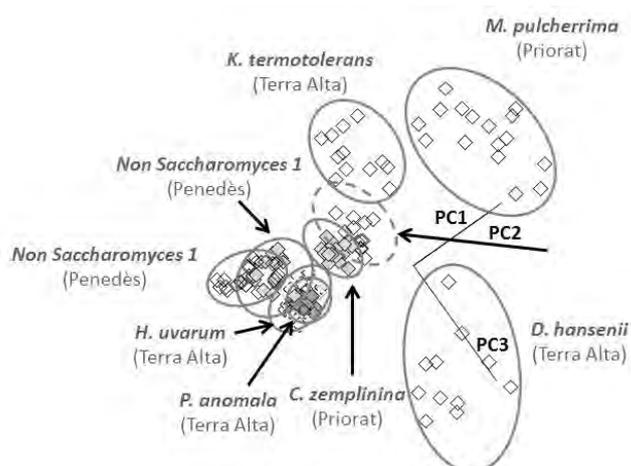


Figura 3. a) Proyección de clases y poder de discriminación para las cepas No-*Saccharomyces*.

4. Conclusiones

El primer estudio muestra resultados prometedores de la técnica ATR-FTIR para discriminar entre distintas cepas *S. cerevisiae* así como para estudiar los cambios bioquímicos que se producen durante el proceso de fermentación. El segundo estudio muestra la habilidad de la técnica para detectar los cambios producidos por diferentes nutrientes comerciales en la composición de la pared celular de levaduras durante la fermentación. Y el tercer estudio muestra la capacidad para la discriminación de diferentes cepas y especies autóctonas de levaduras durante la fermentación alcohólica.

5. Bibliografía

1. Ferreira, M. L., Costa, A. M., Ribeiro, N., Simoes, T., & Barros, P. 2009. Quality control in FTIR wine analysis acceptance of analytical results. *Ciencia e Técnica Vitivinícola*, 24, 47–53.
2. Laghi, L., Versari, A., Parpinello, G.P., Nakaji, D.Y., & Boulton, R.B. 2011. FTIR spectroscopy and direct orthogonal signal correction preprocessing applied to selected phenolic compounds in red wines. *Food Analytical Methods*, 4, 619–625.
3. Baldauf, N. A., Rodriguez-Romo, L. A., Männig, A., Yousef, A. E., & Rodriguez-Saona, L. E. 2007. Effect of selective growth media on the differentiation of *Salmonella enterica* serovars by Fourier transform mid-infrared spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 68, 106–114.
4. Oust, A., Moretto, T., Kirschner, C., Narvhus, J. A., & Kohler, A. 2004. FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli. *Journal of Microbiological Methods*, 59, 149–162.
5. Burattini, E., Cavagna, M., Dell'Anna, R., Malvezzi Campeggi, F., Monti, F., Rossi, F., & Torriani, S. 2008. A FTIR microspectroscopy study of autolysis in cells of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Vibrational Spectroscopy*, 47, 139–147.
6. Cavagna, M., Dell'Anna, R., Monti, F., Rossi, F., & Torriani, S. 2010. Use of ATR-FTIR microspectroscopy to monitor autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* cells in a base wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 39–45.

6. Agradecimientos

Los autores quieren agradecer al programa AIRE (2009AIRE/06) y al Departamento de Ingeniería Química de la Universidad Rovira i Virgili por el apoyo financiero así como al Ministerio de Ciencia e Innovación, Proyecto PTQ-10-03144.

M39 - LEVADURAS AUTÓCTONAS PARA PRODUCIR VINOS LIBRES DE DIÓXIDO DE AZUFRE

Laura Martín, Jennifer Tomé, Miquel Puxeu, Anna Brull, Enric Nart, Imma Andorrà

¹ Fundació Parc Tecnològic del vi, VITEC. Carretera de Porrera, km 1, 43730, Falset.
email: imma.andorra@vitec.cat

RESUMEN:

Se han identificado y caracterizado diferentes levaduras autóctonas propias de una bodega de la D.O.C. La Rioja para producir vino sin dióxido de azufre y que mejore las cualidades organolépticas del vino. Este estudio se divide en dos fases. En la primera fase de estudio se aislaron, identificaron y caracterizaron a escala de laboratorio diferentes cepas de levaduras autóctonas. En la segunda fase se realizaron 5 microvinificaciones a escala semi-industrial: dos con las cepas que presentaron mejores características fermentativas y de imposición, una inoculando las 14 cepas autóctonas del estudio (simulando condiciones de fermentación espontánea) y dos microvinificaciones control con una levadura comercial (con y sin adición de dióxido de azufre). Todos los vinos obtenidos se analizaron química, microbiológica y sensorialmente, con el objetivo de determinar la influencia de las levaduras autóctonas. En todos los casos la cantidad de dióxido de azufre presente al final de la fermentación alcohólica fue inferior a 10 mg/l.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, levaduras autóctonas, dióxido de azufre.

1. Introducción

Las levaduras no sólo conducen la fermentación alcohólica, en lo que respecta a la producción de etanol y dióxido de carbono (CO₂), sino que tienen gran influencia sobre la calidad del vino y en particular sobre las características aromáticas del producto [1]. La calidad de los vinos es una consecuencia directa de la evolución de la flora microbiana durante la fermentación [2]. La microflora de la uva varía constantemente en función de la variedad de uva, condiciones climáticas, prácticas vitícolas, estado de maduración, daño físico de la uva (causado por hongos, insectos y pájaros) y de los fungicidas aplicados [3]. Debido a esta variabilidad realizar una fermentación espontánea, sin inocular ningún tipo de levadura puede conducir problemas de fermentación, con fermentaciones lentas, paradas de fermentación o bien problemas de reproducibilidad de los vinos. Las levaduras autóctonas como cultivos iniciadores permiten la obtención de un producto más diferenciado y característico de la zona. Estas levaduras, que son específicas del área, están totalmente adaptadas a las condiciones climáticas de la zona, a la materia prima y responsables, parcialmente, de las características únicas de los vinos obtenidos [4, 5].

El dióxido de azufre (SO₂) es la molécula comúnmente conocida como sulfuroso, se utiliza principalmente por sus características como agente antimicrobiano, antioxidante y antioxidásico. Este compuesto se puede añadir en el vino de diferentes formas pero también se puede producir por parte de las levaduras. Diferentes cepas de *S. cerevisiae* producen diferentes cantidades de dióxido de azufre, desde pocos mg/l hasta más de 90 mg/l, dependiendo de las condiciones de fermentación y de la cepa de levadura. Sin embargo, el

dióxido de azufre puede tener un impacto negativo en la calidad sensorial del vino, puede retardar el inicio de la fermentación maloláctica y causar algunos problemas de salud en personas sensibles. Por estos motivos existe una tendencia actual en disminuir o eliminar los niveles de dióxido de azufre en el vino. Se considera que una botella tiene sulfitos si sus niveles sobrepasan los 10 mg/l [6].

El objetivo del presente estudio es la obtención de levaduras autóctonas de la D.O.C. La Rioja de la variedad Tempranillo para producir vinos libres de dióxido de azufre y validar el uso de estas levaduras a escala semiindustrial con mosto de la propia bodega siguiendo las condiciones de vinificación de la bodega.

2. Material y métodos

2.1. Aislamiento e identificación de levaduras autóctonas

Se realizaron fermentaciones espontaneas de la variedad Tempranillo procedente de Bodegas Roda S.A. a 25°C. Durante el transcurso de la fermentación alcohólica se aislaron un total de 216 colonias de levaduras en medio de cultivo YPDA (2% glucosa, 2% peptona, 1% extracto de levadura, 2% agar). Se identificaron las distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* mediante la técnica de amplificación de los elementos delta [7].

2.2. Caracterización de levaduras autóctonas

Para la caracterización de las capacidades fermentativas de diferentes levaduras autóctonas se realizaron diferentes fermentaciones inoculando cultivos puros con las cepas autóctonas aisladas e identificadas. Posteriormente se determinó la capacidad de imposición de las diferentes cepas mediante inoculaciones masivas con todas las cepas. En todos los casos la concentración final fue de 2×10^6 cel/ml. Las fermentaciones se realizaron a escala de laboratorio con mosto concentrado. La evolución de las fermentaciones se monitorizó mediante pérdida de densidad, recuento de levaduras totales y viables. Al final de todas las fermentaciones se realizó un estudio de imposición de la cepa inoculada. En el vino resultante se determinaron diferentes parámetros químicos: ácido acético, acidez total tartárica, glucosa/fructosa residual, pH, y grado alcohólico según los métodos descritos por la OIV.

2.3. Vinificación con levaduras autóctonas

Se utilizó la variedad Tempranillo procedente de Bodegas Roda S.A. Se realizaron 5 microvinificaciones a 25°C en depósitos de 30 litros: dos con las cepas que presentaron mejores características fermentativas y de imposición (P3 y P5), una inoculando las 14 cepas autóctonas del estudio, simulando condiciones reales de fermentación espontanea en bodega y dos microvinificaciones control con una levadura comercial, con baja producción de dióxido de azufre. Todas las microvinificaciones se realizaron por triplicado sin adición de dióxido de azufre, excepto un control. Los tanques de fermentación se inocularon a una concentración de 2×10^6 cel/ml. Diariamente se monitorizó la densidad, población de células totales, mediante contajes al microscopio y población de células viables mediante placa de cultivo con medio YPDA (2% glucosa, 2% peptona, 1% extracto de levadura, 2% agar, w/v; cultimed, Barcelona, España). La fermentación se consideró finalizada cuando los azúcares fueron inferiores a 0.5 g/l. Una vez finalizada la fermentación los vinos se embotellaron y se almacenaron a 14 °C hasta su análisis químico, microbiológico y sensorial. El análisis sensorial se realizó mediante un panel de cata de 10 catadores entrenados. En el diseño de las sesiones de cata y el análisis de resultados se ha utilizado el software de análisis sensorial FIZZ (ver. 2.46B; Biosystèmes, Couteron, France).

3. Resultados

En la primera fase se han aislado un total de 216 colonias de las cuales un total de 14 cepas presentaron un perfil genético diferente entre ellas y a las comerciales. En la figura 1 se observa el perfil de elementos delta de las diferentes cepas de *S. cerevisiae* autóctonas.

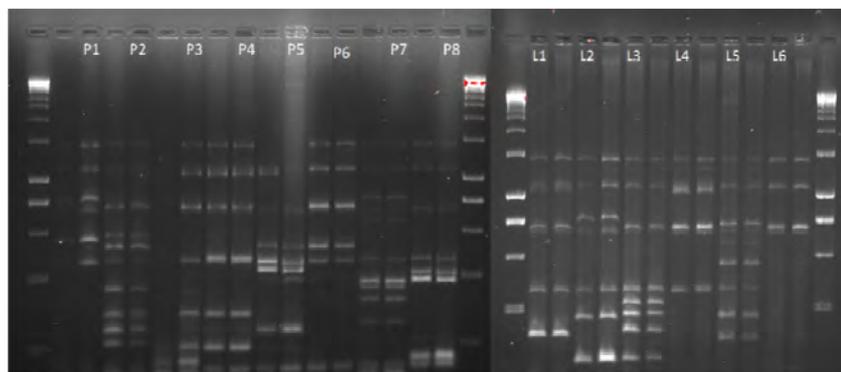


Figura 1. Perfil de elementos delta de las levaduras de *S. cerevisiae* autóctonas.

Posteriormente, en la caracterización de la capacidad fermentativa de las levaduras autóctonas se han obtenido diferencias significativas en la producción de dióxido de azufre, ácido acético y grado alcohólico. De las 14 cepas ocho cepas autóctonas presentaron valores inferiores a 10 mg/l de dióxido de azufre: P1, P2, P3, P4, P5, P7, L3 y L6. Se descartaron las cepas P1 y P2 ya que presentaron una fermentación más lenta, dejando azúcares residuales sin consumir. Entre las restantes se escogieron las cepas P3 y P5 por su baja producción de ácido acético y buena capacidad de imposición compitiendo con otras cepas de *S. cerevisiae*. (Figura 2).

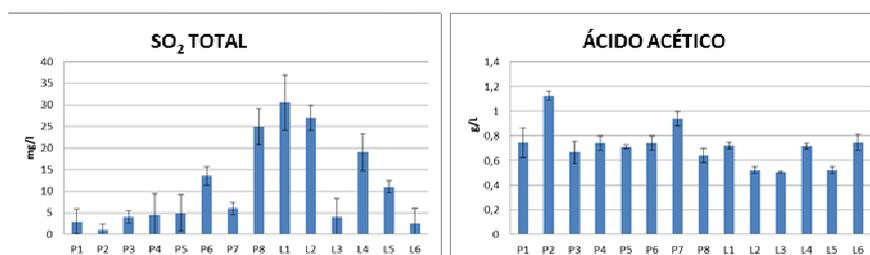


Figura 2. Concentración de dióxido de azufre total y ácido acético producido por las diferentes levaduras autóctonas en cultivos puros a escala de laboratorio

En la segunda fase del estudio, los vinos obtenidos a escala semiindustrial no presentaron diferencias significativas en los análisis químicos básicos. En las microvinificaciones con inóculos puros (control 1, control 2, P3 y P5) la imposición fue alrededor de un 100%. En la inoculación masiva de las 14 cepas autóctonas la levadura P5 se impuso alrededor de un 50%, seguida de la P3 con un 20% de imposición. En el análisis sensorial se observan diferencias significativas en la intensidad de color que es significativamente inferior en el vino control con dióxido de azufre (control 1). Se detectan diferencias sutiles entre los vinos P3, P5, inoculación masiva y comercial en los valores de crémor, sequedad, astringencia, fruta confitada, fruta seca, verdor, láctico y oxidación (Figura 3).

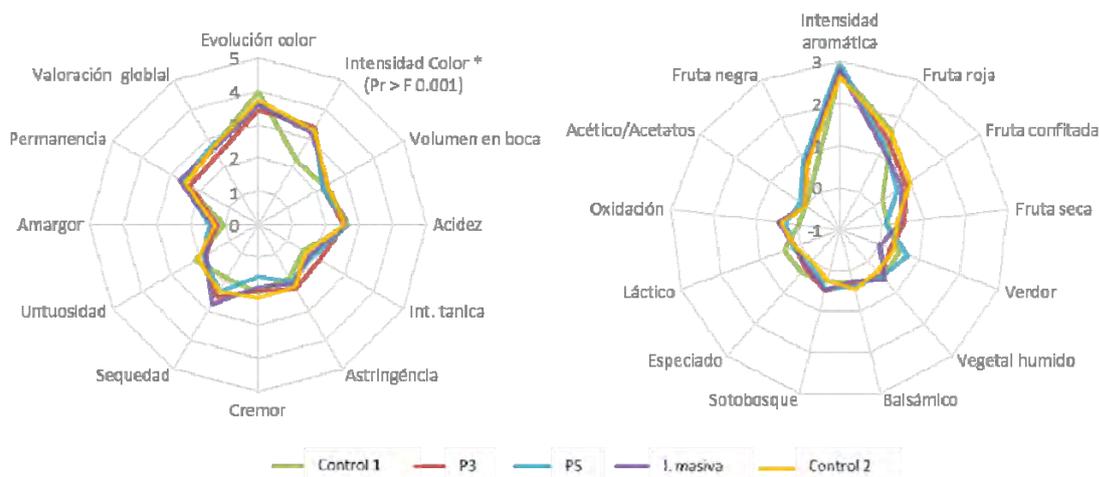


Figura 3. Diagramas de araña de los resultados obtenidos en el análisis sensorial de los vinos.

4. Conclusiones

En este proyecto se han seleccionado, identificado y caracterizado un total de 14 cepas autóctonas de *Saccharomyces cerevisiae*, ocho de las cuales presentan valores de dióxido de azufre inferior a 10 mg/l a final de fermentación. De estas ocho dos cepas se descartan por su poca capacidad fermentativa. De las 6 restantes se escogieron dos cepas por su buena capacidad de imposición y baja producción de ácido acético.

A escala semiindustrial se ha comprobado la eficacia y viabilidad de realizar la fermentación alcohólica inoculando levaduras autóctonas de la propia bodega para obtener vinos de calidad libres de dióxido de azufre. Las características organolépticas de los vinos de estudio han resultado ser comparables a los vinos fermentados con levaduras comerciales con y sin adición de dióxido de azufre, a excepción del parámetro de intensidad colorante que disminuye significativamente cuando se añade dióxido de azufre.

5. Bibliografía

1. Pretorius, I.S. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675-729.
2. Fleet, G.H. 2008. Wine yeast for the future. *FEMS Yeast Res* 8, 979-995.
3. Pretorius, I.S., Van der Westhuizen T.J. & Augustyn, O.P.H. 1999. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *S Afr J Enol Vitic*, 20, 61-70.
4. Mas, A., Torija, M.J., Beltran, G., Novo, M., Hierro, N., Poblet, M., Rozés, N. & Guillamón, J.M. 2002. Selección de levaduras. *Fermentos. Tecnología del Vino*, 39-44.
5. Romano, P., Capece, A., Serafino, V., Romaniello, R. & Poeta, C. 2008. Biodiversity of wild strains of *Saccharomyces cerevisiae* as tool to complement and optimize wine quality. *World J Microbiol Biotechnol*, 24, 1797-1802.
6. Santos, C.M., Nunes, C., Saraiva, J.A. & Coimbra, M.A. 2012. Chemical and physical methodologies for the replacement/ reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *Eur Food Res Technol*, 234:1-12.
7. Legras, J.L. & Karst, F. 2003. Optimisation of interdelta for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. *FEMS Microbiol Lett*, 221, 249-255.

M40 - EFECTO DE LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS Y DERIVADOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE DIFERENTES LEVADURAS VÍNICAS

Beatriz González, Jennifer Vázquez, Albert Mas, Gemma Beltran, M^a Jesús Torija

Universidad Rovira i Virgili, Facultad de Enología, dpto. Bioquímica y Biotecnología,
Biotecnología Enológica. C/ Marcel·lí i Domingo nº1. 43007 Tarragona, España.
beatriz.gonzalez@urv.cat

RESUMEN:

Las levaduras son capaces de adaptarse a las condiciones del medio por la secreción de sustancias como el tirosol, triptofol y feniletanol (derivados del metabolismo de aminoácidos aromáticos) que ejercen una señal intracelular. Asimismo, la melatonina que se sintetiza durante la fermentación alcohólica y otros metabolitos relacionados con ésta (triptamina y serotonina) son también compuestos bioactivos. El objetivo de este estudio es evaluar cómo afectan estos compuestos al crecimiento de diferentes levaduras bajo diferentes concentraciones de nitrógeno. El efecto de los compuestos fue diferente para cada especie y además dependiente de la concentración de nitrógeno. De forma general los compuestos que causaron mayor inhibición fueron el triptofol, triptamina y serotonina.

Palabras clave: Levaduras, *Quorum sensing*, aminoácidos aromáticos, compuestos bioactivos.

1. Introducción

Durante la fermentación, el nitrógeno es uno de los nutrientes más limitantes para el crecimiento y la actividad de las levaduras. Sin duda, el mayor desequilibrio entre los nutrientes básicos se da entre la fuente de carbono (azúcares) y la fuente de nitrógeno (amonio y aminoácidos). Sin embargo no todas las fuentes de nitrógeno pueden ser consideradas igualmente óptimas en cuanto al aumento de biomasa producido. Entre las fuentes que producen un crecimiento rápido se encuentran aminoácidos como la glutamina, asparagina, glutamato y alanina, que producen derivados carbonados, que son rápidamente integrados en el metabolismo fermentativo de la levadura. Por el contrario, entre las fuentes que producen un menor crecimiento se encuentran los aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina) y ramificados (leucina, isoleucina y valina), que producen complejos cetoácidos, que deben ser convertidos en complejos aldehídos y alcoholes superiores para su eliminación (1). A pesar de que los aminoácidos ramificados y aromáticos no producen altas tasas de crecimiento, se acumulan en las primeras fases de la fermentación (1, 2), poniendo de esta manera en duda la correlación asumida entre tasa de crecimiento y preferencia de la fuente de nitrógeno. Además, el hecho de producir esqueletos de carbono no fácilmente asimilables también convierte a estos aminoácidos en los más interesantes en la producción de aromas. Estos alcoholes superiores además de su contribución en el aroma del vino, se han relacionado con la señalización celular y el *quorum sensing* en levaduras (3). Adicionalmente, como resultado del metabolismo del triptófano, las levaduras producen otros metabolitos indólicos relacionados y que presentan actividad biológica como la serotonina, triptamina y melatonina (4, 5). Dichas sustancias tienen un efecto también sobre el propio desarrollo de las levaduras, por lo que el conocimiento de su regulación y metabolismo pueden resultar interesantes.

El objetivo de este estudio es evaluar cómo afectan estos compuestos bioactivos presentes en bebidas fermentadas al crecimiento de diferentes especies de levaduras, en medios con diferentes concentraciones de nitrógeno.

2. Material y métodos

Las levaduras utilizadas fueron cepas vínicas comerciales, o aislados naturales, del género *Saccharomyces*. Las comerciales fueron: SC20 Levucell, T73, QA23 (Lallemand), y VIN7 (Anchor) y los aislados naturales: S1, SB, P5. También se estudió el efecto sobre especies no-*Saccharomyces* de interés enológico, *Metschnikowia pulcherrima* (Mp4 y la cepa comercial FLAVIA (Lallemand)), *Torulasporea delbrueckii* (Td4 y la cepa comercial BIODIVA (Lallemand)), *Candida zemplinina* (dos aislados naturales Cz4 y Cz1) y *Hanseniaspora uvarum* (dos aislados naturales Hu4 y Hvk).

Para su crecimiento, se utilizó un medio mínimo con Yeast Nitrogen Base (YNB) sin aminoácidos ni amonio, suplementado con bisulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, empleando dos concentraciones diferentes, 1 mM y 10 mM. Posteriormente, se añadieron al medio los compuestos a estudiar: melatonina, serotonina, triptófano, triptamina, triptofol, feniletanol y tirosol a diferentes concentraciones desde 0,1 ppm a 1000 ppm. En cada caso se inocularon 2×10^6 cél/mL a partir de un pre-cultivo crecido también en YNB sin aminoácidos ni amonio, suplementado con 1 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en agitación continua a 120 rpm y 28°C durante 72h. El crecimiento (DO600) fue monitorizado durante 48h en un lector de microplacas (BMG LABTECH) con lecturas cada 30 min.

3. Resultados

Saccharomyces cerevisiae

De todos los compuestos estudiados el que más afectó a todas las cepas de la especie *S. cerevisiae* fue la serotonina (Fig.1). A elevadas concentraciones de serotonina la mayoría de cepas eran incapaces de crecer. La triptamina sobre todo afectó a la fase de latencia de las levaduras. El triptofol también afectó al desarrollo de todas las cepas, tanto a la fase de latencia como a la DO máxima del cultivo. Las cepas que presentaron una mayor inhibición de crecimiento en presencia de triptofol, eran las que tuvieron a la vez mayor actividad *quorum sensing*, este compuesto ha sido descrito junto el fenietanol como inductor del cambio de morfología en *Saccharomyces cerevisiae* (3).

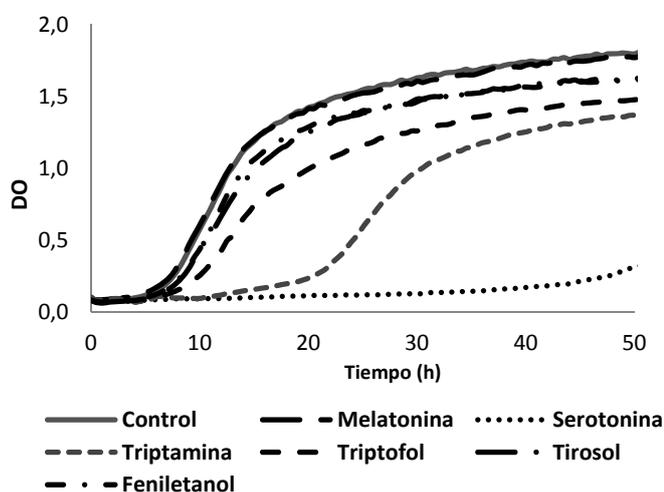


Figura1. Cinética de crecimiento de la cepa P5 de *S. cerevisiae* a 1000ppm de los compuestos bioactivos, 1mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Metschnikowia pulcherrima

Se estudió el efecto sobre dos cepas de *M. pulcherrima*, un aislado natural (Mp4) y una cepa comercial FLAVIA (Lallemand). En ambas cepas, el único compuesto que afectó al desarrollo de la levadura fue el triptofol (Fig. 2).

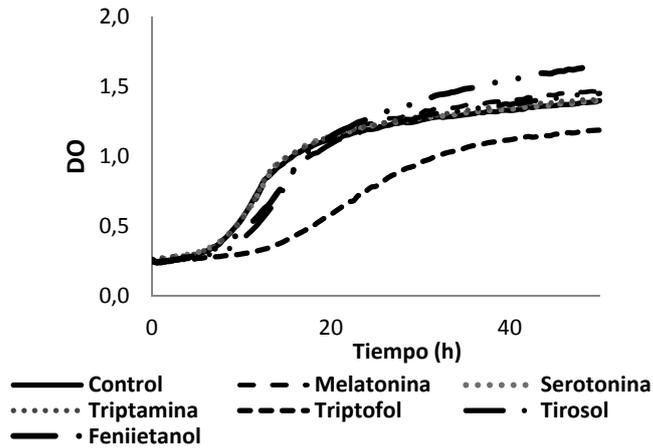


Figura 2. Cinética de crecimiento de un aislado natural de *M. pulcherrima* (Mp4) a 1000ppm de compuestos bioactivos, 1mM de $(NH_4)_2SO_4$

Torulasporea delbrueckii

Para *T. delbrueckii* también se estudió el efecto sobre un aislado natural (Td4) y una cepa comercial BIODIVA (Lallemand). En el caso de la cepa comercial el efecto fue parecido a *S. cerevisiae*. Los compuestos que más afectaron al crecimiento fueron: serotonina, triptamina y triptofol. En el caso de la cepa Td4 su desarrollo únicamente fue afectado por el triptofol.

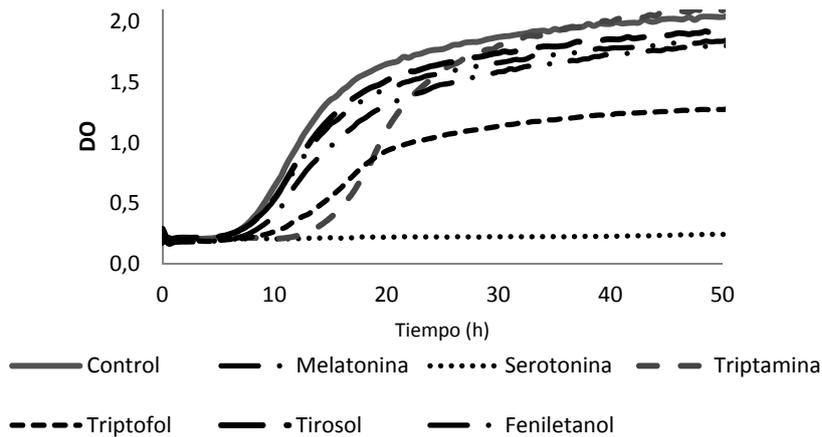


Figura 3 Cinética de crecimiento de la cepa comercial de *T. delbrueckii* (BIODIVA) a 1000ppm de compuestos bioactivos, 1mM de $(NH_4)_2SO_4$

Hanseniaspora uvarum

En el caso de las dos cepas estudiadas de *H. uvarum* los dos compuestos que más efecto tuvieron sobre el crecimiento fueron el triptofol y la triptamina. A altas concentraciones de triptamina ambas levaduras fueron incapaces de crecer. En la figura 4, se observa como hay una relación directa entre la concentración de triptofol en el medio, y la disminución del crecimiento de la cepa. Solo en concentraciones bajas (10 ppm) el crecimiento no se ve afectado.

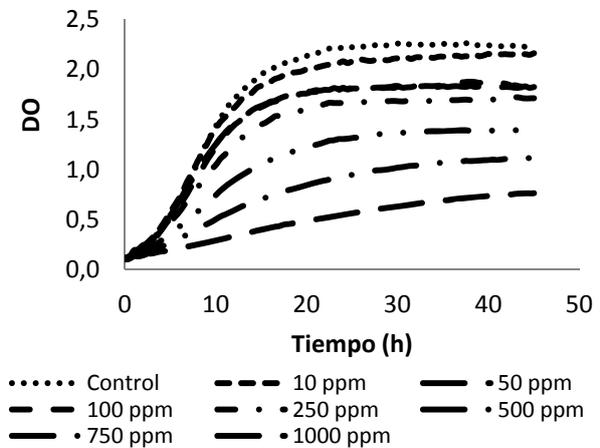


Figura 4 Cinética de crecimiento de la cepa Hu4 de *H. uvarum* a diferentes concentraciones de triptofol de 10 a 1000ppm, 10mM de $(NH_4)_2SO_4$

Candida zemplinina

El triptofol y la triptamina también fueron los compuestos que más afectaron al crecimiento en *C. zemplinina*, tanto a la fase de latencia como a la DO máxima del cultivo. En las dos cepas estudiadas el efecto observado por los compuestos fue el mismo.

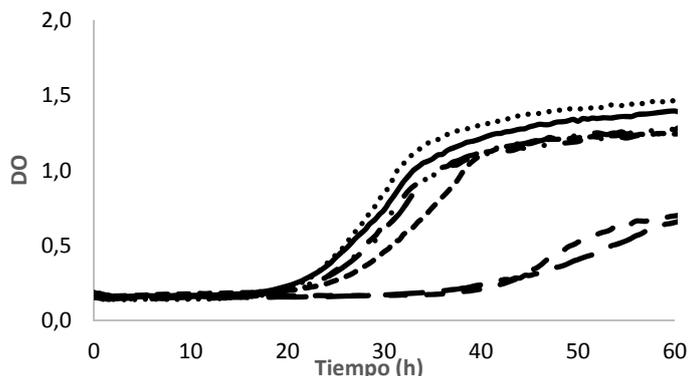


Figura 5 Cinética de crecimiento de *C. zemplinina* Cz1 a 1000ppm de compuestos bioactivos, 1mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

4. Conclusiones

Se observó que el efecto de los compuestos era diferente para cada especie, y dependiente de la concentración de nitrógeno, cuando la concentración de nitrógeno era más baja, es decir cuando el medio era suplementado con 1mM de bisulfato de amonio, el efecto de los compuestos sobre la levadura era mayor.

Los compuestos que más afectaron a la cinética de crecimiento de las levaduras vínicas estudiadas han sido el triptofol, la serotonina (precursor de la hormona melatonina), y la triptamina.

5. Bibliografía

1. Beltran, G., Esteve-Zaroso, B., Rozes, N., Mas, A., Guillamón, JM. 2005. Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. In: J Agric Food Chem. 53:996-1002.
2. Henschke PA., Jiranek V. 1993. Yeasts-metabolism of nitrogen compounds. In Wine Microbiology and Biotechnology. Fleet GH (ed). 77-164.
3. Chen, H., Fink, GR. 2006, Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. In: Genes Develop. 20:1150-1161.
4. Rodriguez-Naranjo, Ml., Torija, MJ., Mas, A., Cantos-Villar, E., Garcia-Parrilla, MC. 2012, Production of melatonin by *Saccharomyces* strains under growth and fermentation conditions. In: J Pineal Res. 53:219-224.
5. Mas, A., Guillamon, J.M., Torija, M.J., Beltran, G., Cerezo, A.B., Troncoso A. M., Garcia-Parrilla, M.C. 2014. Bioactive compounds derived from the yeast metabolism of aromatic amino acids during alcoholic fermentation. In: BioMed Research International. vol. 2014, Article ID 898045, 7 pages, 2014. doi:10.1155/2014/898045

6. Agradecimientos

El presente trabajo forma parte del proyecto AGL2013-47300-C3-1-R del Ministerio de Economía y Competitividad.

M41 - EMPLEO DE UN CONSORCIO DE LEVADURAS AUTÓCTONAS EN VINOS DE LA VARIEDAD CARIÑENA COMO HERRAMIENTA PARA REFLEJAR *TERROIR*

Beatriz Padilla, Àngela Ferreres, Rosa Pastor, Braulio Esteve-Zarzoso, Gemma Beltran
y Albert Mas

Universitat Rovira i Virgili. Departament de Bioquímica i Biotecnologia (Marcel·li Domingo 1,
43007 Tarragona)

beatriz.padilla@fundacio.urv.cat

RESUMEN:

En los últimos años se ha destacado el impacto de la biodiversidad levaduriforme tanto en la calidad como en la complejidad de los vinos. Recientemente, se ha propuesto el uso de levaduras nativas como estrategia para elaborar vinos diferenciados que reflejen el *Terroir*. En este trabajo, se han empleado levaduras tanto no-*Saccharomyces* como *Saccharomyces* aisladas del DOQ Priorat y seleccionadas por su aptitud enológica para inocular mosto de la variedad Cariñena en condiciones de vinificación industriales. La inoculación secuencial de levaduras no-*Saccharomyces* y *S. cerevisiae* resulta una estrategia apropiada para la diferenciación de vinos de calidad de la DOQ Priorat.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, no-*Saccharomyces*, fermentación alcohólica y Priorat.

1. Introducción

En la actualidad, existe una marcada tendencia en distintas regiones vitivinícolas dirigida a producir vinos con identidad geográfica. Entre las variables que influyen en el *Terroir*, los microorganismos autóctonos, y en concreto las levaduras, han sido propuestos como factores clave en la preservación tanto de la tipicidad como de la complejidad de los vinos (1).

Además, aparte del uso de recursos microbianos nativos, la biodiversidad de levaduras presente a lo largo de la fermentación alcohólica también juega un papel relevante en las características finales del vino. Así, en la uva se encuentran principalmente levaduras pertenecientes a especies no-*Saccharomyces* que a medida que avanza el proceso de vinificación, son reemplazadas por *Saccharomyces cerevisiae*, debido a que esta especie es la dominante durante la fermentación alcohólica (2). En esta línea, en los últimos años se han publicado diversos estudios que sugieren la inoculación de mostos con consorcios de distintas especies de levadura para la elaboración de vinos con una mayor complejidad (3).

Por ello, el objetivo del presente trabajo ha sido validar a nivel industrial el uso de un consorcio de especies de levaduras previamente aisladas de la DOQ Priorat y que además refleje la biodiversidad presente en las fermentaciones espontáneas de la zona. Para ello, se ha diseñado un cultivo iniciador que contiene tanto levaduras no-*Saccharomyces* así como cepas pertenecientes a la especie *S. cerevisiae* para inocular mosto de la variedad cariñena.

2. Material y métodos

2.1 Cepas y producción de biomasa

Dentro de las levaduras no-*Saccharomyces* se han utilizado 4 cepas pertenecientes a las especies *Hanseniaspora uvarum* (Hu), *Candida zemplinina* (Cz), *Torulaspota delbrueckii* (Td) y *Metschnikowia pulcherrima* (Mp). Además, se han incluido 3 cepas de *S. cerevisiae* (SFB1, SFB2 y SL1). Todas las levaduras empleadas han sido aisladas de fermentaciones espontáneas en la DOQ Priorat y seleccionadas por su aptitud enológica. Para la producción de biomasa, las distintas cepas se crecieron en medio YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa, 1.7% agar) a 28°C.

2.2 Fermentación y muestreo

Se llevaron a cabo dos estrategias de inoculación en mosto de la variedad Cariñena y en condiciones de fermentación industriales (1050 L). En el primer caso (A), se realizó una inoculación con el consorcio de 4 especies de levaduras no-*Saccharomyces* formado por Hu ($1.2 \cdot 10^6$ células/mL), Cz ($6 \cdot 10^5$ células/mL), Td (10^5 células/mL) y Mp (10^5 células/mL), en las proporciones encontradas en estudios previos. Tras 24 h se incorporó al tanque de fermentación la mezcla de 3 cepas de *S. cerevisiae* (población total $2.1 \cdot 10^6$ células/mL). En la segunda de las estrategias (B) solo se empleó el cultivo formado por las 3 cepas de *S. cerevisiae* a la misma concentración. De cada uno de los depósitos se retiraron muestras diariamente para monitorizar fermentación.

2.3 Recuento e aislamiento de levaduras

Los recuentos de levaduras totales se llevaron a cabo en medio YPD, y los de levaduras no-*Saccharomyces* se realizaron en medio agar lisina (LIS) (6.6% Oxoid medio lisina, 0.5% lactato potásico, 0.2% ácido láctico). En ambos medios se sembraron placas con diluciones seriadas de la muestra, que se incubaron a 28°C durante 2-3 días. Para el aislamiento y la identificación de levaduras se seleccionaron al azar 25 colonias de cada uno de los medios y de las muestras correspondientes al mosto, 24 h después de cada inoculación, mitad y final de la fermentación.

2.4 Identificación y tipificación de levaduras

Las levaduras se identificaron mediante RFLP-PCR de 5.8S-ITS del rRNA (4). Además, los resultados obtenidos se complementaron con la secuenciación de los dominios D1-D2 del gen 26S del rDNA (5). Por otra parte, los aislados de *S. cerevisiae* del final de las dos fermentaciones se tipificaron a través del análisis de las regiones inter-delta (6) y los de *H. uvarum* mediante RAPD M13 (7).

2.5 Análisis sensorial

Los dos vinos resultantes se presentaron a un panel de catadores mediante un test triangular y otro de preferencia. El panel estaba compuesto por 11 jueces (6 mujeres y 5 hombres) pertenecientes al Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Universitat Rovira i Virgili.

3. Resultados

La fermentación alcohólica se llevó a cabo en 8 días, lo que se corresponde con una cinética fermentativa y de crecimiento óptima (Figura 1). El mosto presentó la composición típica de los mostos del Priorat, con una mayor presencia de *H. uvarum* (74%), seguida por *C. zemplinina* (25%) y *M. pulcherrima* (1%).

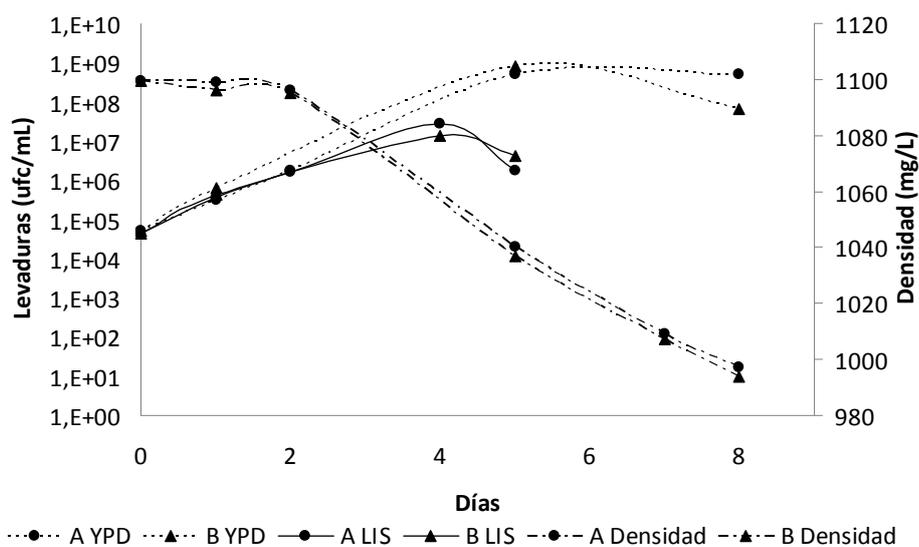


Figura 1. Cinética fermentativa y población de levaduras.

Tras la inoculación de la fermentación A con el consorcio de no-*Saccharomyces* (24 h) se obtuvieron aislados de todas las especies inoculadas exceptuando *T. delbrueckii*. Además, tras la incorporación de *S. cerevisiae* (24 h Sc, M y F), esta especie dominó el proceso de manera gradual tanto en la fermentación A como en la B (Figura 2).

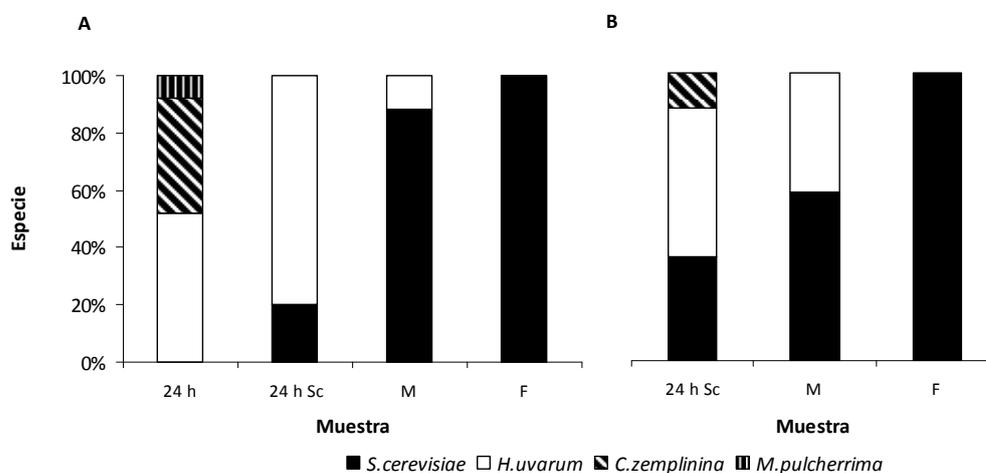


Figura 2. Dinámica poblacional de las especies de levaduras (YPD).

Con respecto a la tipificación, es importante remarcar que todas las colonias de *S. cerevisiae* aisladas al final de ambas fermentaciones, así como los aislados de *H. uvarum*, presentaron un patrón electroforético igual al de las cepas inoculadas, por lo que se puede deducir que las cepas inoculadas han sido las responsables principales de la fermentación. Los vinos resultantes de la inoculación con los distintos consorcios de levaduras fueron evaluados como significativamente diferentes, si bien no hubo una clara preferencia por parte de los catadores.

4. Conclusiones

Este trabajo demuestra que el uso del consorcio de levaduras autóctonas, compuesto tanto por especies no-*Saccharomyces* como por *S. cerevisiae*, permite reproducir en los vinos obtenidos la huella microbiana característica del Priorat. Por tanto, las estrategias de inoculación propuestas en este estudio permitirían un acercamiento hacia la producción de vinos con identidad geográfica.

5. Bibliografía

1. Tofalo, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Fasoli, G., Aguzzi, I., Corsetti, A.; Suzzi, G. 2013. Biogeographical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast by molecular methods. *In: Frontiers in Microbiology*. 4, 166, 1-13.
2. Fleet, G. H. 1993. The microorganisms of winemaking-isolation enumeration and identification. *In: Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers. 1-27.
3. Belda, I., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., Calderon, F.; Benito, S. 2015. Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspota delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. *In: Applied Microbiology and Biotechnology*. 99, 1911-1922.
4. Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F.; Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *In: International Journal of Systematic Bacteriology*. 49, 329-337.
5. Kurtzman, C. P.; Robnett, C. J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *In: Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*. 73, 331-371.
6. Legras, J. L.; Karst, F. 2003. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *In: FEMS Microbiology Letters*. 221, 249-255.
7. Fadda, M.E., Mossa, V., Pisano, M.B., Deplano, M.; Cosentino, S. 2004. Occurrence and characterization of yeasts isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. *In: International Journal of Food Microbiology*. 95, 51-59.

6. Agradecimientos

Este estudio se enmarca dentro del proyecto Europeo WILDWINE (Ref. 315065).

M42 - INTERACCIONES ENTRE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Y *HANSENIASPORA UVARUM* EN FERMENTACIONES ALCOHÓLICAS

Chunxiao Wang, Albert Mas, Braulio Esteve-Zarzoso

Universitat Rovira i Virgili, Departament de Bioquímica i Biotecnologia (Marcel·li Domingo 1, 43007, Tarragona, España)

chunxiao.wang@estudiants.urv.cat

RESUMEN:

Durante la fermentación del mosto de uva, levaduras de las especies *Saccharomyces* dominan claramente sobre las no-*Saccharomyces* en las etapas finales de la fermentación. Varios factores podrían estar relacionados con esta imposición.

Para realizar la fermentación, se diseñaron dispositivos utilizando tubos de diálisis, que permitían la difusión de las principales moléculas del mosto de uva, pero no el paso de células de levaduras. Se evaluaron algunos de los factores (contacto célula-célula, nutrientes, alcohol y compuestos tóxicos) responsables probables de la interacción entre *Saccharomyces cerevisiae* y *Hanseniaspora uvarum* inoculando una u otra levadura en los diferentes compartimentos de los dispositivos.

Los resultados muestran que la población de *H. uvarum* cultivable disminuyó drásticamente en las últimas etapas, cuando *S. cerevisiae* estaba presente en el otro compartimento, de manera similar a las fermentaciones alcohólicas. Por lo tanto, el contacto célula a célula no parece ser la causa principal de la falta de cultivabilidad de *H. uvarum*. Como el fenómeno de la pérdida de cultivabilidad siempre aparecía en las etapas finales de las fermentaciones, los compuestos relacionados con el desarrollo de la fermentación (como el etanol o ciertos metabolitos secretados por *S. cerevisiae*) podían estar más estrechamente relacionados con la interacción. Se comprobó que el etanol tiene un efecto letal limitado en las levaduras no-*Saccharomyces*. Sin embargo, los resultados obtenidos en el análisis de los metabolitos producidos durante la fermentación se ha visto que sí que tienen un efecto claro en la supervivencia de estas levaduras al final de la fermentación.

Palabras clave: contacto célula-célula, vino, etanol, compuesto tóxicos

1. Introducción

Distintas especies de las levaduras aparecen durante la fermentación del mosto de uva, y por métodos de análisis dependientes de cultivo, las especies de *Saccharomyces* dominan claramente sobre las no-*Saccharomyces* en las etapas finales de la fermentación. La pérdida de cultivabilidad de las no-*Saccharomyces* podría estar relacionada con una nutrición limitada (Albergaria et al., 2003); condiciones de fermentación, como oxígeno y temperatura (Salvadó et al., 2011); metabolitos secretados por levaduras, como etanol y compuestos tóxicos (Branco et al. 2014); y el contacto célula a célula (Nissen et al. 2003) entre otros.

En este estudio, se han diseñado dispositivos que separaban físicamente levaduras en diferentes compartimentos. En estos dispositivos se realizaron fermentaciones alcohólicas,

para evaluar el efecto del contacto célula-célula. Así mismo, sobrenadantes de diferentes etapas de la fermentación con *S. cerevisiae* fueron inoculados con *H. uvarum* para determinar su cultivabilidad en el entorno creado por *S. cerevisiae* sin contacto celular. Después, mosto sintético con el mismo nivel de azúcar y etanol como los sobrenadantes, fueron utilizados para comprobar si éstos metabolismos son los responsables o hay otros metabolitos implicados.

2. Material y métodos

Levaduras, mosto y medios

Las levaduras de *S. cerevisiae* y *H. uvarum* se aislaron de la DOQ Priorat y pertenecen a la colección del grupo. El mosto utilizado es una dilución a 200 g/L azúcar desde mosto natural concentrado, o mosto sintético con diferentes niveles de azúcar y etanol. El recuento de microorganismos se realizó por microscopio óptico y en medio YPD o Agar Lisina.

Fermentaciones en los dispositivos compartimentalizados

Como se muestra en la Figura 1, tubos de diálisis (MWCO 12.4 kDa) se colocaron en botellas de 50 mL (A) o 250 mL (B) para establecer dispositivos con dos compartimentos independientes. Ambos dispositivos tienen un compartimento interno (el compartimento dentro del tubo de diálisis) y externo (el compartimento dentro de la botella, pero fuera del tubo de diálisis). Otro dispositivo (C) sin el tubo de diálisis se utilizó como un control para el dispositivo B.

Las fermentaciones se realizaron en los tres dispositivos a 25°C con agitación a 120 rpm. En los dispositivos A, se utilizaron 10 mL de mosto natural en ambos compartimentos (Ratio 1:1). En los dispositivos B, 20 mL de mosto natural se introdujo en el compartimento interno y 180 mL externo (Ratio 1:9). En los dispositivos A and B, *S. cerevisiae* se inoculó en el compartimento externo y *H. uvarum* interno. En los dispositivos C, 200 mL de mosto natural se utilizaron, se inocularon simultáneamente *S. cerevisiae* y *H. uvarum*.

Inoculación de *H. uvarum* adaptadas en medios

Se recogieron sobrenadantes de diferentes etapas de una fermentación con *S. cerevisiae* utilizando mosto sintético, y se inocularon con células adaptadas de *H. uvarum*. Estas mismas células adaptadas de *H. uvarum* se inocularon también en YPD y en mostos sintéticos imitando los sobrenadantes de *S. cerevisiae* (el mismo nivel de azúcar y etanol).

Para comprobar el efecto del etanol sobre la cultivabilidad de *H. uvarum*, células de esta especie fueron cultivadas en mostos sintéticos con la siguiente composición: 12.5 g/L glucosa, 12.5 g/L fructosa y 30 mg N/L nitrógeno) pero con diferentes concentraciones de etanol (de 6% a 12% v/v). Se analizaron las poblaciones de *H. uvarum* tras 48 horas de inoculación.

3. Resultados

La fermentación en dispositivos A (con el mismo volumen en ambos compartimentos) finalizó en 10 días, con una fuerte disminución de la cultivabilidad de *H. uvarum* después de seis días y ninguna recuperación en el día 8 (Figura 1 A). La fermentación en los dispositivos B con *S. cerevisiae* en mayor volumen que *H. uvarum* (9:1) procedió más rápido, y la pérdida de cultivabilidad de *H. uvarum* apareció antes (disminución en el día 3 y ninguna recuperación en el día 5, Figura 1B). La fermentación mixta en el dispositivo C (Figura 1C) mostró casi el mismo desarrollo de fermentación y poblaciones de levaduras que la fermentación en dispositivo B, lo que indica que no se observaron efectos evidentes del contacto célula a célula.

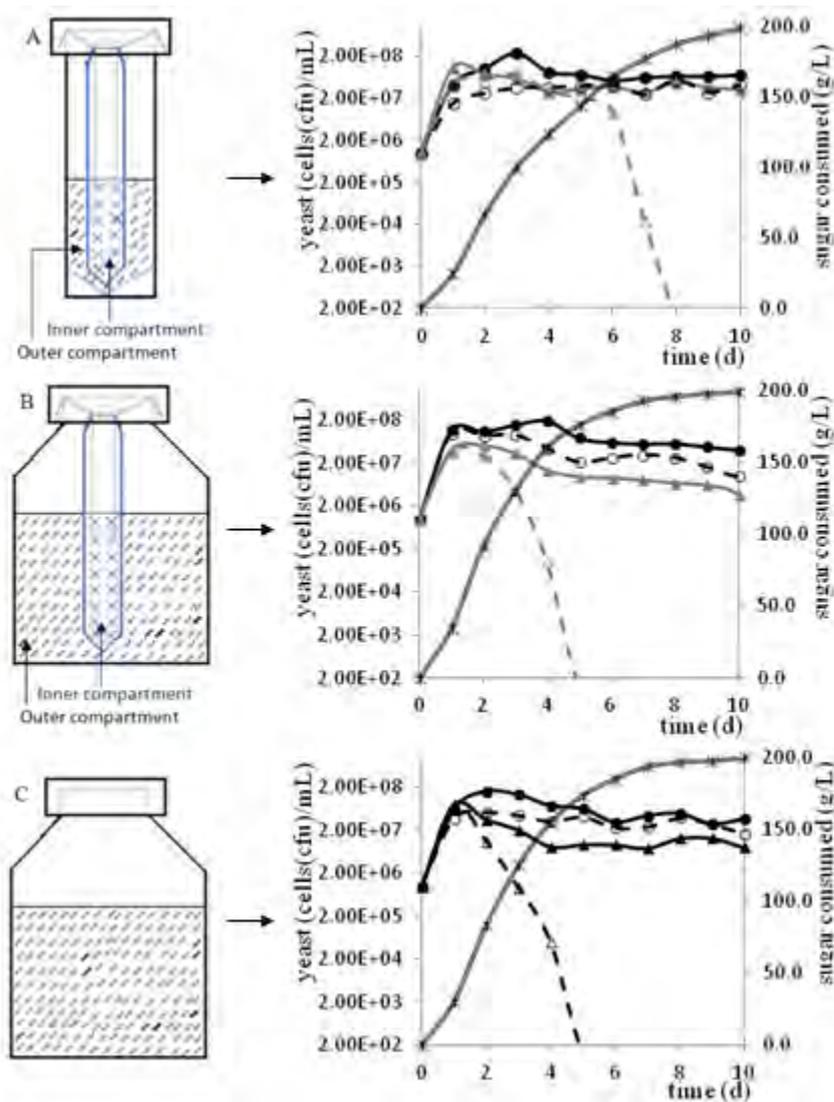


Figura 1 Evolución de las poblaciones de las levaduras durante las fermentaciones en los dispositivos con tubo de diálisis (A, B) o sin tubo de diálisis (C). Líneas continuas pertenecen a placas de cultivo, discontinuas microscopio, negras *S.cerevisiae* en compartimento exterior, y grises *H. uvarum* en compartimento interno. Símbolos: (●, ⊖) *S. cerevisiae*; (▲, △) *H. uvarum*; (⊗) azúcar consumido.

En experimentos de inoculación de *H. uvarum* en medios, la población de *H. uvarum* cuantificada por microscopía mantuvo siempre un nivel similar, sin embargo, las células no siempre eran cultivables. Además no se recuperaron células de *H. uvarum* de los sobrenadantes de la fermentación con *S. cerevisiae* en etapa tardía, mientras que las células expuestas a mosto sintético simulando los mismos sobrenadantes fueron menos afectadas, y la pérdida de cultivabilidad procedió lentamente (Figura 2). Estos resultados parecen indicar que los metabolitos secretados por *S. cerevisiae* durante la fermentación parecen jugar un papel importante en la cultivabilidad de *H. uvarum*, aunque otros compuestos (etanol y azúcar) también parecen ejercer algún efecto.

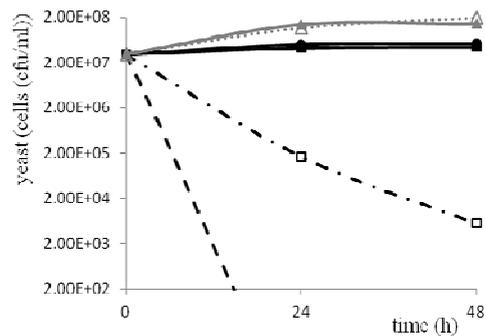


Figura 2 Cuantificación de las células de *H. uvarum* después de ser inoculadas en YPD (▲, ◻), sobrenadante de *S. cerevisiae* (●, ◉) y mosto sintético que imitan *S. cerevisiae* sobrenadante (◻, ◉). Las células se cuantificaron por microscopía (líneas continuas) y cultivo en placa (líneas discontinuas).

Células adaptadas de H. uvarum también se inocularon en mostos sintéticos con diferentes concentraciones de etanol, y los resultados mostraron que la cultivabilidad disminuyó y se correlacionó bien con el aumento de concentración de etanol. Sin embargo, 10^4 cfu/mL de *H. uvarum* todavía se recuperaron después de la incubación durante 48h en mostos con etanol de 12% v/v.

4. Conclusiones

Los metabolitos secretados por *S. cerevisiae*, y no el contacto célula-célula, fueron probablemente el principal factor causante de la pérdida de cultivabilidad de *H. uvarum* durante la última etapa de fermentación. A pesar de que el etanol también desempeñó un papel en el proceso de pérdida de cultivabilidad, otros compuestos deben ser los responsables de tal efecto.

5. Bibliografía

1. Albergaria, H., Torrão, A. R., Hogg, T., Gírio, F. M., 2003. Physiological behaviour of *Hanseniaspora guillermondii* in aerobic glucose-limited continuous cultures. FEMS Yeast Research 3, 211-216.
2. Branco, P., Francisco, D., Chambon, C., Hébraud, M., Arneborg, N., Almeida, M. G., Caldeira, J., Albergaria, H., 2014. Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions. Applied Microbiology and Biotechnology 98, 843-853.
3. Nissen, P., Nielsen, D., Arneborg, N., 2003. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. Yeast 20, 331-341.
4. Salvadó, Z., Arroyo-López, F. N., Barrio, E., Querol, A., Guillamón, J. M., 2011. Quantifying the individual effects of etanol and temperatura on the fitness advantages of *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiolgy 28: 1155-1161.

6. Agradecimientos

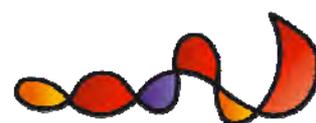
Chunxiao Wang ha recibido una beca del China Scholarship Council (Num. 201206300028). El presente trabajo se encuentra en marcado en el proyecto Europeo Wildwine (Ref. 315065).



TE

Tecnología Enológica

ENOLOGIA2.015
INNOVACIÓN VITIVINÍCOLA



TE01 - INFLUENCIA DE LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA EN LA CONCENTRACIÓN DE MERCAPTANOS POLIFUNCIONALES EN VINOS DE LA VARIEDAD MERLOT -

P. Hernandez-Orte^{1*}, **B. Concejero**¹, **J. Astrain**², **B. Lacau**², **C. Baron**², **V. Ferreira**¹

¹Laboratorio del Análisis del Aroma y Enología. Dpto de Química Analítica, Universidad de Zaragoza

²Bodega Pirineos, Carretera de Barbastro, Km 3.500, 22300 Barbastro, Huesca
puhernan@unizar.es

RESUMEN:

Los mercaptanos polifuncionales son importantes en el aroma de los vinos ya que a concentraciones de nanogramos/L impactan en su perfil aromático. En los vinos estos mercaptanos están unidos a moléculas de cisteína o de glutatión. La liberación de los aromas desde su precursor se produce por la acción enzimática β -liasa que poseen algunos microorganismos. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la FML sobre la liberación de los mercaptanos. El estudio se realizó dos años consecutivos. En el primer año se estudiaron dos cepas de bacterias. En el segundo se estudió el efecto de la cantidad de bacterias inoculadas sobre la liberación de los mercaptanos. Además, durante los dos años se probó la influencia de la adición de chips de roble durante la FML en la concentración de los mercaptanos. La cantidad de poblaciones afecta significativamente a la cantidad de 3AMH producido. Si la FML se realiza en presencia de chips de roble la concentración de FFT y 3AMH es superior ($p < 0,05$).

Palabras clave: fermentación maloláctica, mercaptanos polifuncionales.

1. Introducción

La formación de aromas en el vino es un proceso complejo donde juegan un papel importante el tipo de uva, el metabolismo de los microorganismos durante la fermentación y cómo se ha conducido la conservación y crianza de los mismos.

Entre los aromas importantes directamente procedentes de la uva se encuentran la 4-mercapto-4-metil- 2-pentanona (4M4M2P) y el 3-mercaptohexanol (3MH) que tienen aromas a boj y frutas tropicales. Estos compuestos son liberados en el proceso de vinificación de sus precursores cisteínicos y del glutatión. Durante la fermentación alcohólica se forma el acetato de 3-mercaptohexilo (3AMH) con notas de fruta de la pasión. También existen otros mercaptanos polifuncionales como el furfuriltiol (FFT), bencilmercaptano (BM) y 2-metilfurantiol (2M3F) con orígenes diversos, y que se liberan en el vino aportando notas a café, empireumáticas etc

El proceso de vinificación, además de la fermentación alcohólica, comprende otras etapas necesarias para conseguir que el vino tenga las cualidades adecuadas. Durante estas etapas tienen lugar cambios organolépticos en el vino, que pueden verse influenciados por factores tanto enológicos como microbiológicos o tecnológicos. La fermentación maloláctica (FML), consiste en la transformación del ácido málico, ácido duro, en ácido láctico, de sabor más suave. Las bacterias lácticas (BL) *Oenococcus oeni* son habitualmente las responsables de llevar a cabo la FML en el vino. Con esta fermentación bacteriana se consigue la reducción de la acidez y la modificación del sabor.

Diversos investigadores han encontrado que distintas cepas de BL tienen distintos efectos en el vino, tanto a nivel gustativo como aromático [1-7]. Las BL metabolizan aminoácidos transformándolos en otros productos que deprecian la calidad, como las aminas biógenas [8, 9]. Además las BL pueden generar compuestos azufrados poco apreciados en el vino como sulfuro de dimetilo y H₂S, en la metabolización de la cisteína y la metionina [10, 11]. Actualmente, no se tienen muchos datos sobre el efecto de la fermentación maloláctica en los mercaptanos polifuncionales ni en sus precursores, excepto para el 3-mercaptohexanol. De forma general, se ha descrito que el contenido de este compuesto disminuye durante la fermentación maloláctica [12]. Sin embargo Antalick et al. [2], publicaron un trabajo en el que estudiaron la modificación de las características frutales tras la FML. Según estos autores, la evolución del 3MH durante la FML no seguía una tendencia clara, ya que observaron un aumento en la concentración de 3MH durante la misma, no documentada anteriormente.

2. Material y métodos

Durante las vendimias de 2012 y 2013 se han vinificado uvas de la variedad Merlot de la D.O. Somontano, en la Bodega Pirineos. Al acabar la fermentación alcohólica de un depósito de 40000 L el vino obtenido se repartió en depósitos de 1500L los dos años de estudio. En 2012 se probaron dos cepas de bacterias diferentes, Lalvin VP41 y ALPHA (α) (Lallemand, España). Además en otro ensayo se inoculó la VP41 en presencia de chips con alto contenido en furfural. Estos ensayos se realizaron con chips con diferentes grados de tostado, 0.3 g/L de DC310 y 0.5 g/L de DC190, (Boisse France, Vivelys, Francia). En 2013, se estudió el impacto de diferentes concentraciones de poblaciones de bacterias (pob 1 y pob 2 (doble cantidad de células que la pob 1)) sobre el desarrollo de la FML y sobre el perfil tílico del vino. La FML se realizó con la bacteria seleccionada en 2012 (Lalvin VP41) a dos niveles de población. En un tercer depósito se repitió la adición de chips en condiciones similares a las del 2012. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado. Tras finalizar la fermentación maloláctica, se tomaron muestras de todos los depósitos y se analizaron los mercaptanos polifuncionales: 2-furfuriltiol, 4-metil-4-mercapto-2-pentanona, acetato de 3-mercaptohexilo, 3-mercaptohexanol, 2-metil-3-furantiol y benzilmercaptano, siguiendo la metodología publicada por Mateo-Vivaracho et al. [13].

Con los datos obtenidos se realizaron estudios ANOVA para determinar si existían diferencias significativas entre las diferentes cepas de bacterias, diferentes niveles de poblaciones y el uso o no de chips.

3. Resultados

En el año 2012 se realizaron estudios ANOVA de un factor para cada uno de los mercaptanos polifuncionales, para determinar si existían diferencias significativas entre las distintas cepas de bacterias inoculadas y la misma cepa inoculada en presencia de chips. Respecto al factor cepa no se encontraron diferencias significativas y respecto al factor uso o no de chips solo se encontraron diferencias significativas para el FFT y la 4M4M2P ($P < 0.05$). El 2M3F, 3AMH, 3MH y BM (figuras 1 y 2) alcanzaron concentraciones más altas con la bacteria VP41 que con la α . La concentración de 4M4M2P fue también más elevada con la VP41, pero en presencia de chips de roble. Por tanto en el año 2012 se seleccionó la bacteria VP41 para inocular los depósitos de 2013.

En el 2013 se realizaron también 2 estudios ANOVA. En el primero, el factor fue la población de bacterias inoculadas, mientras en el segundo el factor fue el uso o no de chips.

En el primer ANOVA en el que se compararon las distintas dosis de bacterias, se encontraron solo diferencias significativas para 3AMH ($P=0.088$). En la gráfica 1 se ve que cuanto más población de bacterias se inocula, más 3AMH se produce. Este dato concuerda con lo observado en los experimentos de seguimiento de FML. Una población mayor de bacterias inoculadas puede producir mayores cantidades de enzimas β -liasas y acetiltransferasas y por lo tanto liberar más 3MH de su precursor y generar el éster 3AMH.

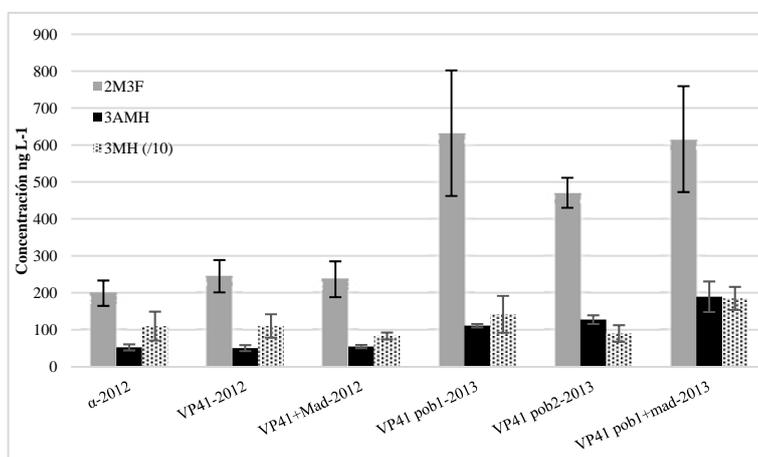


Figura 1. Concentración de 2M3F, 3MH(/10) y 3AMH para cada uno de los ensayos: α , cuando se inocula la cepa de bacteria ALPHA; VP, para las muestras inoculadas con la cepa VP41. Con dos poblaciones, (pob 1 y pob 2) y por último VP+M, para las muestras inoculadas con la cepa de bacteria VP41 y chips de roble en los años 2012 y 2013

Comparando el uso de bacterias solo o adicionado con chips de roble, los compuestos con diferencias significativas fueron el FFT ($P=0.017$) y de nuevo el 3AMH ($P=0.032$). Para ambos compuestos las concentraciones fueron superiores en el caso de usar chips de roble (figuras 1 y 2). Parece como si los chips tuvieran un efecto protector sobre el 3AMH, y por supuesto aportasen el furfural necesario para formar FFT.

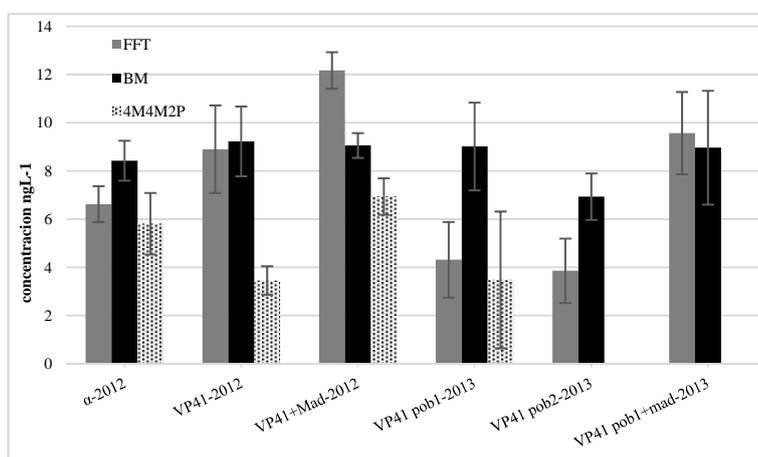


Figura 2. Concentración de FFT, BM y 4M4M2P par cada uno de los uno de los ensayos: α , cuando se inocula la cepa de bacteria ALPHA; VP, para las muestras inoculadas con la cepa VP41. Con dos poblaciones, (pob 1 y pob 2) y por último VP+M, para las muestras inoculadas con la cepa de bacteria VP41 y chips de roble en los años 2012 y 2013

La concentración de 3MH fue más elevada en 2013 en presencia de chips lo contrario de lo que ocurría en 2012, aunque no significativamente. Las desviaciones estándar fueron muy elevadas por lo que no se pueden sacar conclusiones generales para este compuesto.

El BM en 2013 alcanzó concentraciones menores con más poblaciones de bacterias. La concentración de este compuesto apenas se modifica en la presencia de chips.

Tanto en 2012 como en 2013, la presencia de madera hace que aumente la concentración del FFT (figura 2) y este efecto no depende de la concentración de bacterias. El hecho de que exista más FFT en los depósitos con madera es lógico ya que este compuesto se puede formar con el furfural extraído de la madera y el H₂S presente en el vino [14]

4. Conclusiones

En este estudio se ha encontrado que tanto las cepas de bacterias como el nivel de poblaciones influyen en la liberación de mercaptanos polifuncionales, especialmente en la 4M4M2P, el FFT y el 3MHA. Si la FML se realiza en presencia de chips de roble la concentración de FFT y 3AMH es significativamente superior. Por otra parte la realización de la FML en presencia de madera favorece el mantenimiento del 3MHA.

5. Bibliografía

1. Sauvageot, F. and P. Vivier. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1997. 48(2): p. 187-192.
2. Antalick, G., M.C. Perello, and G. de Revel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012. 60(50): p. 12371-12383.
3. Hernandez-Orte, P., et al. *Food Science and Technology International*, 2012. 18(2): p. 103-112.
4. Lerm, E., L. Engelbrecht, and M. du Toit. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 2010. 31(2): p. 186-212.
5. Canas, P.M.I., et al. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008. 21(8): p. 724-730.
6. Ugliano, M. and L. Moio. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005. 53(26): p. 10134-10139.
7. de Revel, G., et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999. 47(10): p. 4003-4008.
8. Polo, L., et al. *Annals of Microbiology*, 2011. 61(1): p. 191-198.
9. Buteau, C., C.L. Duitschaever, and G.C. Ashton. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1984. 35(4): p. 228-236.
10. Pripis-Nicolau, L., et al. *J Appl Microbiol*, 2004. 96(5): p. 1176-84.
11. Vallet, A., et al. *J Appl Microbiol*, 2008. 104(6): p. 1833-40.
12. Murat, M.-L.D., Denis; Tominaga, Takatoshi. *Revue française d'oenologie*, 2004. 207: p. 20-23.
13. Mateo-Vivaracho, L., J. Cacho, and V. Ferreira. *Journal of Chromatography A*, 2007. 1146(2): p. 242-250.
14. Blanchard, L., T. Tominaga, and D. Dubourdieu. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001. 49(10): p. 4833-4835.

6. Agradecimientos

Este proyecto ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, bajo el programa INNPACTO: referencia IPT-2012-0277-060000. Ruta prevalente tiólica para un vino tinto de la variedad Merlot del somontano.

TE02 - ALTERNATIVAS A LA ELABORACIÓN TRADICIONAL DE VINOS DULCES DE UVA PEDRO XIMÉNEZ PASIFICADA

José I. Santiago¹, Teresa García-Martínez², Jaime Moreno-García², Rafael A. Peinado¹,
Nieves López de Lerma¹

¹Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Departamento de Química Agrícola y Edafología, Ed. Marie Curie, 3ª planta, 14014 Córdoba, España.

²Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, Departamento de Microbiología, Ed. Severo Ochoa, planta baja, 14014 Córdoba, España.

b92lolem@uco.es

RESUMEN:

Se han elaborado a partir de un mosto de uva Pedro Ximénez pasificada tres tipos de vinos: Vino Dulce natural, Vino Naturalmente Dulce y Pedro Ximénez tradicional, con los siguientes objetivos, a) demostrar que se puede fermentar en condiciones similares a las de bodega mostos con elevadas concentraciones de azúcar; b) elaborar vinos con menor cantidad de alcohol adquirido; c) comparar analítica y organolépticamente los vinos dulces obtenidos. La fermentación parcial da lugar a vinos de mayor complejidad aromática que los obtenidos de forma tradicional. Los valores anormalmente elevados de acidez volátil, unidos al menor contenido de azúcar hacen que los vinos parcialmente fermentados tengan un mejor equilibrio acidez dulzor. Dado que la tendencia actual es la de obtener vinos con una menor graduación alcohólica, los VND podrían satisfacer los gustos de una parte de los consumidores al carecer este tipo de vinos de alcohol añadido.

Palabras clave: Fermentación parcial, Pedro Ximénez, VDN, VND, Volátiles

1. Introducción

La práctica conocida como el “asoleo” se realiza en zonas vitícolas de clima caluroso o semiárido. En España, destacan tres regiones vitivinícolas donde se realiza esta práctica: Montilla-Moriles, Málaga y Xerez, siendo la primera la de mayor producción. En la región de Montilla-Moriles se encuentra el hábitat ideal de la variedad de uva Pedro Ximénez, la cual es muy versátil y se emplea para la elaboración de vinos fino, amontillado, oloroso y palo cortado, así como para elaborar el vino dulce que lleva su nombre. Éste se obtiene tras someter la uva al asoleo durante 7-10 días. Una vez prensada, se obtiene un mosto con un contenido en azúcar en torno a los 450 g/L que se encabeza para evitar la fermentación [1]. A partir de este vino base podemos encontrarnos diferentes Pedro Ximénez (PX) en función del tiempo de envejecimiento. Organolépticamente destacan los aromas de pasificación (dátiles, miel, etc.) y los torrefactos y balsámicos desarrollados tras largos periodos de crianza. En boca resultan dulces pero equilibrados y muy aromáticos por vía retronasal.

2. Material y métodos

Mosto y condiciones de fermentación.

El mosto de uva pasificada se obtuvo de Bodegas del Pino en la D.O. Montilla-Moriles. El contenido en azúcar fue de 25 Baume. Una parte se alcoholizó hasta alcanzar un 15% (v/v)

para elaborar el vino tradicional (VT). Otra parte del mosto se fermentó, bien con levadura autóctona o bien con levadura seleccionada por su osmotolerancia. Una parte de los mostos en fermentación se detuvo cuando el contenido en etanol alcanzó el 8% (v/v) mediante la adición de alcohol hasta 15% y aplicando frío obteniéndose de este modo un Vino Dulce Natural (VDN). Otra parte se detuvo de forma espontánea, obteniéndose un Vino Naturalmente Dulce (VND). Todos los vinos se refrigeraron a 4°C.

Análisis generales y de compuestos volátiles. Análisis estadístico.

Las variables enológicas se determinaron según los métodos de referencia. Los compuestos volátiles se determinaron en un Cromatógrafo de Gases Agilent 7890, acoplado a un detector de masas MSD 5975C. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico mediante el software Statgraphics centurion XVI.

3. Resultados

Destacan los valores de la acidez volátil (tabla 1). Esta aumenta significativamente en los VDN y aun más en los VND en relación al VT. El ácido acético es producido en pequeñas cantidades durante la fermentación alcohólica [2], siendo valores elevados indicativos de una contaminación microbiana. Sin embargo, en los vinos dulces obtenidos se han descrito valores elevados de ácido acético sin que exista contaminación [3]. Esto es debido a que las levaduras están sometidas a un gran estrés osmótico lo que les lleva a producir elevadas cantidades de glicerina. Para equilibrar el potencial redox intracelular se produce también ácido acético [4].

Tabla 1. Variables enológicas determinadas. Letras diferentes indican diferencias significativas al 95%

Variable	VT	VDNa	VDNs	VNDa	VNDs	ANOVA
pH	4,85±0,01	4,73±0,02	4,62±0,01	4,59±0,02	4,55±0,04	abcd
Acidez titulable (g/L ácido tartárico)	2,15±0,02	3,5±0,1	3,57±0,08	3,61±0,03	3,72±0,03	ab(bc)(cd)d
Acidez volátil (g/L ácido acético)	0,47±0,02	1,33±0,04	1,40±0,02	1,80±0,02	1,92±0,05	abcde
IPT	15,7±0,2	15,9±0,1	15,47±0,08	17,1±0,1	17,18±0,07	aabcc
Absorbancia 420 nm	1,19±0,01	1,15±0,02	1,09±0,02	1,23±0,02	1,32±0,03	abcde
Etanol %(v/v)	15,0±0,5	15,0±0,5	15,0±0,5	11,0±0,5	11,0±0,5	

VT: Vino tradicional. VDN: Vino dulce natural. VND: Vino naturalmente dulce. Subíndice a : levadura autóctona.

Subíndice s: levadura seleccionada.

La tabla 2, muestra los valores de los ésteres determinados. Estos compuestos tienen una gran influencia en el carácter afrutado de los vinos [3]. Tienen dos vías de formación, la primera es química y la segunda es microbiológica. Como consecuencia de la fermentación el contenido total en ésteres aumenta de forma significativa, lo que es debido al metabolismo de las levaduras. No obstante, debemos tener en cuenta que la vía química también tiene una especial influencia como se observa en el caso de los vinos obtenidos de forma tradicional. En este sentido, el hecho de que los vinos dulces naturales tengan un mayor contenido en etanol que los naturalmente dulces podría explicar el mayor contenido en ésteres en los primeros en relación con los segundos, aun cuando las levaduras hayan fermentado una mayor cantidad de azúcares.

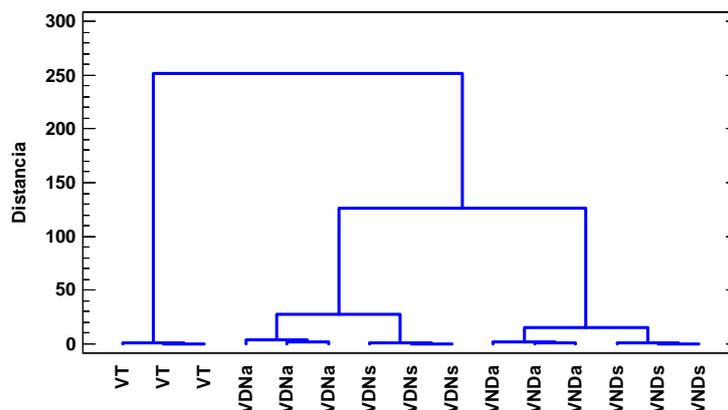
Tabla 2. Compuesto volátiles determinados (microgramos/L). Letras diferentes indican diferencias significativas al 95%

Compuesto	VT	VDNa	VDNs	VNDa	VNDs	ANOVA
Acetato de metilo	81±3	85±3	64±4	39±2	58±2	aabcd
Propanoato de etilo	374±9	152±7	142±4	271±11	239±11	abbcd
Isobutanoato de etilo	0,0±0,0	3,4±0,2	1,4±0,2	5,8±0,2	2,4±0,1	abcde
Butanoato de etilo	3,5±0,1	119±4	123±6	96±2	82±3	abbcd
Acetato de isoamilo	60,2±1,4	193±9	202±9	120±5	105±3	abbcd
Hexanoato de etilo	2,2±0,2	96,0±0,4	106±5	65±4	60,8±0,8	abcdd
Heptanoato de etilo	1,6±0,2	16,9±0,9	24±1	16,2±0,9	14,5±0,7	abcdb
Succinato de dietilo	81,7±2,0	107±5	101±2	226±7	243±10	abbcd
Octanoato de etilo	3,8±0,1	51,1±0,6	58±1	16,6±0,4	17,2±0,6	abcdd
Acetato de 2-feniletanol	6,2±0,6	12,1±0,5	12,8±0,5	15,4±0,3	15,0±0,1	abbcc
G-nonolactona	11,7±0,1	23,0±0,5	23±1	32±1	31,02±0,04	abbcc
Decanoato de etilo	4,6±0,1	114±2	162±6	3,1±0,2	2,92±0,02	abcaa
Decalactona	4,7±0,2	4,9±0,2	4,4±0,0	9,4±0,1	7,3±0,2	aabcd
Dodecanoato de etilo	0,24±0,01	77±4	105±6	1,03±0,07	0,73±0,04	abcaa
Tetradecanoato de etilo	nd	2,1±0,1	2,2±0,1	nd	nd	abcaa
Hexadecanoato de etilo	1,58±0,02	7,6±0,3	8,2±0,4	5,9±0,2	7,2±0,3	abcdb

VT: Vino tradicional. VDN: Vino dulce natural. VND: Vino naturalmente dulce. Subíndice a : levadura autóctona. Subíndice s: levadura seleccionada. nd: no detectado

Con objeto de estudiar las diferencias entre los distintos vinos se ha realizado un análisis de conglomerados. Con este método las muestras se van agrupando en función de lo parecidas que son entre sí, de modo que cuanto menor es la distancia entre dos grupos mayor es la similitud entre estos. Como puede observarse en la figura 1, existe una gran diferencia entre el VT y los obtenidos por fermentación parcial. En segundo lugar, se observan diferencias entre los VDN y los VND. En cuanto a la influencia del tipo de levadura usada, las diferencias entre son mayores en el caso de los VDN, probablemente porque al final de la fermentación alcohólica en los vinos naturalmente dulces las diferencias entre levaduras se atenúan.

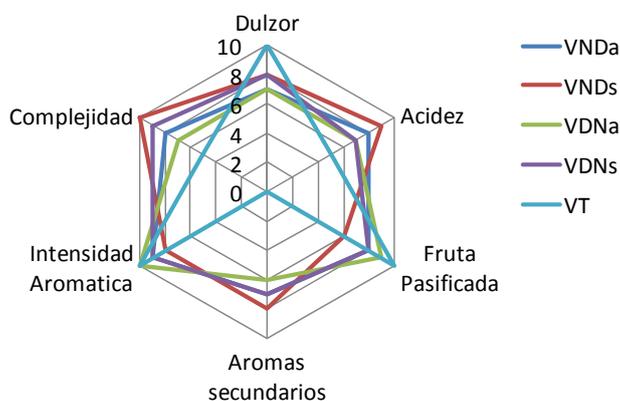
Figura 1. Análisis de conglomerados.



VT: Vino tradicional. VDN: Vino dulce natural. VND: Vino naturalmente dulce. Subíndice a : levadura autóctona. Subíndice s: levadura seleccionada.

El análisis organoléptico realizado (figura 2), muestra que el VT presentó la máxima puntuación en intensidad aromática, dulzor y fruta pasificada (aromas primarios). El resto de los vinos presentó una mayor complejidad y mejores valores de acidez. Esto último, unido a los menores valores de dulzor hace que los vinos fermentados presenten un mejor equilibrio acidez dulzor que el VT.

Figura 2. Intensidad de los descriptores organolépticos analizados.



VT: Vino tradicional. VDN: Vino dulce natural. VND: Vino naturalmente dulce. Subíndice a : levadura autóctona. Subíndice s: levadura seleccionada.

4. Conclusiones

La fermentación parcial de mostos de uva Pedro Ximénez pasificada da lugar a vinos de mayor complejidad aromática que los obtenidos de forma tradicional presentando un mejor equilibrio acidez dulzor. Dado que la tendencia actual es la de obtener vinos con una menor graduación alcohólica, los VND podrían satisfacer los gustos de una parte de los consumidores al carecer este tipo de vinos de alcohol añadido.

5. Bibliografía

1. López de Lerma, N., Bellicontro, A., Mencarelli, F., Moreno, J.; Peinado, R.A. 2012a. Use of electronic nose validated by GC-MS, to establish the optimum off-vine dehydration time of wine grapes. *In: Food Chemistry*, 130, 447-452.
2. Moreno, J.; Peinado, R.A. 2012. *Enological Chemistry*. Academic Publisher. London, UK.
3. López de Lerma, N.; Peinado, R.A. 2011. Use of two osmoethanol tolerant yeast strain to ferment must from Tempranillo dried grapes. Effect on wine composition. *In: International Journal of Food Microbiology*, 145, 342-348.
4. López de Lerma, N., García-Martínez, T., Moreno, J., Mauricio, J.C.; Peinado, R.A. 2012b. Volatile composition of partially fermented wines elaborated from sun dried Pedro Ximenez grapes. *In: Food Chemistry*, 135, 2445-52.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto RTA2011-00020-C02-02 del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO-INIA-CCAA) y FEDER.

TE03 - LA TRITURACIÓN DEL HOLLEJO COMO TÉCNICA PARA AUMENTAR LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DURANTE LA VINIFICACIÓN

S. Gómez-Alonso^{1,2}, M. Fernández-González^{1,2}, A. Mena¹, E. García-Romero³, P. M. Izquierdo-Cañas^{2,3}

¹Universidad de Castilla-La Mancha, IRICA, Avda. Camilo José Cela s/n, 13071, Ciudad Real, ES

²Parque Científico y Tecnológico de Castilla-La Mancha, Paseo de la Innovación, 1, 02006 Albacete, ES.

³Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha (IVICAM). Crta. Toledo-Albacete s/n, 13700, Tomelloso, ES.

sergio.gomez@uclm.es

RESUMEN:

El contenido en compuestos fenólicos de la uva puede definir su aptitud enológica, sin embargo también se debe considerar la facilidad con que esos compuestos se extraen al vino durante el proceso de maceración. En este trabajo se evaluó el efecto de la trituration pre-fermentativa y post-fermentativa de los hollejos en la composición y calidad del vino, centrándonos en el estudio del color y de las distintas familias de compuestos fenólicos del vino. Los flavan-3-oles se incrementaron aproximadamente un 80 % respecto al vino control. No se produjeron cambios significativos en el contenido total en antocianos libres, pero sí se observó una disminución de la luminosidad y un incremento de la componente a* en el tratamiento post-fermentación.

Palabras clave: Compuestos fenólicos, hollejo, vinificación, trituration.

1. Introducción

La relación de los compuestos fenólicos con la calidad sensorial del vino hace que el contenido en estos compuestos de la uva sea un parámetro de calidad fundamental que define su aptitud enológica, especialmente en la caso de la variedades de uva que se destinan a la elaboración de vinos tintos. Tan importante como el contenido, es la facilidad con que esos compuestos se extraen al vino durante el proceso de maceración.

En la uva tinta los antocianos se localizan en los hollejos, compartimentados en vacuolas dentro de las células. Para la extracción de estos compuestos al vino es necesario que las paredes celulares se degraden y la membrana de la vacuola se rompa. En general se acepta que la extractabilidad de los antocianos de la piel se incrementa a medida que la uva madura por la acción de enzimas pectolíticas que degradan la pared celular [1]. Además, la composición de la pared celular (grado de metilación de las pectinas, etc.) es responsable de sus propiedades físicas y determina la extractabilidad de los antocianos, viniendo este factor determinado en gran medida por la variedad de uva [2-4]. La variedad de uva Monastrell, cultivada principalmente en el sureste de España, tiene un mayor Índice de Extractabilidad de los antocianos, que el de otras variedades como Syrah, Merlot o Cabernet Sauvignon cultivadas en la misma zona [4], lo que quiere decir que tras el proceso de vinificación sus

hollejos retienen una mayor proporción de los antocianos inicialmente presentes y que necesitaría periodos de maceración más largos [5].

En este trabajo se ha evaluado el efecto que tiene la trituración pre-fermentativa (V-PRF) y post-fermentativa (V-POF) de los hollejos en la composición y calidad del vino obtenido a partir de la uva de la variedad Monastrell, centrándonos fundamentalmente en el estudio del color y de las distintas familias de compuestos fenólicos del vino.

2. Material y métodos

Las uvas de la variedad Monastrell fueron obtenidas del campo experimental del IVICAM (Tomelloso), en su momento óptimo de madurez tecnológica (grado alcohólico potencial del orden de 13-14 %) en septiembre de 2014. Tras el despallado y estrujado de la vendimia, ésta se distribuyó en 9 depósitos de 20 kg cada uno, realizándose vinificaciones por triplicado: vino control (V-C), trituración pre-fermentativa (V-PRF) y post-fermentativa (V-POF). En todos los casos la fermentación-maceración se prolongó durante 10 días a 24 °C. En los vinos V-PRF las partes sólidas de la uva se trituraron en el momento del encubado con la ayuda de una trituradora. En los vinos V-POF la trituración se realizó a los seis días del encubado, cuando la densidad era de aproximadamente 1.005 g/ml. Tras el descube se realizó un trasiego y se corrigió el sulfuroso libre a 25mg/L. Posteriormente los vinos fueron estabilizados por frío y se filtraron y embotellaron antes de su análisis.

Los parámetros analíticos convenciones del vino (contenido alcohólico, acidez total, pH, acidez volátil, SO₂ total, glicerina y características cromáticas CIEL*^a*^b*) se determinaron de acuerdo a los métodos recomendados por la OIV (2014) [6]. La intensidad colorante (IC) se estimó de acuerdo al método descrito por Glories [7]. El contenido en antocianos decolorables y no decolorables por SO₂ se determinó siguiendo el método propuesto por Niketic-Aleksic [8]. La composición fenólica se analizó mediante cromatografía HPLC-DAD-ESI-MS/MS. Los vinos se utilizaron directamente para el análisis de antocianos, y de éstos se separó la fracción libre de antocianos para el análisis de flavonoles y ácidos hidroxicinámicos [9]. El análisis de flavan-3-oles de los vinos y la caracterización de sus unidades estructurales se realizó, según la metodología previamente descrita [10], empleando pirogalol como reactivo de despolimerización.

3. Resultados

El análisis de los parámetros físico-químicos clásicos de los vinos determinó que los tratamientos de trituración de los hollejos no tuvieron un efecto significativo en la composición de los vinos.

Se observó un incremento significativo en el contenido en antocianos decolorables por SO₂ de los vinos en que se realizó una trituración post-fermentativa de los hollejos (Tabla 1), que indicaría que la trituración de los hollejos facilita la extracción de los antocianos al vino fermentado. En el caso de los antocianos libres determinados por HPLC y los piranoantocianos la trituración prefermentativa de los hollejos produjo una disminución significativa respecto a los vinos control. Resultados similares se obtuvieron para los derivados de ácidos hidroxicinámicos y los flavonoles, aunque en este último caso las diferencias no fueron significativas.

Tabla 1. Contenido en antocianos, flavonoles y derivados de ácidos hidroxicinámicos (DAHC) de los vinos de la variedad Monastrell elaborados.

	V-C	V-PRF	V-POF
Antoc. decolorables por SO ₂ (mg/L)	369.61 ± 8.38 ^{ab}	353.71 ± 2.16 ^a	389.11 ± 16.29 ^b
Antoc. no decolorables por SO ₂ (mg/L)	23.35 ± 0.91	25.01 ± 6.86	22.75 ± 0.67
Antocianos libres (HPLC)*	152.01 ± 15.62 ^b	131.55 ± 3.71 ^a	136.52 ± 4.16 ^{ab}
Antocianos acilados (HPLC)*	38.32 ± 2.51	34.98 ± 1.60	35.03 ± 0.78
Piranoantocianos (HPLC)*	3.64 ± 0.35 ^b	3.01 ± 0.14 ^a	3.48 ± 0.26 ^{ab}
Suma Antocianos (HPLC)*	193.93 ± 18.45	169.54 ± 5.22	175.04 ± 4.54
Suma Flavonoles (HPLC)**	102.06 ± 6.27	95.78 ± 8.37	105.44 ± 4.47
Suma DAHC (HPLC)***	57.20 ± 4.96 ^b	35.29 ± 5.37 ^a	50.98 ± 3.49 ^b

Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test de Duncan ($\alpha=0.05$). *Resultados expresados como mg equivalentes de malvidina-3-glucósido/L. ** Resultados expresado como mg equivalentes quercetina-3-glucósido/L. *** Resultados expresado como mg equivalentes de ácido caftárico/L.

En la tabla 2 se observa que los flavan-3-oles, monómeros, dímeros y polímeros, se incrementaron significativamente con la trituración, con un aumento aproximado del 80 % respecto al vino control. Se observó un aumento del porcentaje de galoilación y la disminución de la proporción de prodelfinidinas, lo que indicaría que la trituración incrementó la proporción de flavan-3-oles de las semillas respecto a los de los hollejos en los vinos. El grado medio de polimerización no cambio significativamente.

Tabla 2. Contenido en flavan-3-oles de los vinos de la variedad Monastrell elaborados.

	V-C	V-PRF	V-POF
Monómeros Flavan-3-oles (mg/L)	139.36 ± 7.15 ^a	288.44 ± 20.27 ^b	286.15 ± 27.71 ^b
Dímeros Flavan-3-oles (mg/L)	46.95 ± 2.33 ^a	127.25 ± 8.26 ^b	117.66 ± 13.14 ^b
Total Flavan-3-oles (mg/L)	296.01 ± 38.65 ^a	526.23 ± 81.97 ^b	563.19 ± 39.60 ^b
Grado medio polimerización	3.39 ± 0.26	3.36 ± 0.28	3.62 ± 0.08
% Galoilación	2.69 ± 0.14 ^a	4.82 ± 0.16 ^b	6.13 ± 0.04 ^c
%Prodelfinidinas	21.42 ± 0.72 ^b	12.97 ± 1.30 ^a	13.55 ± 0.37 ^a

Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test de Duncan ($\alpha=0.05$).

En la tabla 3 podemos observar que sí se produjeron cambios en el color, observándose una disminución de la luminosidad tratamiento post-fermentación, que son también los vinos de mayor contenido en antocianos libres. Respecto a la intensidad colorante, también los vinos V-POF mostraron mayores valores.

Tabla 3. Características cromáticas de los vinos de la variedad Monastrell elaborados.

	V-C	V-PRF	V-POF
L *	41.67 ± 1.17 ^b	38.97 ± 1.80 ^b	35.02 ± 1.57 ^a
a *	58.90 ± 0.38 ^{ab}	56.78 ± 2.11 ^a	60.73 ± 1.45 ^b
b *	18.91 ± 0.44 ^a	19.50 ± 0.74 ^a	22.86 ± 1.69 ^b
C *	61.86 ± 0.26 ^{ab}	60.03 ± 2.22 ^a	64.90 ± 1.90 ^b
H *	17.80 ± 0.48 ^a	19.29 ± 0.50 ^b	20.61 ± 1.03 ^b
Intensidad Colorante	3.18 ± 0.11 ^a	3.38 ± 0.16 ^a	4.00 ± 0.25 ^b
Tonalidad	0.73 ± 0.03	0.76 ± 0.04	0.69 ± 0.02

Diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test de Duncan ($\alpha=0.05$).

4. Conclusiones

La trituración pos-fermentativa de los hollejos de la uva Monastrell favorece la extracción de los antocianos del hollejo y da lugar a vinos de menor luminosidad. Sin embargo, la aplicación pre-fermentativa de este tratamiento no produjo efectos significativos en el contenido en antocianos ni en el color.

5. Bibliografía

1. Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. 2000 Handbook of Enology. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, John Wiley and Sons Ltd., Baffins Lane, Chichester, 2000.
2. Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Ros-García, J.M., López-Roca, J.M., Gómez-Plaza, E. 2006. A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. *Anal. Chim. Acta* 563, 26–32.
3. Rolle, L., Torchio, F., Zeppa, G., Gerbi, V. 2008. Anthocyanin extractability assessment of grape skins by texture analysis. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 42, 157–162.
4. Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Ros-García, JM., Bautista-Ortín, AB., López-Roca, JM., Fernández-Fernández, JI., Gómez-Plaza, E. 2008. Anthocyanins and tannins in four grape varieties (*Vitis vinifera* L.). Evolution of their content and extractability. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 42, 147–156.
5. Romero-Cascales, I., Ortega-Regules, A., Lopez-Roca, J., Fernández-Fernández, J., Gómez-Plaza E. 2005. Differences in anthocyanins extractability from grapes to wines according to variety. *Am. J. Enol. Vit.* 56, 212-219.
6. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. 2014. Methods of analysis of wines and must. Compendium of international methods of wine and must analysis. OIV, Paris.
7. Glories, Y. 1984. La couleur des vins rouges II, *Connaissance de la vigne et du vin. Vigne vin.* 18, 253–271.
8. Niketic-Aleksic, GK., Hrazdrina, G. 1972. Quantitative analysis of the anthocyanin content in grape juices and wines. *Lebensm. –Wiss. Technol.* 5, 163-165.
9. Castillo-Muñoz, N., Fernández-González, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I. 2009. Red-color related phenolic composition of Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) grapes and red wines. *J. Agric. Food Chem.* 57, 7883-7891.
10. Lago-Vanzela, E.S., Da-Silva, R., Gomes, E., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I. 2011. Phenolic composition of the edible parts (flesh and skin) of Bordô grape (*Vitis labrusca*) using HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 59, 13136-13146.

6. Agradecimientos

Los autores S. Gómez-Alonso, M. Fernández-González y P.M. Izquierdo-Cañas agradecen al Fondo Social Europeo y a la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha la cofinanciación de sus contratos a través del programa INCRECYT.

TE04 - IMPACTO DEL POLIASPARTATO DE POTASIO EN LA ESTABILIDAD TARTÁRICA Y EL AROMA DE LOS VINOS

Ricardo López, Eduardo Vela, Purificación Hernández-Orte, Vicente Ferreira

Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología, Universidad de Zaragoza, Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A), Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias (Edif. D), Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza
riclopez@unizar.es

RESUMEN:

En esta comunicación, se presentan los resultados de un estudio de un año de duración en el que se ha comparado el efecto sobre la estabilidad tartárica, en diferentes tipos de vinos, del Poliaspartato de Potasio (KPA) frente al ácido metatartárico bajo la influencia de diversos coadyuvantes (goma arábiga, elagitaninos o ácido ascórbico). Además de la estabilidad tartárica, en este trabajo se ha seguido la variación en los parámetros enológicos clásicos, así como un análisis exhaustivo de su composición volátil complementada con los correspondientes análisis sensoriales. Los resultados obtenidos demuestran que el KPA es una alternativa válida como método de estabilización tartárica y que no afecta al perfil organoléptico de los vinos.

Palabras clave: poliaspartato de potasio, estabilidad tartárica, aroma, análisis sensorial, cromatografía

1. Introducción

La inestabilidad tartárica está relacionada con la presencia en el vino del ácido tartárico, el más abundante de los ácidos orgánicos de las uvas, y cationes como el potasio y el calcio. Estos compuestos se encuentran frecuentemente por encima de sus concentraciones de saturación. Este estado de sobresaturación es mantenido por la presencia de coloides naturales en el vino (polisacáridos o taninos), pero un descenso de la temperatura del vino puede romper el equilibrio causando la formación de cristales de tartrato. Una vez que los cristales alcanzan un determinado tamaño precipitan al fondo del contenedor. Si esto sucede después del embotellado, los cristales permanecen en el fondo de la botella y son percibidos negativamente por el consumidor.

Existen varias prácticas enológicas disponibles para la estabilización tartárica del vino, aunque ninguna es del todo satisfactoria para los productores. Estas prácticas se basan en tres estrategias diferentes: la inducción de la cristalización, la adición de inhibidores de cristalización y la eliminación del exceso de iones. El tratamiento por frío corresponde a la primera categoría y es probablemente el más practicado. En la segunda categoría destacan la adición de ácido metatartárico (MTA) y carboximetilcelulosa. En la tercera estrategia, se encuentra el tratamiento del vino con resinas catiónicas para retirar iones potasio y calcio. Todas estas posibilidades presentan limitaciones desde el punto de vista del impacto sensorial en el vino, el impacto medioambiental y el coste final del producto.

El objetivo del proyecto europeo STABIWINE es el desarrollo de un nuevo método de estabilización tartárica más económico y con menor impacto medioambiental. El mejor

candidato encontrado para esta tarea es el poliaspartato de potasio (KPA). El KPA es un polímero obtenido por condensación del ácido aspártico. El material original para la extracción del ácido aspártico es la pulpa de remolacha después de la extracción del azúcar, es por tanto, el subproducto de otra industria. Es completamente biodegradable y por su habilidad quelante de iones metálicos se ha utilizado como agente desincrustante e inhibidor de la corrosión (1). En el presente trabajo se presentan los resultados de un estudio de un año de duración en el que se ha comparado el efecto del KPA sobre la estabilidad tartárica y el aroma y sabor en diferentes tipos de vinos y bajo la influencia de diversos coadyuvantes.

2. Material y métodos

El poliaspartato de potasio fue proporcionado por Esseco Srl (Trecate, Italia). Un volumen de 110 L de un vino tinto y la misma cantidad de vino blanco, ambos procedentes de Bodegas Ignacio Marín (D.O. Cariñena), de 2013 fueron utilizados para los experimentos. Los vinos fueron tomados directamente del depósito y sin estabilización previa. En el caso del vino tinto se diseñó un experimento factorial completo con tres factores y dos niveles por factor. El primer factor fue adición de KPA o MTA (10 g/hl), el segundo factor adición de goma arábiga (Maxigum Enartis) 0 o 1 ml/l, y el tercer factor fue la adición de ellagitaninos en 0 o 5 g/hl (2³ ensayos en duplicado). Después de la adición de los productos, los vinos fueron embotellados y guardados a 20 °C durante un año, para su análisis a las 48 h, 6 y 12 meses. Se procedió de idéntica forma para el vino blanco pero sustituyendo la adición de ellagitaninos por ácido ascórbico en 0 o 5 g/hl. Sobre cada una de estas muestras se determinaron, además de los parámetros enológicos clásicos, los siguientes análisis químicos: estabilidad tartárica mediante cold test (2), estabilidad de color, ácidos orgánicos mediante HPLC y compuestos volátiles mediante GC-FID (3) y GC-MS (4).

Los análisis sensoriales se llevaron a cabo mediante test triangulares. El panel de catadores estaba compuesto por 11 jueces con experiencia previa en análisis sensorial de vino. Los ensayos se realizaron en copas negras normalizadas con 30 ml de vino cubierto con un vidrio de reloj. A los jueces se les pidió que identificaran mediante aroma y sabor la copa diferente en diversas comparaciones entre tratamientos. La significatividad estadística se calculó de acuerdo con las recomendaciones de AENOR. Los tratamientos estadísticos se realizaron con el software SPSS v. 22 de IBM.

3. Resultados

El objetivo fundamental del experimento era comprobar la eficacia del KPA y diversos aditivos en el mantenimiento de la estabilidad tartárica. Para ello se evaluó la inestabilidad tartárica mediante el denominado "cold test", consistente en determinar la cantidad de ácido tartárico mediante HPLC antes y después de mantener el vino durante 6 días a -4 °C (2). Una diferencia de concentraciones menor de 0,2 indica una adecuada estabilidad tartárica. Los análisis de las muestras después de 6 meses de contacto mostraron que tanto los vinos tratados con KPA como con MTA eran estables (datos no mostrados). Sin embargo, esta situación cambió después de 12 meses de contacto (Figura 1). Tanto en el caso del vino blanco como en el del vino tinto, el MTA había perdido su eficacia como estabilizante ya que los valores del test de frío eran mayores de 0,3 en todos los casos. Por el contrario, los vinos tratados con KPA eran todavía estables tartáricamente ya que las diferencias eran menores de 0,2.

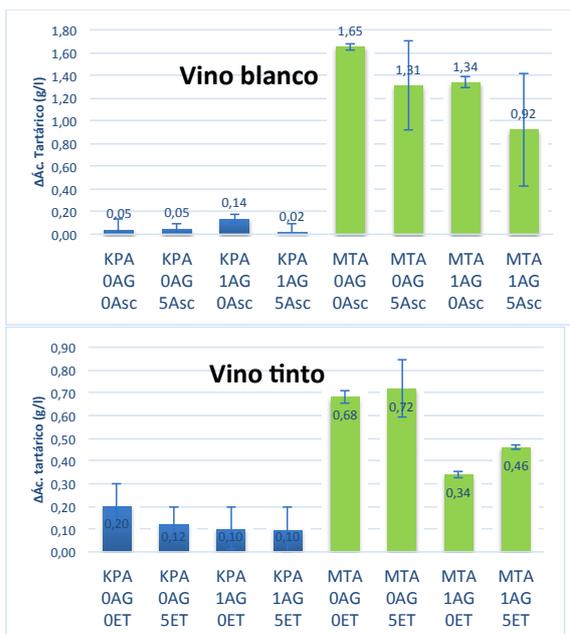


Figura 1: resultados del test de frío después de 12 meses de contacto. Valores mayores indican mayor inestabilidad tartárica. Claves: KPA: vinos tratados con poliaspartato de potasio, MTA: vinos tratados con ácido metatartárico. 0AG sin adición o 1AG 1 ml/l de goma arábica añadida. 0Asc sin adición o 5Asc 5 g/hl de ácido ascórbico añadido. 0ET sin adición o 5ET 5 g/hl de ellagitaninos añadidos.

El efecto inhibitor del KPA en la formación de cristales de tartatro, se basa en la adsorción de las moléculas del polímero en los sitios activos de crecimiento de la matriz del cristal. Esto conduce a una nucleación y crecimiento reducidos y a la formación de estructuras cristalinas distorsionadas (5). Este fenómeno inhibitor permanece después de 1 año en los vinos en el caso del KPA pero no en los vinos que fueron tratados con MTA.

Un punto crucial en el desarrollo de un nuevo aditivo es asegurar que la tipicidad del aroma no se altera con el tratamiento. Para comprobar este punto se determinaron 67 compuestos volátiles en cada una de las 96 muestras de vino producidas en los experimentos. El análisis estadístico ANOVA de los datos de composición volátil de las muestras de vino no mostró diferencias significativas que pudieran tener un impacto en la percepción sensorial de las muestras. Desde el punto de vista de la composición volátil, se puede asegurar que los tratamientos con KPA no modifican sensiblemente el perfil de aromático de los vinos. A modo de ejemplo, en la figura 2 se muestran los contenidos en acetato de isoamilo en los vinos blancos y de dihidrocinnamato de etilo en los vinos tintos.

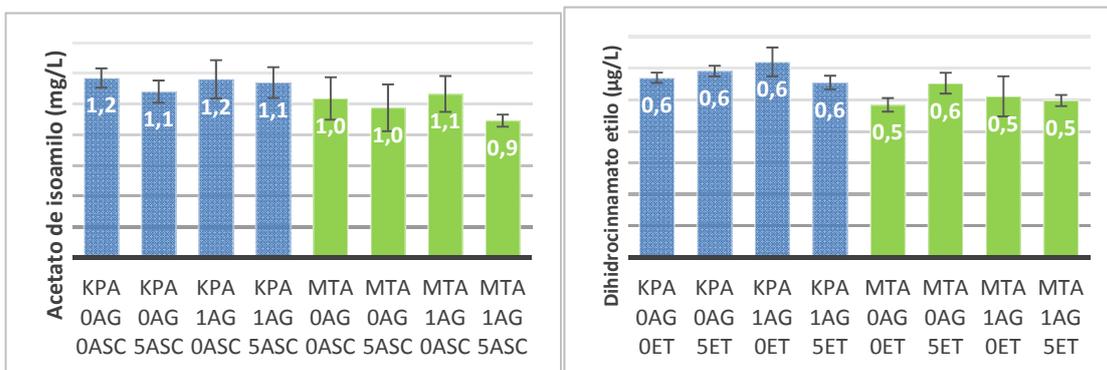


Figura 2: concentración de acetato de isoamilo en vinos blancos (izda.) y dihidrocinnamato de etilo en vinos tintos (dcha.) después de 12 meses de contacto. Claves: KPA: vinos tratados con poliaspartato de potasio, MTA: vinos tratados con ácido metatartárico. 0AG sin adición o 1AG 1 ml/l de goma arábica añadida. 0Asc sin adición o 5Asc 5 g/hl de ácido ascórbico añadido. 0ET sin adición o 5ET 5 g/hl de ellagitanninos añadidos.

Además de evaluar la posible influencia de los tratamientos en los compuestos volátiles, se realizaron ensayos sensoriales para confirmar que no existían diferencias organolépticas. Con este objetivo, a lo largo de los 12 meses de experimento se realizaron test triangulares basados en el aroma y en el sabor tanto para los vinos tintos como blancos, siempre comparando los vinos tratados con KPA frente a los tratados con MTA. En ninguno de los ensayos realizados los catadores fueron capaces de encontrar diferencias significativas que permitieran asegurar una alteración del perfil organolépticos de los vinos causado por el tratamiento con KPA.

4. Conclusiones

Después de un experimento de un año de duración en el que se han analizado exhaustivamente las eficacia en la estabilización tartárica y el impacto sensorial, se puede afirmar que el poliaspartato de potasio es un aditivo eficaz para prevenir la formación de cristales de bitartrato en las botellas de vino y supone una alternativa más económica que la estabilización por frío. Igualmente se ha podido confirmar mediante análisis químicos y sensoriales que el poliaspartato de potasio no altera el perfil organoléptico de los vinos.

5. Bibliografía

1. Low, K.C.; Wheeler, A.P.; Koskan, L.P. 1996. Commercial poly(aspartic acid) and its uses. *In: Advances in Chemistry Series 248*. American Chemical Society.
2. Boulton, R.; Singleton, V.; Bisson, L.; Kunkee, R. 1996. *In: Principles and practices of winemaking*. Springer. 327-329.
3. Ortega, C., Lopez, R.; Cacho, J.; Ferreira, V. 2001. Development and validation of a new method based on gas chromatographic–flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts. *In: J. Chromatography A*. 923, 205-214.
4. Lopez, 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. *In: J Chromatography A*. 966, 167-177.
5. Hasson, D.; Shemer, H.; Sher, A. 2011. State of the art of friendly “Green” scale control inhibitors: a review article. *In: Ind. Eng. Chem. Res.* 50, 7601-7607.

6. Agradecimientos

El trabajo presentado ha sido financiado a cargo del proyecto de la Unión Europea: STABIWINE Use Of Biopolymers For Sustainable Stabilization Of Quality Wines (FP7-SME-2012 SME-2012-2: Research for SME associations)

TE05 - INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y FORMATO DE LA LEVADURA SOBRE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES MAYORITARIOS EN LA SEGUNDA FERMENTACIÓN DEL CAVA

Fina Capdevila¹, José Miguel Fuentes-Espinosa², Teresa García-Martínez³, Juan Carlos Mauricio³, Juan J. Moreno², Anna Puig-Pujol^{*1}

¹Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries - Institut Català de la Vinya i el Vi. Plaça Àgora, 2. 08720 Vilafranca del Penedès (Barcelona), España.

²Universidad de Córdoba, Departamento de Química Agrícola, Edificio C3, Planta 3. Campus Universitario de Rabanales. Ctra. N-IVa, Km 396, 14014, Córdoba, España.

³Universidad de Córdoba, Departamento de Microbiología, Edificio C6, Planta baja. Campus Universitario de Rabanales. Ctra. N-IVa, Km 396, 14014, Córdoba, España.

anna.puig@irta.cat

RESUMEN:

Tradicionalmente, la segunda fermentación en botella, para la elaboración de cava, se realiza mediante la inoculación de levaduras en formato libre, lo que condiciona un proceso de removido y eliminación de lías muy lento y laborioso. El uso de levaduras inmovilizadas en soportes naturales, que no aporten sustancias extrañas al vino es una alternativa viable que permite reducir y simplificar estas etapas. En el presente trabajo se compara la composición de cavas obtenidos después de 15 meses de crianza, estableciendo como factores de variación las temperaturas de 10 y 14°C y el formato de inoculación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* P29 inmovilizada en forma de biocápsulas y en forma libre. Se han cuantificado 17 variables enológicas y 11 compuestos volátiles mayoritarios en los cuatro lotes. Mediante un análisis de varianza múltiple se han establecido 10 compuestos o fracciones que dependen del formato de inoculación y 15 de la temperatura.

Palabras clave: Cava, bioinmovilización, segunda fermentación, volátiles.

1. Introducción

Numerosas investigaciones sobre los vinos espumosos se han enfocado al estudio de los fenómenos de autólisis de las levaduras, las enzimas implicadas y los productos liberados durante la fase de crianza sobre lías de levaduras y elevadas presiones de CO₂. Otros factores como la cepa de levadura, el vino base y el tiempo de crianza y su influencia sobre el perfil aromático del vino espumoso han sido tratados también en algunas publicaciones [1]. Sin embargo, se han realizado pocas investigaciones sobre el comportamiento de las levaduras en la segunda fermentación en botella [2], particularmente sobre el efecto que el formato utilizado en el licor de tiraje como cultivo iniciador (levaduras libres o inmovilizadas) posee sobre los contenidos en los compuestos volátiles secundarios de la fermentación, relacionados con el aroma [3, 4, 5].

Recientes estudios realizados en el INCAVI y en el grupo de investigación Vitenol de la Universidad de Córdoba han demostrado que las células de levadura bioinmovilizadas sobre un hongo GRAS, aplicadas a la segunda fermentación en botella, poseen la misma efectividad fermentativa y proporcionan cavas con las mismas características de espumabilidad y

persistencia de espuma que los cavas elaborados de forma tradicional y poseen las mismas características enológicas generales. Además, el uso de bio-cápsulas presenta como ventaja sobre el formato libre que el proceso de removido se puede realizar en menos de dos minutos [6]. En el presente trabajo se han elaborado cavas con quince meses de crianza utilizando para la segunda fermentación en botella el mismo vino base y la misma levadura en dos formatos (libre e inmovilizada como bio-cápsulas) y dos temperaturas (10 y 14°C), con el objetivo de comparar su efecto sobre la composición de los cavas obtenidos.

2. Material y métodos

Como inóculo se utilizó la levadura *S. cerevisiae* P29 (CECT 11770), aislada por el INCAVI en la D.O. Penedès, en dos formatos. Uno de ellos corresponde a células libres inoculadas con adición de 0.6 mg/L de bentonita y otro a la misma cepa de levadura inmovilizada en forma de biocápsulas. En ambos casos se inoculó una población de 1×10^6 células/mL. Las biocápsulas de levadura se obtuvieron de acuerdo a la patente WO2012175774 en la Universidad de Córdoba. La segunda fermentación se llevó a cabo en botellas estándar de 750 mL, utilizando como vino base el obtenido con la mezcla de uvas 50 % Macabeu + 30 % Xarel·lo + 20 % Parellada, y un contenido en etanol de 10.8 % v/v, 6.4 g/L acidez total y pH 3.05, al que se añadieron 21 g/L de sacarosa. Se prepararon dos lotes de botellas, uno conteniendo las levaduras en formato libre y otro con las levaduras inmovilizadas y la mitad de cada lote se sometió a fermentación a una temperatura de 10°C y la otra mitad a 14°C. La actividad fermentativa se controló midiendo el incremento de presión de CO₂ en la botella mediante un afrómetro interno y después de un periodo total de 15 meses se procedió al análisis de 3 botellas del cava obtenido en cada una de las cuatro condiciones estudiadas.

El contenido en etanol, azúcar, acidez total, acidez volátil, pH, sulfuroso libre y total, se analizó según los protocolos establecidos por la OIV. El ácido málico, ácido láctico, glicerol y nitrógeno amoniacal y amínico se analizaron mediante método enzimático. Las absorbancias a las longitudes de onda de 280, 420, 520 nm se determinaron en un espectrofotómetro Uv-Vis. Los compuestos volátiles mayoritarios y 2,3-butanodiol se cuantificaron por inyección directa del cava en un cromatógrafo de gases según el método descrito en [7]. Finalmente, se determinó la capacidad espumante (HM: espumabilidad; HS: persistencia de la espuma) mediante el sistema Mosalux. Los datos mostrados corresponden a las medias de tres botellas distintas del mismo lote analizadas por triplicado y han sido sometidos a un análisis de la varianza múltiple de dos factores con interacción (MANOVA) aplicando previamente el test de Levene como prueba de homogeneidad. El software de análisis estadístico usado fue Statgraphics Centurion XVI.

3. Resultados

Los lotes fermentados a 10°C presentaron una cinética de producción de CO₂ más lenta que los fermentados a 14°C. Los inóculos de levaduras libres iniciaron la fermentación antes que las biocápsulas a 14°C (día 4 y 13, respectivamente) y también a 10°C (día 11 y 25, respectivamente). Ambas fermentaciones finalizaron a los 60 días a 14°C y a los 109 a 10°C.

La Tabla 1 muestra los valores medios y desviación estándar de las características de los cavas elaborados en las cuatro condiciones estudiadas, después de un periodo de 15 meses. También figuran los niveles de significación (α), obtenidos con el análisis de la varianza de dos vías usando formato, temperatura y su interacción como fuentes de variación. Los resultados indican que la mayoría de las variables no dependen del formato y sólo muestran

diferencias significativas a un nivel $\alpha \leq 0.05$, la altura máxima y la estabilidad de la espuma, que presentan valores ligeramente mayores en las fermentaciones llevadas a cabo con células libres. Por otro lado, contenido en calcio, absorbancias a 420, 520 y la intensidad colorante, son dependientes de la temperatura de fermentación y presentan valores mayores a 14°C mientras que el nitrógeno amínico, que también depende de la temperatura, presenta el valor mínimo a esta temperatura. Por último, sólo etanol y nitrógeno amínico presentan un nivel significativo de la interacción formato-temperatura, lo que indica que existe una relación entre estos dos factores que justifican las diferencias observadas.

Tabla 1. Características enológicas y análisis de varianza de los cavas elaborados con la levadura P29 en dos formatos de inoculación y a dos temperaturas después de 15 meses. Los valores de α indican la dependencia de cada compuesto con la fuente de variación considerada (F=Formato y T= Temperatura) y con la interacción (FxT).

Compuesto	Libres				Bicápsulas				Nivel significación α .		
	T=10°C		T=14°C		T=10°C		T=14 °C		F	T	FxT
	Media	Desv.	Media	Desv.	Media	Desv.	Media	Desv.			
Azúcares (g/L)	0.20	0.00	0.27	0.06	0.27	0.06	0.30	0.00	0.0667	0.0667	0.4996
Etanol (% v/v)	12.05	0.03	12.02	0.01	12.00	0.04	12.04	0.02	0.4236	0.6844	0.0353
pH	3.12	0.01	3.12	0.01	3.12	0.01	3.12	0.00	0.5796	0.1215	0.5796
Acidez total (g/L)	5.60	0.00	5.53	0.06	5.60	0.00	3.87	2.92	0.3513	0.3163	0.3513
Acidez Volátil (g/L)	0.25	0.02	0.25	0.01	0.25	0.01	0.24	0.01	0.3319	0.3319	0.6195
Acido Málico (g/L)	1.73	0.15	1.83	0.06	1.77	0.12	1.70	0.10	0.4609	0.8028	0.2328
Acido láctico (g/L)	0.47	0.06	0.40	0.00	0.40	0.00	0.40	0.00	0.0805	0.0805	0.0805
Ca (mg/L)	92	5	98	1	92	1	97	1	0.9103	0.005	0.7363
A420 (UA)	0.073	0.001	0.080	0.003	0.072	0.001	0.078	0.001	0.0754	0.0001	0.5927
A520 (UA)	0.008	0.001	0.010	0.001	0.007	0.000	0.010	0.002	0.8196	0.032	0.8196
IC (UA)	0.081	0.002	0.090	0.003	0.079	0.002	0.088	0.003	0.2725	0.0004	0.8196
Hm (altura máxima)	25.3	2.5	27.0	3.6	18.3	6.7	16.7	4.0	0.01	1.000	0.5367
Hs (altura estabilidad)	14.0	5.6	18.3	7.4	9.7	0.6	7.7	4.6	0.0363	0.7062	0.3199
NFA (mg/L)	65.0	1.0	63.7	1.2	66.0	1.7	65.0	3.6	0.3729	0.3729	0.8961
N amínico (mg/L)	5.67	0.58	3.67	0.58	5.33	0.58	5.33	0.58	0.0805	0.0171	0.0171
N amoniacal (mg/L)	59.33	1.15	60.00	1.00	60.67	1.15	59.67	3.21	0.6558	0.8812	0.4626

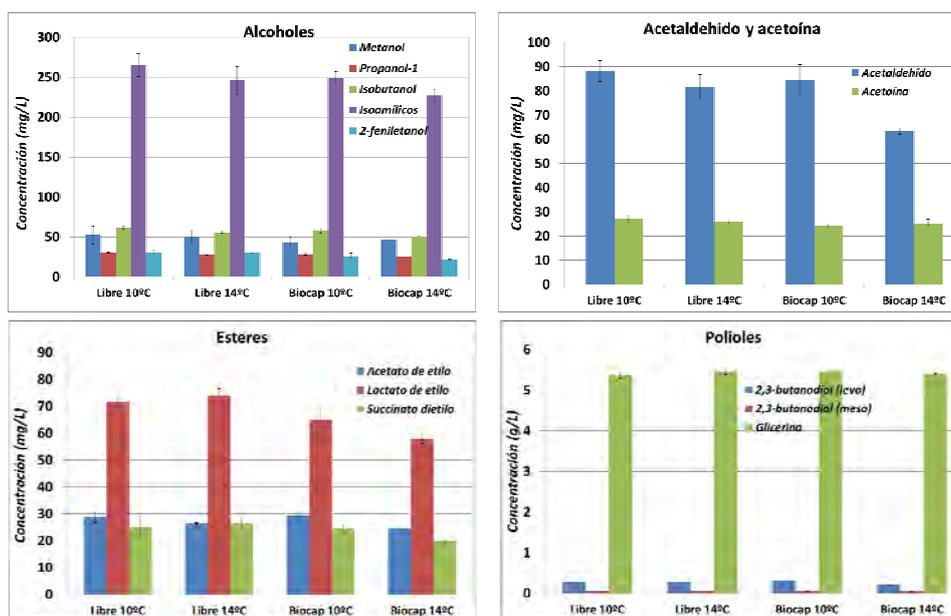
Todos los cavas presentan contenidos en los compuestos del aroma y polioles muy similares, aunque las diferencias obtenidas para algunos compuestos son significativas estadísticamente (Figura 1). En resumen, prácticamente todos los compuestos volátiles analizados dependen significativamente del formato y presentan menores contenidos cuando se usan bicápsulas de levadura. Sólo acetato de etilo, isobutanol y succinato de dietilo entre los volátiles y 2,3-butanodiol (*levo* y *meso*) junto a glicerina no dependen del formato. Todos los compuestos dependen también significativamente de la temperatura de fermentación, con la excepción de metanol, acetoína y lactato de etilo. Finalmente, la interacción formato-temperatura presenta niveles significativos para todos los compuestos a excepción de metanol, propanol-1, isobutanol, alcoholes isoamílicos y succinato de dietilo.

Mediante la cata triangular realizada por 8 catadores expertos se obtuvieron diferencias no significativas en cuanto a los formatos de inóculo utilizados, siendo los cavas elaborados con bicápsulas a cualquier temperatura mejor valorados en el test de preferencia. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre formatos y temperaturas en las puntuaciones de los descriptores valorados, aunque los cavas elaborados con bicápsulas a las dos temperaturas obtuvieron una mejor puntuación en aroma y sabor.

4. Conclusiones

La segunda fermentación en botella realizada con las bicápsulas de la levadura P29 permite obtener cavas con menores contenidos en compuestos mayoritarios del aroma relacionados con olores pesados, lo que aumenta su calidad sensorial. También la temperatura de 14°C permite la obtención de cavas con menores contenidos en estos aromas.

Figura 1. Contenidos medios en compuestos volátiles mayoritarios de los cavas después de 15 meses de fermentación y crianza con la levadura P29 en dos formatos de inoculación (células libres y biocápsulas) y a dos temperaturas (10 y 15 °C).



5. Bibliografía

1. Torresi, S., Frangipane, M.T., Anelli, G. 2011. Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: A review. *In: Food Chem.* 129: 1232-1241
2. Marti-Raga, M., Sancho, M., Guillamón, J. M., Mas, A., Beltran, G. 2015. The effect of nitrogen addition on the fermentative performance during sparkling wine production. *In: Food Res. Intern.* 67: 126-135. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.10.033
3. Pisanelli, A.M., Favati, F., Crapisi, A., Borin, G., Spettoli, P. 1989. The free amino-acid content of bottle-fermented moscato-bianco sparkling wine by immobilized yeasts. *In: Yeast*, 5: 113-116.
4. Bozdogan, A., Canbas, A. 2011. Influence of yeast strain, immobilization and ageing time on the changes of free amino acids and amino acids in peptides in bottle-fermented sparkling wines obtained from *Vitis vinifera* cv. *In: Emir. Int. J. Food Sci. Tech.* 46: 1113-1121.
5. Peinado, R.A., Moreno, J.J., Villalba, J.M., González-Reyes, J.A., Ortega, J.M., Mauricio, J.C. 2006. Yeast biocapsules: A new immobilization method and their applications. *In: Enz. Microb. Technol.* 40: 79-84.
6. Puig-Pujol, A., Bertran, E., García-Martínez, T., Capdevila, F., Minguéz, S., Mauricio, J.C. 2013. Application of a new organic yeast immobilization method for sparkling wine production. *In: Am. J. Enol. Vitic.*, 64: 386-394.
7. Peinado, R.A., Moreno, J.A., Muñoz, D., Medina, M., Moreno, J. 2004. Gas-chromatographic quantification of major volatile compounds and polyols in wine by direct injection. *In: J. Agric. Food Chem.* 52: 6389–6393.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO-INIA-CCAA) y FEDER a los Proyectos coordinados RTA2011-00020-C02-01 y 02

TE06 - ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE CAVAS ROSADOS ELABORADOS CON LEVADURAS INMOBILIZADAS EN BIOCÁPSULAS

Anna Puig-Pujol¹, Eugenio Revilla², Fina Capdevila¹

¹IRTA-INCAVI, Departamento de Investigación Enológica, Plaça Àgora, 2. 08720 Vilafranca del Penedès (Barcelona), España.

²UAM, Departamento de Química Agrícola y Bromatología.28049 Madrid, España.
anna.puig@irta.cat

RESUMEN:

La inmovilización de levaduras en soportes naturales se está estudiando como una alternativa al uso de levaduras libres durante la segunda fermentación en botella para la elaboración de cava, facilitando las etapas de removido y eliminación de las lías. Por otro lado, el consumo de cava rosado ha incrementado en los últimos años y evitar la evolución del color es un factor clave a tener en consideración. En este trabajo se han analizado las características fisicoquímicas, cromáticas y sensoriales de dos lotes de cava a los 4, 14 y 20 meses de crianza, uno obtenido mediante un sistema orgánico de inmovilización celular: las biocápsulas, y otro fermentado con la misma cepa de levadura (P29 – CECT 11770) en forma libre con bentonita. Se detectó una disminución de IC, polifenoles y concentración de antocianinas respecto al vino base a lo largo de la crianza en ambos lotes, aunque fue más acusada en los cavas fermentados con levaduras libres. En la cata descriptiva, los cavas elaborados con biocápsulas se puntuaron mejor en intensidad de color, aroma, persistencia y valoración final.

Palabras clave: cava rosado, biocápsulas, color, análisis sensorial

1. Introducción

La inmovilización celular en procesos fermentativos es un campo de investigación en expansión debido a su atractivo técnico y a sus ventajas económicas, comparado con el uso de células libres (1). En la industria elaboradora de vinos espumosos por el método tradicional como el Champagne en Francia, Talento en Italia o Cava en España, se ha estudiado la repercusión cualitativa del uso de levaduras incluidas en diferentes formatos y soportes de inmovilización para facilitar el proceso de removido y aclareo de las botellas (2, 3).

Aunque la mayoría de los cavas elaborados por el método tradicional se producen a partir de variedades blancas, el uso de las variedades tintas para elaborar cavas rosados ha ido creciendo en los últimos años, pasando de 2,5 millones de botellas en 2001 a más de 20 millones en 2014 (www.crcava.es). Los estudios recientes sobre vinos espumosos rosados elaborados con levaduras libres se han centrado básicamente en la evolución de los compuestos fenólicos durante la crianza (4), evolución de los compuestos volátiles (5,6) o el papel de distintos constituyentes en las características de la espuma (5,7). No obstante, no se ha encontrado ningún estudio donde se hayan comparado las características enológicas y cualitativas de espumosos rosados elaborados con levaduras inmovilizadas y libres.

El objetivo del trabajo ha sido evaluar las variables enológicas, cromáticas y sensoriales de cavas rosados monovarietales de Pinot noir a distintos tiempos de crianza elaborados con un inóculo de levaduras encapsuladas mediante un novedoso sistema, las biocápsulas,

consistente en la bioinmovilización espontánea entre un hongo y las células de levadura que realizan la segunda fermentación. Las características que le confieren al cava las biocápsulas se han comparado con una segunda fermentación en botella del mismo lote de vino base inoculado con células libres de la misma cepa de levadura con bentonita como clarificante.

2. Material y métodos

Los lotes de cava se elaboraron en la bodega experimental de INCAVI siguiendo el método tradicional a partir de un vino base monovarietal de Pinot noir. El licor de tiraje estaba compuesto por la levadura *S. cerevisiae* P29 (CECT 11770), perteneciente a la colección de levaduras de INCAVI, y sacarosa (22 g/L). En la elaboración de los cavas se utilizaron dos formatos de inóculo: células libres e inmovilizadas en biocápsulas. El inóculo de levaduras libres se preparó con la finalidad de obtener una concentración final dentro de la botella del orden de 1×10^6 células/mL. En este lote se adicionó bentonita (0,6 mL/L) (Adjuvant 83, Station Oenotechnique de Champagne, Epernay, France). La inmovilización de la cepa P29 en forma de biocápsulas se efectuó en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Córdoba (8). El número de biocápsulas introducidas en cada botella se calculó para realizar un inóculo equivalente a 1×10^6 células/mL. La fermentación se realizó a una temperatura de 14°C y se controló a través de la medida periódica de presión. Transcurridos 4, 14 y 20 meses de crianza, se clarificaron y abrieron 3 botellas de cada uno de los dos lotes para su análisis.

Los parámetros enológicos generales se cuantificaron según los métodos descritos por la OIV (9). El ácido málico, ácido láctico, glicerol y nitrógeno amoniacal y amínico (NFA) se analizaron mediante método enzimático (multi-parametric analyzer Lisa 200, TDI, Barcelona, Spain). Los parámetros cromáticos: A_{280} , A_{320} , A_{420} , A_{520} , A_{620} y las coordenadas Cielab se determinaron en un espectrofotómetro Lambda 25 UV-Vis (Perkin –Elmer, Massachusetts, USA). El ión Ca se analizó mediante espectrometría de absorción atómica por llama (FAAS) en un equipo Perkin-Elmer 280 (9). La composición antocianica se determinó por HPLC-DAD (10).

A los 14 y 20 meses de crianza se realizó una cata descriptiva con un panel de 8 catadores.

El tratamiento estadístico se efectuó con la aplicación informática SPSS 15.0.1 (IBM SPSS Statistics, New York, USA). Los resultados representan la media de tres repeticiones (3 botellas distintas del mismo lote). Para todos los parámetros estudiados se realizó un análisis de la varianza (ANOVA).

3. Resultados

Se analizaron distintas variables en diferentes periodos de crianza: 4, 14 y 20 meses, dando especial importancia a la evolución de las relacionadas con el color. La Tabla 1 muestra los valores medios y la desviación estándar de los principales parámetros enológicos. No se encontraron diferencias significativas atribuibles al formato de inóculo de la cepa P29. La fermentación se dio por completada a los 25 días en el lote con células libres y a los 32 en el que contenía biocápsulas. Como se puede observar a los 4 meses los dos lotes no contenían azúcares fermentables.

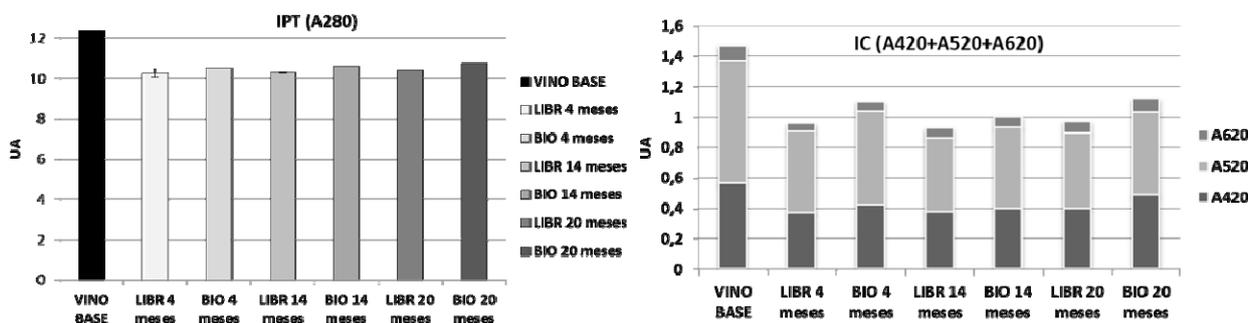
El formato de inóculo de la levadura tampoco influyó significativamente en el contenido global de polifenoles (IPT), antocianos, taninos y color, aunque durante la crianza se produjeron pérdidas de IPT e IC respecto al vino base en ambos lotes (Figura 1). No obstante, esta disminución fue mayor en los cavas elaborados con células libres y bentonita, probablemente debido a los fenómenos de adsorción de componentes del color por las levaduras relacionado con una mayor superficie de contacto con la matriz del vino en formato libre.

Se analizó el perfil antociánico en los dos lotes a los 14 y 20 meses de crianza en botella. La concentración total no superó 10 mg/L, siendo al menos un 30% de ellas piranoantocianinas. El contenido total apenas varió durante la crianza en botella, pero fue aumentando el contenido de piranoantocianinas, sobre todo vitisina A en cavas elaborados con células libres.

Tabla 1. Principales características enológicas de los cavas rosados después de 4, 14 y 20 meses de crianza en los dos formatos de inoculación de la levadura P29: células libres y biocápsulas.

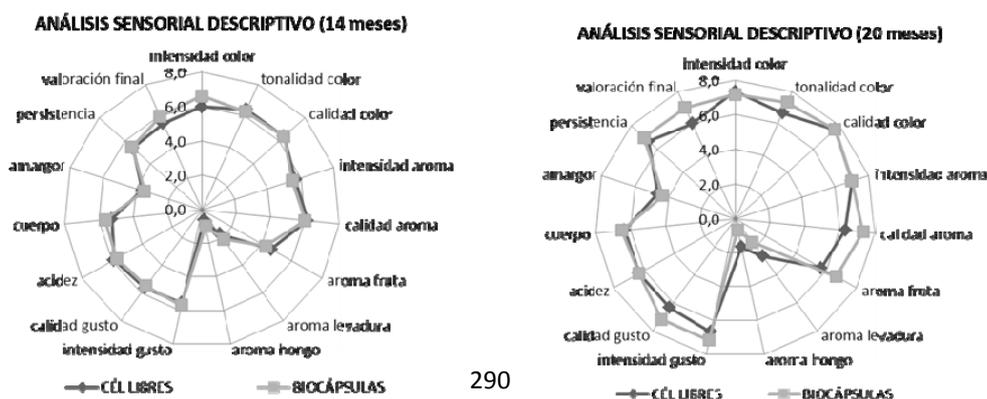
	4 meses		14 meses		20 meses	
	Libres	Biocápsulas	Libres	Biocápsulas	Libres	Biocápsulas
Grado alcohólico (% vol)	11,45 ± 0,04	11,32 ± 0,02	11,39±0,04	11,29±0,01	11,42±0,04	11,30±0,13
Azúcar (g/L)	0,20±0,00	0,10±0,00	0,10±0,00	0,10±0,00	0,10±0,00	0,10±0,00
Ac. total (g/L)	5,15±0,07	5,15±0,07	5,10±0,00	5,20±0,00	5,20±0,10	5,20±0,10
Ac. volátil (g/L)	0,49±0,01	0,46±0,03	0,43±0,01	0,40±0,00	0,42±0,01	0,39±0,01
pH	3,09±0,00	3,08±0,00	3,11±0,00	3,11±0,01	3,11±0,01	3,09±0,01
Ác. málico (g/L)	0,30±0,00	0,30±0,00	0,20±0,00	0,10±0,00	0,20±0,00	0,10±0,00
Ác. láctico (g/L)	1,25±0,07	1,25±0,07	1,25±0,07	1,25±0,07	1,20±0,00	1,30±0,00
Ca (mg/L)	90,00±0,00	90,00±0,00	86,50±0,71	89,50±0,71	86,00±0,00	89,00±0,00
NFA (mg/L)	30,00±1,41	32,50±2,12	30,00±1,41	29,00±0,00	29,67±1,53	30,67±0,58
Glicerol (g/L)	5,35±0,07	5,35±0,07	5,25±0,07	5,20±0,00	4,87±0,21	5,17±0,06

Figura 1. Contenido en polifenoles totales (IPT) e intensidad colorante (IC) del vino base y los cavas rosados elaborados con levaduras libres o levaduras inmovilizadas en biocápsulas a distintos tiempos de crianza.



Se realizó un análisis organoléptico a los 14 y 20 meses mediante una prueba descriptiva en la que se pedía al panel de catadores que puntuaran del 0 al 9 un total de 15 descriptores para definir los cavas a nivel de color, aromático y gustativo (Figura 2). Aunque no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los dos lotes, en general, los cavas rosados elaborados con biocápsulas se puntuaron ligeramente mejor en la mayoría de descriptores.

Figura 2. Análisis organoléptico descriptivo de los cavas rosados de Pinot noir a los 14 y 20 meses de crianza.



4. Conclusiones

El uso de levaduras inmovilizadas en biocápsulas para la elaboración de cavas rosados, aparte de presentar la ventaja adicional de facilitar el proceso de removido y extracción de las lías de levadura, se ha comprobado que mantiene mejor la intensidad del color del producto a lo largo de la crianza respecto a la fermentación tradicional con levaduras libres. Además en el aspecto sensorial, los cavas elaborados con levaduras inmovilizadas destacan por una mejor intensidad y calidad en boca, una buena intensidad aromática y una mejor aceptación final. Por lo tanto, este sistema podría ser una buena alternativa tecnológica para preservar el aspecto visual y organoléptico de cavas rosados de larga crianza.

5. Bibliografía

1. Kourkoutas, Y., Manojlovic, V., Nedovic, V.A. (2010). Immobilization of microbial cells for alcoholic and malolactic fermentation of wine and cider. *In: Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing*. N.J. Zuidam, V.A. Nedovic (Eds.), p. 327.
2. Torresi, S.; Frangipane, M.T., Anelli, G. 2011. Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: A review. *In: Food Chem.* 129: 1232-1241.
3. Puig-Pujol, A., Bertran, E., García-Martínez, T., Capdevila, F., Minnguez, S., Mauricio, J.C. 2013. Application of a new organic yeast immobilization method for sparkling wine production. *In: Am. J. Enol. Vitic.*, 64: 386-394.
4. Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayesterán, B., Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S. 2013. Sparkling wines produced from alternative varieties: sensory attributes and evolution of phenolics during winemaking and aging. *In: Am. J. Enol. Vitic.*, 64: 39-49.
5. Pozo-Bayón, M.A., Martín-Álvarez, P.J., Moreno-Arribas, M.V., Andujar-Ortiz, I., Pueyo, E. 2010. Impact of using Trepát and Monastrell red grape varieties on the volatile and nitrogen composition during the manufacture of rosé Cava sparkling wines. *In: LWT-Food Sci. Technol.*, 43: 1526-1532.
6. Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., Bueno-Herrera, M., Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayesterán, B. 2015. Grape variety, aging on lees and aging in bottle after disgorging influence on volatile composition and foamability of sparkling wines. *In: LWT-Food Sci. Technol.*, 61: 47-55.
7. Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayesterán, B., Pérez-Magariño, S. 2015. Role of major wine constituents in the foam properties of White and rosé sparkling wines. *In: Food Chem.*, 174: 330-338.
8. García-Martínez, T.; Peinado, R.A.; Moreno, J.; García-García, I. & Mauricio, J.C. 2011. Co-culture of *Penicillium chrysogenum* and *Saccharomyces cerevisiae* leading to the immobilization of yeast. *In: J. Chem. Technol. Biotech.* 86:812-817.
9. OIV. 2008. Recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des Vins et des Mûts. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, París, France.
10. Revilla, E; Carrasco, D.; Benito, A. & Arroyo-García, R. 2010. Anthocyanin composition of several wild grape accessions. *In: Am. J. Enol. Vitic.*, 61: 636-642.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación de este trabajo al Proyecto RTA2011-00020-C02-01 del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO-INIA-CCAA) y FEDER.

TE07 - APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS DE VINIFICACIÓN PARA INCREMENTAR EL AROMA DE VINOS BLANCOS OBTENIDOS A PARTIR DE VARIEDADES DE UVA NEUTRAS

**Díaz-Maroto, M.C., Alañón Pardo, M.E., Schumacher, R., de Torres, C.,
Pérez-Coello, M.S.**

UCLM/IRICA, Área de Tecnología de los Alimentos, Campus Universitario, s/n, 13071, Ciudad Real, España

mariaconsuelo.diaz@uclm.es

RESUMEN:

Los residuos generados por la industria del vino (orujos), principalmente durante la vinificación de vinos blancos, son una fuente importante de compuestos aromáticos y fenólicos. Sin embargo, estos orujos de uva son altamente perecederos y estacionales, por lo que requieren un método de conservación adecuado. A este respecto, la liofilización, en comparación con métodos de secado convencionales, es una buena alternativa ya que preserva la calidad de la materia prima. Así, la liofilización apenas causó pérdidas de volátiles varietales, tales como terpenos y compuestos C6, ni incrementos en la concentración de compuestos tipo furano. Además, no se observaron cambios en las cantidades de compuestos fenólicos con respecto a los hollejos frescos. Por otro lado, la maceración de orujos Moscatel liofilizados permitió mejorar el aroma de vinos blancos elaborados a partir de uvas Airén, una variedad considerada neutra, sin afectar negativamente a su color. Estos vinos fueron mejor valorados por los catadores que los macerados con hollejos Moscatel frescos.

1. Introducción

La gestión de los residuos generados por las bodegas es uno de los principales problemas de la industria enológica, principalmente en países como España y, concretamente, en Castilla-La Mancha con más del 50 % del total de viñedos españoles.

El orujo de uva es un producto altamente perecedero y debido a los enormes volúmenes de residuos generados durante la temporada de vendimia, la utilización de los orujos de uva fresca es inviable, por lo que requiere un método adecuado de conservación o uso apropiado. Una de las opciones de mayor valor es la recuperación de los componentes bioactivos, que podrían ser utilizados en otras industrias, sin embargo, el potencial aromático de las uvas, concentrado principalmente en los hollejos, no puede ser olvidado. Concretamente, en la vinificación en blanco, este potencial, en muchos casos, no es suficientemente explotado. La obtención de extractos ricos en compuestos volátiles está muy condicionada a la técnica de extracción empleada. Por este motivo, el secado se plantea como una alternativa para el aprovechamiento del potencial, tanto volátil como polifenólico, presente en los orujos.

En este sentido, el propósito de nuestro estudio fue evaluar, en primer lugar, el impacto de la liofilización en el potencial aromático y polifenólico de los hollejos de uvas blancas obtenidos a partir de subproductos de vinificación (orujos), con el fin de obtener un producto estable y de calidad. Este método de secado se seleccionó después de llevar a cabo un estudio preliminar sobre el efecto de diferentes procesos de deshidratación en la calidad del aroma de hollejos de uvas blancas. Posteriormente, los hollejos liofilizados fueron utilizados para mejorar e incrementar las características químicas y sensoriales de un vino blanco obtenido a partir de una variedad de uva neutra "Airén", mediante maceración prefermentativa.

2. Material y métodos

Muestras.

Los hollejos se obtuvieron de los orujos (mezcla de hollejos y pepitas) generados durante la vinificación de uvas de la variedad "Moscatel de Alejandría" en la bodega experimental de la UCLM, Ciudad Real, España. El contenido inicial de humedad de los hollejos frescos fue del 73,5% en peso seco, mientras que en los hollejos liofilizados se alcanzó un humedad del 9,5 % en peso seco.

Los vinos blancos fueron obtenidos a partir de uvas *Vitis vinifera* variedad "Airén" con y sin maceración prefermentativa con hollejos Moscatel frescos y liofilizados.

Compuestos volátiles.

Para el análisis de los compuestos volátiles mayoritarios, a 1,5 mL de muestra de vino se le añadió 90 μL de 2-pentanol como patrón interno (1 g L^{-1}). Las muestras se inyectaron directamente, en modo Split, en un cromatógrafo de gases *Hewlett Packard modelo 5890N* serie II, acoplado a un detector de ionización de llama (FID). Para llevar a cabo la separación cromatográfica, se utilizó una columna capilar CP-Wax 57 CB Chrompack ($50 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm d.i.}$; $0,25 \mu\text{m}$ de espesor de fase estacionaria).

Por otro lado los compuestos volátiles minoritarios de los hollejos se extrajeron mediante extracción-distilación simultáneas (SDE). La extracción se llevó a cabo a presión atmosférica durante dos horas, utilizando diclorometano como disolvente. Mientras que los compuestos volátiles minoritarios de los vinos fueron aislados mediante la técnica de extracción en fase sólida (SPE), con cartuchos de estireno divinilbenceno *Licrolut EN Merck* de 0,5 g de fase y diclorometano como disolvente de elución.

El análisis cromatográfico de ambos extractos (hollejos y vinos) se realizó en un cromatógrafo de gases modelo *6890N* acoplado a un detector de masas modelo *5973 inert*, (*Agilent Technologies*) y equipado con una columna capilar BP-21 ($60 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm d.i.}$; $0,25 \mu\text{m}$ de espesor de fase estacionaria).

Compuestos fenólicos.

La identificación, separación y cuantificación de los compuestos fenólicos de hollejos y vinos se llevó a cabo mediante el análisis de los extractos por cromatografía líquida de alta resolución utilizando un cromatógrafo HPLC modelo *Agilent 1100*, equipado con un detector de fotodiodos alineados - DAD (G1315B) y acoplado a un espectrómetro de masas con trampa iónica (G2445C) VL con sistema de ionización por electroespray (ESI-MSⁿ). Los datos de los espectros fueron procesados a través del software *Agilent ChemStation* (B.01.03) y el programa del *Tap Agilent LC/MS* versión 5.3.

Como fase estacionaria se utilizó una columna cromatográfica de fase inversa *Rapid Resolution Agilent Zobrax Eclipse XDB-C18*, de 150 mm de longitud x 2,1 mm de diámetro interno, con 3,5 µm de tamaño de partícula, protegida por una columna guardia *Zorbax Eclipse XDB-C18* (12,5 mm x 2,1 mm; 5 µm de tamaño de partícula). La columna fue termostaticada a 40 °C.

Análisis sensorial descriptivo.

Tanto el vino control como los vinos obtenidos por maceración prefermentativa del mosto con los hollejos frescos y liofilizados, fueron evaluados por un panel de catadores expertos. La evaluación se llevó a cabo en una sala de análisis sensorial normalizada, equipada con cabinas separadas. Las muestras se presentaron en copas de vino estandarizadas cubiertas con un vidrio de reloj para minimizar el escape de compuestos volátiles responsables del aroma. Los catadores evaluaron las sensaciones olfativas, gustativas y táctiles de las muestras utilizando una escala de 10 cm no estructurada para valorar la intensidad de cada atributo, donde el extremo izquierdo de la escala indicaba una intensidad nula del descriptor y el extremo derecho los valores máximos.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico IBM SPSS versión 19 para Windows. El test de Student fue utilizado para evaluar las diferencias significativas entre los hollejos frescos, secados en estufa y liofilizados. El Student-Newman-Keuls fue aplicado a fin de encontrar diferencias significativas entre las diferentes muestras de vino.

3. Resultados

Como es común en la variedad Moscatel y aunque las muestras procedían de subproductos de vinificación, elevadas cantidades de compuestos terpénicos se encontraron en los hollejos frescos (1), los cuáles no se vieron prácticamente afectados por el proceso de deshidratación, al igual que los norisoprenoides. Además, se observó un incremento en el contenido de algunos de estos compuestos, concretamente ácido geránico, δ -careno y vitispirano. Los incrementos observados podrían ser atribuidos a la ruptura de las células vegetales en las cuáles se almacenan dichos volátiles, producida por el vacío aplicado durante la liofilización. Este aumento de compuestos volátiles durante la liofilización ha sido previamente descrito por otros investigadores en el caso de hollejos de distintas variedades de uvas (2).

Por el contrario, se produjeron importantes pérdidas de alcoholes y aldehídos de 6 átomos de carbono, al igual que durante la liofilización y secado en horno de hollejos de uva de variedades tintas (2).

Finalmente, se observó un incremento en la concentración de algunos compuestos furánicos debido a reacciones de pardeamiento.

Respecto al contenido en compuestos fenólicos, dentro de la familia de los flavonoles, derivados de la quercetina y del kaempferol fueron identificados en hollejos frescos y liofilizados, encontrándose el glucurónido y el glucósido de quercetina en concentraciones mayores. La liofilización no generó importantes cambios en las cantidades de estos compuestos, al contrario que en el caso de dos variedades de uva tintas, Cabernet Sauvignon and Carmenère (2).

Los flavonoles se almacenan en vacuolas celulares, sin embargo, a menudo se encuentran en las áreas más externas de dichas vacuolas (3). Por tanto, si la estructura celular se daña durante la liofilización, debido principalmente al vacío aplicado, aquellos compuestos almacenados en las áreas más externas de las células serán más sensibles a su degradación o pérdida, lo cual podría explicar el distinto comportamiento de los flavonoles durante la liofilización de diferentes variedades de uvas, en este caso, blancas y tintas.

Con respecto al GRP y a los dos ácidos hidroxicinámicos (*trans*-caftárico y *trans*-cutárico) determinados a 320 nm, no se observaron diferencias significativas entre las muestras frescas y liofilizadas, probablemente a que dicho tratamiento de desecación se realiza en ausencia de oxígeno y a bajas temperaturas. Esto demuestra las ventajas de la liofilización para obtener un producto desecado de similar calidad al original.

La utilización de orujos de uvas blancas “Moscatel” liofilizados para llevar a cabo maceraciones prefermentativas en una vinificación en blanco de una variedad neutra, como Airén, permitió incrementar la calidad de los vinos obtenidos, no encontrándose diferencias significativas con los vinos macerados con orujos frescos. Concretamente la maceración mejoró el aroma de los vinos, sin afectar negativamente a su color. Los vinos macerados con hollejos frescos y liofilizados conservaron las notas frutales, aunque el único vino que presentó notas florales en su perfil de sabor fue el macerado con hollejos liofilizados. Además, éstos últimos fueron mejor valorados por los catadores que los macerados con hollejos frescos.

4. Conclusiones

La liofilización apenas causó pérdidas de volátiles característicos de la variedad de uva, ni aumentos en la concentración de compuestos tipo furano. Por otra parte, los hollejos liofilizados obtenidos a partir de subproductos de vinificación no presentaron cambios en las cantidades de compuestos fenólicos con respecto a los hollejos frescos.

Entre otras aplicaciones, los hollejos obtenidos a partir de subproductos de una variedad de uva aromática, como Moscatel, y liofilizados, se podrían utilizar para mejorar el aroma y sabor de vinos blancos elaborados a partir de variedades de uva neutras. Naturalmente, este estudio es un primer paso o propuesta para revalorizar los residuos procedentes de bodegas, sin embargo, se requieren futuros trabajos sobre la evaluación de los costes del proceso y sobre otras aplicaciones potenciales de los productos liofilizados.

5. Bibliografía

1. Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2000). Varietal Aroma. Handbook of Enology. The chemistry of wine stabilization and treatments (Vol 2). New York: Willey.
2. de Torres, C., Díaz-Maroto, M. C., Hermosín-Gutiérrez, I., & Pérez-Coello, M. S. (2010). Effect of freeze-drying and oven-drying on volatiles and phenolics composition of grape skin. *Analytica Chimica Acta*, 660, 177–182.
3. Chism, G. W., & Haard, N. F. (1996). Food Chemistry. In O. R. Fennema (Ed), (pp. 943-1011). New York: Dekker.

6. Agradecimientos

Los autores quieren expresar su agradecimiento a la Junta de Comunidades de Castilla la Mancha por la financiación económica otorgada a través del proyecto POII 2014-009-A.

TE08 - RELACIÓN ENTRE EL PERFIL Y LA ESTABILIDAD PROTEICA DE VINOS PINOT GRIS

Lira, E.¹, Rodríguez-Bencomo, J. J.¹, Salazar, F. N.³, Curioni, A.²; Vincenzi, S.²; López, F.¹

¹Departament d'Enginyeria Química, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Av. Països Catalans 26, 43007, Tarragona, España.

²Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente (DAFNAE), Università di Padova, via dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italia

³Escuela de Alimentos, Facultad de Recursos Naturales, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Waddington 716, 2360100 Valparaíso, Chile

francisco.lopez@urv.cat

RESUMEN:

El perfil proteico de la variedad de uva Pinot Gris y de sus vinos ha sido escasamente estudiado por lo que existe poca información sobre la tendencia de los vinos a formar quiebras proteicas. Aunque es posible extrapolar resultados obtenidos con otras variedades, se desconoce si existen particularidades de esta cepa respecto a la estabilidad proteica. En este estudio se analizó para 14 vinos de la variedad Pinot Gris de origen italiano, su contenido de proteínas, perfil proteico, estabilidad/inestabilidad y dosis estabilizante de bentonita necesaria. Los resultados obtenidos han mostrado que la dosis estabilizante de bentonita para estos vinos tiene una alta correlación con la fracción proteica entre 20-30 kDa, y algo menor con el contenido total de proteínas.

Palabras clave: Pinot gris, estabilidad proteica, bentonita

1. Introducción

En la evaluación sensorial de vinos blancos por parte de los consumidores su limpidez y claridad son de gran importancia, estando relacionadas con las proteínas del vino y es uno de los principales factores que afectan a la estabilidad del vino durante el almacenaje (Bayly & Berg, 1967). Las proteínas influyen en el perfil aromático del vino, ya que pueden estar unidas a compuestos del aroma, e igualmente están involucradas en la calidad de la espuma de los vinos espumosos. Las proteínas aunque suelen encontrarse en bajas concentraciones en el vino, algunas de ellas pueden precipitar (Waters et al., 1991) generando turbidez. Cada variedad y cada vino tienen una proporción diferente de proteínas, que dependen de la vendimia, tratamientos pre y post fermentativos y de la variedad de uva utilizada (Waters et al., 2005).

El uso de la bentonita para evitar el riesgo de precipitación en los vinos embotellados se encuentra bastante extendido debido a su eficacia, bajo costo y por tratarse de un proceso simple, sin embargo, tiene algunos inconvenientes como pérdidas significativas de vino, el costo asociado a la eliminación de desechos, aspectos de seguridad y salud ocupacional (Waters et al., 2005), interferencia con las membranas utilizadas en las prácticas de vinificación (Salazar et al., 2007) y no ser un adsorbente específico eliminando tanto compuestos deseables como indeseables (Miller et al., 1985). A pesar de todos los inconvenientes la

bentonita aún es el agente más efectivo en la estabilización proteica de vinos (Chagas et al., 2012).

La relación entre variedades de uvas, contenido de proteínas y estabilidad proteica ha sido brevemente descrita hasta ahora, y generalmente estos estudios se han llevado a cabo a escala piloto o laboratorio o como un aspecto secundario en otros trabajos. Existen algunos estudios con variedades como la Macabeo (Salazar et al., 2006) cuyos vinos tienen un bajo contenido de proteínas y baja inestabilidad proteica, la variedad Sauvignon Blanc descrita habitualmente como muy inestable (Esteruelas et al., 2009), Chambave Muscat (Lambri et al., 2012), Semillon (Pocock et al., 2011), Chardonnay y Gewürztraminer (Sanborn et al., 2010) y Manzoni Bianco (Vincenzi et al., 2011), entre otras. En este trabajo se analiza la relación entre el contenido y tipo de proteínas en el vino, su estabilidad proteica y la dosis de bentonita necesaria para su estabilización total para vinos de la variedad Pinot Gris.

2. Material y métodos

Se emplearon vinos de la variedad Pinot Gris de origen italiano de la añada 2012, acabada la fermentación alcohólica sin ningún tratamiento estabilizante, y que fueron inmediatamente congelados hasta su análisis. Estos vinos fueron elaborados siguiendo el protocolo habitual de cada bodega. El contenido de proteínas total se determinó por el método de Bradford (1976). Los análisis químicos básicos (grado alcohólico, acidez total y volátil, pH y azúcares residuales) se realizaron mediante la metodología oficial de análisis de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). El perfil proteico se determinó mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) descrito en Canals et al. (1998). El test térmico de estabilidad proteica utilizado es el descrito en Salazar et al. (2006). La dosis estabilizante de bentonita corresponde a la menor dosis de bentonita necesaria para estabilizar el vino. La bentonita usada ha sido la bentonita sódica líquida Volclay (KWK).

3. Resultados

En la Tabla 1 se presenta las características básicas de cada vino, los cuales a pesar de tener diversos orígenes presentan parámetros similares. El contenido de proteínas totales se indica en la Tabla 2, así como si era estable o no y en caso de ser inestable se presenta la dosis de bentonita requerida para alcanzar la completa estabilidad proteica.

El perfil proteico de cada uno de los vinos también fue analizado y el resultado se presenta en la Tabla 2. Se pueden apreciar las tres fracciones usualmente asociadas a vinos blancos: F1 (> 100 kDa, invertasas), F2 (40 – 60 kDa, β -glucanasas) y F3 (20 – 30 kDa, quitinasas y proteínas del tipo taumatina) (Canals et al., 1998; Sauvage et al., 2010). Las concentraciones difieren entre los distintos vinos, siendo F3 la más alta y F1 la más baja en términos generales. F2 también presenta bajas concentraciones que fluctúan entre 0.2 – 2.1 mg BSA/L.

Se realizó un análisis de Pearson para establecer la correlación entre el contenido total de proteínas, el contenido de las distintas fracciones y la dosis de bentonita requerida para estabilizar los vinos. La dosis estabilizante de bentonita para vinos Pinot Gris tiene una alta correlación con el contenido de la fracción F3 ($R=0.820$, $p=0.01$) y algo menor con el contenido total ($R=0.814$, $p=0.01$) y con la fracción F2 ($R=0.755$, $p=0.01$).

La relación entre el contenido de proteínas y las diferentes fracciones proteicas con la inestabilidad de vinos blancos y consecuentemente con la dosis estabilizante de bentonita no

es clara (Waters et al., 2005). La inestabilidad de un vino no parece estar correlacionado con su contenido total de proteínas (Bayly & Berg, 1967), sino a cada proteína individualmente (Waters et al., 1992). No obstante Dawes et al. (1994) encontraron una correlación lineal entre el contenido de proteínas y la dosis de bentonita, pero no encontraron selectividad en función del punto isoeléctrico de la bentonita, ya que eliminaba todas las fracciones proteicas presentes. Estas diferentes conclusiones encontradas en la literatura disponible se pueden atribuir a los diferentes métodos utilizados para fraccionar las proteínas y determinar sus niveles (Waters et al., 2005). En este trabajo, en términos generales, aquellos vinos con un mayor contenido de proteínas también tenían una mayor proporción relativa de la fracción F3 y requerían de una mayor dosis de bentonita para lograr la estabilidad proteica final.

Tabla 1. Análisis químico vinos Pinot Gris al finalizar la fermentación alcohólica.

Vino	Región	Grado alcohólico (% v/v)	Acidez Volátil (g ac. acético /L)	Acidez Total (g ac. tartárico/L)	pH	Azúcar Residual (g/L)
Friuli 327	Friuli	12.8 ± 0.3	0.07 ± 0.01	4.61 ± 0.14	3.37 ± 0.01	2.83 ± 0.03
Friuli 35	Friuli	12.5 ± 0.3	0.14 ± 0.01	3.72 ± 0.11	3.51 ± 0.01	2.75 ± 0.03
Oderzo 110	Treviso	12.7 ± 0.3	0.00 ± 0.00	4.16 ± 0.12	3.35 ± 0.01	2.55 ± 0.03
Oderzo 116	Treviso	12.5 ± 0.3	0.02 ± 0.00	4.45 ± 0.13	3.40 ± 0.01	2.58 ± 0.03
Oderzo 114	Treviso	12.8 ± 0.3	0.01 ± 0.00	4.35 ± 0.13	3.38 ± 0.01	2.61 ± 0.03
Motta di Livenza 90	Treviso	12.7 ± 0.3	0.10 ± 0.01	4.07 ± 0.12	3.47 ± 0.01	2.63 ± 0.03
Motta di Livenza 91	Treviso	11.6 ± 0.2	0.11 ± 0.01	3.38 ± 0.10	3.51 ± 0.01	2.28 ± 0.02
Motta di Livenza 93	Treviso	12.2 ± 0.2	0.11 ± 0.01	3.81 ± 0.11	3.40 ± 0.01	2.41 ± 0.02
Motta di Livenza 00	Treviso	11.9 ± 0.2	0.15 ± 0.02	4.45 ± 0.14	3.35 ± 0.01	2.89 ± 0.03
Pramaggiore 56	Venezia	12.0 ± 0.2	0.07 ± 0.01	4.09 ± 0.12	3.38 ± 0.01	2.67 ± 0.03
Pramaggiore 63	Venezia	12.1 ± 0.2	0.07 ± 0.01	4.12 ± 0.12	3.36 ± 0.01	2.36 ± 0.02
Tezze di Piave 01	Treviso	12.5 ± 0.3	0.21 ± 0.02	4.61 ± 0.14	3.58 ± 0.01	2.51 ± 0.03
Tezze 02	Treviso	12.5 ± 0.3	0.22 ± 0.02	4.54 ± 0.14	3.59 ± 0.01	2.59 ± 0.03
Cerletti	Treviso	12.3 ± 0.2	0.17 ± 0.02	5.51 ± 0.17	3.32 ± 0.01	2.56 ± 0.03

Tabla 2. Contenido de proteínas, estabilidad proteica, dosis estabilizante de bentonita, y perfil proteico de vinos.

Vino	Contenido proteínas (mg/L BSA)	Estabilidad proteica	Dosis estabilizante bentonita (g/hL)	Contenido proteínas F1 (mg BSA/L)	Contenido proteínas F2 (mg BSA/L)	Contenido proteínas F3 mg BSA/L)
Friuli 327	36.7 ± 0.1	Estable	-	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1	25.8 ± 0.8
Friuli 35	42.0 ± 0.7	Inestable	42	1.3 ± 0.1	1.0 ± 0.0	30.1 ± 0.1
Oderzo 110	27.7 ± 0.4	Estable	-	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.1	19.6 ± 2.3
Oderzo 116	37.8 ± 0.6	Inestable	40	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	20.4 ± 1.3
Oderzo 114	31.8 ± 0.2	Inestable	4	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0	20.7 ± 0.3
Motta di Livenza 90	31.9 ± 0.4	Inestable	9	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1	21.5 ± 0.6
Motta di Livenza 91	32.2 ± 0.3	Inestable	22	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	22.7 ± 0.8
Motta di Livenza 93	32.4 ± 0.1	Inestable	18	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	18.3 ± 1.4
Motta di Livenza 00	35.9 ± 0.3	Inestable	16	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.2	30.3 ± 1.3
Pramaggiore 56	28.6 ± 0.2	Estable	-	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1	13.7 ± 0.8
Pramaggiore 63	37.5 ± 0.2	Inestable	160	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.1	24.5 ± 4.3
Tezze di Piave 01	44.2 ± 0.3	Inestable	172	0.4 ± 0.2	2.1 ± 0.0	43.5 ± 1.0
Tezze 02	43.7 ± 0.3	Inestable	165	0.6 ± 0.1	1.3 ± 0.5	46.2 ± 2.1
Cerletti	46.7 ± 0.7	Inestable	180	0.5 ± 0.1	1.3 ± 0.0	51.9 ± 1.1

4. Conclusiones

Como conclusión de este trabajo se puede apreciar que la fracción F3 (proteínas en un rango entre 20 – 30 kDa) es la que presenta una mayor relación con la inestabilidad proteica de los vinos Pinot Gris italianos de la vendimia 2012.

5. Bibliografía

1. Bayly, F.C., Berg, H.W. 1967. Grape and wine proteins of white wine varieties. *Am. J. Enol. Vitic.*, 18, 18 – 32
2. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248 – 254.
3. Canals, J. M., Arola, Ll., Zamora, F. (1998). Protein fraction analysis of white wine by FPLC. *Am. J. Enol. Vitic.*, 49, 383 – 388.
4. Chagas, R., Monteiro, S., Ferreira, R.B. 2012. Assessment of Potential Effects of Common Fining Agents Used for White Wine Protein Stabilization. *Am. J. Enol. Vitic.*, 63, 574 – 578.
5. Dawes, H., Boyes, S., Keene, J., Heatherbell, D. 1994. Protein instability of wines: Influence of protein isoelectric point. *Am. J. Enol. Vitic.*, 45, 319 – 326
6. Esteruelas, M., Poinssaut, P., Sieczkowski, N., Manteau, S., Fort, M.F., Canals, J.M., Zamora, F. 2009. Characterization of natural haze protein in sauvignon white wine. *Food Chem.*, 113, 28-35.
7. Lambri, M., Dordoni, R., Silva, S., De Faveri, D.M. 2012. Comparing the impact of bentonite addition for both must clarification and wine fining on the chemical profile of wine from Chambave Muscat grapes. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 47, 1 – 12.
8. Miller, G.C., Amon, J.M., Gibson, R.L., Simpson, R.F. 1985. Loss of wine aroma attributable to protein stabilization with bentonite or ultrafiltration. *Austral. Grapegrower Winemaker*. 256, 49-50
9. Pocock, K.F., Salazar, F.N., Waters, E.J. 2011. The effect of bentonite fining at different stages of white winemaking on protein stability. *Austral. J. Grape Wine Res.*, 17, 280 – 284.
10. Salazar, F.N., Achaerandio, I., Labbé, M.A., Güell, C., López, F. 2006. Comparative study of protein stabilization in white wine using zirconia and bentonite: physicochemical and wine sensory analysis. *J. Sci. Food Agric.*, 54, 9955 – 9958.
11. Salazar F.N., de Bruijn J.P.F., Seminario L., Güell C., López, F. 2007. Improvement of wine crossflow microfiltration by a new hybrid process. *J. Food Eng.*, 79, 1329 – 1336.
12. Sanborn, M., Edwards, C.G., Ross, C.F. 2010. Impact of Fining on Chemical and Sensory Properties of Washington State Chardonnay and Gewürztraminer Wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 61, 31-41
13. Sauvage, F.X., Bach, B., Moutounet, M., Vernhet, A. 2010. Proteins in white wines: Thermo-sensitivity and differential adsorption by bentonite. *Food Chem.*, 118, 26 – 34.
14. Vincenzi, S., Marangon, M., Tolin, S., Curioni, A. 2011. Protein evolution during the early stages of white winemaking and its relations with wine stability. *Austral. J. Grape Wine Res.*, 17, 20-27
15. Waters, E.J., Wallace, W., Williams, P.J. 1991. Heat haze characteristics of fractionated wine proteins. *Am. J. Enol. Vitic.*, 101, 365 – 369.
16. Waters, E.J., Wallace, W., Williams, P.J. 1992. Identification of heat unstable wine proteins and their resistance to peptidases. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1514 – 1519.
17. Waters, E.J., Alexander, G., Muhlack, R., Pocock, K.F., Colby, C., O'Neill, B.K., Høj, P.B., Jones, P. 2005. Preventing protein haze in bottled white wine. *Austral. J. Grape Wine Res.*, 11, 215 – 225.

6. Agradecimientos

E.L. agradece el soporte económico de la Universitat Rovira i Virgili (beca predoctoral). J.J.R.B. agradece la beca del programa 'Beatriu de Pinós' (beca 2007PIV-00017) con el soporte del Secretariat d'Universitats i Recerca del Departament d'Economia i Coneixement de la Generalitat de Catalunya y la Unión Europea.

TE09 - BETA-GLUCOSIDASAS DE CEPAS DE LEVADURAS NATIVAS URUGUAYAS: ESTUDIO Y POTENCIAL APLICACIÓN EN LIBERACIÓN DE AROMAS EN VINOS

S. de Ovalle¹, B. M. Brena¹, P. González-Pombo¹.

1 Cátedra de Bioquímica, DepBio. Facultad de Química- UdelaR, Gral Flores 2124, CC1157
Montevideo, Uruguay.

pgonzale@fq.edu.uy

RESUMEN:

Las aplicaciones potenciales de las beta-glucosidasas de las cepas no-*Saccharomyces* en la industria vitivinícola son muy interesantes ya que el aroma varietal y la calidad percibida se incrementan mediante la hidrólisis de los terpenos y otros compuestos glicosilados. En este trabajo se presentan beta-glucosidasas obtenidas de tres cepas seleccionadas (*Metschnikowia pulcherrima*, *Issatchenkia orientalis* e *Issatchenkia terricola*), que han sido aisladas de levaduras autóctonas de mostos y vinos procedentes de viñedos uruguayos. Se estudiaron las propiedades fisicoquímicas de las enzimas purificadas, así como la estabilidad a pH ácido, tolerancia al etanol y glucosa. Especialmente, las beta-glucosidasas del género *Issatchenkia* demostraron muy buenas propiedades de estabilidad para su aplicación en condiciones enológicas, permitiendo realizar estudios de aromatización en vino joven Moscatel con muy buena actividad frente a los glicósidos monoterpénicos y norisoprenoides. El impacto sensorial de estos compuestos en las propiedades aromáticas del vino se comprobó mediante análisis sensorial con un panel de expertos, mediante la realización de un test triangular.

Palabras clave: beta-glucosidasas, caracterización, inmovilización, aromas.

1. Introducción

El aroma típico de los vinos se debe principalmente a compuestos volátiles derivados de la uva. En las uvas, así como en una gran variedad de frutas, existe una gran reserva de precursores de aroma en forma de glicósidos, no volátiles que no contribuyen directamente al aroma (Williams P.J., 1993). Por esta razón, la industria del vino ha centrado su atención en glucosidasas para hidrolizar estos precursores en compuestos aromáticos activos liberando al aroma volátil.

Una muy buena alternativa al uso de las preparaciones fúngicas exógenas, que muchas veces causan aromas no deseados, es el uso de enzimas específicas contenidas en las levaduras que forman parte del ecosistema del vino, adaptadas al ambiente enológico y esenciales para la autenticidad de los vinos. En particular, algunas levaduras no-*Saccharomyces*, son capaces de aportar caracteres específicos al producto final del proceso fermentativo gracias a la producción de enzimas capaces de actuar eficientemente sobre los sustratos glicosídicos existentes, generando compuestos volátiles. Estas levaduras no-*Saccharomyces* producen glucosidasas intra y extracelulares (González-Pombo et al., 2008, Palmeri et al., 2007) que pueden tener gran impacto en la producción de vinos con identidad y mayor complejidad aromática.

En este trabajo se presenta el estudio de beta-glucosidasas de tres cepas nativas (*Metschnikowia pulcherrima*, *Issatchenkia orientalis* e *Issatchenkia terricola*) que han sido aisladas de mostos y viñedos uruguayos. Se reportan las propiedades fisicoquímicas de las

enzimas seleccionadas con vistas a su posible aplicación en condiciones enológicas, (estabilidad a pH ácido, tolerancia al etanol y glucosa) así como su impacto en las propiedades sensoriales de los vinos

2. Material y métodos

Obtención de glucosidasas

- Preparación del cultivo en buffer fosfato-citrato pH 5.0 conteniendo: caseína 1 g/l, extracto de levadura 25 g/l y glicerol 8 ml/l. a 26°C en matraces Erlenmeyer con 1/10 de su volumen en un agitador orbital (100 oscilaciones min⁻¹). Se sigue el crecimiento por medida de Abs 420nm.
- Purificación de enzima mediante diversas técnicas de purificación y uso de AKTApurifier.
- Determinación de actividad enzimática con el sustrato cromogénico p-nitrofenil-β-D-glucopiranosido (PNPG) a 23°C y la producción de p-nitrofenol liberado se determina espectrofotométricamente en función del tiempo de incubación (González-Pombo et al., 2008).

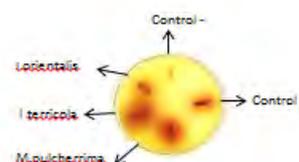
Tratamiento enzimático de vino blanco joven

- Determinación del contenido de glicósidos en vino moscatel mediante el índice Glicosil-Glucósido (GG), usando una columna C18 fase reversa según Williams et al. 1995.
- Aislamiento de volátiles en cartucho Isolute ENV+ según reportes (Boido et al., 2003).
- Identificación y cuantificación de compuestos aromáticos liberados se realizó mediante GC-MS utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17 acoplado con un detector de masa Shimadzu QP 5050 y equipado con una columna capilar de sílica fundida (25 m x 0.25 mm d.i.), con fase estacionaria BP 20 (0,25 m de espesor). La identificación se realiza utilizando bases de datos con espectros de referencia (Adams, 1995). La identificación de los compuestos se confirmó por medio de la determinación de índices de retención lineal (Kovats), obtenidos utilizando una mezcla de n-alcenos de referencia (C9-C26).

3. Resultados

Selección de cepas de levadura productoras de β-glucosidasas activas a pH ácido.

Del relevamiento de la colección de cepas enológicas productoras de actividad β-glucosidasa a pH 4.0, se seleccionaron tres cepas que con alta actividad evidenciada por el diámetro del halo de difusión de Fe-esuletina (Fig 1).



Mediante diversas estrategias de purificación se obtuvieron preparaciones homogéneas de dichas β-glucosidasas (Gonzalez-Pombo et al., 2008; Gonzalez-Pombo et al., 2011).

Las propiedades de dichas enzimas se presentan en la Tabla 1.

Cepa	Origen de β-glucosidasa	Caracterización fisicoquímica			Inhibición		Parámetros cinéticos	
		pH óptimo ^a	T óptima (°C) ^b	pI	Glucosa (100g/L)	Etanol (≤12% v/v)	Km (mM) ^c	Vmax (μmoles pNP/mL.min)
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Intracelular	4.5±0.3	50±1.0	4.2±0.05	Sí	No	5,6	0,8
<i>Issatchenkia terricola</i>	Extracelular	4.5±0.3	50±1.0	3.5±0.05	20%	No	4,35	58E-5
<i>Issatchenkia orientalis</i>	Extracelular	5.0±0.2	50±1.0	4.0±0.05	25%	No	0.83	50E-3

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas y cinéticas de las β-glucosidasas de las cepas nativas.

^a estudiado en el rango pH 3–10.

^b estudiado en el rango 23–80 °C.

^c usando pNPG como sustrato a pH 4.5 y 23°C.

Una gran limitante al uso de las β -glucosidasas en forma soluble en vinos es su baja actividad y estabilidad a valores bajos de pH. Se desarrollaron biocatalizadores inmovilizados de β -glucosidasa mediante diversas metodologías como estrategia de estabilización a bajos valores de pH y en presencia de etanol. En todos los casos los protocolos de inmovilización desarrollados fueron muy simples y con muy buenos rendimientos (Tabla 2).

Tabla 2. Inmovilización de β -glucosidasas

β -glucosidasa	Tipo unión	Tipo soporte	Rendimiento Inmovilización ^a (%)
<i>M. pulcherrima</i>	Iónica	Gel amino-agarosa	95
<i>I. terricola</i>	Covalente	Eupergit-C	90
<i>I. orientalis</i>	Adsorción y post-entrecruzamiento	Nanopartículas de sílica mimética	83

^a Porcentaje de enzima inmovilizada en relación a la enzima aplicada

La inmovilización estabiliza la β -glucosidasa frente a bajos valores de pH.

Con la finalidad de simular condiciones reales encontradas en vinos, se estudia el comportamiento de las beta-glucosidasas en medio similar vino a pH 4.0 y a temperatura ambiente. Los estudios realizados demuestran notoriamente que el proceso de inmovilización de β -glucosidasas tuvo un fuerte efecto estabilizador en estas condiciones (Tabla 3). Es de destacar los resultados obtenidos con los derivados inmovilizados β -glucosidasas de *I. Orientalis* e *I. terricola*, lográndose factores de estabilización de 15 y 20, respectivamente. Esta fuerte estabilización alcanzada con los derivados inmovilizados de *Issatchenkia*, permitió realizar los estudios de aromatización con la enzima inmovilizada directamente en vinos.

Tabla 3. Resultados del estudio de estabilidad a pH 4.0 en similar vino (etanol-agua 12:88 (v/v) conteniendo 3.5 g/L de ácido tartárico, 2.5 g/L de ácido málico and 60 mg/L de metabisulfito de sodio) de la enzima soluble vs inmovilizada. Valores de vida media en días (50% actividad residual).

β -glucosidasa	<i>M. pulcherrima</i>	<i>I. orientalis</i>	<i>I. terricola</i>
soluble	0.04	1	2
inmovilizado	0.2	15	40

Disminución del índice Glucosil-Glucosa por la actividad de los derivados inmovilizados β -glucosidasa de *Issatchenkia*.

Cuando se incuban los derivados inmovilizados con vino blanco moscatel (pH 4.0 y 22°C) conteniendo 130 μ M glicósidos (valor GG), se observa una disminución del contenido de los mismos a un 50% (66 μ M) y 57% (74 μ M) para los derivados β -gluc-terricola y β -gluc-orientalis respectivamente. Los biocatalizadores inmovilizados fueron muy estables en estas condiciones experimentales, preservando el 50% y el 90% de su actividad luego del período de incubación (16 días), para el derivado β -gluc-orientalis y derivado β -gluc-terricola respectivamente.

Consistentemente, el resultado del análisis de GC-MS realizado luego de finalizado el tratamiento del vino Moscatel con el derivado β -glu-terricola y posterior aislamiento de volátiles en fase sólida, mostró un incremento significativo (determinado por análisis ANOVA), en monoterpenos (de 1420 a 1914 μ g/L $p < 0.05$) y norisoprenoides (de 27 a 99 μ g/L $p < 0.01$) con respecto al vino control (Gonzalez-Pombo et al., 2011).

Los resultados del test triangular realizado con un panel de 10 jueces sensoriales expertos, evidenciaron que existen diferencias altamente significativas entre el aroma del vino tratado enzimáticamente con β -gluc-terricola y el vino control. Respecto a los descriptores de cada muestra, los evaluadores detectaron en el vino tratado con el derivado β -glu-terricola, mas aroma a dulce de frutas, miel y pasas frente al vino control.

4. Conclusiones

El presente trabajo pretende contribuir a la investigación sobre el papel y la posible explotación de levaduras no-*Saccharomyces* en el desarrollo del aroma del vino, centrándose en la caracterización de nuevos biocatalizadores purificados de β -glucosidasa de cepas nativas. El uso del biocatalizador inmovilizado permite obtener enzimas con propiedades mejoradas de actividad y estabilidad así como un mejor control del proceso de hidrólisis, siendo este aspecto de primordial importancia para el tratamiento de los vinos jóvenes. Su uso hace posible una liberación rápida y controlada de terpenos y norisoprenoides, lo que promueve el desarrollo de un aroma más complejo en corto tiempo favoreciendo una venta rápida del producto, pero conservando una fracción de aromas ligados como reserva aromática potencial, a ser liberado en el tiempo. Los resultados más destacable se obtuvieron con la β -glucosidasa de *I. terricola* purificada que ha permitido desarrollar un biocatalizador inmovilizado con propiedades muy promisorias de actividad y estabilidad en condiciones enológicas. Su buena funcionalidad fue demostrada en un vino Moscatel joven, confiriéndole propiedades sensoriales claramente diferentes y aportando cierta complejidad aromática. Dicho biocatalizador inmovilizado muestra una estabilidad de almacenamiento muy buena y además, una vida media prometedor en condiciones enológicas (960 horas).

5. Bibliografía

- Adams R. 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy. Carol Stream, IL: Allured.
- Boido, E., Lloret, A., Medina, K., Fariña, L., Carrau, F., Versini, G., Dellacasa, E. (2003) Aroma composition of Vitis vinífera cv. Tannat: the typical red wine from Uruguay. J. Agric. Food. Chem. 51, 5408-5413.
- González-Pombo, P., Fariña, L., Carrau, F., J.M., Batista-Viera, F., Brena, B.M. (2011) A novel extracellular beta-glucosidase from Issatchenkia terricola: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. Process Biochemistry. 46: 385 – 389.
- González-Pombo, P., Pérez, G., Carrau, F., Guisán, J.M., Batista-Viera, F., Brena, B.M. (2008) One-step purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. Biotechnol Lett. 30:1469–1475.
- Palmeri, R., Spagna, G. (2007). Beta-Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. Enz. Microb. Technol. 40(3), 382-389.
- Williams, P.J. (1993) "Hydrolytic flavor release release in fruit and wines through hydrolysis of non-volatile precursors". En Flavor Science- Sensible Principles and Techniques. Am. Chem. Soc. Acree, T.E., Teranishi, R., EDS. p 287. Washington DC.
- Williams, P., Strauss, C., Wilson, B. (1982) Use of C 18 reversed-phase liquid chromatography for the isolation of monoterpene glycosides and norisoprenoid precursors from grape juice and wines. J. Chromat. 235, 471-480.

TE10 - INFLUENCIA DE LA FECHA DE VENDIMIA SOBRE EL PERFIL VOLÁTIL DE LOS VINOS DE ALBARELLO

Mónica López¹, Daniel Cuesta^{2,3}, Eugenio Revilla³, Manuel M. Losada², Elena Falqué^{1*}

¹ Universidad de Vigo, Facultad de Ciencias, Depto. Química Analítica, Ourense, España

² Universidad Politécnica de Madrid, Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola, Depto. Ciencia y Tecnología Aplicadas, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, España

³ Universidad Autónoma de Madrid, Depto. Química Agrícola, 28049 Madrid, España
efalque@uvigo.es

RESUMEN:

En este trabajo se han recogido uvas de la variedad Albarello (Denominación de Origen 'Valdeorras') en dos fechas: finales de Septiembre y primeros de Octubre. La vinificación se llevó a cabo de la misma forma con ambas vendimias y se analizaron los compuestos volátiles por Cromatografía de Gases (con detector de ionización de llama y por acoplamiento con la Espectrometría de Masas). Los resultados obtenidos muestran que los vinos de Albarello procedentes de ambas vendimias muestran perfiles aromáticos diferentes, debido, principalmente, a que los contenidos en terpenos, alcoholes superiores y lactonas aumentan cuanto más tardía es la vendimia; mientras que los de aldehídos y cetonas, y ésteres etílicos disminuyen.

Palabras clave: Albarello, fecha de vendimia, compuestos volátiles, cromatografía de gases, aroma

1. Introducción

El aroma de los vinos está constituido por unos centenares de compuestos volátiles, cuyos contenidos varían mucho y los umbrales de percepción olfativa de estos compuestos también son diversos. Por lo tanto, el impacto olfativo sobre el vino de estas sustancias depende tanto de su concentración como de su naturaleza. La personalidad aromática propia de cada variedad es consecuencia de las infinitas combinaciones que pueden existir entre las concentraciones de los distintos compuestos odoríferos de los vinos [1].

En el aroma de un vino y, consecuentemente en su calidad, influyen multitud de factores que abarcan desde el "terroir" y la variedad empleada, hasta las diferentes operaciones tecnológicas aplicadas en bodega. Durante el proceso de maduración, la uva sufre varios cambios, de los cuales el más importante cuantitativamente es la acumulación de agua y de azúcares; sin embargo, también van a aparecer otros compuestos que condicionarán el aroma que presenten, posteriormente, los vinos [2].

Con respecto al momento de recolección de la uva, hay que distinguir entre el momento de madurez de la uva y el momento óptimo de vendimia, y que no siempre tienen por qué coincidir, ya que dependerá del tipo de vino que se quiera elaborar. La madurez fisiológica de la vid como ser vivo no es la misma que la madurez industrial, momento en el que se obtiene el máximo peso de la vendimia con la mayor concentración de azúcares o en el que la relación azúcares/acidez es máxima. Tradicionalmente se elegía como fecha de vendimia la de madurez industrial, pero existen otros criterios enológicos para fijar la fecha de

vendimia según determinadas circunstancias como pueden ser la acumulación de polifenoles, que se conoce como maduración fenólica, o según la formación de aromas varietales, que se conoce como maduración aromática [1,3].

Existen trabajos que demuestran la influencia de la maduración en la composición fenólica de ciertos vinos y, por lo tanto, en el aroma de estos [4], aunque la mayoría de las investigaciones se centran en la influencia sobre el color del vino [5,6]. El objetivo de este trabajo fue conocer la fecha de vendimia más adecuada para la obtención de un vino elaborado con la variedad Albarello con un alto contenido aromático. Para ello se ha analizado, por cromatografía de gases, la composición volátil de los vinos obtenidos, en la misma cosecha, a partir de uvas vendimiadas con una semana de diferencia.

2. Material y métodos

Muestras de vino. La uva de Albarello se ha vendimiado en la D.O. Valdeorras en dos fechas diferentes: el 26 de Septiembre (Albarello 1ª vendimia) y el 3 de octubre (Albarello 2ª vendimia). Todos los vinos se vinificaron del mismo modo, siguiendo el procedimiento tradicional para vinos tintos, empleando la levadura AWRY 796 (Maurivin) e induciendo la fermentación maloláctica con la bacteria Uvaferm Alpha (Lallemand).

Análisis de los compuestos volátiles. Las sustancias volátiles se determinaron por Cromatografía de Gases siguiendo las metodologías propuestas por Bertrand [7] y Armada *et al.* [8]. Las muestras de vino se inyectan en modo splitless (30 s) en un cromatógrafo Hewlett Packard con detector de ionización de llama. La columna capilar utilizada es HP-Innowax (60 m x 0,25 mm, 0,25 μ m). Programa de temperatura: 45 °C (isoterma de 1 min), incremento a 3 °C/min hasta 230 °C (25 min). La temperatura del detector y del inyector es de 250 °C. El gas portador es helio (18 psi) a un flujo de 1,4 mL/min.

Para la determinación por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas, se inyecta 1 μ L del extracto, obtenido por triple extracción con diclorometano, en modo splitless (30 s) en un cromatógrafo Hewlett Packard HP-5890-II acoplado a un Espectrómetro de Masas Hewlett Packard HP 5970, usando la misma columna capilar y condiciones cromatográficas comentadas anteriormente. El Espectrómetro de Masas trabaja en impacto electrónico (energía de ionización, 70 eV; temperatura de la fuente, 250 °C) y la adquisición de datos se realiza en modo "scanning" (rango de masas, 30-300 uma; 1,9 espectros/s).

Análisis estadístico. Los resultados analíticos fueron sometidos a un tratamiento estadístico con el fin de evaluar si existían diferencias significativas para cada uno compuesto aromático presente en los vinos de Albarello en función de la fecha de vendimia; para ello se realizó un ANOVA y se calcularon las LSD (mínima diferencia significativa), para el 95% de probabilidad.

3. Resultados

Como se puede observar en la Figura 1, no todos los compuestos aumentan su concentración a consecuencia de una vendimia tardía, algunos se mantienen prácticamente estables o disminuyen. Estos efectos no se pueden considerar positivos o negativos sin analizar la influencia que tienen dichos compuestos en las características organolépticas del vino. En el

caso de los terpenos, la fecha de vendimia más adecuada sería la segunda, ya que se produce un aumento significativo del contenido en α -terpineol, que dota al vino de matices florales (lila), lo que conlleva una mejora del perfil aromático del mismo [9]. El aumento de concentración de las lactonas también puede repercutir positivamente en la calidad del vino.

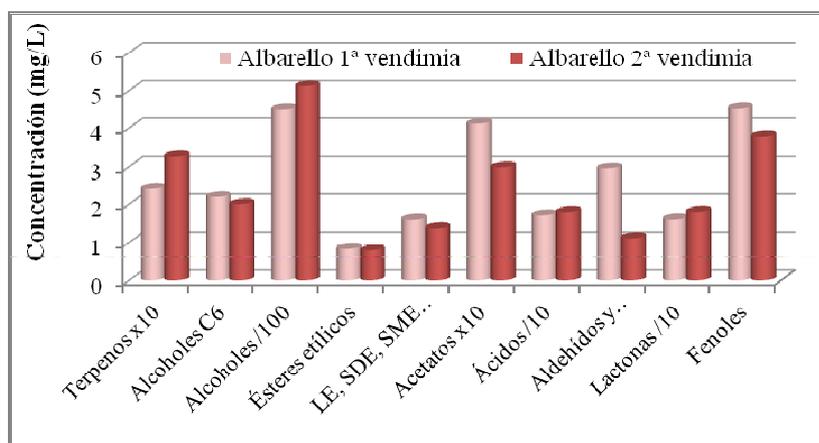


Figura 1. Composición volátil (mg/L) de los vinos de Albarello procedentes de dos vendimias

También se produce un leve aumento en la concentración de ácidos que, según sean de cadena larga o corta, tienen connotaciones negativas al estar presentes en el vino. El efecto de la fecha de vendimia coincide con los estudios en otros vinos, donde no solamente por la composición en ácidos, sino por el aumento que sufren otros muchos compuestos a consecuencia de una vendimia tardía tiene un impacto negativo en el aroma del vino [11].

La familia de compuestos que más aumenta de concentración en la segunda fecha de vendimia con respecto a la primera son los alcoholes; sin embargo, no influiría excesivamente en el aroma del vino Albarello porque la mayoría de ellos se encuentran en concentraciones demasiado pequeñas para ser percibidos de forma individual o enmascarar otros aromas, a excepción de los alcoholes isoamílicos o el 2-fenil-etanol [2]. En cambio, el contenido global de alcoholes C6 disminuye al vendimiarse más tarde, ya que suelen ser más abundantes en vinos provenientes de uvas carentes de maduración [2], proporcionando olores herbáceos.

Aldehídos y cetonas, acetatos y fenoles volátiles también disminuyen su concentración significativamente al realizar una vendimia más tardía, sobre todo los primeros porque la acetoína y el benzaldehído disminuyen su concentración. Los acetatos, que dotan de olores particulares [2], están presentes en contenidos más elevados en el vino de Albarello 1ª vendimia. Destaca la pérdida de fenoles volátiles, ya que disminuyen significativamente todos los que se detectaron, lo que podría tener un efecto positivo para la calidad del vino, ya que algunos compuestos, como el etil-fenol, son responsables de desviaciones olfativas; aunque también se podrán distinguir una serie de olores especiados proporcionados por otros fenoles.

La contribución de los ésteres al aroma global del vino está relacionada con la concentración inicial de aminoácidos, que depende de la madurez de la uva y la variedad [4]. Aunque una vendimia más tardía provoca una disminución, es casi inapreciable. También el contenido global en lactato de etilo (LE), succinato de dietilo (SDE) y de monoetilo (SME) disminuye, pero es debido únicamente a la menor concentración del SME, ya que los otros dos compuestos presentan mayor contenido en el vino Albarello 2ª vendimia.

4. Conclusiones

Los resultados muestran que los vinos de Albarello obtenidos muestran distintos perfiles aromáticos, sobre todo en cuanto a los contenidos en terpenos, alcoholes superiores, aldehídos y cetonas, lactonas y ésteres. Con los datos obtenidos, la mejor opción sería una vendimia más tardía, ya que se produce una mejora global en muchos compuestos aromáticos importantes del vino. No obstante, la recomendación de una fecha de vendimias óptima debería avalarse por el estudio a lo largo de varios años, además, al tratarse de una variedad tinta, también habría que tener en consideración los datos obtenidos a nivel de color y de composición fenólica.

5. Bibliografía

1. Hidalgo Togores, J. 2003. Tratado de Enología. Tomo 1. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.
2. Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. 2003. Tratado de Enología 2. Química del vino. Estabilización y tratamientos. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
3. Lasanta, C.; Caro, I.; Gómez, J.; Pérez, L. 2014. The influence of ripeness grade on the composition of musts and wines from *Vitis vinifera* cv. Tempranillo grown in a warm climate. Food Res. Int., 64, 432-438.
4. Martínez-Gil, A.M.; Garde-Cerdán, T.; Lorenzo, C.; Lara, J.F.; Pardo, F.; Salinas, M.R. 2012. Volatile compounds formation in alcoholic fermentation from grapes collected at 2 maturation stages: Influence of nitrogen compounds and grape variety. J. Food Sci., 71(1), 71-79.
5. Pérez-Magariño, S.; González-San José, M.L. 2006. Polyphenols and color variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. Food Chem., 96, 197-208.
6. Bautista-Ortín, A.B.; Fernández-Fernández, J.I.; López-Roca, J.M.; Gómez-Plaza, E. 2006. The effect of grape ripening stage on red wine color. J. Int. Sci. Vigne Vin, 40(1), 15-24.
7. Bertrand, A. 1968. Utilisation de la chromatographie en phase gazeuse pour le dosage des constituants volatils du vin. Thèse Docteur en Chimie. Universidad de Burdeos II, Francia.
8. Armada, L.; Fernández, E.; Falqué, E. 2010. Influence of several enzymatic treatments on aromatic composition of white wines. Food Sci. Technol., 43, 1517-1525.
9. Reynolds, A.G.; Wardle, D.A.; Dever, M. 1993. Terpene response to pressing, harvest date, and skin contact in *Vitis vinifera*. Hort. Sci., 28(9), 920-924.
10. Gómez-Míguez, M.J.; Gómez-Míguez, M.; Vicario, I.M.; Heredia, F.J. 2007. Assessment of color and aroma in white wines vinifications: Effects of grape maturity and soil type. J. Food Engin., 79, 758-764.

TE11 - ELABORACIÓN DE VINOS ESPUMOSOS DE CALIDAD A PARTIR DE VARIEDADES TINTAS. EFECTO DE DIFERENTES TÉCNICAS VITIVINÍCOLAS EN LA COMPOSICIÓN POLIFENÓLICA

Isabel Hernández-Saseta¹, Miriam Conzález-Lázaro¹, Zenaida Guadalupe¹, Belén Ayestarán¹, Marta Bueno-Herrera², Carlos González-Huerta², Pedro López de la Cuesta², Silvia Pérez-Magariño²

¹Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja y CSIC), C/Madre de Dios 51, 26006 Logroño (España)

²Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Ctra. Burgos km 119, 47071 Valladolid (España)

zenaida.guadalupe@unirioja.es

RESUMEN:

El objetivo principal de este trabajo fue la elaboración de vinos espumosos tintos de calidad con el fin de ampliar la oferta de los vinos espumosos y abrir nuevos mercados.

Se estudiaron diferentes técnicas de vinificación para obtener vinos base idóneos para la elaboración de vinos espumosos naturales tintos siguiendo el método tradicional y sin adición de licor de expedición.

Se estudió el efecto de la técnica de vinificación en el contenido de los compuestos fenólicos, ya se ha visto que juegan un papel fundamental en la calidad de la espuma.

Palabras clave: Vinos espumosos tintos, técnicas vitícolas, composición polifenólica

1. Introducción

En este trabajo se elaboraron vinos espumosos tintos de Tempranillo con el fin ampliar la oferta de los vinos espumosos y abrir nuevos mercados.

Los vinos espumosos tintos deben tener una graduación alcohólica moderada, una buena intensidad de color y una buena estructura en boca. Para ello se estudiaron diferentes técnicas de vinificación que permitan obtener vinos base idóneos para la elaboración de vinos espumosos naturales tintos siguiendo el método tradicional: (a) maceración pre-fermentativa en frío seguida de un descube en caliente; (b) delestaje con eliminación de semillas; (c) reducción del contenido en azúcar de los mostos de partida; (d) desalcoholización parcial de vino mediante ósmosis.

Los compuestos fenólicos engloban compuestos responsables del color, cuerpo, astringencia y amargor de los vinos; es decir, tienen un papel fundamental en sus características sensoriales. Además, en los vinos espumosos juegan un papel fundamental en la calidad de la espuma (1). La composición y la carga fenólica de los vinos está influida por factores como la variedad de uva y el estado de madurez de la misma, la maceración de los hollejos, las numerosas técnicas de vinificación y las diferentes reacciones que se dan durante

el envejecimiento de los mismos. Además, la presencia de lías en la botella tiene un papel importantísimo en el caso de los vinos espumosos elaborados mediante el método tradicional. Existen numerosas técnicas de elaboración del vino que influirán en mayor o menor medida en la composición y en la carga fenólica del vino base, y en consecuencia en el vino espumoso.

En este trabajo se evalúa el efecto de las técnicas de vinificación empleadas en el contenido de compuesto fenólicos en el vino base, y en su evolución durante la crianza sobre lías en botella y tras el degüelle de los vinos espumosos.

2. Material y métodos

La variedad de uva utilizada en este estudio fue la variedad Tempranillo. Se elaboraron diferentes vinos base utilizando diferentes técnicas de vinificación. También se elaboraron dos vinos base testigo con uva madura (TST) y con uva pre-madura (TPT) siguiendo el proceso de vinificación tradicional para vinos tintos.

Tanto para la maceración pre-fermentativa en frío como para el delestaje se utilizaron uvas con una graduación alcohólica probable inferior a 12º v/v. En la maceración pre-fermentativa en frío (TPHS), las uvas se enfriaron con hielo seco hasta 5ºC. En la técnica de delestaje se realizaron dos delestajes diarios tras el inicio de la fermentación eliminándose entre el 40 y el 60% de las semillas. Para los tratamientos de eliminación de azúcares del mosto y la desalcoholización parcial del vino se utilizaron uvas que habían alcanzado el grado de madurez óptimo. En la experiencia de la eliminación de azúcares del mosto (TSA), una parte del mosto se sometió a un proceso de nanofiltración, obteniéndose un permeado con entre un 50 y 60% menos de azúcar inicial, sustituyendo parte del mosto inicial por el permeado obtenido. En la técnica de desalcoholización parcial del vino base (TSD), parte del vino se sometió a un proceso de ósmosis para rebajar su graduación alcohólica. Se mezcló el vino parcialmente desalcoholizado con el vino final en la proporción necesaria para obtener un vino con el mismo grado alcohólico que en las experiencias anteriormente descritas. Los vinos tintos espumosos se elaboraron siguiendo el método de elaboración tradicional y no se adicionó licor de expedición. Se tomaron muestras a los 0 (vino base), 3, 6, 9 y 12 meses de crianza sobre lías. A los 12 meses se realizó el degüelle y se tomaron muestras tras 6 y 12 meses de degüelle (crianza sin lías).

La cuantificación de los compuestos monómeros se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta-visible (HPLC-DAD), siguiendo el método de Gómez-Alonso (2).

3. Resultados

En la Figura 1 se representa la concentración total de antocianos, ácidos hidroxicinámicos y flavanoles de los vinos elaborados con diferentes técnicas de elaboración y obtenidos a partir de uva pre-madura (TPHS, TPD y TPT) y de uva madura fenólicamente (TSA, TSD y TST).

La cantidad de antocianos totales fue muy superior en los vinos elaborados a partir de uva madura fenólicamente, salvo en el caso del vino en el que se aplicó la técnica de

desalcoholización parcial del vino (TSD), la cual provocó una disminución del contenido total de antocianos. En general, los primeros meses de contacto con las lías produjeron una disminución en el contenido de antocianos. En los vinos con mayor cantidad de antocianos totales su contenido en antocianos disminuyó en mayor medida, siendo un 53% para el vino TSA y un 43% para el vino TST.

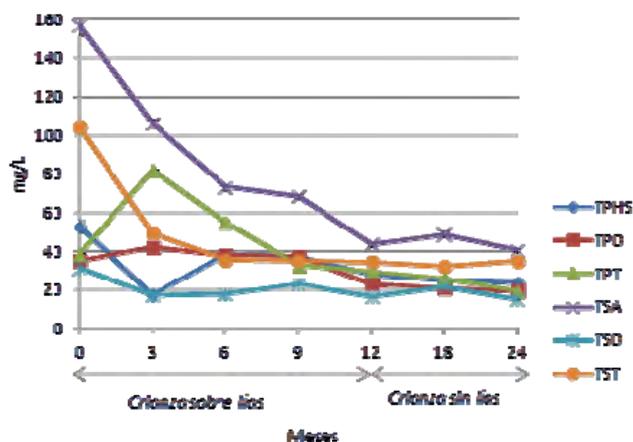


Figura 1. Concentración de antocianos totales (mg/L)

Tras eliminar las lías de las botellas el contenido de antocianos totales se mantiene estable en todos los vinos a los seis y doce meses del degüelle. A los doce meses del degüelle, todos los vinos tienen un contenido similar en antocianos totales, salvo los vinos TSA y TST, que presentan cerca de un 20% más de antocianos totales que el resto.

En resumen, los vinos que presentaron un mayor contenido de antocianos totales tuvieron la mayor pérdida de los mismos, dándose una pérdida del 74% de la cantidad inicial de antocianos totales para el vino TSA y un 66% para el vino TST, es decir, a mayor cantidad inicial de antocianos, mayores pérdidas de antocianos tendrán lugar durante la elaboración del vino espumoso.

Los antocianos de los vinos elaborados están compuestos en su mayoría por antocianos no acilados, seguidos de los antocianos acetilados y cumarilados. Todas las familias de antocianos presentaron la misma evolución a lo largo de los meses que los antocianos totales (datos no mostrados).

Los vinos base elaborados a partir de uva pre-madura y tratada con hielo seco y el vino testigo elaborado a partir de uva madura presentaron una mayor concentración de ácidos hidroxicinámicos (Figura 2). La concentración de ácidos hidroxicinámicos medida para cada tipo de uva y de elaboración evolucionó de una forma muy similar entre tratamientos, observándose un incremento entre los 9 y 12 meses de crianza sobre lías.

Los vinos base elaborados con uva madura fenólicamente presentaron una concentración menor de flavanoles que los vinos elaborados con uva pre-madura (Figura 3). Durante la crianza en botella, todos los vinos elaborados a partir de uva pre-madura aumentaron su concentración de flavanoles sin embargo los vinos elaborados a partir de uva madura se mantuvieron constantes.

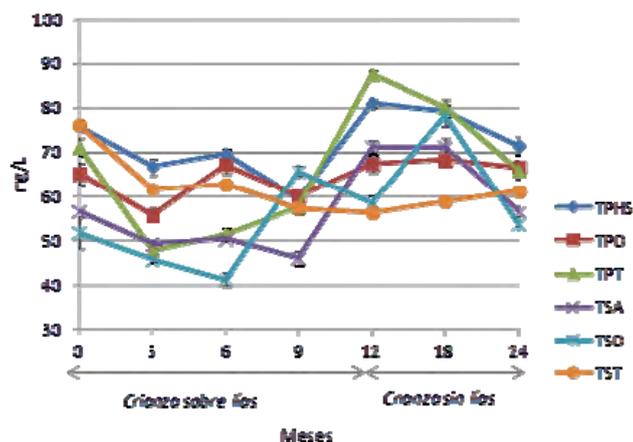


Figura 2. Concentración de ácidos hidroxicinámicos totales (mg/L)

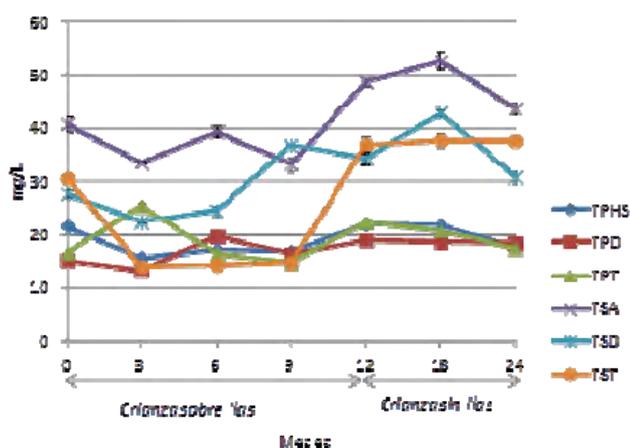


Figura 3. Concentración de flavonoles totales (mg/L)

5. Bibliografía

1. Martínez-Lapuente L., Guadalupe Z., Ayestarán B., Pérez-Magariño S., 2015. Role of major wine constituents in the foam properties of white and rosé sparkling wines. *In: Food Chemistry* 174, 330-338.
2. Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Hermosín-Gutierrez, I., 2007. *In: HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. Journal of Food Composition and Analysis* 20, 618-626.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen al INIA la financiación recibida a través del proyecto RTA2012-00092-C02-01 (con fondos FEDER). Isabel Hernández Sasetta agradece al Ministerio de Educación por la beca de iniciación a la investigación concedida en el curso 2014-2015.

TE12 - MANEJO DE LA FERMENTACIÓN PRE FERMENTATIVA EN FRÍO CON LA LEVADURA SELECCIONADA *Metschnikowia pulcherrima*

Vincent Gerbaux¹, Isabelle Davanture¹, Anne Guilloteau¹, Françoise Raginel¹, José M. Heras², Anne Julien²

¹ Institut Français de la Vigne et du Vin (IFV), 6 rue du 16^{ème} Chasseurs, 21200 Beaune, Francia.

² Lallemand SAS, Rue des Briquetiers, 31702, Blagnac, Francia.

Vincent.gerbaux@vignevin.com

RESUMEN:

La maceración pre fermentativa en frío es una práctica común en la elaboración de vinos tintos en la región de Borgoña con el objetivo del manejo del color y la intensidad aromática en la variedad Pinot noir. Sin embargo, hay microorganismos en las uvas, especialmente levaduras de las especies *Kloeckera apiculata* ó *Hanseniaspora uvarum*, que pueden producir ácido acético y acetato de etilo. Una levadura de esta especie ha sido seleccionada por el IFV, a partir de una colección original de 500 cepas aisladas de Pinot noir en la región de Borgoña. Se propone que la práctica enológica de la inoculación de una biomasa de *Metschnikowia* seleccionada en uvas de Pinot noir durante la maceración pre fermentativa en frío, limita la sobre-producción de compuestos indeseables por la competencia con los microorganismos que los producen, resultado en un impacto positivo en la calidad del vino.

Palabras clave: Maceración pre-fermentativa en frío, protección biológica, *Metschnikowia pulcherrima*, Pinot Noir.

1. Introducción

La maceración pre-fermentativa en frío es una técnica ampliamente difundida en todo el mundo para la elaboración de los vinos tintos. Diferentes opciones técnicas pueden ser elegidas con arreglo al objetivo y las posibilidades de la bodega. El nivel de temperatura y el nivel de sulfitado son parámetros determinantes que directamente influyen sobre la flora microbiana presente. La temperatura está generalmente comprendida entre 10 y 15°C.

La maceración pre-fermentativa en frío es citada a menudo para mejorar el color y la intensidad aromática frutada. El aumento en el color estaría vinculado a una sobredosis de dióxido de azufre, indeseable en un contexto de disminuir las dosis del mismo. Esta intensidad del color observada durante una maceración en frío antes de la fermentación es un tema de estudio. El aumento del carácter afrutado está vinculado a la flora microbiana presente. Sin embargo, se ha demostrado que la flora de levaduras dominante de la uva integra particularmente levaduras de la especie *Kloeckera apiculata* (o *Hanseniaspora uvarum*), caracterizadas por una fuerte aptitud para producir ácido acético y acetato de etilo.

En estas condiciones, puede ser interesante asociar una maceración pre-fermentativa en frío y una siembra con una levadura cuyas aptitudes enológicas son conocidas. El objetivo es doble, proteger el mosto de las levaduras indeseables y favorecer la expresión aromática. *Metschnikowia pulcherrima* es una levadura común de la uva que perfectamente puede cumplir este papel.

2. Material y métodos

Una colección original de más de 500 cepas de levaduras de Borgoña se ha constituido a partir de parcelas de vides y de vendimias no fermentadas. Esta colección ha sido sometida a un proceso de selección ligado a diferentes criterios con el fin de reducir el número de cepas interesantes para el objetivo. 25 cepas han sido retenidas y clasificadas en un orden de interés decreciente. Las 15 primeras han sido identificadas genéticamente. Todas ellas pertenecen a la especie *Metschnikowia pulcherrima* y son diferentes entre ellas. Se tomaron en consideración tres cepas (A, B, C) para estudios en laboratorio y en bodega experimental, considerando, primeramente, biomasas líquidas producidas en laboratorio y, en segundo lugar, biomasas en forma de levaduras secas activas (LSA).

Las pruebas en laboratorio se realizaron en frascos de 250 ml. Se utilizó un mosto de la variedad de uva Pinot noir, prensado después de una maceración en frío del orden de dos días. El mosto fue conservado congelado hasta su utilización. Entonces se ajustó en las condiciones fisicoquímicas definidas por el protocolo de estudio y, según los casos, pasteuriza o no (6 mn a 70°C). Se realizaron diferentes experimentaciones para verificar la influencia de las condiciones fisicoquímicas sobre la implantación de *Metschnikowia pulcherrima* en un mosto y para determinar las interacciones con *Kloeckera apiculata*. Se inocularon en el mosto cultivos líquidos de *Kloeckera* (3 cepas de la colección IFV) a aproximadamente 100 cell./ml. Cuatro horas más tarde, *Metschnikowia* es inoculada a aproximadamente 10⁶ cell./ml (cultivo líquido ó LSA según los casos). Testigos no sembrados o con una sola especie de levadura son seguidos como referencia. La temperatura es regulada en estufa. La población de levaduras es seguida mediante cultivo en placa petri con medio agar (base YPD). La fase pre-fermentativa es seguida por una fase fermentativa mediante la siembra con *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin®RC212.

La aplicación práctica en bodega experimental es realizada, sobre dos años de vendimia, en depósitos termo regulados de 2.5hl llenados con 200 kg de uvas de pinot noir. Según el año de cosecha, el sulfitado en el encubado es reducido (3.5 g / hl) o nulo. Tres lotes homogéneos están constituidos, entre los que dos están sembrados con *Metschnikowia pulcherrima* a 25 g/ hl (cepas A y B en forma de LSA), al día siguiente del encubado en caso de sulfitado o durante el encubado en ausencia de sulfitado. Después de una fase pre-fermentativa de 5 días a 15°C, los tres lotes son inoculados con *Saccharomyces cerevisiae* a 20 g/hl Lalvin®RC212. La fermentación alcohólica es efectuada entre 20 y 30°C. Después del agotamiento de los azúcares, una maceración final en caliente es realizada (un día a 35°C y uno a 40°C), antes del descubado. La duración total de la maceración es de 14 días. Tras la fermentación maloláctica los vinos son almacenados en depósitos inerte as una temperatura del orden de 15°C durante 10 meses.

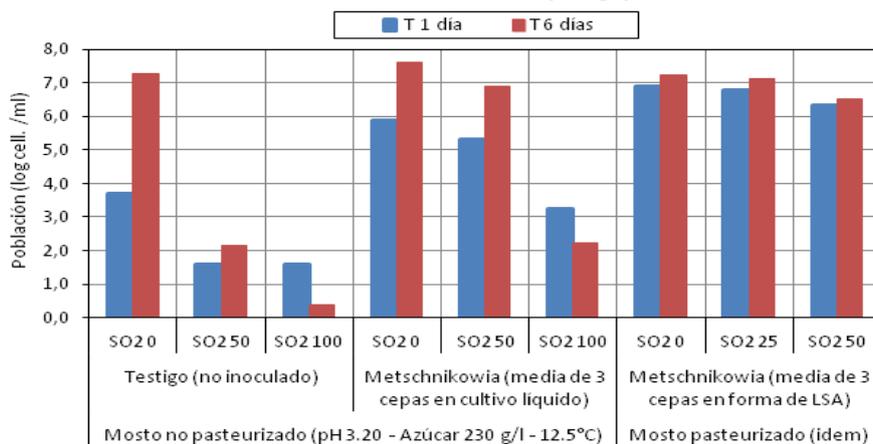
3. Resultados

Se estudió la influencia de las condiciones fisicoquímicas sobre la implantación de *Metschnikowia pulcherrima* en el mosto.

Influencia del sulfitado (Figura 1). El mosto, no pasteurizado, contiene levaduras que se desarrollan rápidamente en ausencia de sulfitado, a pesar de una temperatura baja de 12.5°C. Un sulfitado de 50 mg/l inhibe el crecimiento de levadura y un sulfitado de 100 mg/l

reduce esta población. La implantación de una biomasa líquida de *Metschnikowia* es muy buena en el mismo mosto, no sulfitado. En 5 días, la población aumenta más de una potencia de diez para sobrepasar 10^7 cell./ml. Un sulfitado de 100 mg/l reduce fuertemente a la población de levaduras e inhibe su crecimiento. El estudio realizado con LSA de *Metschnikowia*, inoculada en un mosto pasteurizado, confirma la buena implantación hasta un sulfitado de 50 mg / l. El nivel inicial de población siendo más elevado que con los cultivos líquidos, el crecimiento luego es débil durante la incubación. Estos resultados muestran también que la producción de una biomasa de *Metschnikowia* en forma de LSA es bien controlada en esta fase según los objetivos planteados.

Figura 1: Implantación de *Metschnikowia pulcherrima* en un mosto en función del nivel de sulfitado (en mg/l).

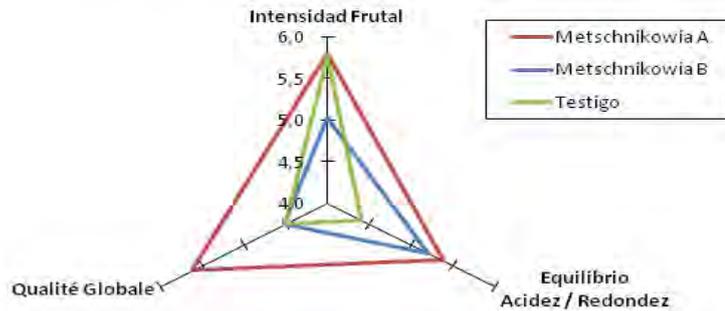


Influencia de la temperatura: en ausencia de sulfitado y en ausencia de pasteurización, una población de levaduras indígenas se desarrolla en el lote testigo no sembrado y a la temperatura de 10°C. La levadura *Metschnikowia* se implanta prácticamente tanto a 10°C como a 15°C. El crecimiento posterior está influido normalmente por el nivel de temperatura. La utilización de un LSA de *Metschnikowia* confirma una buena aptitud para implantarse a baja temperatura, 11°C, con una población muy próxima de la observada a 19°C.

Aplicación práctica de *Metschnikowia pulcherrima* en bodega experimental sobre Pinot noir.

La inoculación precoz de *Metschnikowia* (durante el encubado o al día siguiente del encubado) no tiene incidencia notable sobre el desarrollo de la fermentación alcohólica, iniciada por la siembra con *Saccharomyces cerevisiae*. Las vendimias de Pinot noir presentaban contenidos en nitrógeno asimilable (ammoniacal y aminado) de 275 y 245 mg / l, para cada uno de los años de vendimia considerados. Para el segundo caso, se ha añadido un nutriente complejo al primer tercio de la fermentación alcohólica a la dosis de 40 g / hl. Los análisis realizados al final de la elaboración muestran un grado alcohólico similar de un lote al otro. La inoculación con *Metschnikowia* no tiene incidencia sobre la degradación de los azúcares del mosto. Los valores de acidez total y de pH son también similares. En cambio, el contenido en ácido acético es más débil para los lotes inoculados con *Metschnikowia*, siendo 0.28 g/l para la cepa A, contra 0.40 g/l para el lote testigo. Ambas experimentaciones han sido catadas al final de la elaboración por un jurado de expertos, en una sala de análisis sensorial, utilizando el software específico Fizz. Los resultados muestran que la cepa A de *Metschnikowia* presenta los mejores resultados en términos de intensidad frutada, de equilibrio gustativo y de calidad global (Figura 2).

Figura 2 : Evaluación sensorial de lotes de pinot noir elaborados con una fase prefermentativa en frío, con ó sin *Metschnikowia pulcherrima*. – Valores medios de dos vendimias, depósitos de 2,5 hl.



4. Conclusiones

El interés en utilizar una levadura seleccionada de *Metschnikowia pulcherrima*, en el marco de la elaboración de vinos tintos que integra una maceración pre-fermentativa en frío, es confirmado. Esta levadura resiste un nivel de sulfitado de 50 mg/ l en fase líquida. En estas condiciones, la población viva de *Metschnikowia* sobrepasa 10^7 cell./ml al final de maceración pre-fermentativa en frío. Los resultados confirman que la especie *Kloeckera apiculata* tiene una aptitud notable para multiplicarse en el mosto. Esta levadura, entre las mayoritarias de la flora de la uva, produce una cantidad anormalmente elevada por ácido acético. Los resultados muestran claramente que la inoculación con *Metschnikowia* inhibe completamente la actividad de *Kloeckera*, frente a la producción de ácido acético y de acetato de etilo. La aplicación práctica en bodega experimental confirma que la inoculación con *Metschnikowia* limita la presencia de ácido acético en relación al lote testigo, no inoculado para la fase pre-fermentativa. Se demuestra igualmente que la producción de *Metschnikowia* en forma de levadura seca activa está bien controlada con una viabilidad y una recuperación de actividad muy buenas en un mosto. La utilización de *Metschnikowia pulcherrima* es una nueva herramienta que permite controlar una maceración pre-fermentativa en frío y de administrar mejor el principal problema de esta técnica que es la ausencia de control de la flora de levaduras indígenas, mayoritariamente desfavorables a la calidad.

5. Bibliografía

1. Ciani, M., and G. Picciotti. 1995. The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeast associated with wine-making. *Biotechnol. Lett.* 17:1247-1250.
2. Pretorius, I. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast.* 16:675-729.
3. Ganga, M. A., and C. Martínez. 2004. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 96:76-83.
4. Renouf, V. 2006. Description et caractérisation de la diversité microbienne durant l'élaboration du vin : Interactions et équilibres – Relation avec la qualité du vin. Tesis presentada al Institut National Polytechnique, Toulouse, Francia.

TE13 - EFECTO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE ELABORACIÓN EN EL AROMA Y SABOR DE VINOS BLANCOS DE TEMPRANILLO

Neiba Quintana¹, Leticia Martínez Lapuente¹, Zenaida Guadalupe¹, Belén Ayestarán¹,
Mar Vilanova², Roberto Vicente³, Clara Canals³, Elena Adell³

¹Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (Universidad de la Rioja, Gobierno de La Rioja y CSIC),
C/ Madre de Dios 51, 26006 Logroño (España)

²Misión Biológica de Galicia, C/ El Palacio-Salcedo. 36143. Pontevedra (España)

³Bodega Campo, C/ Viejo Camino de Lapuebla, 50, 26006 Logroño (España)

belen.ayestaran@unirioja.es

RESUMEN:

El objetivo de este trabajo fue caracterizar el aroma y sabor los vinos de Tempranillo blanco elaborados de forma tradicional y por maceración carbónica con y sin crianza en barrica. Los compuestos que más contribuyeron al aroma de los vinos de Tempranillo blanco fueron relacionados con aromas frutales; estos descriptores fueron también los más percibidos por los catadores en el análisis sensorial. Los resultados mostraron diferencias notables en la concentración total de compuestos volátiles entre las distintas técnicas de elaboración. Los vinos elaborados de forma tradicional mostraron niveles más altos de ácidos grasos que los vinos de maceración carbónica, los cuales mostraron niveles más altos de acetatos.

Palabras clave: Tempranillo blanco, técnicas de vinificación, compuestos volátiles, análisis sensorial

1. Introducción

En los últimos años la Denominación de Origen Calificada (D.O.Ca) Rioja ha impulsado la recuperación de variedades minoritarias autóctonas, con el fin de diversificar los vinos y así establecer un nicho propio para su venta en el marco de un mercado cada vez más competitivo. La variedad Tempranillo blanco, autorizada en el año 2007 por Consejo Regulador de la D.O.Ca Rioja, es una de las nuevas variedades que puede aportar mayor personalidad y tipicidad a los vinos blancos de la D.O.Ca Rioja. Esta variedad posee un genotipo muy próximo a la variedad Tempranillo tinto, aunque ha perdido el 1% de su información genética en la mutación.

En general los vinos de Tempranillo blanco tienen un color amarillo verdoso; destacando por su aroma varietal característico, en el que predominan notas afrutadas intensas (plátano, cítricos y frutas tropicales) y también florales y terpénicas; en el paladar son equilibrados, con cierta estructura y persistencia medio-larga (1). No obstante, las características sensoriales de un vino varietal pueden cambiar según el método de vinificación y de crianza empleado. La mayoría de vinos blancos varietales se elaboran por la fermentación única del mosto, sin maceración fermentativa con las partes sólidas del racimo, pero en el método de maceración carbónica, la fermentación se lleva a cabo en presencia de racimos enteros. Estas diferentes características de elaboración, entre otras cosas, pueden intervenir en las características aromáticas del vino blanco varietal resultante, aportando calidad y carácter propio al vino obtenido. Los compuestos volátiles de los vinos blancos varietales provienen no sólo de la variedad de uva empleada sino también de las levaduras que llevan a cabo la fermentación alcohólica y del envejecimiento en barrica. Los compuestos odoríferos

provenientes de la uva y característicos de la variedad juegan un rol determinante en la calidad y tipicidad del vino. Hay que señalar también que la mayor parte de los componentes del aroma se forman como productos secundarios del metabolismo de las levaduras durante la fermentación alcohólica; sin olvidar que el roble aporta al vino diferentes sustancias volátiles y compuestos fenólicos que mejoran su calidad aromática y gustativa.

Por todo ello, en este trabajo se analiza la composición volátil y se caracterizan sensorialmente los vinos de Tempranillo blanco elaborados de forma tradicional y por maceración carbónica con y sin crianza en barrica.

2. Material y métodos

La **elaboración del vino blanco de Tempranillo** se realizó en la bodega experimental de la Bodega Campo Viejo (D.O.Ca Rioja). En la *elaboración tradicional*, la uva se preno neumáticamente llevando dos protocolos de actuación diferentes: a la mitad de la uva se le realizó un prensado con maceración, y a la otra mitad sin maceración. En el primer caso, se inoculó el mosto desfogado con la levadura comercial Ferm ES 181 (Enartis) y se adicionaron nutrientes. El proceso de fermentación se realizó a una temperatura de $13,1 \pm 1,1^\circ\text{C}$. Los vinos obtenidos se denominaron VT-ES 181. En el segundo caso, se inoculó el mosto desfogado con levadura Actiflore F33 (Laffort) y se adicionaron nutrientes. Durante la fermentación se mantuvo la temperatura entre $15,8 \pm 1,3^\circ\text{C}$. Los vinos obtenidos se denominaron VT-F33. En la *elaboración por maceración carbónica*, el racimo entero de uva se encubó directamente llenando dos depósitos. Los depósitos habían sido previamente inertizados con CO_2 antes de su llenado, durante y tras el llenado. Durante el proceso de fermentación se añadió a cada depósito cortezas con alto contenido en manoproteínas y nutrientes. A un depósito se le adicionó la levadura ES 401 (Enartis), y al otro depósito la levadura Vintage White (Enartis). Durante la fermentación, ambos depósitos se mantuvieron a una temperatura entre 16 y 20°C y se realizaron dos pisajes diarios. Cuando se alcanzó una densidad de 1,020-1,010 g/mL, los racimos se prensaron y se separaron las distintas calidades, obteniendo vino yema, vino de primera prensa y de segunda prensa, dejándolos finalizar la fermentación por separado. Cada semana se removieron las lías mediante battonages. Se mezclaron entonces los vinos procedentes de la primera y la segunda prensa, se sulfitaron y se tomaron muestras; los vinos obtenidos se denominaron MC-ES y MC-VW. Posteriormente se llenaron dos barricas con la mezcla realizada y se continuó con su battonage semanal. Los vinos obtenidos tras 4 meses de crianza en barrica se denominaron MC-B-ES 401 y MC-B-VW.

Los **métodos de análisis** utilizados para la determinación de *parámetros enológicos* generales fueron los métodos oficiales de la OIV (1990). Los *compuestos volátiles* se determinaron mediante cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (2) siguiendo el método QDA (3). Todos los análisis se realizaron por duplicado. El **análisis sensorial** de todos los vinos lo realizó un panel de cata compuesto por 20 catadores. Los catadores marcaron la intensidad de cada atributo en una escala de respuesta cuantitativa con 5 niveles de intensidad, donde 0 correspondía a la ausencia de percepción y 5 a una intensidad muy elevada. El **análisis estadístico** de los atributos sensoriales fue un Análisis de Procusters Generalizado (Generalized Procustes Analysis, GPA), y se utilizó el software Senstools Version 3.3.2. (Utrecht, The Netherlands).

3. Resultados

La Tabla 1 muestra un resumen de los datos obtenidos. La utilización de levaduras secas activas no influyó de manera determinante en los compuestos volátiles de los vinos de Tempranillo blanco, de la misma forma que no influyó la presencia o ausencia de crianza. Por el contrario, los vinos elaborados de forma tradicional presentaron diferencias destacables en

comparación con los elaborados por maceración carbónica. Los vinos elaborados de forma tradicional presentaron concentraciones mayores en ácidos grasos y ésteres de etilo, caracterizados por aromas rancios y afrutados respectivamente, que los vinos de maceración carbónica. Los vinos de maceración carbónica presentaron concentraciones mayores de acetatos que los vinos elaborados de forma tradicional. Sin embargo es importante destacar que en ambos vinos los compuestos mayoritarios fueron los alcoholes, destacando por sus aromas afrutados.

Tabla 1. Compuestos volátiles de los vinos de Tempranillo blanco¹

(E)-3-Hexen-1-ol	31±12	14±4	23±35	18±2	10±1	24±6
(Z)-3-Hexen-1-ol	133±13	115±16	39±29	36±2	29±2	40±9
1-propanol	404±58	311±41	594±49	885±88	603±70	861± 201
2-metil-1-propanol	546±66	896±78	1609±81	1248±159	1602±104	1296±296
1-butanol	60,69 ± 9,63	53± 8,95	1567±4274	70±8	71±10	69±18
3-metil-1-butanol	20346±1620	20383±1704	36569±2635	33330±2147	35581±1421	35758±7766
1-hexanol	601±70	599±78	138±22	157±16	139±6	191±50
4-nonanol	249±89	276±33	223±51	229±22	243±44	275±122
2-feniletanol	5521±1503	6613±896	15222±1996	17290±1885	13655±299	18325±4572
3-metil-1-pentanol	34±6	38±6	41±8	36±4	38±6	37±12
Alcohol bencílico	14±1	15±2	286±562	84±4	85±7	93±25
3-metiltiopropanol	24±3	28±4	87±10	130±27	79±7	127±33
Butirato de etilo	411±73	400±76	313±39	243±46	256±11	317±83
Hexanoato de etilo	1660±214	1295±264	600±90	495±111	568±19	668±199
Lactato de etilo	196±16	342±36	176±26	154±15	195±8	161±37
Octanoato de etilo	2249 ±285	2057±327	812±114	818±188	821±36	1156±363
Decanoato de etilo	942±124	833±121	568±66	604±86	508±154	806±245
Succinato de dietilo	59±18	216±63	110±18	87±21	118±6	92±26
Isoamiloacetato	7463±993	7125±1180	8462±1242	7616±1157	7746±310	9253±2420
Acetato de hexilo	864±110	738±116	87±15	94±30	86±4	148±45
2-fenilacetato	466±66	489±86	7101±144	841±150	647±25	1040±332
Acetoina	39±4	66±23	20±3	43±32	14±2	59±13
Ácidos 2 y 3 metilbutanoico	54±13	86±51	119± 22	120±29	126±5	138±45
Ácido hexanoico	2879±304	2605±281	1006±441	1034±170	1157±25	1245±331
Ácido octanoico	8564±1027	8176±1156	3250±410	3199±742	3189±78	4178±1207
Ácido decanoico	3320±485	3255±511	969±152	1323±402	1201±48	1971±722
Ácido geránico	276±69	1141±174	357±63	180±71	302±10	234±92
Ácido dodecanoico	196±48	218±36	60±28	64±29	83±3	111±42
Ácido hexanodecanoico	153±135	132±37	113±27	131±29	102±6	152±48
4-vinilguaiacol	93±21	89±12	127±21	84±7	121±5	93±29
Vainillina	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
4-vinilfenol	288±42	445±75	431±50	464±35	542±37	261±170

¹VT-ES 181: vinificación tradicional con levadura ES 181; VT-F33: vinificación tradicional con levadura Actiflore F33; MC-VW: maceración carbónica con levadura Vintage White; MC-ES 401: maceración carbónica con levadura ES 401; MC-B-VW: maceración carbónica en barrica con levadura Vintage White; MC-B-ES 401: maceración carbónica en barrica con levadura ES 401. Se muestra la media y desviación estándar (n=3)

Los espacios vectoriales GPA obtenidos de las evaluaciones sensoriales de los vinos de Tempranillo blanco se muestran en las figuras 1a y 1b. Se observa que el método de vinificación y la presencia o no de barrica fueron los efectos más importantes. No se observaron diferencias significativas en la percepción gustativa y olfativa debidas al uso de diferentes levaduras comerciales.

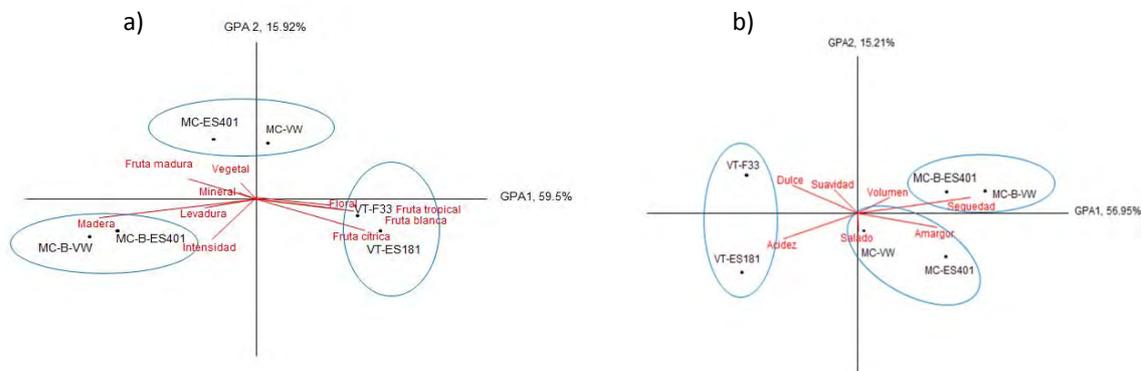


Figura 1. GPA olfativo (figura 1a) y gustativo (figura 1b) de los vinos de Tempranillo blanco

Los vinos de elaboración tradicional mostraron altas correlaciones con los descriptores florales y afrutados y los de maceración carbónica sin barrica se caracterizaron por aromas vegetales y minerales así como descriptores de fruta madura; los aromas a madera y levadura fueron predominantes en los vinos de maceración carbónica con barrica, que fueron los más intensos aromáticamente (Figura 1a). En la fase gustativa los vinos de elaboración tradicional presentaron los valores más altos en percepción dulce, suavidad y sensación de acidez; la maceración carbónica produjo vinos con mayor volumen en boca pero también se incrementaron las sensaciones secas y amargas, probablemente debido a la presencia del raspón durante su elaboración; los vinos elaborados por maceración carbónica con crianza en barrica fueron descritos como los más secos y de mayor volumen (Figura 1b).

4. Bibliografía

1. Consejo Regulador de la Denominación de Origen Calificada Rioja (www.riojawine.com).
2. Oliveira, J. M., Faria, M., Sá, F., Barros, F., Araújo, L. M. 2006. C6-alcohols as varietal markers for assessment of wine origin. *In: Analytical Chemical Acta*. 563, 300-309.
3. Lawless, H.T., Heymann, H. 1998. Sensory evaluation of food. Principles and Practices. Kluwer Academic/Plenum Publishers, Massachusetts.

TE14 - EFECTO DEL GRADO DE MADUREZ DE LA UVA Y TÉCNICAS ENOLÓGICAS EN LA COMPOSICIÓN VOLÁTIL DE VINOS TINTOS ESPUMOSOS

S Pérez-Magariño*¹, M Bueno-Herrera¹, C González-Huerta¹, P López de la Cuesta¹, M González-Lázaro², L Martínez-Lapuenta², S Bañuelos², Z Guadalupe², B Ayestarán²

¹Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Consejería de Agricultura y Ganadería, Ctra. Burgos Km. 119, 47071 Valladolid, España

²Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (Universidad de la Rioja, Gobierno de La Rioja y CSIC), Madre de Dios 51, 26006 Logroño, España

*permagsi@itacyl.es

RESUMEN:

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del grado de maduración de la uva y de diferentes técnicas enológicas en la composición volátil de vinos tintos espumosos con 9 meses de crianza sobre lías en botella. Se elaboraron diferentes vinos base a partir de la variedad de uva Tempranillo, vendimiada en dos estados diferentes de maduración y se estudiaron dos técnicas enológicas en cada uno de ellos. Se encontraron diferencias entre los diferentes vinos espumosos, principalmente en el contenido de acetatos de alcoholes, alcoholes C6, y derivados de la vainillina, dependiendo del grado de madurez de la uva. Las técnicas enológicas modificaron la composición volátil en menor medida.

Palabras clave: espumosos tintos, compuestos volátiles, hielo seco, delestage, reducción de azúcares, desalcoholización

1. Introducción

La elaboración y el consumo de vinos tintos espumosos no es habitual en España. Sin embargo, este tipo de vinos se elabora en otros países, como Estados Unidos, Australia, Sudáfrica, Argentina, Italia, etc., con una gran aceptación por parte de los consumidores. Uno de los principales problemas a la hora de elaborar estos vinos es la obtención de un vino base con unas características adecuadas, un contenido alcohólico moderado y una buena sensación en boca. El grado alcohólico de los vinos base para la elaboración de vinos espumosos debe estar entre 10-11.5°. Sin embargo, las uvas tintas vendimiadas en ese momento de madurez tecnológica no han alcanzado el grado de madurez fenólica adecuado. Por ello, se deben utilizar técnicas que permitan adecuar las características de un vino tinto a la elaboración de un vino espumoso. La maceración pre-fermentativa en frío [1-2] o el “delestage” con la eliminación parcial de las pepitas [3] pueden ser técnicas útiles para mejorar la calidad de los vinos elaborados con uvas pre-maduras. Por otro lado, uvas vendimiadas en el momento óptimo de madurez (madurez fenólica) darán lugar a vinos con un elevado grado alcohólico, por lo que el uso de técnicas como la reducción del azúcar en el mosto [4] o del grado alcohólico en el vino [5-6] pueden resultar interesantes.

Por ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del grado de maduración de la uva y de diferentes técnicas enológicas en la composición volátil de vinos tintos espumosos.

2. Material y métodos

2.1. Elaboración de los vinos tintos espumosos

Se vendimiaron uvas de la variedad Tempranillo en dos momentos de madurez diferentes: uvas pre-maduras (PM) con un grado alcohólico y acidez adecuada para la elaboración de vinos espumosos, aunque las uvas no tenían una adecuada madurez fenólica; y uvas maduras, considerando su momento óptimo de madurez fenólica (M).

Se realizaron 3 tipos de elaboraciones con cada grupo de uvas vendimiadas. Con las uvas pre-maduras se elaboró un vino control siguiendo el método tradicional de vinificación en tinto (PM-C); un vino con maceración pre-fermentativa en frío con hielo seco, manteniendo una temperatura de 5°C durante 3 días antes de comenzar la fermentación alcohólica (PM-HS); y un vino con “delestaje” y eliminación parcial de las pepitas que se realizó después de dos días del comienzo de la fermentación alcohólica durante 3 días consecutivos (PM-D). Con las uvas maduras se elaboró un vino control (M-C); un vino con reducción del contenido de azúcares en el mosto mediante un proceso de nanofiltración (M-RA) usando la membrana SR3 [7]; y un vino con desalcoholización parcial mediante ósmosis inversa (Bucher Vaslin) (M-D).

Las elaboraciones de los vinos espumosos se realizaron en la bodega de la Estación Enológica (Rueda, Valladolid), y se llevaron a cabo siguiendo el método tradicional o “champenoise”. Tras el tiraje, las botellas se mantuvieron en la cava subterránea a temperatura y humedad relativa controlada hasta el momento del degüello a los 9 meses.

2.2. Métodos analíticos y análisis estadístico

El análisis de la composición volátil se llevó a cabo previa extracción líquido-líquido y posterior cuantificación por cromatografía de gases-masas [8]. El tratamiento estadístico de los datos se realizó a través del análisis de la varianza (ANOVA) y la determinación de las diferencias estadísticas entre medias se realizó aplicando el test LSD (mínima diferencia significativa), y con un nivel de confianza del 95%.

3. Resultados

Los grados alcohólicos probables de las uvas pre-maduras y maduras fueron de 11° y 12,5°, respectivamente. Por ello, la reducción de azúcar en mosto y la desalcoholización se realizaron para conseguir reducir el contenido alcohólico en aproximadamente 1,5°. Así, los vinos espumosos tintos presentaron un contenido alcohólico de $12,0^{\circ} \pm 0,3$, a excepción del vino control (M-C) que presentó $13,5^{\circ} \pm 0,2$.

En general, los vinos obtenidos con uvas pre-maduras presentaron mayores concentraciones of alcoholes C6, principalmente 1-hexanol y cis-3-hexenol (Tabla 1). Estos compuestos son responsables de las notas herbáceas y vegetales que pueden aparecer en los vinos y que tienen un efecto negativo si sobrepasan los umbrales de percepción [9]. Además, estos vinos presentaron los contenidos más altos de acetatos de alcoholes, especialmente los elaborados con maceración pre-fermentativa en frío (PM-HS). Por otro lado, los vinos obtenidos con uvas maduras mostraron mayores concentraciones de los derivados de

vainillina que pueden contribuir al aroma con notas florales y dulces, así como de γ -lactonas, alguna de las cuales puede aportar aromas frutales [10].

Tabla 1. Concentración de los compuestos volátiles ($\mu\text{g/L}$) de los vinos espumosos tintos tras 9 meses de crianza sobre lías en botella.

	PM-C ^a	PM-HS	PM-D	M-C	M-RA	M-D
Butirato de etilo	173 a ^b	191 b	167 a	168 a	189 b	169 a
2-metilbutirato de etilo	10 a	10 a	11 a	13 a	13 a	106 b
Isovalerato de etilo	15 a	15 a	16 a	19 b	22 c	31 d
Hexanoato de etilo	413 bc	398 b	427 c	414 bc	412 bc	360 a
Lactato de etilo*	124 b	140 c	144 c	153 d	130 b	99 a
Octanoato de etilo	269 c	220 b	234 b	234 b	212 b	158 a
Decanoato de etilo	55 d	50 cd	47 c	36 b	51 cd	29 a
Acetato de isoamilo	1075 c	2155 d	1041 c	612 a	891 b	526 a
Acetato de β -feniletilo	235 c	251 d	263 d	112 b	118 b	45 a
Ácido isovalérico	1357 a	1563 b	1544 b	1375 a	1324 a	2050 c
Ácido hexanoico	4068 b	4209 c	4068 b	4509 d	4078 b	3739 a
Ácido octanoico	3634 bc	3468 b	3784 c	3382 ab	3117 a	4427 d
Ácido decanoico	472 c	456 c	439 c	362 b	321 ab	311 a
1-hexanol	1278 c	1306 c	1315 c	877 b	867 b	584 a
Trans-3-hexen-1-ol	76 d	64 c	63 c	49 b	42 a	43 a
Cis-3-hexen-1-ol	372 d	388 e	387 e	51 c	31 b	21 a
Alcohol bencílico	134 a	155 b	155 b	321 e	223 c	256 d
Alcohol de β -feniletilo*	53,7 b	55,9 c	56,9 c	49,9 a	57,5 c	60,2 d
Linalol	4,1 bc	4,9 d	4,4 c	3,7 b	2,9 a	4,4 c
α -terpineol	1,0 a	1,0 a	1,7 c	1,8 c	1,3 b	6,5 d
β -citronelol	3,7 ab	5,2 c	3,6 a	4,1 b	3,8 ab	4,1 b
γ -Butirolactona*	10,5 a	14,1 c	10,7 a	15,1 d	13,4 b	16,7 e
γ -Nonalactona	3,0 b	2,6 a	3,0 b	5,0 d	4,0 c	4,8 d
Vainillato de metilo	1,9 a	1,7 a	1,5 a	13,0 d	11,2 c	8,5 b
Vainillato de etilo	16 ab	14 a	18 b	38 d	26 c	55 e
Acetovainillona	26 ab	25 a	28 b	34 c	34 c	32 c

^a Abreviaturas en Materiales y Métodos; ^b Valores con letras diferentes para cada compuesto indican diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$. * datos en mg/L

No se encontraron diferencias importantes en los vinos elaborados con uvas pre-maduras por efecto de las diferentes técnicas estudiadas. Únicamente, los vinos obtenidos con maceración pre-fermentativa en frío con hielo seco presentaron mayores contenidos de acetatos de alcoholes, linalol y citronelol. En cuanto a los tratamientos realizados con la uva madura, la desalcoholización parcial del vino fue la que dio lugar a mayores diferencias. Los vinos espumosos tintos obtenidos a partir de vino parcialmente desalcoholizado presentaron mayores concentraciones de ésteres etílicos de ácidos grasos ramificados y menores de ésteres etílicos de ácidos grasos lineales, así como de los alcoholes C6. Por otro lado, la reducción de azúcar en los mostos modificó poco la composición volátil de los vinos espumosos finales, observándose una ligera disminución de γ -lactonas y de los derivados de vainillina.

4. Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el grado de madurez de la uva afectó de forma más importante a la composición volátil de los vinos. Las técnicas enológicas aplicadas modificaron estos compuestos en menor grado, por lo que pueden resultar interesantes para conseguir vinos base con un adecuado grado alcohólico. Sin embargo, será necesario estudiar la influencia de estas técnicas en otros compuestos como los fenoles que afectan a la sensación gustativa.

5. Bibliografía

1. Gómez-Míguez, M., González-Miret, M.L., Heredia, F.J. 2007. Evolution of colour and anthocyanin composition of Syrah wines elaborated with pre-fermentative cold maceration. *In: Journal of Food Engineering* 79, 271-278.
2. Álvarez, I., Aleixandre, J.L., García, J., Lizama, V. 2006. Impact of pre-fermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines. *In: Analytica Chimica Acta* 563, 109-115.
3. Zamora, F. 2003. Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos. AMV Editores.
4. García-Martín, N., Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., González-Huerta, C., Mihnea, M., González-Sanjosé, M.L., Palacio, L., Prádanos, P., Hernández A. 2011. Sugar reduction in white and red musts with nanofiltration membranes. *In: Desalination Water Treatment* 27, 167-174.
5. Rodríguez-Bencomo, J.J., Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S., Cano-Mozo, E., González-Huerta, C., Herrera, P. 2008. Desalcoholización de vinos mediante columna de cono rotatorio: características del vino final. *In: Enólogos* 51, 58-62.
6. Belisario-Sanchez, Y.Y., Taboada-Rodríguez, A., Marin-Iniesta, F., López-Gómez, A. 2009. Dealcoholized wines by spinning cone column distillation: phenolic compounds and antioxidant activity measured by the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Method. *In: Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 6770-6778.
7. Salgado, C., Carmona, F.J., Palacio, L., Prádanos, P., Hernández, A. 2012. Evaluation of nanofiltration membranes for sugar reduction in red grape must. *In: Proceedings of Euromembrane 2012, London, UK.*
8. Rodríguez-Bencomo, J.J., Ortega-Heras, M.; Pérez-Magariño, S. 2010. Effect of alternative techniques to ageing on lees and use of non-toasted oak chips in alcoholic fermentation on the aromatic composition of a red wine. *In: European Food Research and Technology* 230, 485-496.
9. Ferreira, V., Fernández, P., Peña, C., Escudero A., Cacho, J.F. 1995. Investigation on the role played by fermentation esters in the aroma of young Spanish wines by multivariate analysis. *In: Journal of the Science of Food and Agriculture* 67, 381-392.
10. Jarauta, I., Ferreira, V., Cacho, J. 2006. Synergic, additive and antagonistic effects between odorants with similar odour properties. *In: Flavour science: recent advances and trends.* Elsevier, Amsterdam, NL, 205-208.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen al INIA la financiación recibida a través del proyecto RTA2012-00092-C02-01 (con fondos FEDER).

TE15 - INFLUENCIA DEL TIPO DE DEPÓSITO EN LA FERMENTACIÓN Y EVOLUCION DE LOS VINOS. COMPOSICIÓN AROMÁTICA

María José García, Victoria Lizama, Inmaculada Alvarez, José Luis Aleixandre-Tudó y José Luis Aleixandre

*Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Universitat Politècnica de València.
Camino de Vera s/n, 46023 Valencia. e-mail: mesparza@tal.upv.es*

RESUMEN:

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la influencia del tipo de depósito (hormigón y acero inoxidable) en la composición final de vinos de Tempranillo y Cabernet Sauvignon, así como la evolución de los compuestos aromáticos de un vino conservado en depósitos de hormigón, depósitos de acero inoxidable y barricas de roble francés, tanto nuevas como usadas un máximo de tres años, para poder establecer en que recipientes es aconsejable realizar la conservación de los vinos para obtener la máxima calidad aromática.

Los resultados muestran que los vinos fermentados en acero inoxidable son más aromáticos que los fermentados en hormigón. Los vinos conservados en diferentes recipientes, muestran cambios en su composición aromática, aumentando la concentración de los alcoholes debido a la hidrólisis de sus acetatos. También es importante el aumento de los ésteres (excepto decanoato de etilo) ya que estos compuestos son los responsables de los aromas afrutados de los vinos.

La crianza de los vinos en barrica de roble da lugar a la aparición de los aromas terciarios, incrementando significativamente la presencia de los fenoles volátiles, vainillina, β -metil- γ -octolactona y 5- metilfurfural, compuestos que contribuyen a la mayor intensidad y calidad aromática de los vinos.

1. Introducción

El aroma del vino es el resultado de complejos equilibrios entre los distintos componentes volátiles. La calidad del vino se basa en la complejidad de su composición y en el gran número de sustancias que intervienen en su caracterización organoléptica, particularmente las responsables del aroma. Muchas de estas sustancias se encuentran presentes en la uva, otras se forman durante la fermentación, otras se producen durante el envejecimiento, pero todas van evolucionando en el vino durante este periodo.

La técnica de elaboración y conservación de vinos influye en las características aromáticas, siendo un factor importante de incidencia directa en los aromas del vino [1]. Durante la conservación de los vinos se forman aromas terciarios por reacciones ácido catalizadas y por la hidrólisis de los terpenos. Además, la barrica de madera modifica la composición aromática produciendo extracción de muchos compuestos volátiles de la misma madera, como β -metil- γ -octolactona que contribuye a aromas a madera, coco, etc. [2]., Durante la conservación en acero inoxidable también puede producirse una cierta microoxigenación que favorece las reacciones de hidrólisis, por lo tanto formación de otros aromas terciarios [3]. .

En este trabajo, se plantea el estudio de la evolución de la composición polifenólica y aromática de un vino tinto elaborado con la variedad Tempranillo, perteneciente a la Denominación de Origen Utiel-Requena, después de haber sido sometido a diferentes tipos de conservación y crianza en depósitos de acero inoxidable, depósitos de hormigón, y barricas de roble francés.

El objetivo principal del estudio es establecer el sistema de conservación más adecuado que permita mejorar la composición y la estabilidad de los compuestos aromáticos del vino, así como sus características organolépticas, para conseguir la calidad óptima de estos vinos.

2. Material y métodos

Para elaborar el vino base de estas experiencias se procesó uva tinta de la variedad Tempranillo en la Bodega Chozas Carrascal, de la Denominación de Origen Utiel-Requena. Para el trabajo experimental se han utilizado 3 depósitos de acero inoxidable, 3 de hormigón y cuatro barricas de tonelería diferente: Bel Air, Ermitage, Adour e Intona.

Los depósitos de hormigón utilizados en este estudio tienen una capacidad cúbica que permite un sombrero fino, con mejor extracción de polifenoles durante los remontados y paredes gruesas que permiten mantener mejor la temperatura de su interior por lo que clarifican mejor y quedan más estables. En estos depósitos existe una ligera microoxigenación; lo que permite la polimerización y su consiguiente suavidad en los vinos.

Por el contrario, en los depósitos de acero inoxidable no se produce microoxigenación en los vinos, en este tipo de depósitos los vinos evolucionan menos que en los depósitos de hormigón, lo cual puede ser una buena característica si se quieren vinos con menor evolución sobretodo en aroma y color.

Respecto a barricas, los cuatro tipos son de roble francés, con 225 litros de capacidad, tostado medio. Las barricas Bel Air están fabricadas en Burdeos y la madera procede de una mezcla de tres zonas de Allier; esta barrica es la más ligera con respecto a las otras tres. Las barricas Adour fueron fabricadas en Plaisance de Gers, la madera procede únicamente de bosques de Allier y es la barrica más pesada de las cuatro. Las barricas Ermitage, son barricas que pertenecen al grupo Charlois, siendo Ermitage una de las marcas que trabaja en barricas, la tonelería se encuentra en La Charite-sur-Loire y la madera es una mezcla de los bosques de Bertranges y Tronçais. Por último, las barricas Intona, son de una tonelería española, al contrario que las otras tres ya que pertenecen a tonelerías francesas, esta tonelería está situada en Monteagudo, Navarra. La madera de este tipo de barricas procede de los bosques de Allier.

Para la determinación de los compuestos aromáticos de los vinos se ha utilizado la técnica de la cromatografía de gases. El método de extracción utilizado es el que propone Dolores Herranz [4] y que se basa en el propuesto por Cocito y col., presentando ciertas modificaciones realizadas por la autora mencionada con el objeto de optimizar la técnica.

El tratamiento estadístico de los valores obtenidos en las determinaciones analíticas realizadas en los vinos producto de las distintas experiencias, se ha llevado a cabo con el programa informático *STATGRAPHICS Plus 5.1 for Windows*. Se ha realizado análisis de la varianza (ANOVA) para establecer la influencia de las distintas prácticas tecnológicas ensayadas sobre los parámetros aromáticos analizados en los vinos.

El análisis estadístico empleado es de tipo LCD con niveles de significancia del 99% ($p < 0,01$) y del 95% ($p < 0,05$). Al comparar los resultados se indican con una misma letra los valores que no son significativamente diferentes y, con una letra distinta en caso contrario.

3. Resultados

Para realizar el estudio comparativo de los compuestos aromáticos en los vinos tintos sometidos a una estancia en depósitos de acero inoxidable, hormigón y en barricas de roble francés de diferentes tonelerías y con un grado de tostado medio, se han identificado 18 compuestos volátiles, entre ellos alcoholes, ésteres, fenoles volátiles y ácidos.

Tabla 1. Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles (mg/L) en los vinos conservados en depósitos de acero inoxidable, hormigón y barricas en mayo.

MAYO						
COMPUESTOS	INOXIDABLE	HORMIGÓN	BEL AIR	ERMITAGE	ADOUR	INTONA
4-etilguaicol	2,62±0,87 a	2,11±0,21 a	2,08±0,85 a	2,09±1,07 a	2,32±0,28 a	2,63±0,87 a
1-propanol	7,98±0,87 ab	9,72±1,67 ab	6,94±0,65 a	8,02±0,48 ab	8,08±0,68 b	9,35±2,22 ab
2-feniletanol	14,71±1,56 a	32,37±0,83 bc	32,28±0,86 bc	27,09±5,05 b	33,58±0,99 c	31,70±1,1 bc
β-pinen	0,19±0,02 a	0,14±0,02 bc	0,19±0,03 a	0,17±0,01 b	0,19±0,03 c	0,20±0,01 bc
α-pinen	4,15±0,02 a	4,85±0,07 b	2,34±0,01 a	4,01±0,08 ab	2,95±0,01 b	1,25±0,01 b
2-butanol	5,04±0,50 a	5,99±1,25 a	5,99±0,83 a	5,99±0,32 a	5,99±0,99 a	5,99±2,90 a
Cis 3 hexeno	1,39±0,43 a	1,49±0,16 a	1,29±0,06 a	1,91±0,89 a	1,38±0,11 a	1,33±0,01 a
Acetato de isoamilo	4,70±0,34 a	4,32±0,33 b	4,10±0,42 b	4,86±0,84 b	4,64±0,49 b	5,23±0,02 b
Decanoato de etilo	0,35±0,01 a	0,32±0,01 b	0,36±0,09 b	0,33±0,02 b	0,26±0,03 ab	0,35±0,01 c
Dietil succinato	2,49±0,28 a	5,04±1,11 b	4,52±1,20 b	5,42±0,07 b	4,78±0,01 b	5,21±0,10 b
Etil hexenoato	3,80±2,40 a	4,52±0,33 a	3,92±0,47 a	3,10±0,97 a	3,70±0,23 a	4,83±0,43 a
Lactato de etilo	18,30±0,76 a	19,41±2,98 b	14,98±0,58 b	19,43±1,38 b	16,86±0,72 b	18,28±0,56 b
Ácido decanoico	3,23±0,42 b	2,84±0,17 ab	1,74±0,84 a	2,65±0,27 ab	3,69±0,52 b	3,23±0,26 b
Vainillina	nd	nd	nd	nd	nd	nd
β-metil-γ-octolactona	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Linalol	0,10±0,01 a	0,10±0,01 b	0,16±0,01 ab	0,10±0,01 bc	0,10±0,01 c	0,09±0,01 bc
Diacetal	2,59±0,55 a	3,89±0,14 b	4,02±0,15 b	4,17±0,06 b	4,01±0,16 b	4,27±0,05 b
Eugenol	nd	nd	1,04±0,31 a	2,19±0,39 a	4,61±0,50 a	2,20±0,35 a

Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas al 95%. nd: no detectado

Tabla 2. Valores medios, desviación estándar y ANOVA de los compuestos volátiles (mg/L) en los vinos conservados en depósitos de acero inoxidable, hormigón y barricas en agosto.

AGOSTO						
COMPUESTOS	INOXIDABLE	HORMIGÓN	BEL AIR	ERMITAGE	ADOUR	INTONA
4-etilguaicol	3,93±0,53 ab	5,24±1,49 b	3,42±0,05 a	4,01±0,59 ab	3,41±0,18 a	3,35±0,35 a
1-propanol	10,50±1,77 a	11,40±1,97 a	10,04±0,04 a	11,57±0,61 a	9,86±0,43 a	9,88±1,35 a
2-feniletanol	46,05±4,99 a	46,30±0,40 a	46,45±1,37 a	54,34±3,19 b	46,01±2,24 a	45,44±0,03 a
β-pinen	0,32±0,05 a	0,31±0,01 a	0,31±0,01 a	0,38±0,03 a	0,31±0,01 a	0,31±0,01 a
α-pinen	6,75±0,01 ab	7,39±0,01 a	6,48±0,01 a	7,61±0,02 ab	7,21±0,07 a	5,71±0,01 a
2-butanol	5,16±0,14 a	4,18±0,07 a	4,15±0,23 a	4,69±0,96 a	4,40±0,25 a	4,85±0,87 a
Cis 3 hexeno	2,20±0,11 a	3,25±0,44 ab	3,08±1,13 ab	3,74±0,37 b	3,12±0,62 ab	3,32±0,20 ab
Acetato de isoamilo	8,80±0,28 a	8,03±1,03 a	8,68±0,96 a	8,38±0,45 a	9,48±0,58 a	8,33±0,01 a
Decanoato de etilo	0,81±0,13 a	0,87±0,04 ab	0,90±0,02 ab	1,02±0,03 b	0,78±0,02 a	0,99±0,01 b
Dietil succinato	18,08±1,61 a	18,54±0,50 a	17,80±0,05 a	20,95±0,52 b	18,34±1,10 a	17,40±0,24 a
Etil hexenoato	5,39±0,25 b	4,92±0,26 a	4,81±0,07 a	5,56±0,33 a	5,41±0,06 a	4,48±0,04 a
Lactato de etilo	40,22±8,03 a	44,40±0,12 a	38,43±0,23 a	46,70±1,3 a	36,70±1,0 a	34,52±4,2 a
Ácido decanoico	2,99±1,22 b	1,42±0,52 ab	1,94±0,08 ab	1,30±0,14 a	1,57±0,52 ab	2,57±0,58 ab
Vainillina	nd	nd	0,09±0,01 a	0,26±0,38 a	0,11±0,01 a	0,24±0,01 a
β-metil-γ-octolactona	nd	nd	0,31±0,01 a	0,32±0,01 a	0,36±0,01 b	0,26±0,01 c

Linalol	0,47±0,07 a	0,49±0,01 a	0,44±0,01 a	0,52±0,02 a	0,42±0,05 a	0,46±0,04 a
Diacetal	62,87±3,72 b	71,43±3,16 ab	48,87±0,24 a	94,78±3,28 c	63,28±2,36 b	74,2±3,89 b
Eugenol	nd	nd	7,07±0,77 a	5,38±2,16 a	8,99±0,45 a	8,01±0,04 a

Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas al 95%. nd: no detectado

Como se aprecia en las tablas 1 y 2, hay un efecto significativo del tipo de depósito utilizado para la conservación de los vinos a lo largo del tiempo sobre la concentración de la mayoría de los compuestos volátiles analizados. Esto es debido a que la estancia en bodega y depósito de hormigón da lugar a importantes modificaciones en la composición del vino debido principalmente a la difusión del oxígeno. Los cambios se producen por diversas razones: cesión de componentes por la madera de roble y diversas reacciones químicas como esterificación, hidrólisis, oxidación, acetilación. [5]. [6]. [7].

4. Conclusiones

Los resultados muestran que el tipo de depósito (acero inoxidable, hormigón o bodega) utilizado en la conservación del vino, influye significativamente en la concentración de la mayoría de los compuestos volátiles analizados, y esto es debido al diferente aporte de oxígeno en cada recipiente y al aporte de compuestos cedidos por el material utilizado como es el caso de las bodegas. Durante la conservación del vino se produce un aumento de alcoholes, ésteres, fenoles volátiles y aldehídos furánicos. El tipo de bodega utilizado afecta significativamente al contenido en los vinos de alfa pinen, cis 3 hexenol, decanoato de etilo, dietil succinato, ácido decanoico, β -metil- γ -octolactona, y diacetal. Los vinos conservados en bodega Ermitage presentan mayor concentración de β -metil- γ -octolactona y vainillina, ambos son compuestos aportados por la bodega y que por tanto caracterizan a los vinos de crianza.

5. Bibliografía

1. Pozo-Bayón, M., 2011. Descifrando las claves químicas que explican el aroma del vino. ACE: Enología.nº 127. Dirección URL: <<http://www.acenologia.com>>.
2. Glories, Y., 1991. Phénomènes oxydatifs liés a la conservation sous bois. *Journal International Sciences de la Vigne et du Vin: le bois et la qualité des vins eaux-devie* (special issue), 93-104
3. Rapp, A. y Mandery, H., 1986. Wine aroma. *Experientia*. 42: 873-884.
4. Herranz, M. D. 1999. Características de calidad de vinos blancos jóvenes varietales de zalema. Tesis doctoral. Facultad de farmacia. Sevilla
5. Ortega-Heras, M.; González-Sanjosé, M.L.; González-Huerta, C., 2007. Consideration of the influence of aging process, type of wine and oenological classic parameters on the levels of wood volatile compounds present in red wines. *Food Chemistry*, 103, 1434–1448.
6. Pérez-Prieto, L.; 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.
7. Garde Cerdán, T.; Rodríguez, S.; Ancin, C., 2001-2002. Volatile composition of aged wine in used barrels of French oak and American oak. *Food research international* 35 , 603-610.

6. Agradecimientos

Los autores del agradecen a la Bodega Chozas Carrascal el suministro de los vinos utilizados en el estudio.

TE16 - EFECTO DEL TIPO DE DEPÓSITO SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LOS PARÁMETROS POLIFENÓLICOS DE VINO TINTO

Lizama, V., Álvarez, I., Peidró, M.J., García M.J., Aleixandre, J.L.; Aleixandre-Tudó, J.L.

Universitat Politècnica de Valencia, Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo
(Avda. Fausto Elio s/n, 46022, Valencia)

vlizama@tal.upv.es

RESUMEN:

El consumidor actual, busca vinos tintos con mucho color y estructura, pero que no sean demasiado amargos ni astringentes. Para favorecer la polimerización de taninos, sin que se produzca una pérdida de color, se han propuesto diversos métodos, como son la microoxigenación empleo de barricas, etc.

En el presente trabajo se establece la diferencia en la evolución de los vinos conservados en depósito de acero, de cemento no revestido y en barrica. Los depósitos de acero inoxidable y los de cemento no revestido se emplearon para fermentación y almacenamiento, por lo que la microoxigenación, producida en estos últimos, será decisiva para la polimerización de polifenoles desde la fermentación.

Otro aspecto incluido en este trabajo es estudiar si hay diferencias en el momento en que se realice la microoxigenación, es decir durante la fermentación y conservación o bien posteriormente en la barrica.

1. Introducción

La realización de la vinificación en diversos materiales condiciona al comportamiento de los compuestos polifenólicos de los vinos. La incorporación de oxígeno a través de los materiales constitutivos de los depósitos contribuye a la estabilización de los polifenoles. Las medidas de oxígeno disuelto en el vino en diferentes tipos de depósito de vinificación han puesto de manifiesto que en los depósitos de acero inoxidable la concentración de oxígeno disuelto es menor a la observada en los vinos conservados en depósitos de hormigón y de madera.

El acero inoxidable, por sus características de inercia y estanqueidad, no influye determinantemente en la evolución de la composición de los vinos. Los depósitos de cemento impermeabilizados con resinas epoxi tienen un comportamiento similar al acero inoxidable, aunque es de destacar en ellos su inercia térmica [1 y 2], pero si estos depósitos no se inertizan pueden dar lugar a una cierta microoxigenación que contribuya a la estabilización de los compuestos polifenólicos.

La madera aporta al vino compuestos aromáticos y taninos, y debido a la microoxigenación que tiene lugar a través de sus poros, da lugar a la estabilización de los polifenoles, tanto durante el proceso de crianza, como durante la fermentación y conservación, en mayor medida cuanto menor sea la relación superficie/volumen. Las barricas de roble se utilizan para el envejecimiento de vinos y bebidas alcohólicas debido a sus efectos positivos, como el aumento de la estabilidad del color, la clarificación espontánea, la disminución de la astringencia. Los cambios de color que se producen durante el envejecimiento de los vinos pueden ser debidos a la creación de nuevos pigmentos, como

piroantocianos [3] y a la condensación entre antocianos y flavonoles, bien directa o mediada por acetaldehído.

Es importante destacar el papel de los elagitaninos en la evolución del color de los vinos. Estos compuestos fenólicos extraídos de la madera mejoran la estabilidad del color y reducen la astringencia del vino al favorecer las reacciones de condensación antociano-tanino, y taninos entre sí, con polisacáridos, etc. [4], mientras que limita los procesos de degradación de los compuestos fenólicos [5]. Las características fisicoquímicas de la vino (pH , alcohol, acidez titulable, acidez volátil y SO₂) son muy importantes durante el envejecimiento, ya que algunos compuestos fenólicos , tales como elagitaninos , se extraen más o menos de la madera en función de las características del vino [6].

En un vino joven, el color depende básicamente de su composición en antocianos libres y de los posibles copigmentos. Más adelante, cuando el vino envejece, los antocianos libres desaparecen del vino a lo largo del tiempo debido a su oxidación, o a su combinación directa con los flavanoles o mediada por el etanal. Las reacciones de los polifenoles y su degradación hacen que los compuestos fenólicos de los vinos tintos se modifiquen continuamente y se transformen en otras especies moleculares más estables, ocasionando pérdidas de color y astringencia.

2. Material y métodos

El plan experimental comprende la elaboración y estudio del comportamiento de dos variedades de uva Tempranillo y Cabernet Sauvignon, fermentadas en hormigón y acero inoxidable; así como el estudio de la evolución de un vino obtenido por coupage de los anteriores, y conservado en depósitos de acero inoxidable y hormigón, y en barricas de roble francés.

Las uvas de la variedad Tempranillo y Cabernet Sauvignon fueron vendimiadas mecánicamente, desgranadas para separar los granos, raspones, etc., con suavidad, sulfitadas y posteriormente introducidas en depósitos de acero inoxidable y de hormigón. Cada variedad fermenta de forma individual en los dos tipos de depósitos, realizándose las experiencias por triplicado. Una vez separado el vino de los orujos se volvieron a llevar a los depósitos de acero inoxidable y hormigón para la realización de la fermentación maloláctica.

Posteriormente se realizó toda la analítica en los diferentes depósitos a los seis meses, IC, IPT, concentración de antocianos, taninos condensados, Índice de PVPP, Índice de ionización, Índice de Gelatina, grado medio de polimerización de los taninos [7]. Se realizó el seguimiento de la evolución de los vinos durante 6 meses. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3. Resultados

Como se puede observar, en los resultados obtenido en la Tabal 1, se produce una importante disminución del color de los vinos durante los meses de conservación, siendo más acusada esta disminución en los vinos conservados en depósitos de acero inoxidable y hormigón. El mayor color observado en los vinos conservados en barricas puede ser debido a que se mantengan los antocianos en forma coloreada debido a las reacciones mediadas por el oxígeno que tienen lugar por incorporación de éste a través de los poros de las barricas, pero también al aporte de taninos elágicos por parte de la madera, que influyen sobre la evolución del color ya que tienen un efecto protector de la oxidación sobre los antocianos que contribuyen al color [8].

Por otra parte, los antocianos decolorables están formados mayoritariamente por antocianos libres no protegidos por otras moléculas, que por tanto son más reactivos y más fáciles de oxidar y decolorar (Vivas et al., 1995). El mayor descenso se observa en los vinos conservados en barricas, no encontrándose diferencias significativas entre los vinos conservados en acero inoxidable y hormigón.

El porcentaje de antocianos combinados con los taninos, valorados por el Índice de PVPP, se incrementa durante la conservación de forma paralela a la desaparición de los antocianos libres o decolorables, y estas nuevas estructuras contribuyen a la estabilidad del color de los vinos [9]. Las barricas de madera, y en menor medida el hormigón, permiten esta microoxigenación que trae como consecuencia una mayor estabilidad de los taninos [10].

Tabla 1. Valores medios obtenidos, desviación estándar y ANOVA de las determinaciones realizadas del vino inicial y después de 6 meses de conservación en los distintos recipientes.

DETERMINACIÓN QUÍMICA	VINO INICIAL	CONSERVACIÓN DURANTE 6 MESES			F-ratio	P-value
		INOXIDABLE	HORMIGON	BARRICA NUEVA		
INTENSIDAD COLORANTE	15,01 ± 0,05	13,07 ± 0,32 a	13,21 ± 0,11 b	14,74 ± 0,34 c	455,09	0,000
IPT	67,34 ± 0,47	63,47 ± 0,20 a	62,67 ± 0,57 a	65,36 ± 0,91 b	23,39	0,000
ANTOCIANOS DECOLORABLES (mg/L)	680,79 ± 2,06	482,94 ± 3,59 b	499,19 ± 6,67 b	470,90 ± 5,48 a	21,24	0,000
I. PVPP (%)	30,51 ± 2,09	63,78 ± 3,53	61,77 ± 3,88	60,63 ± 3,41	3,36	0,080
TANINOS CONDENSADOS (mg/L)	2,99 ± 0,16	2,54 ± 0,07 a	2,77 ± 0,21 b	3,10 ± 0,09 c	3,59	0,032
mDP	5,40 ± 0,05	5,65 ± 0,00	5,35 ± 0,00	5,50 ± 0,01	3,58	0,049
% GALOILACIÓN	5,17 ± 0,13	4,79 ± 0,00 a	4,83 ± 0,00 a	5,06 ± 0,05 b	11,11	0,0028
PESO MOLECULAR TANINOS	1611,93 ± 14,76	1683,07 ± 165	1594,80 ± 124	1640,30 ± 198	3,59	0,049
I. GELATINA (%)	61,55 ± 1,14	41,35 ± 6,56 a	45,17 ± 5,30 a	50,55 ± 2,82 b	3,96	0,023

*Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas

Así pues, la microoxigenación provocada en el depósito de cemento, debería provocar un mayor aumento del mDP que en los vinos conservados en acero inoxidable; dicho efecto no se obtiene, pero hay que tener en cuenta que no existen diferencias significativas entre acero inoxidable y hormigón. El porcentaje de galoilación, tiene que ver con la polimerización de los taninos y sobre todo con la astringencia. Un porcentaje de galoilación cercano al 5%, anticipa que la uva no estaba perfectamente madura en cuanto a su madurez polifenólica, pudiendo haber habido cesión de taninos de pepitas a los vinos. Estos resultados corroboran los obtenidos en la determinación del Índice de Polifenoles Totales, en el que se observa que los vinos en barrica contienen mayor concentración de polifenoles, y en el Índice de gelatina, que pone de manifiesto como los vinos criados en las barricas nuevas presentan una mayor astringencia, debido probablemente a la cesión de elagitaninos a los vinos [11]. El mayor aporte de taninos elágicos por parte de las barricas nuevas trae como consecuencia una mayor astringencia, ocasionada por la reactividad con las proteínas de la saliva de los taninos elágicos. El hecho de que sean los vinos conservados en barrica nueva los de mayor grado de polimerización de sus taninos entre sí y con polisacáridos, no es suficiente para compensar la gran astringencia que aportan los taninos elágicos [8]. A medida que los vinos van envejeciendo, los taninos elágicos van disminuyendo al intervenir en reacciones de oxidación, precipitación, etc., que traen como consecuencia una disminución de la astringencia y un mayor equilibrio organoléptico [12].

4. Conclusiones

Durante la conservación, la Intensidad Colorante disminuye en todos los vinos, siendo más acusada esta disminución en los vinos conservados en depósitos de acero inoxidable y hormigón comparativamente con aquellos conservados en barricas.

La concentración de taninos condensados se va incrementando durante la conservación a medida que desciende la de catequinas, en mayor medida en los vinos conservados en barricas. La conservación del vino en bodega favorece el incremento del grado de polimerización de taninos, tal y como muestran los resultados de la floroglucínólisis. Sin embargo la conservación en hormigón, no contribuye de la misma manera a la polimerización de los taninos.

5. Bibliografía

1. Chabas, J., Vannobel, C. 1982. Les progres constatés dans la technologie des équipements des caves vinicoles. *In: Documentación Cemagref*
2. Cemagref. 1994. Recommandations applicables à la construction tome 1 et a la rénovation tome II des cuves á vin en béton armé. *In: Groupe de travail DDAF hérault et Vaucluse, Cemagref Aix-en-Provence*
3. Rentzsch, M., M. Schwarz, P. Winterhalter. 2007. Pyranoantho-cyanins-an overview on structures, occurrence, pathways of formation. *In: Trends Food Sci. Technol.* 18:526-534.
4. Chassaing, S., et al. 2010. Phytochemical studies of new anthocyano-ellagitannin hybrid pigment: About the origin of the influence of oak c-glycosidic ellagitannins on wine color. *In: Eur. J. Org. Chem.* 1:55-63.
5. Jordão, A.M., J.M. Ricardo-da-Silva, O. Laureano, W. Mullen, A. Crozier. 2008. Effect of ellagitannins, ellagic acid and volatile compounds from oak wood on the +catechin, procyanidin B1 and malvidin-3-glucoside content of model wines. *In: Aust. J. Grape Wine Res.* 14: 260-270.
6. Jordão, A.M., J.M. Ricardo-da-Silva, and O. Laureano. 2005. Extraction and evolution of some ellagic tannins and ellagic acid of oak wood chips *Quercus pyrenaica* in model solution. Effect of time, pH, temperature and alcoholic content. *In: S. Afr. J. Enol. Vitic.* 26:25-31
7. Kennedy, J., Jones, P. 2001. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *In: J. Agric. Food Chem.*, 49: 1740- 1746.
8. Fernández de Simón, B., Cadahía, E, Hernández, T., Estrella, I. 2006. Evolution of oak related volatile compounds in a Spanish red wine during 2 years bottled, after ageing in barrels made of Spanish, French and American oak wood. *In: Analytica Chimica Acta.* 563, 198-203
9. Vivas, N. 1995. Fenómenos ligados a la maduración de la madera de roble durante su secado. *In: "X Cursos Rioja" ed. Ayuntamiento de Haro,* pp 97-109.
10. Sartini, E., Arfelli G., Fabiani A., Piva A. 2007. Influence of chips, lees and micro-oxygenation during aging on the phenolic composition of a red Sangiovese wine *In: Food Chemistry* 104, 1599–1604.
11. Vivas, N., Glories, Y. 1996. Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging. *In: American journal of enology and viticulture.* 47 (1) p.103-107.
12. Cano-López, M., Pardo, F., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. 2006. Effect of micro-oxygenation on anthocyanin and derived pigment content and chromatic characteristics of red wines. *In: American Journal of Enology and Viticulture,* 57, 325–331.

TE17 - INNOVACIONES TECNOLÓGICAS EN LA ELABORACIÓN DE LOS VINOS VERDEJO DE CASTILLA-LA MANCHA

Eva Sánchez-Palomo¹, Rodrigo Alonso Villegas¹, Miguel Ángel González Viñas¹

¹ Universidad de Castilla-La Mancha, Dpto. Química Analítica y Tecnología de Alimentos, Avda. Camilo José Cela, 10, 13071, Ciudad-Real, España)
Eva.Sanchez@uclm.es

RESUMEN:

Se ha estudiado el efecto del contacto con la madera de roble en forma de virutas, en las diferentes etapas del proceso de vinificación, en la composición volátil y las características sensoriales de los vinos de la variedad Verdejo. Los compuestos del aroma fueron analizados mediante CG-EM previo aislamiento mediante SPE. El perfil sensorial de los vinos objeto de estudio fue evaluado por un panel de catadores expertos. Las virutas de roble fueron adicionadas durante la fermentación alcohólica y en el vino joven. Los vinos fermentados con virutas de roble durante la fermentación alcohólica presentaron las mayores concentraciones de ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena corta y larga, de alcoholes superiores, compuestos bencénicos, lactonas de roble y compuestos furánicos. El perfil sensorial de los vinos se vio modificado en función del punto de adición de las virutas de roble.

Palabras clave: Verdejo; Virutas de roble; Proceso de vinificación; Compuestos Volátiles; Perfil Sensorial

1. Introducción

En la actualidad el uso de la barrica de roble en la crianza de los vinos se ha convertido en una técnica de alta calidad para la maduración de los vinos, pero no es la única, aunque sí seguramente la más cara. En los últimos años se ha popularizado la adición al vino en diferentes momentos del proceso de vinificación de trozos de madera de roble de diferentes tamaños (polvo, virutas, trozos de duelas,...) que contribuyen a cambiar organolépticamente al vino.

El presente trabajo de investigación como principal objetivo estudiar el efecto que la adición de las virutas de roble tener en diferentes etapas del proceso de vinificación podía tener en la composición volátil y en el perfil sensorial de los vinos blancos jóvenes de la variedad Verdejo cultivada en la región de Castilla-La Mancha.

2. Material y métodos

Para la elaboración de los vinos se utilizaron uvas de la variedad Verdejo cultivadas en la región de Castilla-La Mancha, recogidas en su punto óptimo de madurez y en perfecto estado sanitario. Los vinos se elaboraron a escala de laboratorio. El vino control se elaboró siguiendo el esquema de elaboración tradicional en blanco. El resto de vinos se elaboraron con la adición de virutas de roble en una concentración de 6g/L en diferentes puntos del proceso

de vinificación durante la fermentación alcohólica (FA) y terminado el proceso de vinificación (DF). Todas las fermentaciones se realizaron por duplicado. El inóculo utilizado fue la levadura seleccionada *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* C.E.C.T. nº 10835. Terminada la fermentación alcohólica los vinos fueron trasegados, filtrados, embotellados y almacenados en condiciones controladas de luz, humedad y temperatura.

La extracción de los compuestos volátiles de los vinos se realizó según el método propuesto por Sanchez-Palomo y col. en el año 2006 (1), utilizando cartuchos de polipropileno-divinilbenceno de 0.5g de fase sólida y 4-nonanol como patrón interno.

El análisis sensorial fue realizado por un panel formado por diez catadores expertos en análisis sensorial de vinos utilizando los atributos que previamente habían sido seleccionados por consenso como los que mejor describían las características de los vinos. Para la cuantificación de los diferentes atributos se utilizaron escalas no estructuradas de 10 cm y algunas sustancias de referencia. Todos los vinos se evaluaron por duplicado en una sala de cata normalizada (2) y utilizando copas normalizadas (3) cubiertas con un vidrio de reloj para evitar las pérdidas.

3. Resultados

En las Figuras 1 y 2 se muestran respectivamente las concentraciones medias de los principales grupos de compuestos del aroma varietal, de los principales compuestos extraídos de la madera y del aroma fermentativo de los vinos Verdejo objeto de este estudio. Estos resultados ponen de manifiesto que los vinos elaborados con adición de virutas de roble durante la fermentación alcohólica presentaron mayores concentraciones de esteres etílicos de ácidos grasos de cadena larga y de etil, hexil e isoamil acetatos. Además estos vinos presentaron también las mayores concentraciones de compuestos bencénicos, las lactonas de roble y los compuestos furánicos seguidos de los vinos en contacto con las virutas una vez finalizados.

El perfil sensorial de los vinos fue evaluado por un panel de catadores expertos con amplia experiencia en Análisis Sensorial de vinos. La Figura 3 muestra las puntuaciones medias otorgadas por los catadores a los principales atributos evaluados en el perfil olfativo de los vinos objeto de estudio.

El perfil sensorial de los vinos Verdejo de Castilla-La Mancha elaborados siguiendo el esquema tradicional de vinificación en blanco se caracterizó por elevadas intensidades de olor a fresco, manzana verde, afrutado, fruta tropical y cítricos con ciertas notas dulces. La adición de virutas de roble durante las diferentes etapas del proceso de vinificación modificó el perfil sensorial de los vinos. Así, los vinos elaborados en contacto con virutas de roble durante la fermentación alcohólica presentaron menores intensidades de los principales atributos del perfil sensorial de los vinos control incrementándose las intensidades de aroma a fruta madura y dulzón y apareciendo nuevos atributos como coco, especias dulces, tostado y madera relacionados principalmente con los compuestos cedidos por la madera al vino. Por último los vinos elaborados en contacto con madera tras la fermentación alcohólica presentaron características sensoriales intermedias entre los otros dos vinos objeto de estudio presentando el perfil base de los vinos control aunque con intensidades ligeramente inferiores y las notas de los vinos en contacto con madera durante la fermentación alcohólica más atenuadas.

4. Conclusiones

Mediante este estudio ha sido puesto de manifiesto que el punto de adición de las virutas de roble durante el proceso de vinificación tiene un claro efecto en la composición volátil y en el perfil sensorial de los vinos Verdejo de Castilla-La Mancha. La extracción de los compuestos procedentes de las virutas de roble se incrementa en el caso de los vinos en contacto con virutas de roble durante la fermentación alcohólica.

Los resultados obtenidos van a permitir a la industria vinícola ejercer un mayor control en el uso de las virutas de roble en las diferentes etapas del proceso de vinificación. El punto de adición de las virutas de roble debería ser recomendado de acuerdo con el perfil sensorial deseado en el vino.

5. Bibliografía

1. Sánchez-Palomo, E.; Pérez-Coello, M. S.; Díaz-Maroto, M. C.; González Viñas, M. A.; Cabezudo, M. D. 2006. Contribution of free and glycosidically-bound volatile compounds to the aroma of muscat "a petit grains" wines and effect of skin contact. In: Food Chemistry, 95, 279-289.
2. UNE-EN ISO 8589 (2010). Análisis Sensorial. Guía General para el diseño de salas de cata.
3. UNE 87022 (1992). Análisis sensorial. Utensilios. Copa para la degustación de vino.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen a la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha la financiación económica a cargo del proyecto PEII-2014-011-A

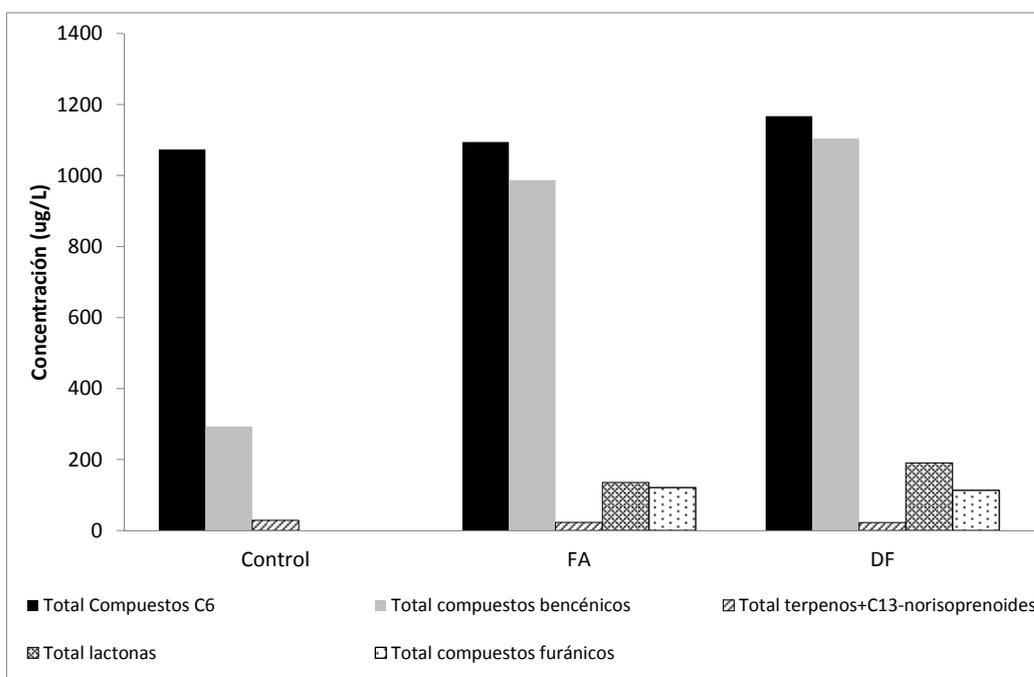


Figura 1. Concentraciones medias (ug/L) de los principales grupos de compuestos volátiles varietales y extraídos de la madera de los vinos objeto de estudio

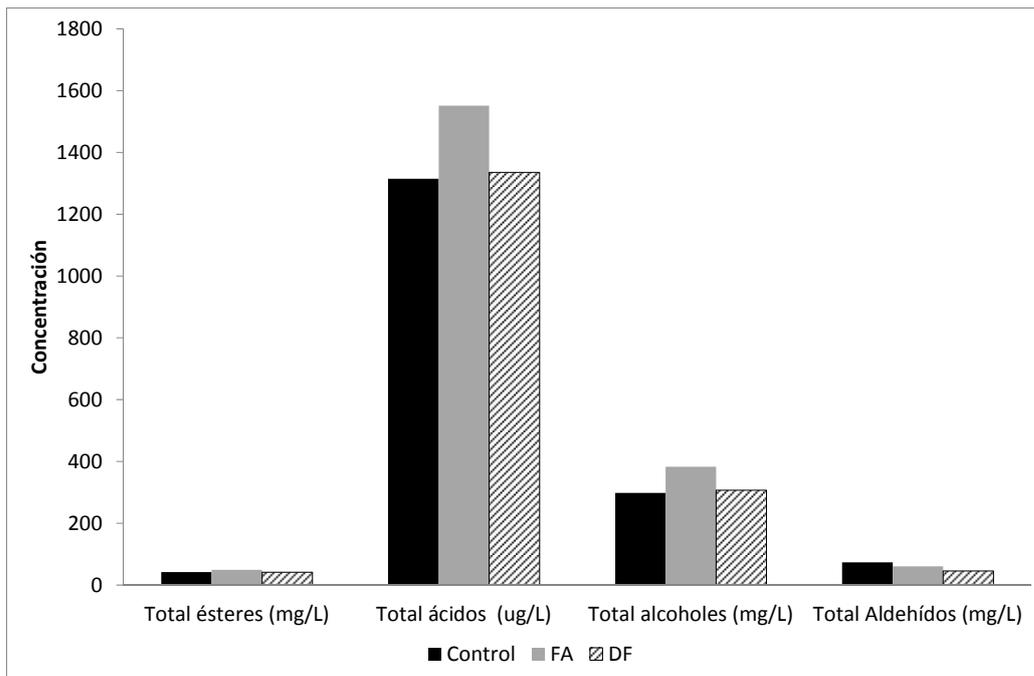


Figura 2. Concentraciones medias de los principales grupos de compuestos formados durante la fermentación alcohólica del perfil del aroma de los vinos objeto de estudio

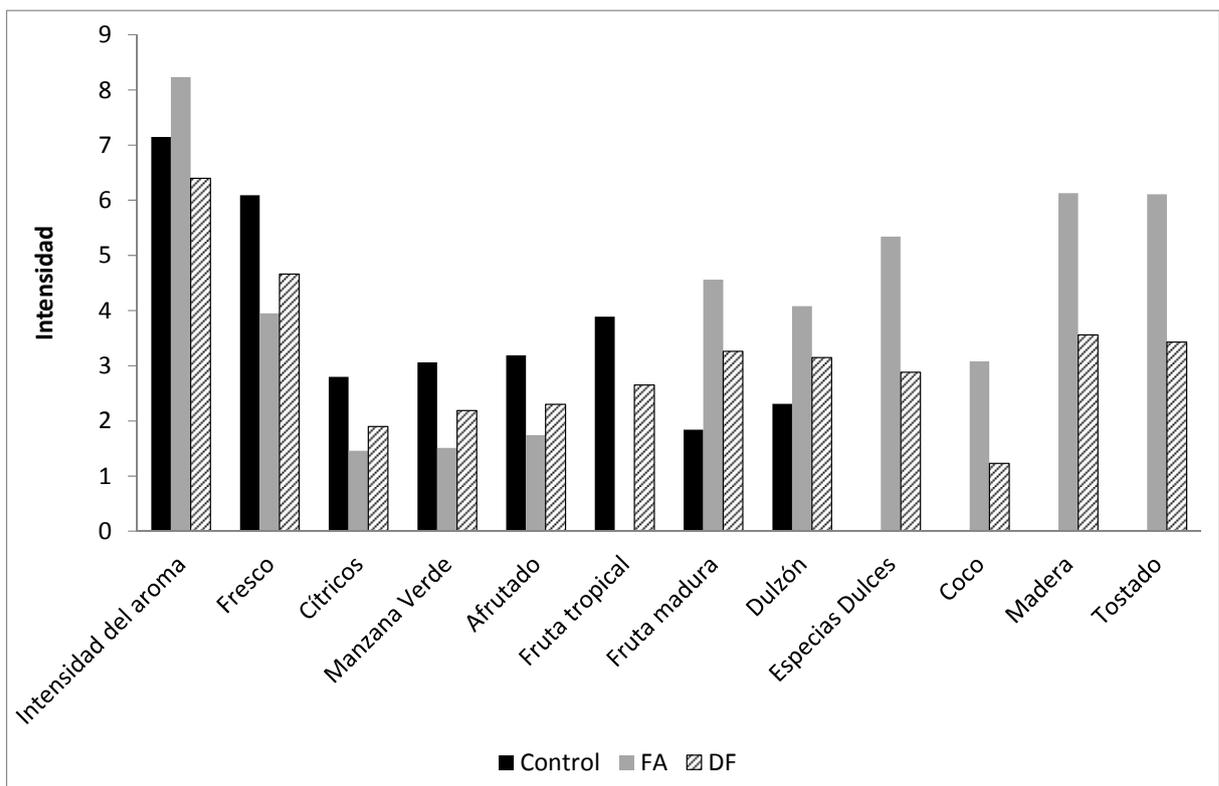


Figura 3. Intensidades medias de los principales atributos del perfil sensorial de los vinos objeto de estudio

TE18 - MEJORA DEL AROMA DE LOS VINOS TINTOS DE LA VARIEDAD MORAVÍA DULCE MEDIANTE LA TÉCNICA CO-FERMENTACIÓN

Eva Sánchez-Palomo¹, Eva Gómez García-Carpintero¹, Miguel Ángel González Viñas¹

¹ Universidad de Castilla-La Mancha, Dpto. Química Analítica y Tecnología de Alimentos, Avda. Camilo José Cela, 10, 13071, Ciudad-Real, España)

Eva.Sanchez@uclm.es

RESUMEN:

El objetivo del presente trabajo fue determinar la influencia de la técnica de co-vinificación con la variedad Cencibel en el aroma varietal y las características sensoriales de los vinos Moravia Dulce. Los compuestos del aroma fueron analizados mediante CG-EM previo aislamiento mediante SPE. El perfil sensorial de los vinos objeto de estudio fue evaluado por un panel de catadores expertos. La co-vinificación con la variedad Cencibel produjo un descenso en la concentración de los compuestos C₆ y un aumento de la concentración de los compuestos terpénicos y C₁₃-norisoprenoides con respecto a los vinos monovarietales. El perfil olfativo de los vinos co-vinificados presentó mayor complejidad aromática en general que los vinos monovarietales. La co-vinificación puede considerarse como una técnica interesante para la mejora del aroma de los vinos monovarietales de la variedad Moravia Dulce

1. Introducción

El aroma del vino está formado por una amplia variedad de compuestos de diferente naturaleza química y en un amplio rango de concentraciones. Hasta el momento en el vino han sido identificados más de 800 compuestos volátiles (1,2), entre los que se incluyen, ácidos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, fenoles, lactonas, terpenos, C₁₃-norisoprenoides, derivados azufrados, etc. La repercusión de estos compuestos en el aroma global del vino depende tanto de su concentración como de su “umbral de percepción olfativa” de modo que, sólo aquellos compuestos cuya concentración supere el umbral de percepción olfativa contribuirán de manera individual al aroma global del vino, mientras que el resto contribuyen de manera sinérgica, antagónica...

Actualmente cada vez son más los consumidores que demandan vinos más complejos e innovadores, que los elaborados mediante la vinificación tradicional, considerando de mayor calidad los vinos que expresan en grado superlativo sus características varietales. En los últimos años, se han realizado grandes avances en la investigación sobre la aplicación de las técnicas enológicas con la idea de mejorar la calidad del vino y aumentar su complejidad aromática.

El objetivo principal de este estudio fue determinar la influencia de la técnica de co-vinificación con la variedad Cencibel en el perfil químico y sensorial del aroma de los vinos de la variedad Moravía Dulce cultivada en la región de Castilla-La Mancha.

2. Material y métodos

Para la elaboración de los vinos se utilizaron uvas tintas de las variedades Cencibel y Moravia Dulce cultivadas en la región de Castilla-La Mancha, recogidas en su punto óptimo de madurez y en perfecto estado sanitario. Los vinos se elaboraron a escala de laboratorio en garrafas de 10L de capacidad. Se elaboraron vinos monovarietales de las dos variedades y vinos mediante la técnica de la co-vinificación de las variedades Cencibel (50%) y Moravia Dulce (50%). El inóculo utilizado fue la levadura seleccionada *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae* C.E.C.T. nº 10835. Los bazuqueos fueron manuales cada 12 horas. Terminada la fermentación alcohólica, los vinos fueron descubados e inoculados con bacterias lácticas *Lactococcus Oeni* para inducir la fermentación maloláctica tras la cual, se trasegaron dos veces, se filtraron y se embotellaron.

La extracción de los compuestos volátiles de los vinos se realizó según el método propuesto por Sánchez-Palomo y col. en el año 2006 (3) utilizando cartuchos de polipropileno-divinilbenceno de 0.5g de fase sólida y 4-nonanol como patrón interno. Los compuestos libres fueron eluidos con diclorometano (10mL) y posteriormente concentrados bajo corriente de nitrógeno hasta un volumen final de 0.5µL.

El análisis cuantitativo de los diferentes compuestos se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se utilizó un cromatógrafo 6890N (Agilent) acoplado a un detector de masas 5973 inert y equipado con una columna BP-21 (60m x 0.25mm x 0.25mm). La ionización se realizó en modo de impacto electrónico con una energía de 70 eV; Temperatura del inyector: 250°C; Temperatura de la línea de transferencia 280 °C; velocidad de barrido: 1 scan/min.; rango de adquisición de masas: 40-450 amu. Programa de temperatura del horno: 70° C (5 min.) - 1°C/min - 95° C (10 min.) - 2° C/min - 190° C (40 min.). La identificación de los compuestos se realizó mediante la comparación de los espectros de los compuestos con los de las sustancias puras en el caso de que se encontraran comercialmente disponibles y con los datos existentes en la librería de espectros Wiley G 1035 A. Como gas portador se utilizó He (1.0ml/min.).

El análisis sensorial fue realizado por un panel formado por diez catadores expertos en análisis sensorial de vinos utilizando los atributos que previamente habían sido seleccionados por consenso como los que mejor describían las características de los vinos. Para la cuantificación de los diferentes atributos se utilizaron escalas no estructuradas de 10 cm y algunas sustancias de referencia. Todos los vinos se evaluaron por duplicado en una sala de cata normalizada (4) y utilizando copas normalizadas (5).

3. Resultados

La Figura 1 muestra las concentraciones medias de los principales grupos de compuestos del aroma varietal de los vinos objeto de este estudio. A la vista de los resultados podemos observar como los vinos monovarietales elaborados con la variedad Moravía Dulce presentaron una concentración de compuestos C₆ superior a la de los vinos Cencibel. La concentración de compuestos C₆ de los vinos co-fermentados fue ligeramente superior a la de los vinos Moravía Dulce monovarietales suavizándose así las notas verdes de los mimos.

Con respecto a la concentración de compuestos terpénicos y C₁₃-norisoprenoides los vinos obtenidos mediante la técnica de co-fermentación presentaron mayores

concentraciones que los vinos monovarietales lo que pone de manifiesto al utilizada de la técnica de co-vinificación para aumentar el carácter varietal de los vinos.

Por último los compuestos bencénicos fueron el grupo cuantitativa y cualitativamente mayoritario de compuestos volátiles del aroma varietal de los vinos independientemente de la técnica de vinificación utilizada. La influencia de la técnica de co-fermentación en este grupo de compuestos fue la misma que en el caso de los compuestos C₆ presentando concentraciones inferiores a los vinos monovarietales Moravía Dulce superiores a los vinos Cencibel monovarietales.

El perfil sensorial de los vinos fue evaluado por un panel de catadores expertos con amplia experiencia en Análisis Sensorial de vinos. La figura 2 muestra las puntuaciones medias otorgadas por los catadores a los principales atributos del perfil sensorial del aroma de los vinos monovarietales y co-vinificados.

Los vinos monovarietales Cencibel presentaron un perfil olfativo caracterizado principalmente por aromas a fruta roja, fresco, regaliz y especias. El perfil sensorial de los vinos Moravía Dulce fue en general más neutro con menores intensidades de aroma a fresco, especias y dulce con notas a frutas rojas. La técnica de co-vinificación modificó el perfil sensorial de los vinos Moravía Dulce aumentando su intensidad de aroma así como las intensidades de los principales atributos del mismo y apareciendo algunas notas propias de los vinos de la variedad Cencibel debido probablemente a un efecto sinérgico que potencia las notas aromáticas en este vino.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto la utilidad de la técnica de co-vinificación para aumentar el carácter varietal de los vinos Moravía Dulce obteniéndose vinos con un perfil químico y sensorial más complejo que los vinos monovarietales.

El empleo de ésta técnica de elaboración permitirá al sector enológico ampliar la oferta de vinos de calidad y permitir la diversificación de un mercado monocorde.

5. Bibliografía

1. Ferreira, V.; López, R.; Escudero, A.; Cacho, J.F. 1998. *In: Journal of the Science of Food and Agriculture*. 77, 259–267.
2. Cabaroglu, T.; Canbas, A.; Lepoutre, J.P.; Gunata, Z. 2002. *In: American Journal of Enology and Viticulture*. 53, 64–68.
3. Sánchez-Palomo, E.; Pérez-Coello, M. S.; Díaz-Maroto, M. C.; González Viñas, M. A.; Cabezudo, M. D. 2006. Contribution of free and glycosidically-bound volatile compounds to the aroma of muscat “a petit grains” wines and effect of skin contact. *In: Food Chemistry*, 95, 279-289.
4. UNE-EN ISO 8589 (2010). Análisis Sensorial. Guía General para el diseño de salas de cata.
5. UNE 87022 (1992). Análisis sensorial. Utensilios. Copa para la degustación de vino.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen a la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha la financiación económica a cargo del proyecto PEII-2014-011-A

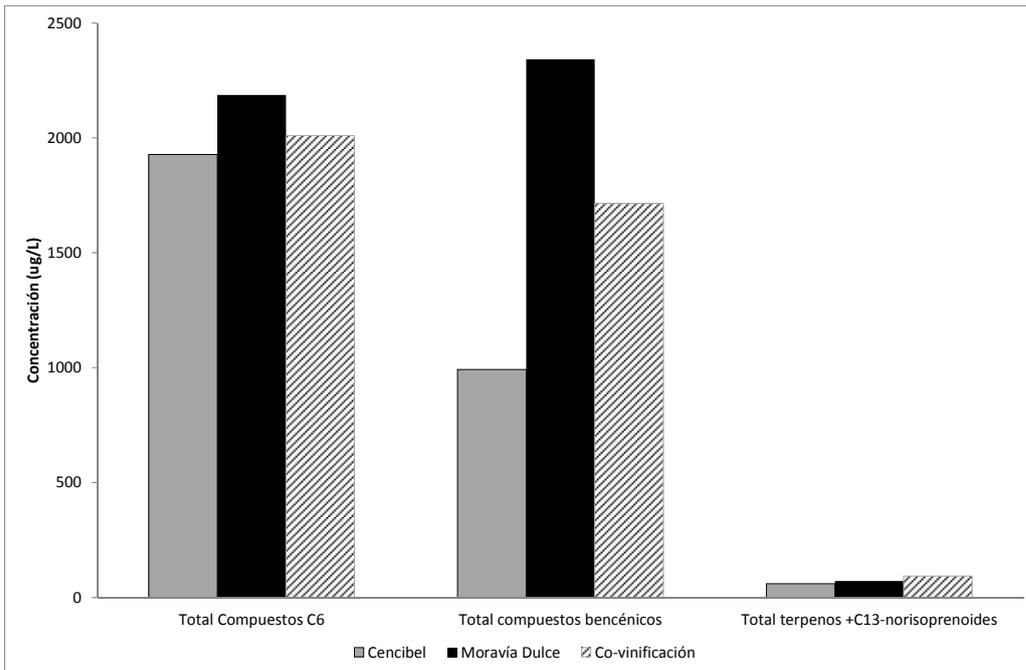


Figura 1. Concentraciones medias (ug/L) de los principales grupos de compuestos del aroma varietal de los vinos objeto de estudio

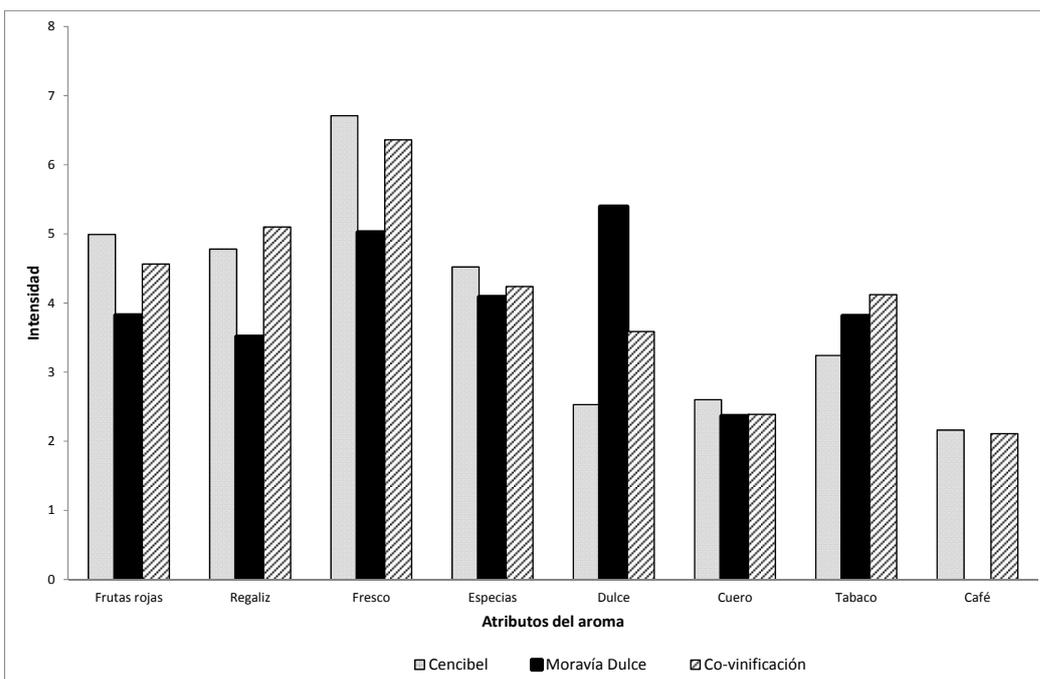


Figura 2. Intensidades medias de los principales atributos del perfil sensorial de los vinos objeto de estudio

TE19 - VIABILIDAD DEL EMPLEO DE QUITOSANO Y DE LEVADURAS SECAS INACTIVAS RICAS EN GLUTATIÓN COMO ALTERNATIVAS AL DIÓXIDO DE AZUFRE EN LA ELABORACIÓN DE VINO BLANCO

Laura Medina, Olga Pascual, Francesca Fort, Joan Miquel Canals y Fernando Zamora

Universitat Rovira i Virgili/Facultat d'Enologia, departament de Bioquímica i Biotecnologia.
C/ Marcel·lí Domingo 1. 43007-Tarragona, España.

fernando.zamora@urv.cat

RESUMEN:

Existe en una creciente inquietud sobre la necesidad de elaborar vinos sin SO₂. Por esta razón se planteó un estudio sobre la viabilidad de emplear quitosano como alternativa antimicrobiana y levaduras secas inactivas (LSI) ricas en glutatión como alternativa antioxidante al SO₂ en vinificación en blanco. Todos los vinos elaborados sin SO₂ realizaron la fermentación maloláctica si bien presentaban tan solo un pequeño incremento de la acidez volátil atribuible a dicho proceso. Los vinos elaborados sin SO₂ también presentaban un mayor nivel de pardeamiento probablemente debido a que la velocidad de consumo de oxígeno por las polifenol oxidadas es mayor que la de liberación de glutatión de las LSI.

Palabras clave: Alternativos al SO₂, Glutatión, Quitosano.

1. Introducción

Existe en una creciente inquietud sobre la necesidad de elaborar vinos libres de los aditivos considerados como poco saludables como es el caso del dióxido de azufre [1,2]. No obstante, el SO₂ resulta muy difícil de substituir ya que presenta simultáneamente propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antioxidantes [3]. Por esta razón se han propuesto diversos productos y/o tratamientos alternativos [4,5] tales como el tratamiento a altas presiones [6], la lisozima [7], el ácido ascórbico [8] e incluso el lavado de las uvas con hipoclorito sódico [9]. Recientemente se han propuesto dos nuevos posibles alternativos al dióxido de azufre que parecen muy prometedores. Se trata del quitosano y del glutatión [10,11]. El quitosano ha sido propuesto por sus propiedades antimicrobianas, especialmente efectivas sobre *Brettanomyces/Dekkera* [10], si bien también parece tener efectos antioxidantes por su capacidad de absorber hierro y compuestos fenólicos [12]. Por su parte el glutatión, ya sea como producto puro o en forma de levaduras secas inactivas ricas en glutatión, ha sido propuesto por sus propiedades antioxidantes [13]. El quitosano fue autorizado como aditivo enológico recientemente por la OIV y el glutatión, ya sea de forma pura o por medio de levaduras secas activas se encuentra en las fases finales previas a su aprobación.

Por estas razones, el objetivo del presente trabajo fue el de estudiar la viabilidad del empleo de ambos aditivos como alternativa al uso tradicional del dióxido de azufre en la vinificación en blanco.

2. Material y métodos

El mosto de Xarel.lo obtenido tras un prensado en prensa neumática se recogió en un tanque al que se le añadió nieve carbónica para desplazar el oxígeno. Una vez homogeneizado se trasegaron alícuotas de 8 litros a depósitos del mismo volumen a los que se aplicaron los distintos tratamientos: Control convencional (6 g/hl de SO₂), poco SO₂ (2 g/hl de SO₂) y nada de SO₂. A su vez, excepto en el control convencional se procedió a combinar en los diferentes grupos experimentales la adición o no de 8 g/hl de quitosano (No Brett Inside; Lallemand Inc., Montreal, Canada) y/o 40 g/hl de levaduras secas inactivas ricas en glutatión (Optimunwhite, Lallemand Inc., Montreal, Canada). La Tabla 1 esquematiza el diseño experimental.

Tabla 1. Esquema experimental

Parámetro	Control convencional	Con muy poco SO ₂				Sin SO ₂			
SO ₂	6 g/hl	2 g/hl				0 g/hl			
Quitosano	No	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si
LSI ricas en glutatión	No	No	No	Si	Si	No	No	Si	Si

Los mostos fueron desfangados a las 24 horas. Tras lo cual fueron fermentados en condiciones controladas (18 °C). Finalizada la fermentación alcohólica, el control convencional fue sulfitado (4 g/hl), los vinos elaborados con poco SO₂ fueron sulfitados con una baja dosis (1 g/hl), y los vinos sin SO₂ no fueron sulfitados, tras lo cual fueron trasegados y estabilizados en una cámara frigorífica a 4 °C durante 4 semanas. Todas las experiencias se realizaron por triplicado y se los mostos fueron fermentados en condiciones controladas utilizando gases inertes en todos los trasiegos.

Los parámetros estándar de los vinos se determinaron con los métodos recomendados por la OIV [14]. El color fue medido mediante la A₄₂₀ [15] y las coordenadas CIELab* [16] Los componentes volátiles mayoritarios se determinaron por Cromatografía de gases [17].

3. Resultados

La Tabla 2 muestra los resultados correspondientes a los parámetros generales de los diversos vinos.

Tabla 2. Parámetros generales

Parámetro	Control convencional (6g/hl)	Con muy poco SO ₂ (2 g/hl)				Sin SO ₂ (0 g/hl)			
	No	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si
Quitosano	No	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si
Glutatión	No	No	No	Si	Si	No	No	Si	Si
GA	11,0 ± 0,1 A	11,0 ± 0,1 A	10,9 ± 0,0 A	11,0 ± 0,0 A	10,9 ± 0,1 A	11,0 ± 0,1 A	11,0 ± 0,1 A	11,0 ± 0,0 A	11,2 ± 0,3 A
Glicerol (g/l)	5,3 ± 0,5 A	5,5 ± 0,2 A	5,8 ± 0,3 A	5,9 ± 0,3 A	5,9 ± 0,2 A	5,5 ± 0,1 A	5,8 ± 0,2 A	5,6 ± 0,5 A	5,8 ± 0,5 A
ATT (g/L)	6,7 ± 0,0 A	6,7 ± 0,1 A	6,4 ± 0,0 B	6,3 ± 0,3 A _B	6,2 ± 0,5 A _B	6,0 ± 0,1 B	6,2 ± 0,0 B	6,2 ± 0,1 B	5,6 ± 0,1 C
Ácido L-málico (g/l)	1,59 ± 0,02 A	1,76 ± 0,23 A	1,55 ± 0,01 A	1,23 ± 0,69 A	1,16 ± 1,00 A	0,00 ± 0,01 B	0,04 ± 0,03 B	0,02 ± 0,01 B	0,04 ± 0,02 B
Ácido L-láctico (g/l)	0,00 ± 0,01 A	0,00 ± 0,00 A	0,00 ± 0,00 A	0,27 ± 0,47 A	0,38 ± 0,65 A	1,07 ± 0,03 B	1,05 ± 0,01 B	1,06 ± 0,01 B	1,10 ± 0,01 B
Ácido acético (g/l)	0,21 ± 0,02 A	0,15 ± 0,04 B	0,16 ± 0,02 A _B	0,16 ± 0,02 A _B	0,18 ± 0,02 A _B	0,28 ± 0,02 C	0,27 ± 0,02 C	0,29 ± 0,00 C	0,27 ± 0,00 C
SO ₂ libre (mg/l)	21 ± 1 A	9 ± 1 B	10 ± 1 B	7 ± 2 B	9 ± 2 B	6 ± 1 B _C	5 ± 1 C	5 ± 0 C	5 ± 1 C
SO ₂ total (mg/l)	77 ± 1 A	34 ± 7 B	36 ± 1 B	44 ± 3 B	31 ± 9 B	7 ± 1 C	6 ± 2 C	6 ± 1 C	10 ± 1 C

Como era de esperar, los niveles de SO₂ libre y total eran mayores en el vino control convencional, que en los elaborados con poco SO₂ y éstos a su vez superiores a los del vino elaborado sin SO₂. La presencia de SO₂ en los vinos elaborados sin SO₂ confirma que las levaduras sintetizan algo de SO₂. No se observaron diferencias significativas en el grado alcohólico ni en la concentración de glicerol. Todos los vinos elaborados sin SO₂ realizaron la fermentación maloláctica mientras que los que se elaboraron con 2 o 6 g/hl no. Los vinos sin SO₂ tenían una acidez volátil algo más alta. No obstante, estas diferencias fueron realmente discretas y atribuibles al desarrollo de la FML y no a otra desviación de índole microbiológica.

La Tabla 3 muestra los parámetros del color.

Tabla 3. Parámetros del color

Parámetro	Control convencional (6g/hl)	Con muy poco SO ₂ (2 g/hl)				Sin SO ₂ (0 g/hl)			
	No	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si
Glutatioón	No	No	No	Si	Si	No	No	Si	Si
A ₄₂₀	0,05 ± 0,00 A	0,06 ± 0,00 B	0,06 ± 0,00 B	0,07 ± 0,01 B	0,07 ± 0,01 B	0,08 ± 0,00 B	0,08 ± 0,00 B	0,08 ± 0,00 B	0,09 ± 0,01 B
L*	98,8 ± 0,2 A	98,4 ± 0,2 A	98,3 ± 0,2 A	98,3 ± 0,2 A	98,2 ± 0,1 A	98,6 ± 0,1 A	98,7 ± 0,1 A	98,6 ± 0,1 A	98,1 ± 0,1 B
a*	-0,32 ± 0,14 A	-0,17 ± 0,10 B	-0,22 ± 0,13 A	-0,30 ± 0,10 A	-0,39 ± 0,34 A	-0,70 ± 0,12 A	-0,60 ± 0,05 A	-0,68 ± 0,08 A	-0,72 ± 0,07 A
b*	3,30 ± 0,10 A	3,62 ± 0,04 B	3,42 ± 0,06 B	4,25 ± 0,34 B	4,08 ± 0,88 B	5,02 ± 0,13 B	4,76 ± 0,05 B	5,14 ± 0,02 B	5,73 ± 0,24 B

Todos los vinos elaborados sin SO₂ presentaron una mayor coloración amarilla (A420) lo que indicaría que el efecto protector frente al pardeamiento de las LSI ricas en glutatión no fue efectivo, probablemente debido a que el pardeamiento enzimático es más rápido que la liberación del glutatión por parte de las LSI. Estos resultados sugieren la necesidad de realizar nuevas experiencias con glutatión puro para que este antioxidante este presente de forma apreciable en el mosto de forma inmediata.

El análisis mediante cromatografía de gases de los compuestos volátiles mayoritarios (Datos no incluidos) mostró solo pequeñas diferencias entre los vinos elaborados con o sin SO₂. Cabe señalar que no hubo diferencias en la concentración de etanal lo que sugiere que se consiguió proteger a los componentes volátiles de la oxidación.

4. Conclusiones

El conjunto de los resultados obtenidos indica que el empleo de quitosano y levaduras secas inactivas ricas en glutatión, conjuntamente con el empleo de gases inertes como alternativa al SO₂ permitió obtener vinos con una acidez volátil razonable si bien no se consiguió inhibir la fermentación maloláctica ni que los vinos sufrieran un mayor pardeamiento que los obtenidos con la adición de dióxido de azufre. Dado la importancia de evitar la fermentación maloláctica en los vinos blancos, especialmente en zonas cálidas, y sobretodo el pardeamiento sigue siendo necesario estudiar cómo mejorar los procesos a fin de evitar el uso del SO₂. Estos resultados sugieren realizar nuevas experiencias incluyendo el glutatión puro y la lisozima.

5. Bibliografía

1. Taylor, S.L., Higley, N.A., Bush, R.K. 1986. Sulfites in Foods: Uses, Analytical Methods, Residues, Fate, Exposure Assessment, Metabolism, Toxicity, and Hypersensitivity. *Advances in Food Research*, 30, 1-76.

2. Costanigro, M., Appleby, C., Menke, S.D. 2014. The wine headache: Consumer perceptions of sulfites and willingness to pay for non-sulfited wines. *Food Quality and Preferences*, 31, 81-89.
3. Zamora, F. 2005. El anhídrido sulfuroso; algunas reflexiones sobre este aditivo. *Enólogos*, 38, 28-31.
4. Santos, M.C., Nunes, C., Saraiva, J.A., Coimbra, M.A. 2012. Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *European Food Research Technol.*, 234, 1-12.
5. Guerrero, R.F., Cantos-Villar, E. 2015. Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Trends in Food Science Technology*, 42, 27-43.
6. Santos, M.C., Nunes, C., Cappelle, J., Gonçalves, F.J., Rodrigues, A., Saraiva, J.A., and Coimbra, M.A. 2013. Effect of high pressure treatments on the physiochemical properties of a sulfur dioxide-free red wine. *Food Chemistry*, 141, 2558-2566.
7. Sonni, F., Cejudo-Bastante, M.J., Chinnici, F., Natali, N., Riponi, C. 2009. Replacement of sulfur dioxide by lysozyme and oenological tannins during fermentation: influence on volatile composition of white wines. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 89, 688-695.
8. Li, H., Guo, A., Hua Wang, H., 2008. Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, 108, 1-13.
9. Yoo, K.S., Ahn, J.E., Han, J.S., Seo, E., Otgonbayar, G.E., Han, N.S. 2011. Antimicrobial treatment of grapes using sodium hypochlorite in winemaking and its effects on the chemical and sensory characteristics of wines. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 1243-1249.
10. Ferreira, D., Moreira, D., Costa, E.M.; Silva, S., Pintado, M.M., Couto, J.A. 2013. The Antimicrobial Action of Chitosan against the Wine Spoilage Yeast *Brettanomyces/Dekkera*. *Journal of Chitin and Chitosan Science*, 1, 240-245.
11. Comuzzo, P., Zironi, R. 2013. Biotechnological Strategies for Controlling Wine Oxidation. *Food Engineering Reviews*, 5, 217-229.
12. Chinnici, F., Natali, N., Riponi, C. 2014. Efficacy of Chitosan in Inhibiting the Oxidation of (+)-Catechin in White Wine Model Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 9868–9875.
13. Comuzzo, P., Battistutta, F., Vendrame, M., Páez, M.S., Luisi, G., Zironi, R. 2015. Antioxidant properties of different products and additives in white wine. *Food Chemistry*, 168, 107-114.
14. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin .2014. Methods of analysis of wines and must. <http://www.oiv.int/oiv/info/enmethodesinternationalesvin>.
15. Glories, Y. 1984. La couleur des vins rouges. 2^éme partie: mesure, origine et interpretation. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 18, 253–271.
16. Ayala, F., Echávarri, J.F., Negueruela, A.I. 1999. A new simplified method for measuring the color of wines. III. All wines and brandies *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 359-363
17. Ortega, C.; Lopez, R.; Cacho, J.; Ferreira, V. 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.*, A2001, 923, 205-214.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Programa Cien “Nuevas estrategias vitivinícolas para la sostenibilidad y el incremento de la competitividad del sector en el mercado internacional” en colaboración con la empresa Lallemand Bio,S.L.

TE20 - EFECTOS DEL ENCOLADO CON PROTEÍNAS DE ORIGEN NO ANIMAL EN DIFERENTES CONDICIONES DE USO SOBRE LA CALIDAD DEL VINO

Marín-Arroyo, M.R.¹, Becerril, J.¹, Esparza, M.¹

¹Universidad Pública de Navarra, departamento de Tecnología de Alimentos, Grupo Ænoltec (Avances en Enología). Edificio Los Olivos, Campus Arrosadía, 31005, Pamplona, España.
remedios.marin@unavarra.es

RESUMEN:

En este trabajo, utilizando un diseño factorial completo, se estudió la clarificación de vino tinto cv. Tempranillo con 3 proteínas de origen no animal (proteína de guisante, proteína de levadura, proteína de patata) a diferentes temperaturas (12, 16 y 20 °C) y diferentes dosis. Mediante la determinación de índices se analizó el efecto sobre los compuestos fenólicos totales y sobre los principales grupos polifenólicos.

Los resultados muestran una significativa influencia de la temperatura en los parámetros estudiados que, con ventajas como una reducción de turbidez similar y un volumen de lías menor a los que se obtienen con clarificantes clásicos como la gelatina, según las condiciones de uso, permiten modular la influencia sobre la calidad del vino tratado.

Palabras clave: clarificación, vino tinto, proteínas vegetales.

1. Introducción

El encolado no es solo una operación para conseguir limpidez y estabilidad en el vino sino que, bien gestionado, es un instrumento para la mejora global de su calidad. Tras la aprobación, en diciembre de 2005, del Reglamento (CE) nº 2165/2005 que autorizaba la adición de materias proteicas de origen vegetal en los tratamientos del vino y del mosto, se dispone en el mercado de diferentes clarificantes proteicos de origen no animal. En la actualidad, está autorizado el uso de proteínas procedentes del trigo, del guisante y de la patata (último clarificante vegetal en ser admitido con la publicación del Reglamento (CE) nº 1251/2013). La corta existencia de este tipo de clarificantes y con ello el limitado conocimiento sobre sus efectos hace conveniente su estudio en las diferentes condiciones de uso.

2. Material y métodos

Para el estudio se empleó un vino tinto joven monovarietal cv. Tempranillo adquirido en una bodega navarra tras finalizar la fermentación maloláctica. Hasta su uso, el vino se almacenó en depósitos de 25 litros, en cámara frigorífica a 12 °C.

Se estudiaron tres proteínas de origen no animal: proteína procedente de autolisados de levadura (EPL, Oenofrance), proteína de guisante (Proveget 100, Agrovin) y proteína procedente de patata (Vegecoll, Laffort), y dos gelatinas (Vinigel At y Vinigel GR, Agrovin) como referencia.

Los ensayos de clarificación se realizaron por duplicado en conos Imhoff de un litro de volumen, a temperaturas de 12, 16 y 20 °C, con dosis alta y baja que se fijaron según las recomendaciones de sus fichas técnicas y que, para cada proteína fueron (en g/hL): 10 y 22 (EPL), 6 y 16 (Proveget 100), 1 y 5 (Vegecoll). Para los ensayos con las dos gelatinas se realizaron ensayos previos para determinar, en las condiciones más adecuadas de uso de la gelatina, la dosis más adecuada para el vino utilizado que resultó ser 6 g/hL. Los resultados se observaron una vez transcurridas 24 horas desde la adición del clarificante.

La turbidez del vino se midió con la ayuda de un turbidímetro Hach 2100N con compensación de color y se expresa como reducción de la turbidez inicial, en porcentaje. El volumen de lías generado en cada ensayo se midió por lectura directa del cono Imhoff.

Los antocianos totales, taninos totales, índice de etanol e índice de gelatina (IG) se determinaron siguiendo los métodos de Ribéreau-Gayon *et al.* descritos por Zamora (2003) basados en determinaciones espectrofotométricas: El índice de polifenoles totales (IPT) también se determinó siguiendo el método descrito por Zamora (2003) con un factor de dilución de 50. La intensidad colorante y la tonalidad del vino se determinaron de acuerdo a lo descrito por Glories (1984).

3. Resultados

Tanto la proteína de levadura como la de patata consiguieron una mayor reducción de la turbidez que las gelatinas en todos los casos, mientras que en los ensayos con la proteína de guisante los resultados fueron dependientes de la temperatura (gráfico A Figura 1).

En cuanto al volumen de lías (Figura 1), los volúmenes generados con las proteínas de origen no animal fueron siempre menores, a excepción de algunos ensayos con proteínas de patata a dosis altas, y en los ensayos a 12 y 20 °C fueron hasta tres veces inferiores a los obtenidos con las gelatinas. La proteína de patata (VEG) generó un volumen de lías menor a dosis bajas, independientemente de la temperatura mientras que el extracto de levadura (EPL) generó menos lías a 12 y 20 °C que a la temperatura de 16 °C. Esta baja generación de lías con disminuciones de turbidez comparables o mayores a las que se obtienen con gelatina, es generalmente observada en la mayoría de proteínas vegetales ensayadas para la clarificación de vinos (Iturmendi *et al.*, 2010; Noriega-Domínguez *et al.*, 2010)

Se comprobó que el IPT y los taninos totales disminuyeron tras el proceso de clarificación. Se observó una relación entre una mayor disminución de estos parámetros con dosis altas de clarificante, mientras que la temperatura afectó de manera distinta según el tipo de clarificante empleado. Por otro lado, la cantidad de antocianos totales no se vio disminuida en los ensayos realizados con proteínas de origen no animal pero sí se observaron pequeñas disminuciones de antocianos en las clarificaciones con las gelatinas.

Para el índice de etanol, que se interpreta como el porcentaje de taninos que aportan cuerpo y estructura al vino y que no participan en su astringencia, se observa cómo el extracto de levadura y la proteína de guisante consiguieron una mejor conservación de este índice independientemente de la dosis ensayada, consiguiendo los resultados más elevados en las clarificaciones realizadas a 16 °C (Figura 2).

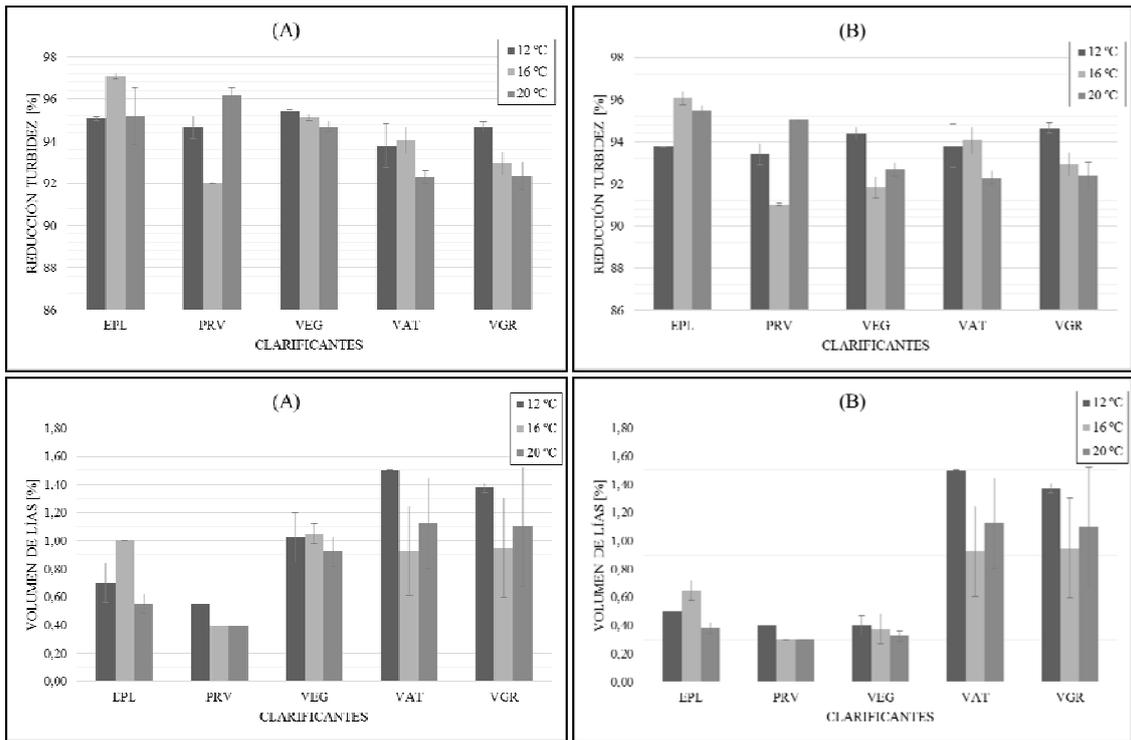


Figura 4. Reducción de la turbidez y volumen de lias en función de la temperatura. (A): Dosis altas de clarificantes; (B): Dosis bajas de clarificantes. EPL: extracto de levaduras; PRV: proteína de guisante; VEG: proteína de patata; VAT: gelatina Vinigel AT; VGR: gelatina Vinigel GR.

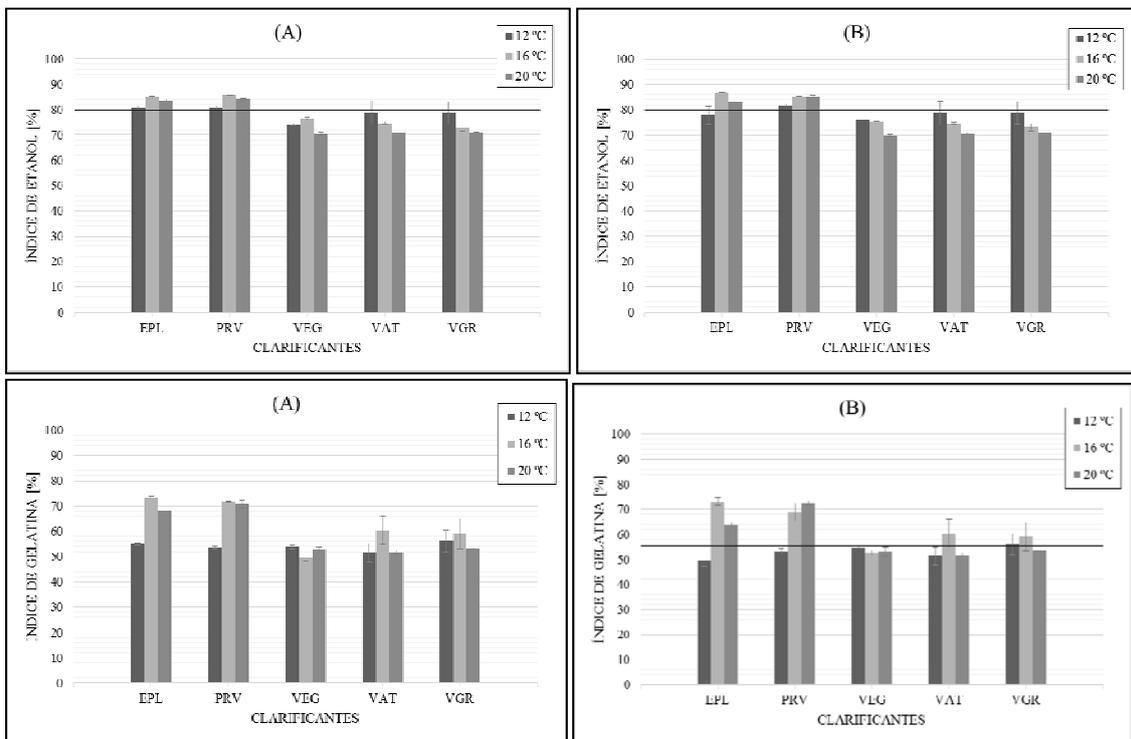


Figura 2. Índice de etanol e índice de gelatina. (A): Dosis altas de clarificantes; (B): Dosis bajas de clarificantes. EPL: extracto de levaduras; PRV: proteína de guisante; VEG: proteína

de patata; VAT: gelatina Vinigel AT; VGR: gelatina Vinigel GR.

***La línea continua representa el valor inicial del índice de etanol o el índice de gelatina.**

Para el índice de gelatina, parámetro representativo del porcentaje de taninos astringentes del vino se determinó que la proteína de patata fue el clarificante que mayor efecto tuvo sobre la astringencia ya que consiguió disminuir este índice en todas las condiciones. En el caso del extracto de levadura y la proteína de guisante se demostró que la temperatura de 12 °C era la más adecuada para hacer disminuir este parámetro.

Todos los resultados se analizaron estadísticamente mediante la realización de una ANOVA simple siendo altamente significativa ($p < 0,01$) la influencia del tipo de proteína sobre todos los parámetros determinados excepto la intensidad colorante, la temperatura sobre todos los parámetros excepto el volumen de lías y la dosis sobre el volumen de lías, el IPT, el Índice de gelatina, y con menor valor de p ($p < 0,05$) los antocianos totales y la tonalidad.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio muestran una significativa influencia del tipo de proteína, la temperatura y la dosis en la disminución de turbidez, volumen de lías y sobre la composición fenólica del vino clarificado. Conocer el efecto de estos factores es de gran importancia ya que permitirá modular la influencia sobre la calidad del vino tratado.

En comparación con las gelatinas, las proteínas de origen no animal aportan ventajas como un menor volumen de lías con una reducción de turbidez similar.

5. Bibliografía

1. Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. 2 Partie. Mesure, origine et interpretation. *In: Connaissance de la Vigne et du Vin*, 18(4), pp. 253–271.
2. Iturmendi, N.; Durán, D.; Marín-Arroyo, M.R. 2010. Fining of red wines with gluten or yeast extract protein. *In: International Journal of Food Science & Technology*, 45, 200-207.
3. Noriega-Domínguez, M.J.; Durán, D.S.; Vírseda, P.; Marín-Arroyo, M.R. 2010. Non-animal proteins as clarifying agents for red wines. *In: Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 44, 3, 179-189.
4. Reglamento (CE) nº 2165/2005 del Consejo que modifica el Reglamento (CE) nº 1493/1999 por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola. Diario Oficial de la Unión Europea nº L 345, 20 de diciembre de 2005.
5. Reglamento (CE) nº 1251/2013 de la Comisión que modifica el Reglamento (CE) nº 606/2009 en lo que respecta a determinadas prácticas enológicas y el Reglamento (CE) nº 436/2009 en lo que respecta a la indicación de estas prácticas en los registros del sector vitivinícola. Diario Oficial de la Unión Europea nº L 323, 3 de diciembre de 2013.
6. Zamora, F. (2003). Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos. 1ª Edición, Mundi Prensa, Madrid.

6. Agradecimientos

A la empresa Laffort que proporcionó su producto Vegecoll.

TE21- PRIMERAS EVIDENCIAS DE LA PRESENCIA DE PRODELFINIDINAS EN EL RASPÓN DEL RACIMO

Olga Pascual¹, Laura Medina¹, Francesca Fort¹, Joan Miquel Canals¹, Sergio Gómez-Alonso², Esteban García-Romero³, Isidro Hermosín-Gutiérrez² y Fernando Zamora¹

¹Universitat Rovira i Virgili/Facultat d'Enologia, departament de Bioquímica i Biotecnologia C/ Marcel·lí Domingo 1. 43007-Tarragona, España. fernando.zamora@urv.cat

²Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, Spain

³Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha, Tomelloso, Ciudad Real, Spain
fernando.zamora@urv.cat

RESUMEN:

El objetivo del presente trabajo fue el de determinar las características de los taninos que aporta el raspón en la vinificación en tinto. Por ello se desarrolló una experiencia con un mosto de uva Cabernet sauvignon sangrado inmediatamente después de su encubado y tras cuatro días de maceración/fermentación. Ambos mostos fueron dispuestos en tanques de microvinificación donde se añadía o no la proporción de raspón original de los racimos empelados. Los resultados indican que el raspón aporta cantidades considerables de tanino y que éste presenta un alto grado de polimerización y un porcentaje muy elevado de prodelfinidinas.

Palabras clave: Raspón, Vinificación en tinto, Prodelfinidinas

1. Introducción

La calidad del vino tinto está fuertemente condicionada por su composición fenólica. Importantes atributos sensoriales como el color, el cuerpo y la astringencia dependen en gran medida de su composición en antocianos y proantocianidinas [1,2]. Los antocianos están sólo en la piel (excepto en las variedades tintoreras), mientras que las proantocianidinas están presentes en la piel, en las semillas y en los raspones [3]. Las proantocianidinas de la piel presentan un alto grado de polimerización y un alto porcentaje de (-)-epigallocatequina [4]. La presencia de (-)-epigallocatequina condiciona que los taninos de la piel, al sufrir una hidrólisis ácida, generen delfinidina además de la cianidina que generarían los otros monómeros: (+)-catequina, (-)-epicatequina y galato de (-)-epicatequina). Por esta razón se considera que los taninos de la piel son procianidinas y prodelfinidinas. Por el contrario las proantocianidinas de las semillas presentan un menor grado de polimerización y un mayor grado de galoilación y no contienen (-)-epigallocatequina [5]. Por esta razón los taninos de las semillas contienen únicamente procianidinas. Sin embargo, se conoce muy poco sobre la composición de las proantocianidinas de los raspones [6,7].

La práctica habitual de la vinificación en tinto suele eliminar los raspones de los racimos para evitar el aporte de excesiva astringencia y amargor [8]. No obstante, en los

últimos años algunos elaboradores de vinos tintos han recuperado la tradición de elaborar sus vinos con los racimos enteros sin despallillar. Estos elaboradores argumentan que la presencia de los raspones origina favorece la extracción y origina vinos con más cuerpo. De hecho, el empleo de los raspones se está convirtiendo en una práctica habitual en la vinificación de vinos orgánicos/biodinámicos/naturales. El objetivo de este trabajo fue el estudio de que verdaderamente aportan los raspones en la vinificación en tinto dado que apenas existe información sobre este tema.

2. Material y métodos

Vinificación: Un depósito de 2.500 Kg de capacidad se llenó con uvas estrujadas, despallilladas y sulfitadas (5 g/hl de SO₂) de la variedad Cabernet Sauvignon con un nivel de madurez adecuado (13,5 % de alcohol probable y 6,5 g/l de acidez total tartárica). Inmediatamente se sangró un 10 % del mosto que fue trasegado a un tanque donde se procedió a clarificar con carbón (100 g/hl) y bentonita (50 g/hl) a fin de eliminar todos los compuestos fenólicos. Este mosto se conservó sin fermentar durante cuatro días a 4 °C. Tras cuatro días de fermentación/maceración, se volvió a sangrar otro 10 % del depósito. Tanto el sangrado a tiempo 0 como el sangrado a tiempo 4 días se distribuyeron en 6 depósitos pequeños (8 litros). Tres de los depósitos se consideraron como control mientras que a los otros tres depósitos se les añadió la proporción de raspón original de los racimos originales. Los depósitos del sangrado a tiempo 0 se inocularon con la misma levadura empleada para la fermentación del depósito inicial. Tras 15 días de maceración, los vinos fueron extraídos, sulfitados (5 g/hl) y estabilizados a 4 °C durante 4 semanas.

Análisis: El índice de polifenoles totales (IPT) se determinó de acuerdo con lo descrito por Ribéreau-Gayon *et al.* [9]. La intensidad colorante se midió de acuerdo con lo indicado por Glories [10]. La concentración de antocianos se determinó espectrofotométricamente mediante el método descrito por Niketic-Aleksic y Hrazdina [11]. La concentración en proantocianidinas, su grado de polimerización y su composición momomérica se determinaron mediante HPLC tras la hidrólisis en presencia de un exceso de floroglucinol de acuerdo con lo descrito por Kennedy y Jones [12].

Estadística: Todos los datos se expresan como la media aritmética de tres replicas ± la desviación estándar. La comparación entre datos se realizó mediante ANOVA de un factor con el software SPSS.

3. Resultados

La Tabla 1 sintetiza los resultados obtenidos. En ella se puede ver que el vino procedente del sangrado inicial y fermentado sin adición de raspón apenas posee color, que contiene una concentración de antocianos muy pequeña y un IPT muy bajo. Esto demuestra que el sangrado inicial apenas había extraído compuestos fenólicos y que los pocos que se hubiesen solubilizado fueron prácticamente eliminados por el tratamiento drástico con carbón y bentonita. Si nos fijamos en el vino obtenido del sangrado inicial que fue fermentado con los raspones se puede ver que presenta un IPT significativamente superior lo que confirma que los raspones liberan al medio compuestos fenólicos. La concentración de antocianos, así como la intensidad colorante eran similares a los de su control sin raspones, lo que confirma que el raspón no aporta antocianos. Sin embargo, la concentración de proantocianidinas se

incrementa muy notablemente, lo que confirma que el raspón libera cantidades importantes de taninos condensados.

Tabla 1. Color y composición fenólica de los diferentes vinos.

Parámetro	Sin Raspón				Con Raspón			
	Sangrado al inicio		Sangrado a los 4 días		Sangrado al inicio		Sangrado a los 4 días	
IPT	7,7 ± 0,3	A	42,0 ± 1,0	C	19,5 ± 0,7	B	48,2 ± 1,4	D
Intensidad colorante	0,31 ± 0,01	A	9,74 ± 0,33	C	0,50 ± 0,03	A	8,13 ± 0,31	D
Antocianos (mg/l)	11 ± 2	A	475 ± 18	C	10 ± 1	A	426 ± 13	B
Procianidinas (mg/l)	0 ± 0	A	347 ± 17	C	310 ± 15	B	669 ± 125	D
Grado de polimerización medio (mDP)	-	-	7,0 ± 0,3	C	5,9 ± 0,2	A	6,9 ± 0,1	B
% de Prodelfinidinas	-	-	32,9 ± 0,3	C	18,4 ± 1,0	A	26,8 ± 0,7	B
% de Galoilación	-	-	2,5 ± 0,3	A	4,5 ± 0,2	B	2,6 ± 0,1	A

Un dato muy interesante es que los taninos aportados por el raspón presentan un grado de polimerización medio (mDP) y un porcentaje de prodelfinidinas relativamente altos, mientras que su porcentaje de galoilación es relativamente bajo.

Si analizamos los datos correspondientes a los vinos procedentes del sangrado a los 4 días podemos ver que las tendencias observadas en los vinos del primer sangrado se mantienen. La presencia del raspón incrementa el IPT si bien en menor medida que en los vino del sangrado inicial y sobretodo la concentración de proantocianidinas. También, el mDP y el porcentaje de prodelfinidinas son significativamente superiores en presencia del raspón. Estos datos confirman que el raspón aporta una considerable cantidad de tanino de alto grado de polimerización y muy rico en prodelfinidinas. Esto indicaría que los taninos del raspón presentan una mayor similitud a los taninos de las pieles que a los taninos de las semillas.

4. Conclusiones

La presencia del raspón provoca un aumento claro de la concentración de taninos condensados o proantocianidinas en el vino. Además el tanino aportado por el raspón presenta un alto grado de polimerización y un porcentaje muy elevado de prodelfinidinas.

5. Bibliografía

1. Gawel, R. 1998. Red wine astringency: a review. Australian Journal of Grape and Wine Research, 4, 74-95.
2. Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., Waters, E.J. 2003. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like médium. Journal of the Science of Food and Agriculture, 83, 564-573.

3. Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubordieu, D. 2006. Handbook of Enology: The Chemistry of Wine Stabilisation and Treatments. Ed. Wiley, Chichester.
4. Souquet, J.M., Cheynier, V., Brossaud, F., Moutounet, M. 1996. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, 43, 509-512.
5. Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., Moutounet, M. 1994. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, 36, 781-784.
6. Hashizume, K., Kida, S., Samuta, T. 1998. Effect of steam treatment of grape cluster stems on the methoxypyrazine, phenolic, acid, and mineral content in red wines fermented with stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4382-4386.
7. Llaudy, M.C., Canals, R., Canals, J.M., Zamora, F. 2008. Influence of ripening stage and maceration length on the contribution of grape skins, seeds and stems to phenolic composition and astringency in wine-simulated macerations. *European Food Research and Technology*, 226, 337-344.
8. Zamora, F. 2003. *Elaboración y crianza del vino tinto; aspectos científicos y prácticos*. Editorial Mundi-Prensa; AMV Ediciones. Madrid.
9. Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubordieu, D. 2006. In *Handbook of Enology. The Chemistry of Wine Stabilisation and Treatments*. Eds. Wiley. Chichester, U.K., Vol. 2, pp 141–203.
10. Glories, Y. (1984) *La couleur des vins rouges. 2ème partie: mesure origine et interpretation*. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 18, 253–271.
11. Niketic-Aleksic, G.K. and Hrazdina, G. 1972. Quantitative analysis of the anthocyanin content in grape juices and wines. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 5, 163–165.
12. Kennedy, J.A. and Jones, G.P. 2001. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1740–1746.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la CICYT (Proyectos AGL2011-29708-C02-01 y AGL2011-29708-C02-02).

TE22 - EMPLEO DE *TORULASPORA DELBRUECKII* EN LA ELABORACIÓN DE VINOS DULCES ANDALUCES.

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y SENSORIAL

M. J. Ruiz-Bejarano, M. C. Rodriguez-Dodero¹, R. Castro¹, C. G. Barroso¹

¹ Universidad de Cádiz, Centro Andaluz de Investigaciones Vitivinícolas (CAIV), Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CeIA3). Av. Rep.Saharahui s/n, CP 11510 Puerto Real, Cádiz.

mariajesus.ruiz@uca.es

RESUMEN:

Los vinos dulces de Andalucía se elaboran a partir de uvas pasificadas, lo que le confiere unas características singulares. En los últimos años, se están desarrollando alternativas al asoleo tradicional como el secado en cámara, que permiten un mayor control del proceso. Asimismo, el empleo de *Torulaspota delbrueckii* está actualmente siendo objeto de estudio en la fermentación de mostos con elevada concentración de azúcar. En este estudio, se ha evaluado el perfil polifenólico, aromático y sensorial, así como el contenido en Ocratoxina A, ácido glucónico y otros ácidos orgánicos, de mostos, vinos y mistelas, elaborados según diferentes sistemas de secado y vinificación. Los resultados obtenidos, muestran diferencias en los vinos y mistelas elaborados en función del secado, variedad y/o elaboración.

Palabras clave: vinos dulces, pasificado, cámara climática, *Torulaspota*, polifenoles, volátiles, sensorial.

1. Introducción

Los vinos dulces de Andalucía se elaboran a partir de uvas secadas al sol, en un proceso conocido como asoleo. En este proceso, las uvas pierden agua gradualmente, dando lugar a un aumento en la concentración de azúcares y variación en el perfil aromático. Sin embargo, esta etapa no está exenta de riesgos, como son las precipitaciones o el ataque de insectos, por lo que en los últimos años se están desarrollando alternativas al asoleo que permitan un control de las condiciones del proceso, tal como el secado en cámara climática. Por otra parte, el empleo de levaduras como *Torulaspota delbrueckii* también ha adquirido un creciente interés, debido a su baja capacidad de producción de acidez volátil en la fermentación de mostos con elevada concentración de azúcar así como a su capacidad reveladora de aromas [1] aunque poseen una baja resistencia al alcohol. Es ésta característica de osmotolerancia de *T. delbrueckii* la que podría ser de gran interés y aplicabilidad en la elaboración de vinos dulces, especialmente aquellos que proceden de un mosto inicial con elevada concentración de azúcar como es el caso de los vinos dulces naturales andaluces.

2. Material y métodos

Se realizaron 24 experiencias, correspondientes a mistelas y vinos fermentados con *T. Delbrueckii* o con *S. Cerevisiae* de dos variedades de uva (Palomino Fino y Pedro Ximénez) secadas en cámara climática (Ibercex A. S. L., S. A.) o en la propia viña mediante secado tradicional y cada uno de ellos por duplicado. El asoleo en viña tuvo lugar en la propia bodega durante los meses de Agosto-Septiembre durante 15 días. Para el secado artificial, los racimos

fueron distribuidos uniformemente en bandejas, y sometidos a una temperatura de 40° C y H.R. del 10%, dándose por finalizados los ensayos cuando la pérdida de peso fue superior al 55% y el Baumé mayor de 20° Bé. Tras el prensado, los mostos se desfangaron a 4°C durante 72 horas. Las mistelas se encabezaron con alcohol vínico hasta 17°. Para los vinos, se emplearon levaduras *Torulaspota delbrueckii* “Zymaflore Alpha” o *Saccharomyces cerevisiae* “Viniferm flora”. Cuando el alcohol de los vinos en fermentación llegaba a 3,5° (con un contenido de azúcar residual mayor de 300 g/l) se procedió a la parada de la fermentación mediante frío y adición de alcohol vínico hasta un grado alcohólico de 10° aprox., tras lo cual se mantuvieron a baja temperatura durante 72 horas para el deslío. Por último, se realizó un nuevo encabezado hasta alcanzar 17°.

Además de los parámetros enológicos de rutina, y a fin de asegurar el correcto estado de los mostos, se determinó el contenido en Ocratoxina A (OTA), mediante una primera extracción y posterior separación y análisis por cromatografía líquida HPLC- FLD [2], y la concentración de ácido glucónico empleando un biosensor Biolan (BiolanMicrobiosensores) específico para éste fin. La cuantificación de ácidos orgánicos se realizó mediante cromatografía de exclusión iónica (IEC) con detección conductimétrica [3]. Los compuestos polifenólicos se evaluaron mediante un sistema UPLC WatersAcquity-PDA [4]. El índice de Polifenoles Totales (IPT) fue determinado por el método de Folin-Ciocalteu. Los compuestos volátiles se analizaron por cromatografía de gases (Agilent) acoplada a detector de masas, previa extracción por adsorción en barra agitadora (SBSE; unidad de desorción térmica TDS-2, Gerstel) siguiendo el método propuesto por Ruiz-Bejarano, MJ et al [5]. El análisis sensorial se llevó a cabo en una sala de catas normalizada, mediante pruebas descriptivas.

3. Resultados

En todos los ensayos se obtuvieron mostos con las condiciones adecuadas para la elaboración de vinos dulces con un contenido en OTA por debajo de los límites de detección y cuantificación, que se establecieron en 0,17 ppb y 0,58 ppb respectivamente. Respecto al ácido glucónico, indicador de contaminación por *Botrytis Cinerea*, los niveles se hallaron dentro del rango aceptable, con concentraciones mayores en mostos de PX y uva secada en cámara. Esta tendencia se observó también en el contenido en ácidos acético, málico y cítrico.

El estudio del contenido polifenólico de los mostos obtenidos antes y tras la etapa de asoleo (tradicional en viña y en cámara climática) puso de relieve significativos incrementos en la mayoría de los compuestos considerados, como consecuencia de la etapa de asoleo. En los vinos elaborados, las variables más influyentes fueron variedad de uva y tipo de secado, teniendo el tipo de vinificación un menor carácter discriminador. En este sentido, fueron los vinos procedentes de la variedad Palomino fino así como el secado en viña los que presentaron mayores niveles en varios de los compuestos considerados, lo que concuerda con los valores obtenidos de IPT. El perfil polifenólico de la variedad Palomino Fino asoleada en viña (PaV) mostró mayores diferencias respecto al encontrado para las restantes muestras, (Fig.1).

En el caso de los constituyentes volátiles, se pone de relieve que el factor más influyente sobre los mismos fue el desarrollo o no del proceso de fermentación alcohólica aunque éste sea de forma parcial en los vinos obtenidos. Todos los vinos procedentes del soleo tradicional, independientemente del tipo de levadura empleada en la fermentación y de la variedad de uva empleada presentan una gran similitud en cuanto a compuestos volátiles. En el caso de los vinos procedentes de la variedad Palomino fino secada en cámara climática, se observa un menor grado de similitud entre ambas fermentaciones que en el caso de la

variedad Pedro Ximénez (Fig. 2). El menor grado Baumé de este mosto, 24,6 °Bé, respecto a los otros tres, que superaron ampliamente dicho valor, parece haber determinado el curso de la fermentación. En este sentido, los compuestos volátiles que demostraron verse afectados significativamente por este factor, levadura de fermentación (*T. delbrueckii* o *S. cerevisiae*), fueron, con valores más bajos para los vinos procedentes de la fermentación con *Torulasporea*: ésteres etílicos como butirato de etilo, acetatos y algunos ácidos grasos, mientras que los valores más altos para los vinos fermentados con *Torulasporea* correspondían a algunos alcoholes (alcohol isoamílico, 2-feniletanol, y alcohol isobutílico) junto a compuestos tales como benzaldehído, (2,2-dietoxietil)-benceno e isobutirato de 2-feniletilo. Estos hechos concuerdan con los resultados observados por Azzolini et al., [6] para vinos dulces fermentados con inoculación secuencial de *Torulasporea* y *S. cerevisiae*.

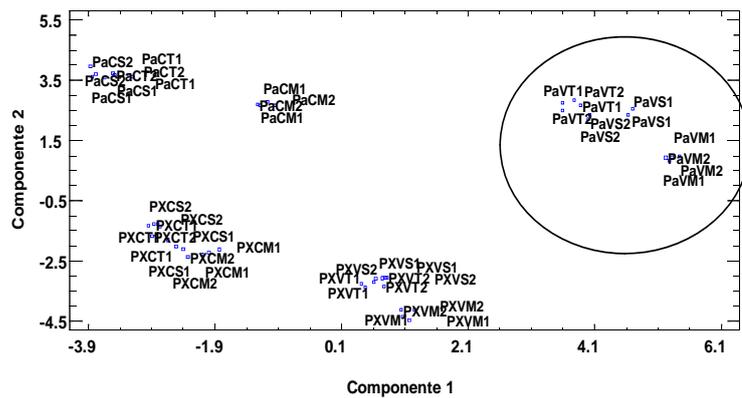


Figura 5. Análisis de componentes principales sobre los compuestos polifenólicos. Vinos (V) y mistelas (M). Pa: Palomino fino; PX: Pedro Ximénez; S: *S. cerevisiae*; T: *T. delbrueckii*

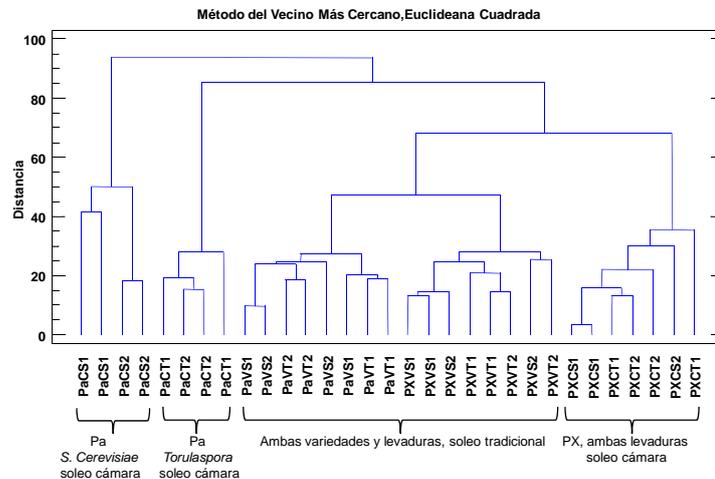


Figura 6. Análisis de clusters, compuestos volátiles. Vinos.

Respecto al perfil sensorial, la única diferencia significativa observada entre las variedades es la mayor sensación alcohólica en nariz de los vinos de PX. La comparación de los sistemas de secado (Fig. 3.a) otorga un mejor perfil sensorial a las muestras de uvas secadas en cámara (tanto en nariz como en boca), en relación inversa a la intensidad del defecto detectado, que es superior en los vinos y mistelas de viña. Si bien son éstos últimos, los que presentan una mayor nota floral, además de ser más dulces. No se observaron diferencias significativas en la impresión general de mistelas y vinos. Los vinos obtenidos con la levadura *Torulasporea* se caracterizaron por una mayor nota cítrica y menor a pasa, y un valor medio en defecto menor que los vinos de *Saccharomyces*. Como resultado, la valoración en boca y

general fue mayor para los vinos de *Torulaspورا* (Fig. 3.b).

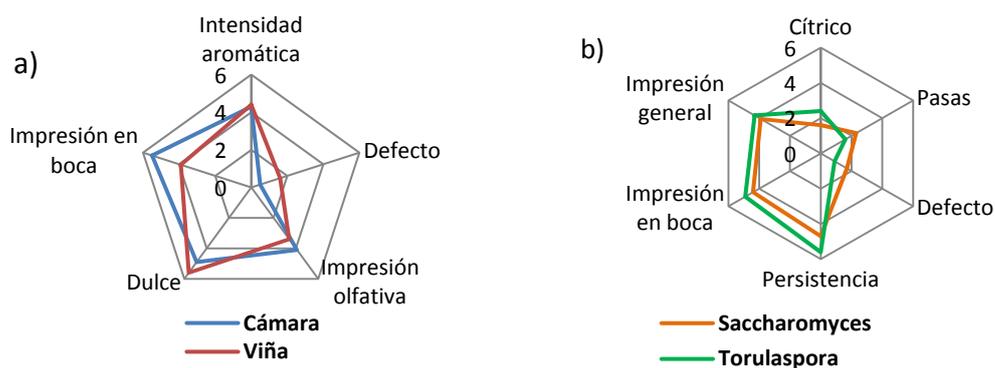


Fig. 3. Gráficos de araña del perfil sensorial. (a) Secado (b) Levadura.

4. Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos, las tres variables estudiadas (variedad, secado y elaboración) influyen significativamente en los vinos obtenidos. A nivel sensorial, destacaron los vinos dulces de uvas secadas en cámara así como aquellos elaborados con *T. delbrueckii*. No obstante, estas diferencias no fueron tan acusadas en el estudio analítico, salvo en los vinos procedentes de uva Palomino secada en cámara, cuyo mosto partía de un menor grado Baumé. Por tanto, sería interesante desarrollar futuras investigaciones con objeto de establecer los límites de tolerancia osmótica y el comportamiento de *T. delbrueckii* frente a concentraciones crecientes de azúcar en el medio.

5. Bibliografía

1. Bely, M.; Stoeckle, P.; Masneuf-Pomarède, I.; Dubourdieu, D. 2008. Impact of mixed *Torulaspورا delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *In: International Journal of Food Microbiology*. 122, 312–320.
2. Ruíz Bejarano, M.J.; Rodríguez-Dodero, M.C., Barroso C.G. 2010. Optimizing the process of making sweet wines to minimize the content of ochratoxin A. *In: J Agric Food Chem*. 58, 13006-12.
3. Guillén, D.A.; Barroso, C.G.; Zorro, L.; Carrascal, V.; Pérez-Bustamante, J.A. 1998. Organic acids analysis in 'Brandy de Jerez' by ion-exclusion chromatography, 'post-column' buffering and conductimetric detection. *In: Analisis*. 26, 186-9.
4. Schwarz, M.; Rodríguez, M.C.; Guillén, D.A.; Barroso, C.G. 2009. Development and validation of UPLC for the determination of phenolic compounds and furanic derivatives in Brandy de Jerez. *In: Journal of Separation Science*. 32, 1782-90.
5. Ruiz-Bejarano, M.J.; Castro-Mejías, R.; Rodríguez-Dodero, M.C.; García-Barroso, C. 2013. Study of the content in volatile compounds during the aging of sweet Sherry wines obtained from grapes cv. Muscat and fermented under different conditions. *In: European Food Research and Technology*. 237, 905-22.
6. Azzolini, M.; Tosi, E.; Lorenzini, M.; Finato, F.; Zapparoli, G. 2015. Contribution to the aroma of white wines by controlled *Torulaspورا delbrueckii* cultures in association with *Saccharomyces cerevisiae*. *In: World J Microbiol Biotechnol*. 31, 277–293.

6. Agradecimientos

Este trabajo está integrado en el proyecto Innterconecta ITC-20131018 (INNTER-VINANDAL 2013) con González Byass Jerez S.L.U.

TE23 - UNA NUEVA LEVADURA ENOLÓGICA QUE PRODUCE MUY BAJOS NIVELES DE COMPUESTOS AZUFRADOS NEGATIVOS GRACIAS A UN ESTUDIO GENÉTICO E HIBRIDACIÓN

Jessica Noble¹, Isabelle Sanchez², Anne Ortiz-Julien¹, José M. Heras¹, Bruno Blondin²

¹Lallemand SAS, Rue des Briquetiers, 31702, Blagnac, Francia.

²INRA, UMR1083 Sciences pour l'œnologie, 2 place Viala 34060 Montpellier Cedex 02 Francia.
jnoble@lallemand.com

RESUMEN:

Los sulfitos son ampliamente utilizados en enología. Sin embargo, existe una tendencia a reducir su uso y controlar sus niveles en el vino final. Las levaduras enológicas pueden también producirlos en cantidades variables durante la fermentación alcohólica. Mediante un método genético cuantitativo, se descubrieron dos locus que afectan la producción de SO₂ y H₂S. La disección de rasgos de un carácter cuantitativo (QTLs según su abreviación en inglés) llevó a la identificación de dos alelos de los genes *MET2* y *SKP2* responsables de las diferencias de producción de compuestos azufrados entre dos cepas de levadura enológica. Una validación funcional demostró su implicación y subrayó el poder y el alcance de su control sobre los fenotipos, así como sobre la producción de SO₂ y H₂S. La transferencia de estos alelos mediante hibridación ofrece grandes posibilidades para optimizar levaduras enológicas y ya ha sido seleccionada una nueva levadura enológica utilizando esta técnica.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*; sulfitos, compuestos azufrados, estudio genético, QTL.

1. Introducción

La demanda de nuevas levaduras enológicas optimizadas para diferentes propiedades tecnológicas particulares, ha aumentado en los últimos años. El conocimiento cada vez mayor y el desarrollo de nuevas tecnologías ofrecen otras posibilidades para la selección de nuevas levaduras enológicas. Se pueden implementar técnicas como la selección clonal, la ingeniería genética y la selección evolutiva, sin embargo, la hibridación es la que se emplea con más frecuencia para tales mejoras. Además, la hibridación no requiere la intervención de la manipulación genética, y resulta en levaduras naturales, no modificadas genéticamente (no MG). No obstante, este método necesita un conocimiento de la base molecular de las propiedades consideradas de interés. La técnica del mapeo de rasgos cuantitativos de interés (QTL) se amplió recientemente para estas aplicaciones.

Este método consiste, por ejemplo, en identificar un vínculo entre una o varias regiones del genoma y una variación fenotípica en un microorganismo. Una vez identificada esta región, se puede entonces dirigir su transferencia de una cepa de levadura a otra para combinar varias propiedades de interés. En este estudio, hemos intentado identificar la región del genoma responsable de numerosas características enológicas, particularmente la producción de sulfitos.

El objetivo de este estudio era la selección y desarrollo de nuevas levaduras enológicas combinando varios fenotipos de interés, como los de baja producción de SO₂/H₂S/acetaldehído y alta capacidad fermentativa. El enfoque original fue el uso de nuevas herramientas genéticas, para conseguir levaduras no MG.

2. Material y métodos

Se seleccionaron dos levaduras enológicas con propiedades complementarias que resultan de interés para este estudio. La cepa JN10 es muy robusta, capaz de completar la fermentación bajo condiciones muy difíciles, como temperaturas altas/bajas y mostos muy clarificados, mientras que la cepa JN17 tiene bajas necesidades en nitrógeno, presenta un perfil equilibrado de compuestos volátiles y produce bajas cantidades de SO₂, acetaldehído y H₂S.

La identificación de QTL se llevó a cabo para encontrar las regiones del genoma de la cepa de levadura JN17 vinculadas a los fenotipos de interés: bajo SO₂ y bajo H₂S. A través de una combinación de conjuntos de datos fenotípicos y genotípicos, hemos logrado ubicar una región del cromosoma XIV que está vinculada a la producción de sulfitos. En esta región, hemos descubierto dos genes de la ruta metabólica del azufre, *MET2* y *SKP2*.

Una vez que se detectaron los marcadores moleculares vinculados a las propiedades que nos interesan, es posible transferirlos de una cepa a otra mediante hibridación dirigida.

En nuestro estudio, pudimos transferir la propiedad de bajo SO₂/H₂S de la cepa de levadura JN17 a la JN10 conservando todas las buenas propiedades de la última. En paralelo, logramos transferir otros dos fenotipos de la cepa parental JN17 (baja producción de acetaldehído y bajas necesidades en nitrógeno).

Intentábamos alcanzar dos objetivos principales:

- Transferir los fenotipos de interés de la cepa de levadura JN17 a la JN10 controlando la presencia de los marcadores moleculares en cada etapa de hibridación;
- Mantener la mayor parte de los antecedentes genéticos de la cepa de levadura JN10 mediante el recruzamiento de cada híbrido haploide generado con la cepa parental JN10.

Después de cuatro ciclos de hibridación, se restituyó más de 93 % del genoma de la cepa de levadura JN10 y validamos la transferencia de todos los fenotipos seleccionados que procedían de la cepa de levadura JN17: bajo SO₂, bajo H₂S, baja producción de acetaldehído y bajas necesidades en nitrógeno. A partir del híbrido de cuarta generación, se inició una nueva etapa de selección para obtener la mejor cepa, combinando las propiedades de este híbrido y buscando propiedades enológicas como una buena capacidad fermentativa, la resistencia a temperaturas extremas, características sensoriales interesantes, etc.

3. Resultados

Todas las cepas derivadas del cuarto ciclo de recruzamiento fueron cuidadosamente caracterizadas a escala de laboratorio en diferentes condiciones enológicas. El objetivo era validar que las propiedades positivas de la cepa de levadura JN10 permanecieran y, también, que las levaduras generadas mostraran una mejora en los fenotipos de interés. Se seleccionó una levadura (Lalvin ICV oKay®) que fue retenida para las etapas de caracterización final.

Se realizaron las pruebas en la Unidad experimental (INRA) de Pech Rouge, Francia. El propósito era comparar la levadura Lalvin ICV oKay® con una levadura de referencia. Las fermentaciones se realizaron con mostos de tres diferentes variedades de uvas: Merlot, Syrah rosado y Macabeo. El mosto de Merlot fue obtenido por la técnica *flash détente*. El mosto de Syrah rosado y el Macabeo fueron prensados y trasegados tras un desfangado estático a baja

temperatura. Las levaduras fueron rehidratadas con Go-Ferm Protect® e inoculadas en una concentración de 25 g/hL. Cuando fue necesario, se agregaron nutrientes en forma orgánica y compleja al primer tercio de la FA. El Merlot fermentó a temperaturas de entre 22°C y 25°C. El Syrah rosado y el Macabeo se fermentaron a 18°C. La FML se llevó a cabo con la bacteria seleccionada Lalvin VP41® en dosis de 1 g/hL.

Durante la FA, medimos el SO₂ en los vinos y validamos la no producción de SO₂ con la levadura Lalvin ICV oKay® comparando con la levadura de referencia (figura 1).

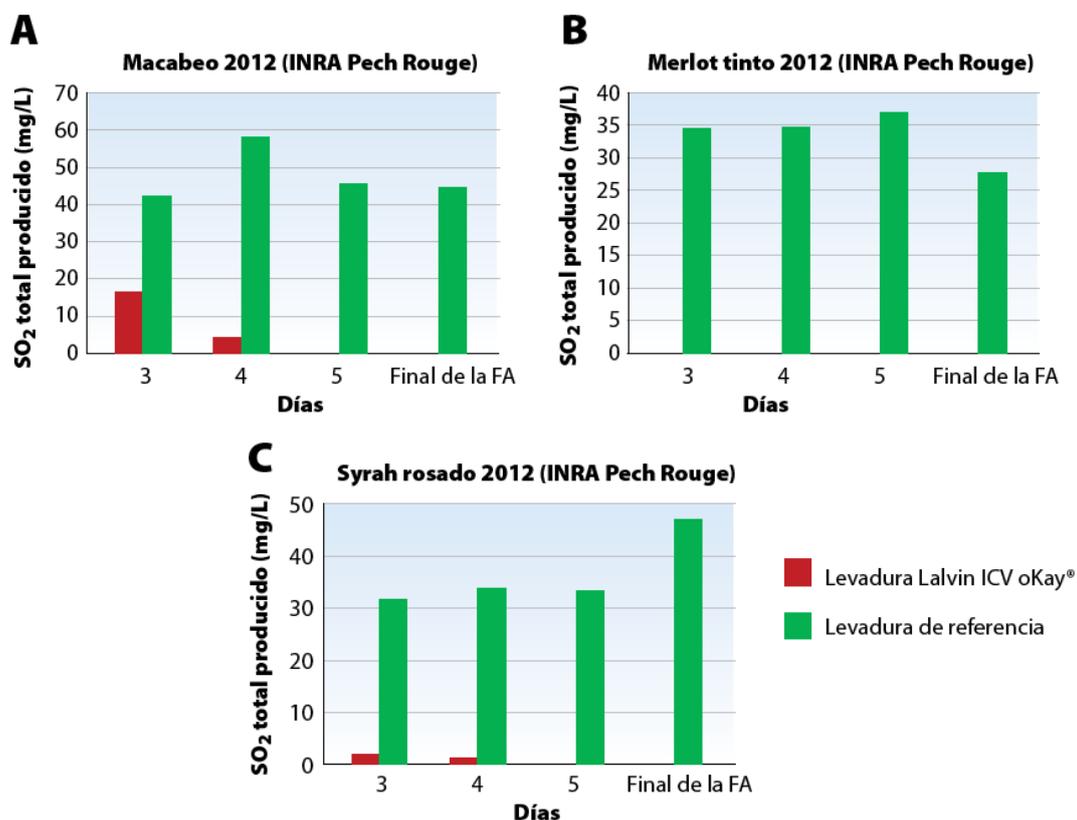


Figura 1. Producción total de SO₂ durante la fermentación alcohólica en tres vinos comparando la levadura Lalvin ICV oKay® con la levadura de referencia.

4. Conclusiones

Comprender la base molecular de la diversidad fenotípica de las levaduras enológicas constituye la primera etapa para el empleo de estrategias de hibridación destinadas a mejorar las propiedades tecnológicas de las levaduras. En este estudio, pudimos descubrir la base molecular responsable de la variación fenotípica en la producción de sulfitos en las levaduras enológicas. Se implementó una investigación QTL con un enfoque global combinando un estudio fisiológico y un análisis transcriptómico. El estudio muestra que la combinación de dos genes, *MET2* y *SKP2*, es responsable de la variación fenotípica observada entre las dos cepas parentales. Además, se ha demostrado que estos genes son también responsables del cambio fenotípico de otras características de interés tecnológico, como la producción de SO₂, H₂S y acetaldehído.

Hasta ahora, los estudios genéticos se habían centrado en el control de la producción de H₂S, pero las soluciones propuestas (p. ej., la reducción de la actividad sulfito reductasa) tenían la desventaja de incrementar mucho la producción de SO₂ (Cordente et al. 2009 y Linderholm et al. 2008). Posteriormente, con el método QTL, se pudieron optimizar muchas otras levaduras enológicas, usando el mismo procedimiento, puesto que un número importante de levaduras enológicas en el mercado tienen por lo menos uno de estos defectos. Ahora, la levadura obtenida con este método muestra cualidades excepcionales. Todas las pruebas realizadas evidencian que su producción de SO₂, H₂S y acetaldehído es casi nula, mostrando los vinos resultantes todo su potencial aromático y respetando el bajo contenido de SO₂ que se les exige para los vinos en el mercado actual.

5. Bibliografía

1. Ambroset, C., M. Petit, C. Brion, I. Sanchez, P. Delobel, C. Guérin, H. Chiapello, P. Nicolas, F. Bigey, S. Dequin, y B. Blondin. 2011. Deciphering the Molecular Basis of Wine Yeast Fermentation Traits Using a Combined Genetic and Genomic Approach. *G3: Genes/Genomes/Genetics*. 1(4):263-281.
2. Bely, M., J. M. Sablayrolles, and P. Barre. 1990. Description of Alcoholic Fermentation Kinetics: Its Variability and Significance. *Am. J. Enol. Vitic.* 41(4):319-324.
3. Casalone, E., C. M. Colella, S. Daly, E. Gallori, L. Moriani, and M. Polsinelli. 1992. Mechanism of resistance to sulphite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*. 22(6): 435-440.
4. Cordente, A. G., A. Heinrich, I. S. Pretorius, and J. H. Swiegers. 2009. Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production. *FEMS Yeast Research*. 9(3):446-459.
5. Deutschbauer, A. M., and R. W. Davis. 2005. Quantitative trait loci mapped to single-nucleotide resolution in yeast. *Nat Genet*. 37(12):1333-1340.
6. Granès, D., L. Pic-Blayteron, J. Negrel, and C. Bonnefond. 2010. Method for a Common Language, Quantitative Descriptive Sensory Analysis. *Practical Winery and Vineyard Journal*. Sept./Oct. 2010



CE

Crianza y envejecimiento

ENOLOGIA2.015
INNOVACIÓN VITIVINÍCOLA



CE01 - METODOLOGÍAS ALTERNATIVAS EN EL ENVEJECIMIENTO DE VINOS TINTOS: EMPLEO DE ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS (APH) Y VIRUTAS DE ENCINA *QUERCUS ILEX* EN CV. TEMPRANILLO.

Samuel Frutos, Daniel Moreno, M. Inmaculada Talaverano, Esther Gamero, Rosario Ramírez, Belén Godoy, Manuel A. Martínez y M. Esperanza Valdés¹

¹Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX) Badajoz, España.
samuel.frutos@gpex.es

RESUMEN:

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la aplicación conjunta de altas presiones hidrostáticas (APH) y virutas de madera de encina (*Quercus ilex*) sobre los parámetros físico-químicos, fenólicos, cromáticos y sensoriales de un vino monovarietal cv. Tempranillo de la cosecha 2013. Las virutas, tras ser sometidas a un proceso de tostado, se agregaron a los vinos en dosis de 5 g/L que fueron sometidos posteriormente a dos tratamientos de APH de igual presión y diferente duración. Tras 6 meses de permanencia en botella, los vinos tratados muestran una disminución significativa de los valores de antocianos, porcentaje de copigmentados y aumentos significativos en los de taninos. Además, la intensidad de los cambios estuvo asociada con el tiempo del tratamiento. De los resultados de este estudio puede concluirse que la aplicación de APH en vinos puede constituirse como un método eficaz y rápido de aromatización de vinos y que la madera de *Quercus Ilex*, con ciertas modificaciones en su procesado y dosis de empleo, puede ser alternativa a las comúnmente empleadas. Por tanto, la utilización combinada de ambas metodologías podría ser efectiva para la salida al mercado de vinos tintos cv. Tempranillo con atributos sensoriales semejantes a los proporcionados por la crianza.

Palabras clave: chips, encina, polifenoles, color, sensorial, aromatización.

1. Introducción

En los últimos años están surgiendo métodos alternativos a la crianza tradicional como son el uso de virutas en lugar de barricas, vinos sumergidos en el mar, aplicación de altas presiones hidrostáticas (APH) [1-5]. Con ello se intentan conseguir transformaciones semejantes y/o complementarias a las que ocurren durante la crianza empleando un menor tiempo y coste. Dichas transformaciones son debidas principalmente al aporte de sustancias fenólicas y aromáticas propias de la madera.

Entre las ventajas del uso de virutas pueden citarse, el bajo coste, una mayor superficie de contacto entre la madera y el vino y la ampliación del abanico de posibilidades en el uso de maderas distintas al roble americano y francés, comúnmente empleados en la fabricación de barricas.

La aplicación de las APH, además de reducir la carga microbiana permitiendo rebajar las cantidades de SO₂ adicionadas al vino, puede modificar y mejorar las propiedades organolépticas del mismo [6].

Por tanto, la unión de los beneficios de ambas técnicas es el punto de partida de este trabajo, cuyo objetivo es evaluar la incidencia de la aplicación conjunta de virutas de encina *Quercus Ilex* y APH en las características físico-químicas, cromáticas y sensoriales de vinos monovarietales cv. Tempranillo.

2. Material y métodos

El estudio se efectuó con vinos monovarietales cv. Tempranillo, cosecha 2013, a los que se le habían adicionado virutas tostadas de encina (5 g/L), procesadas en el Instituto del Corcho, la Madera y el Carbón Vegetal (CICYTEX-ICMC) a partir de madera de duramen del tronco *Quercus Ilex* secada, triturada y tamizada, hasta un tamaño comprendido entre 2 y 4 mm y posteriormente tostadas a 165 °C durante 35 minutos. El conjunto madera-vino se dispuso en 3 lotes de bolsas de plástico herméticamente termoselladas de 3 L, que se sometieron a tratamientos de APH a 400 MPa durante 5 (**AP5**) y 30 minutos (**AP30**) respectivamente, en una máquina HYPERBARIC Wave 6000/55. Tras la aplicación de los tratamientos los vinos fueron embotellados y analizados en dos periodos distintos: tras su embotellado (**AP5-P0** y **AP30-P0**) y tras un período de 6 meses en botella (**AP5-P6** y **AP30-P6**). Por otro lado, tras los mismos intervalos de embotellado, se analizaron vinos control (**C-P0**, **C-P6**) los cuales no habían recibido tratamiento de APH ni habían tenido contacto con virutas.

En los vinos se analizaron los siguientes parámetros: pH, acidez titulable (AT), acidez volátil (AV), anhídrido sulfuroso libre y total, índice de polifenoles totales (IPT), taninos, antocianos, índice de Folin-Ciocalteu y antocianos copigmentados. La caracterización cromática se efectuó mediante las coordenadas CIELab [7].

El análisis sensorial se realizó con las muestras P6 y consistió en una prueba de diferenciación (cata triangular) que llevó a cabo el panel de cata del CICYTEX-INTAEX, según la Norma UNE 87027:1998 para análisis sensorial.

Los diferentes análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico XLSTAT v.2014.

3. Resultados

A continuación, se comenta y discute la incidencia de los tratamientos sobre los valores de los parámetros físico-químicos, compuestos polifenólicos y parámetros cromáticos en los dos momentos estudiados, recién embotellado (P0) y tras seis meses de permanencia en botella (P6) mostrados en la tabla 1

Parámetros generales: En este aspecto únicamente es de destacar el descenso significativo de los valores de SO₂ libre y total observado en los vinos tratados (AP) en el momento P0 y que se mantienen en P6. Se observó además que la magnitud del descenso es mayor conforme aumenta el tiempo del tratamiento. Desde el punto de vista de estabilidad microbiológica del vino, este resultado es irrelevante puesto que la aplicación de APH es efectiva para la pasteurización del vino [6, 8]. Por otra parte, la aplicación de esta técnica no modificó sustancialmente la evolución de estos parámetros observándose que los cambios fueron de igual sentido y amplitud, siendo éstos muy similares en las muestras AP y en las control (C).

Compuestos fenólicos: Independientemente de la duración del tratamiento, frente a los vinos C, los AP presentan en el momento inicial P0, valores significativamente inferiores de antocianos y superiores de IPT. La evolución de la composición fenólica es idéntica en todas las muestras, observándose un descenso significativo de la concentración de antocianos, del % de copigmentados y de taninos, y un aumento, también significativo, del IPT. En comparación con C-P0, se observan cambios proporcionales a la intensidad del tratamiento. Así, para el contenido en antocianos se producen aumentos del 39, 47 y 50 %; del 9, 13 y 14 % para el IPT, y disminuciones del 30, 21 y 18 % para los taninos, en las muestras C-P6, AP5-P6 y AP30-P6 respectivamente.

Características cromáticas: En el momento P0 los vinos AP presentaron valores superiores de a* y significativamente superiores de b*. Al igual que para el contenido en compuestos fenólicos, la evolución de los valores de b* y C* fue proporcional a la intensidad

del tratamiento, y respecto a CP0 se observaron aumentos del 25, 65 y 85 % para b* y del 1, 11 y 13 % para C* en CP6, AP5-P6 y AP30 P6 respectivamente. Sin embargo, la diferencia de color ΔE^*_{ab} intertratamientos no superó el valor de 3 unidades necesarias para ser detectables por el ojo humano. De hecho, la máxima diferencia hallada entre C-P6 y AP30-P6 fue de 1,4.

Análisis sensorial: Tras seis meses de permanencia en botella, y en concordancia con lo anterior, los catadores no apreciaron diferencias entre el color de los vinos procedentes de los diferentes tratamientos. Sin embargo, en la fase olfato-gustativa, el panel sí los diferenció significativamente, con un porcentaje de discriminación del 86,3 %, percibiendo en los vinos AP aromas a madera y tostados, si bien también se apreciaron ciertos sabores identificados como sabor “a tablón”.

4. Conclusiones

De los resultados de este estudio se concluye que la aplicación de APH en vinos a los que se han adicionado virutas de madera, puede constituirse como un método eficaz y rápido de aromatización de vinos, con todas las ventajas que conlleva la disminución del tiempo de estancia en depósito. Este nuevo empleo, unido a la ya demostrada eficacia para la inactivación de microorganismos indeseables, aumenta la eficacia y posibilidades de esta técnica en la industria enológica. En lo que respecta al empleo de virutas de procedencia de *Quercus Ilex*, aunque los cambios observados en los atributos olfato-gustativos de los vinos no fueron todo lo positivos que se deseaba, lo que podría estar relacionado con la dosis de virutas añadida o con la intensidad del tratamiento de tostado aplicado, de los resultados observados en el resto de parámetros se concluye que puede ser una alternativa a las comúnmente empleadas de roble.

Este trabajo inicial abre nuevas vías experimentales en el uso, tanto individual como conjunto, de virutas de encina y APH como método alternativo para la crianza de vinos tintos en proyectos futuros.

5. Bibliografía

1. Gutiérrez Alfonso, V.L. 2002. Sensory Descriptive Analysis Between White Wines Fermented With Oak Chips and In Barrels. *In: J. Food Science*. 6, 2415-2419.
2. Bertrand A., Barbe J-C, Gazeau O. 1997. Aromatisation de vins par différents produits élaborés à partir du bois de chêne. *J. Sci. Tech. Tonnellerie* 3, 37-47.
3. Chassin M. 1999. Variations organoleptiques entre barrique, copeaux et micro- bullage. *Revue Française d'Œnologie* 174, 24-25.
4. Wilker K.L., Gallander J.F. 1988. Comparison of Seyval blanc wine aged in barrels and stainless steel tanks with oak chips. *Am. J. Enol. Vitic.* 39(1), 38-43.
5. Tao Y., Sun D-W., Górecki A., Błaszczak W., Lamparski G., Amarowicz R., Fornal J., Jeliński T. 2012. Effects of high hydrostatic pressure processing on the physicochemical and sensorial properties of a red wine. *I. F Sci. y E. T.* 16, 409-416.
6. Buzrul S. 2012. High hydrostatic pressure treatment of beer and wine: A review. *I. Food Science & Emerg. Tech.* 13, 1–12.
7. Moreno, D.; Gamero, E.; Talaverano, M.I.; Uriarte, D.; Mancha, L.A; Prieto, M.H and Valdés M.E. Effect of leaf removal on composition in *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo wine in Extremadura. GIESCO 2013.
8. Mok C., Song K-T., Park Y-S., Lim S., Ruan R., Chen P. 2006. High Hydrostatic Pressure Pasteurization of Red Wine. *J. Food Science* 8, 265-269.

6. Agradecimientos

Los autores de este trabajo quieren agradecer a los fondos FEDER y al Gobierno de Extremadura la financiación de este proyecto, a la cooperativa Viñaoliva (Almendralejo) la cesión del vino y al grupo de investigación HORTOFRUENOL la ayuda económica prestada. Samuel Frutos agradece a al Gobierno de Extremadura y a FSE la concesión de la Ayuda de Formación de Personal Técnico (TE12014).

Figuras, ecuaciones y tablas

Tabla 1: Parámetros físico-químicos, compuestos fenólicos y parámetros cromáticos

Período Tratamiento	P0			P6		
	C	AP5	AP30	C	AP5	AP30
pH	3,5 ^b	3,5 ^b	3,7 ^a	3,7 [*]	3,7 [*]	3,7 [*]
AT (g·L ⁻¹ A. Tartárico)	4,5	4,5	4,4	4,6	4,7	4,7 [*]
AV (g·L ⁻¹ A. Acético)	0,4	0,4	0,4	0,3 ^{b*}	0,3 ^{a*}	0,3 ^{a*}
SO ₂ libre (mg·L ⁻¹)	14,7 ^a	11,8 ^b	9,2 ^c	14,0 ^a	12,0 ^{ab}	11,7 ^{b*}
SO ₂ total (mg·L ⁻¹)	54,5 ^a	49,3 ^b	47,2 ^b	47,3 ^{a*}	30,0 ^{b*}	26,0 ^{c*}
Antocianos (mg·L ⁻¹ Cl.malvidina)	195,0 ^a	190,6 ^b	189,5 ^b	118,0 ^{a*}	103,3 ^{b*}	98,3 ^{b*}
Copigmentados (%)	30,2 ^a	28,5 ^b	29,0 ^{ab}	19,3 ^{a*}	17,6 ^{ab*}	15,8 ^{b*}
Taninos (g·L ⁻¹ Catequina)	3,3 ^b	3,8 ^a	3,8 ^a	2,3 ^{c*}	2,6 ^{b*}	2,7 ^{a*}
IPT	51,8 ^b	54,4 ^a	54,9 ^a	56,6 ^{b*}	58,7 ^{a*}	58,8 ^{a*}
L	77,9 ^a	77,2 ^b	77,0 ^b	77,9 ^a	74,7 ^{b*}	74,3 ^{b*}
a*	27,9 ^b	28,5 ^{ab}	28,9 ^a	28,3 ^b	30,9 ^{a*}	31,3 ^{a*}
b*	2,0 ^a	1,8 ^b	1,7 ^b	2,5 ^{c*}	3,3 ^{b*}	3,7 ^{a*}
C*	28,0 ^b	28,6 ^{ab}	28,9 ^a	28,4 ^b	31,1 ^{a*}	31,5 ^{a*}
h*	4,2 ^a	3,7 ^b	3,4 ^b	5,0 ^{c*}	6,0 ^{b*}	6,7 ^{a*}

Valores seguidos de *, indican diferencias significativas en los valores de ese tratamiento en los dos momentos de análisis.

En el mismo momento de análisis, y para el mismo parámetro, valores seguidos de distintos superíndices indican diferencias debidas a los tratamientos.

CE02 - IMPREGANCIÓN DE LÍAS DE LEVADURA CON AROMAS DE MADERA PARA SU UTILIZACIÓN DURANTE LA CRIANZA SOBRE LÍAS DE VINOS TINTOS

Palomero, F.¹, Bertani, P.¹, Fernández de Simón, B.², Cadahía, E.², Benito, S.¹, Suárez-Lepe, J.A.¹

¹Laboratorio de Enología. Dpto. Tecnología de Alimentos. ETSI Agrónomos, UPM

²Departamento de Productos Forestales. Instituto de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. CSIC
palomero.felipe@upm.es

RESUMEN:

Este trabajo presenta un método para provocar la difusión indirecta de aromas de madera durante la crianza sobre lías, a partir de las propias paredes de la levadura en autólisis. Para ello, se maceró previamente en un extracto etanólico de madera, una biomasa liofilizada generada exógenamente. Posteriormente, se dosificaron diferentes cantidades de lías de *Saccharomyces cerevisiae*, -previamente impregnadas con extractos de madera y secadas-, en vino tinto, y se realizó un seguimiento analítico. Se emplearon cuatro tipos diferentes de madera: castaño, cerezo, acacia y roble, observándose grandes diferencias en el perfil de volátiles y polifenoles entre las diferentes muestras. Los análisis sensoriales confirmaron el impacto positivo de la técnica, incluso a tiempos cortos de contacto, con una integración sutil de aromas de madera en los vinos. Los diferentes perfiles aromáticos obtenidos son interesantes de cara al posible empleo en tonelería de otras maderas diferentes al roble.

Palabras clave: crianza, vinos tintos, polifenoles, madera, roble, castaño, cerezo, acacia

1. Introducción

El mercado actual de vinos se caracteriza por una cierta homogeneidad y saturación de productos que compiten libremente. Se buscan por tanto nuevas técnicas y tecnologías que abaraten los procesos, permitiendo a la vez obtener productos de elevada calidad, y además que se distingan del resto. Esta diferenciación a costes contenidos puede incrementar significativamente la competitividad de una organización. Hasta ahora una de las opciones más comunes para conseguir este objetivo ha sido la crianza en bodega de roble. Sin embargo esta técnica enológica está reñida con la producción a bajos costes. Por otro lado, la crianza sobre lías es un recurso para elaborar vinos con características sensoriales especiales y extensamente descritas en la bibliografía. Se emplea recientemente incluso en vinos tintos asociada a crianzas en bodega, pero no está exenta de dificultades que marcan claramente el coste de las elaboraciones.

En este ámbito, es necesario señalar que los vinos sometidos a largas crianzas están perdiendo progresivamente prestigio y salida comercial. Actualmente el consumidor prefiere vinos de precios moderados en los que se respetan en mayor medida los aromas primarios o varietales de la fruta, a través de una mejor integración y equilibrio con los volátiles de la madera.

La capacidad de adsorción de levaduras y su posible empleo para clarificar vinos y reducir sus concentraciones de compuestos negativos como OTA y EPHs, ha sido ya estudiada

por diferentes autores. En este sentido, la fijación de antocianos y otros polifenoles en lías de levadura, y los efectos negativos a nivel cromático de la técnica, se ha descrito en algunos artículos científicos (Morata et al., 2003; Palomero et al., 2011). En este ámbito, este trabajo presenta un método para provocar la difusión indirecta de aromas de madera durante la crianza sobre lías, a partir de las propias paredes de la levadura en autólisis.

Para conseguirlo se maceró previamente en un extracto etanólico de diferentes maderas, una biomasa liofilizada generada exógenamente que posteriormente se secó. El análisis de polifenoles y volátiles de madera en las lías ya lavadas y secas, -mediante HPLC/DAD y GC/MS respectivamente,- confirmó su adsorción en las paredes de las levaduras. Para comprobar la potencial utilidad del procedimiento, se dosificaron diferentes cantidades de lías de *Saccharomyces cerevisiae*, -previamente impregnadas con extractos de madera y secadas-, en vino tinto, y se realizó un seguimiento analítico durante un corto periodo experimental.

2. Material y métodos

Una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, seleccionada en el Departamento de Química y Tecnología de Alimentos de la ETS Agrónomos (UPM) de acuerdo a su elevada capacidad de cesión de polisacáridos. La biomasa lavada y liofilizada de esta levadura se maceró con una solución de etanol que previamente se utilizó para extraer compuestos de diferentes maderas. (Fig.1.; Palomero et al., 2015)

Se realizó un seguimiento analítico de las muestras para verificar el impacto de la metodología sobre la composición y las características organolépticas de las diferentes muestras. Los polifenoles de las maderas se analizaron siguiendo la metodología propuesta por Sanz et al., 2012.

Se realizó un análisis sensorial al final del periodo experimental.



Fig. 1. Lías aromatizadas con maderas de roble, castaño, cerezo y acacia

3. Resultados

La figura 2 muestra los perfiles cromatográficos de las diferentes lías de levadura una vez aromatizadas con las diferentes maderas estudiadas. Se observaron grandes diferencias entre los perfiles de polifenoles de las diferentes maderas estudiadas, tanto en términos cuantitativos como cualitativos (Fig. 2).

Las lías de levadura aromatizadas mediante la metodología descrita con fragmentos de madera de castaño, presentaron una concentración muy superior de aldehídos fenólicos como

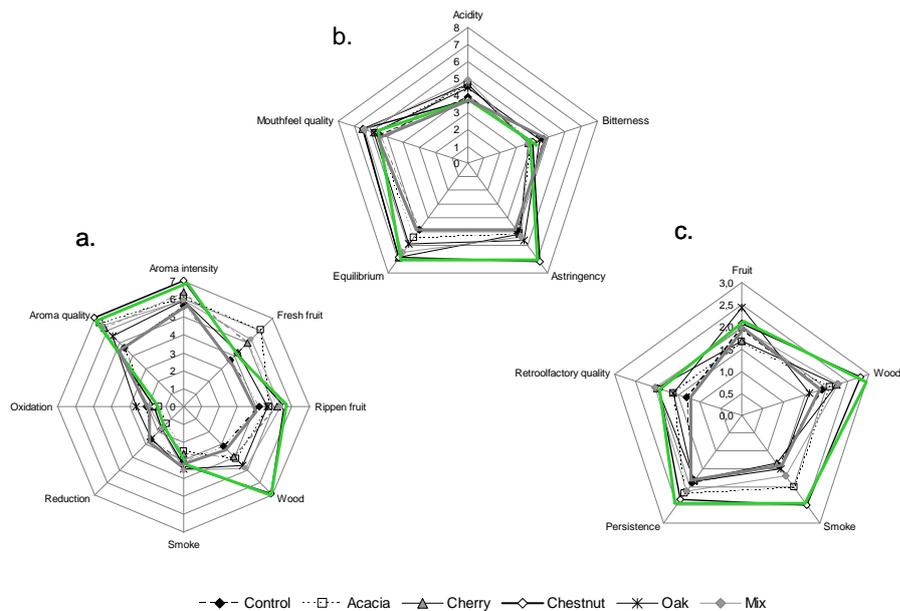


Fig. 3. Evaluación sensorial, a. olfativa, b. en boca, y c. retrogusto, de los vinos tras una crianza de un mes con las diferentes lías aromatizadas.

4. Conclusiones

Las lías de levadura muestran capacidad de adsorber compuestos polifenólicos y volátiles de madera, que posteriormente pueden desorberse en el vino. Maderas de especies diferentes al roble pueden mostrar también una buena aptitud enológica, y por lo tanto constituir una herramienta interesante para la elaboración de vinos de calidad singulares. Cada madera debe ser empleada en función del tiempo más adecuado de crianza considerado para adquirir el perfil aromático y sensorial deseado.

5. Bibliografía

1. Palomero, F; Bertani, P; Fernández de Simón, B.; Cadahía, E., Benito, S; Morata, A.; Suárez-Lepe, 2015 Wood Impregnation of yeast lees for winemaking. *In*: revista/publicacion. Food Chemistry, 171, 212-223.
2. Morata, A.; Gómez-Cordovés, M. C.; Suberviola, J.; Bartolomé, B.; Colomo, B.; Suárez, J. A. 2003. Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. Food Chemistry, 51, 4084-4088.
3. Palomero, F., Ntanos, K., Morata, A., Benito, S., Suárez-Lepe, J.A. 2011. Reduction of wine 4-ethylphenol concentration using lyophilized yeast as bioadsorbent: influence on anthocyanin content and chromatic variables. European Food Research and Technology, 223, 965-977.
4. Sanz, M., Fernández de Simon, B., Cadahía, E., Esteruelas, E., Muñoz, A.M., Hernández, M.T., & Estrela, I. 2012. Polyphenolic profile as a useful tool to identify the woos used in wine ageing. Analytica Chimica Acta, 732, 33-45.

CE03 - INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE DUELAS DE ROBLE FRANCÉS DURANTE LA MICROOXIGENACIÓN Y DE LA CRIANZA EN BARRICAS DE DIFERENTE POTENCIAL EN ELAGITANINOS SOBRE EL COLOR Y LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DEL VINO TINTO

María Navarro¹, Elena González-Royo¹, Francesca Fort¹, Joan Miquel Canals¹, Sergio Gómez-Alonso², Esteban García-Romero³, Isidro Hermosín-Gutiérrez² y Fernando Zamora¹

¹Universitat Rovira i Virgili/Facultat d'Enologia, departament de Bioquímica i Biotecnologia C/ Marcel·lí Domingo 1. 43007-Tarragona, España. fernando.zamora@urv.cat

²Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real, Spain

³Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha, Tomelloso, Ciudad Real, Spain
fernando.zamora@urv.cat

RESUMEN:

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la influencia de la adición de duelas de roble con diferente potencial en elagitaninos durante la microoxigenación del vino sobre su color y su composición. Para ello se procedió a microoxigenar (3ml/l.mes) un vino tinto durante tres meses en ausencia de duelas y en presencia de duelas de tres potenciales de liberación de elagitaninos. Los resultados confirman que a mayor potencial las duelas liberan realmente una mayor concentración de elagitaninos. La mayor presencia de elagitaninos parece ejercer un efecto protector de los antocianos. Por otra parte, parece existir también una relación entre el potencial en elagitaninos y la liberación de ciertos aromas del roble. Así, la concentración en furanos y whiskey lactona cis fue mayor en el IP medio, mientras que los fenoles volátiles alcanzaron valores mayores en el IP alto.

Palabras clave: Microoxigenación, duelas de roble, elagitaninos, aromas

1. Introducción

La estabilización de la materia colorante de los vinos tintos, así como la suavización de su astringencia inicial, precisan de un cierto aporte de oxígeno, necesario para favorecer toda una serie de reacciones en las que participan antocianos y proantocianidinas [1,2]. Gracias al aporte del oxígeno se producen combinaciones, polimerizaciones y condensaciones que generan la aparición de nuevos pigmentos más estables que modifican el matiz del color del vino y garantizan su longevidad [3,4].

Tradicionalmente, estas reacciones se desarrollan durante la crianza del vino en barricas de roble, a través de cuyas duelas, tiene lugar una microdifusión del oxígeno [5,6]. No obstante, la crianza del vino en barricas de roble es un proceso oneroso desde el punto de vista económico y complicado bajo el punto de vista de la organización de la bodega. Por esta razón muchas bodegas emplean de forma complementaria o alternativa la técnica de la

microoxigenación [7]. La microoxigenación complementada con la maceración de alternativos de roble es actualmente una práctica habitual como alternativa a la crianza en barricas de los vinos tintos.

Recientemente, la tonelería Radoux ha desarrollado una técnica analítica basada en el análisis espectrofotométrico del infrarrojo cercano (NIRS) de las duelas que permite clasificarlas en función de su potencial en elagitaninos (IP). El objetivo del presente trabajo fue el de estudiar la influencia durante la microoxigenación de la presencia de duelas de diferente IP.

2. Material y métodos

Un vino tinto de la variedad Cabernet Sauvignon se dispuso en 8 tanques de 165 litros de capacidad y 2,5 metros de altura. A grupos de dos tanques se les introdujeron duelas de roble francés de diferente potencial de liberación de elagitaninos (potencial bajo: IP20; potencial medio: IP40 y potencial alto: IP60) proporcionadas por tonelería Radoux-Pronektar. La proporción de duelas era la que reproducía la relación superficie/volumen de una barrica de 225 litros. Los dos tanques restantes se mantuvieron sin duelas y fueron considerados como control. Todos los tanques se sometieron a microoxigenación a la dosis de 3 ml/l.mes utilizando un equipo multidifusor (VISIO 2/6-Oenodev, Francia). Transcurridos tres meses los vinos fueron analizados.

El índice de polifenoles totales (IPT) se determinó de acuerdo con lo descrito por Ribéreau-Gayon *et al.* [9]. La intensidad colorante se midió de acuerdo con lo indicado por Glories [10]. La concentración de antocianos se determinó espectrofotométricamente mediante el método descrito por Niketic-Aleksic y Hrazdina [11]. Los elagitaninos se determinaron mediante HPLC [12] previa preparación de la muestra de acuerdo con la metodología descrita por García-Estévez *et al.* [13]. Los compuestos volátiles procedentes de la madera fueron determinados mediante CG [14].

3. Resultados

La Tabla 1 muestra los resultados correspondientes al color y los compuestos fenólicos de los diferentes vinos.

Tabla 1. Color y compuestos fenólicos

Parámetro	Vino inicial		MICROOXIGENACIÓN							
			Sin Duelas		Duelas IP20		Duelas IP40		Duelas IP60	
Intensidad colorante (IC)	13,6 ± 0,1	A	14 ± 0,1	B	14,4 ± 0,2	B	13,9 ± 0,1	B	13,8 ± 0,3	AB
Índice de polifenoles totales (IPT)	49,5 ± 0,6	A	49,6 ± 1,7	A	49,1 ± 1,2	A	51,3 ± 1,3	A	51,7 ± 1,2	A
Antocianos (mg/l)	466 ± 1	A	412 ± 6	B	398 ± 15	B	424 ± 1	C	427 ± 5	C
Taninos elágicos (mg/l)	-		-		1,7 ± 0,2	A	3,2 ± 0,4	B	7,8 ± 2,1	C

Como se puede ver en la tabla, existe una clara relación entre el contenido en elagitaninos de los vinos y la presencia de duelas de diferente IP. Cuando mayor es el IP de las

duelas mayor es el contenido en elagitaninos del vino. Estos datos confirman la eficacia del sistema de selección de las duelas mediante NIRS.

Todos los vinos microoxigenados presentaban una intensidad colorante algo superior al vino inicial antes de tratamiento, si bien en el caso del que contenía las duelas de mayor IP no había diferencias significativas. No se observaron diferencias significativas en el índice de polifenoles totales, si bien sí que se detectó una cierta tendencia a incrementarse en los vinos con las duelas de mayor potencial de liberación de elagitaninos (IP40 y IP60). Como era de esperar todos los vinos microoxigenados presentaban una menor concentración de antocianos que el vino original. En ese sentido los vinos con las duelas de IP40 y IP60 presentaban una concentración de antocianos significativamente mayor que el vino sin duelas y el vino con las duelas de menor IP. Estos resultados sugieren un efecto protector por parte de los elagitaninos aportados por las duelas de mayor IP.

La Tabla 2 muestra los resultados correspondientes a los principales compuestos volátiles procedentes de la madera.

Tabla 2. Compuestos volátiles procedentes de la madera

Parámetro	Vino inicial	MICROOXIGENACIÓN			
		Sin Duelas	Duelas IP20	Duelas IP40	Duelas IP60
Furanos (mg/l)	-	-	1043 ± 11 A	1428 ± 26 B	559 ± 345 C
Whiskey-lactona <i>trans</i> (µg/l)	-	-	75 ± 17 A	106 ± 94 AB	26 ± 25 B
Whiskey-lactona <i>cis</i> (µg/l)	-	-	63 ± 24 A	163 ± 16 B	21 ± 4 C
Fenoles volátiles (mg/l)	5,6 ± 0,3 A	6,0 ± 0,4 A	5,4 ± 0,4 A	6,2 ± 0,6 A	9,7 ± 2,0 B
Vainillina (µg/l)	-	-	608 ± 29 B	537 ± 2 C	746 ± 278 BC

La potencialidad en elagitaninos parece tener un efecto sobre la liberación de ciertos aromas por parte de las duelas. Así, la concentración en furanos, responsables de los aromas de frutos secos tostados, y en la whiskey lactona *cis*, responsable del aroma de coco alcanzan su máximo valor en los vinos que contenían las duelas con IP40, mientras que el valor mínimo se presenta en los vinos con las duelas de mayor IP. Este comportamiento parece ser parecido en el caso de la whiskey lactona *trans*, si bien la tendencia no es tan clara. A su vez, los vinos con duelas de IP60, presentaron la máxima concentración en fenoles volátiles. No se observó una tendencia clara en la vainillina.

4. Conclusiones

Existe una clara relación entre el IP de las duelas y la concentración en elagitaninos del los vinos. A mayor IP, mayor concentración. La mayor liberación en elagitaninos por parte de las duelas de mayor IP parece ejercer un efecto protector sobre los antocianos. Asimismo, parece que el IP de las duelas pudiera estar relacionado también con la liberación de ciertos aromas procedentes de la madera de roble.

5. Bibliografía

1. Zamora, F. 2003. Elaboración y crianza del vino tinto; aspectos científicos y prácticos. Editorial Mundi-Prensa; AMV Ediciones. Madrid.
2. Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. 1999. Phenolic Compounds. En "Handbook of enology, Vol 2 The chemistry of wine, Stabilization and treatments". John Wiley & sons, Ltd, Chichester, pp 129-186.
3. Fulcrand, H., Dueñas, M., Salas, E., Cheynier, V. 2006. Phenolic Reactions during Winemaking and Aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 289-297.
4. Zamora, F., (2013) La química del color del vino. *Revista de la SEBBM*, 176, 18-22.
5. Vivas, N. Glories, Y. 1993 Les phénomènes d'oxydo-reduction liés à l'élevage en barriques des vins rouges: Aspects technologiques. *Revue Française d'Enology*, 142, 33-38.
6. Nevares, I, Crespo, R., Gonzalez, C., del Alamo-Sanza, M. 2014. Imaging of oxygen transmission in the oak wood of wine barrels using optical sensors and a colour camera. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20, 353–360.
7. Boulet, J.C., Moutounet, M. 2000 Micro-oxigenación de los vinos. En "Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos". Ed Claude Flancy, Mundiprensa, Madrid. pp 638-640.
8. Michel, J., Jourdes, M., Le Floch, A., Giordanengo, T., Mourey, N., Teissedre, P.L. 2013. Influence of Wood Barrels Classified by NIRS on the Ellagitannin Content/Composition and on the Organoleptic Properties of Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61,11109–11118.
9. Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubordieu, D. 2006. In *Handbook of Enology. The Chemistry of Wine Stabilisation and Treatments*. Eds. Wiley. Chichester, U.K., Vol. 2, pp 141–203.
10. Glories, Y. (1984) La couleur des vins rouges. 2ème partie: mesure origine et interpretation. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 18, 253–271.
11. Niketic-Aleksic, G.K. and Hrazdina, G. 1972. Quantitative analysis of the anthocyanin content in grape juices and wines. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 5, 163–165.
12. Michel, J., Jourdes, M., Silva, M.A., Giordanengo, T., Mourey, N., Teissedre, P.L. 2011. Impact of concentration of ellagitannins in oak wood on their levels and organoleptic influence in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5677–5683.
13. García-Estévez, I., Escribano-Bailón, M.T., Rivas-Gonzalo, J.C., Alcalde-Eon, C. 2010. Development of a fractionation method for the detection and identification of oak ellagitannins in red wines. *Analytica Chimica Acta*, 660, 171-176.
14. Bárata A., Campo E., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V., Cacho, J., Ferreira V. 2011. Analytical and sensorial characterization of the aroma of wines produced with sour rotten grapes using GC-O and GC-MS: identification of key aroma compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2543-2553.

6. Agradecimientos

Agradecemos a la tonelería Radoux-Pronektar por proporcionarnos el material y a la CICYT (Proyectos AGL2011-29708-C02-01 y AGL2011-29708-C02-02) por la financiación.

CE04 - VISUALIZACIÓN DE LA MODIFICACIÓN DE LA HUMEDAD DE LA MADERA DE LAS BARRICAS DE ROBLE DURANTE LA CRIANZA DE VINOS

Roberto Martín, Sara Hernández, María del Álamo-Sanza, Ignacio Nevares

Universidad de Valladolid, UVaMOX, ETS Ingenierías Agrarias (Avda. Madrid, 44, 34001 Palencia, España)

inevares@iaf.uva.es

RESUMEN:

Este trabajo presenta los primeros resultados del desarrollo de un dispositivo que reproduce el escenario barrica y que permite visualizar el avance del frente de humedad en la madera, durante el proceso de envejecimiento. Para ello se ha medido la variación del pH de la madera con un sistema de medida de equipado con sensores luminiscentes que permiten trabajar de forma no destructiva y no invasiva. La relación entre la modificación del pH de la madera y su humedad permite visualizar el proceso de impregnación de la madera durante el envejecimiento.

Palabras clave: humedad, pH, madera, sensor óptico

1. Introducción

Las especies de roble *Quercus petraea* y *Quercus alba* son utilizadas en tonelería por sus características físico-mecánicas. Una diferencia importante entre estas dos especies es la permeabilidad a los fluidos, que está condicionada por la presencia de tilos, menos abundantes y de paredes más finas en el roble francés que en el americano, lo que condiciona el corte en hendidura de los primeros. Durante el envejecimiento de vinos en barricas, la madera se va humectando provocando cambios en su permeabilidad a los fluidos (1).

En este trabajo se ha estudiado la evolución de la humedad de la madera durante el envejecimiento mediante el control de la variación de su pH de manera no invasiva ni destructiva. Para ello, se ha diseñado y construido un dispositivo que reproduce el escenario barrica, provisto de sensores luminiscentes con un indicador sensible a la cantidad de hidrogeniones. La evaluación se ha realizado mediante el análisis ratiométrico de la imagen que se obtiene dividiendo la intensidad aportada por el canal de medida y el de referencia, lo permite establecer una medida relativa para contrarrestar interferencias. El sistema desarrollado ha permitido visualizar como se producía el aumento de la humedad de la madera desde el lado en contacto con el líquido hasta su interior. También se ha visualizado como el avance del frente de agua libre disuelve las sustancias de la madera modificando el pH. Estas sustancias extraídas con carácter ácido provocan la disminución del pH, tanto de la madera como del líquido, lo que permite de forma indirecta conocer la humedad de la madera.

2. Material y métodos

Maderas. Suministradas por la tonelería Duero (Aranda de Duero, Burgos) de *Q. petraea* con tostado medio. Se han mantenido en la sala de barricas con 15 ± 1 °C y un 85 ± 2 % de humedad relativa.

Humedad de la madera. Se han mantenido maderas de ambos tipos en 9 ambientes con diferente humedad relativa para alcanzar diferentes 9 niveles de humedad de equilibrio de la madera entre el 2,4 y el 24,1 %, confirmando su humedad relativa según la norma (EN13183-1).

pH de la madera por método óptico. El equipo de medida ha sido facilitado por la empresa Presens GmbH, equipado con un sensor (SF-HP5R), una cámara VisiSens DU02, y el software VisiSens A2 para la adquisición y tratamiento de imágenes. El equipo fue previamente calibrado empleando diferentes soluciones tampón de pH 3 a 5. La medida ha sido realizada en un dispositivo especialmente diseñado y construido que reproduce las condiciones de barrica.

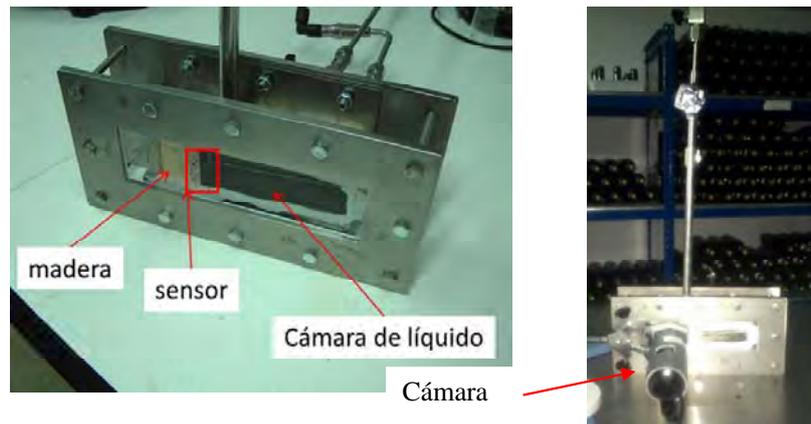


Figura 1. Dispositivo para realizar el seguimiento de la humedad de madera.

3. Resultados

Medida del pH de la madera. En el momento de llenado de la celda, el pH de la disolución era de 5. En la imagen figura 2, la línea verde separa la madera de roble (izquierda) y la disolución (derecha), se observa que el agua que está en contacto con la madera tiene unos colores naranjas, pH entre 2,5-3,1. El primer milímetro de madera también tiene colores naranjas, pero a partir de ese punto su pH es más bajo, predomina el color rojo (pH=1,9-2,5). Transcurridas 8 horas el frente de humedad alcanza el primer milímetro. Al tratarse de roble francés el avance de la humedad sigue siempre el radio medular. El pH hasta 1 mm esta entre 3,8 y 4,4. A partir de ahí hasta el 1,5 mm el pH es de 2,5 a 3,1 y el resto de la madera tiene un pH de 1,3 a 2,5. (figura 3).

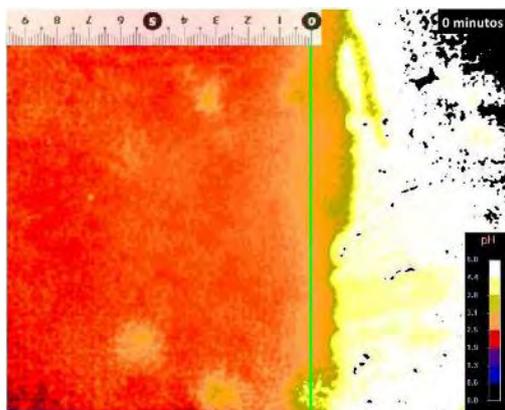


Figura 2

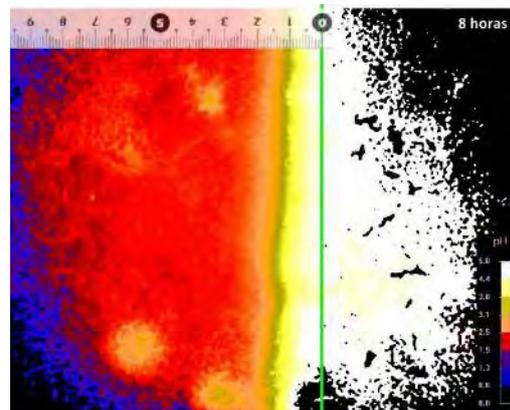


Figura 3

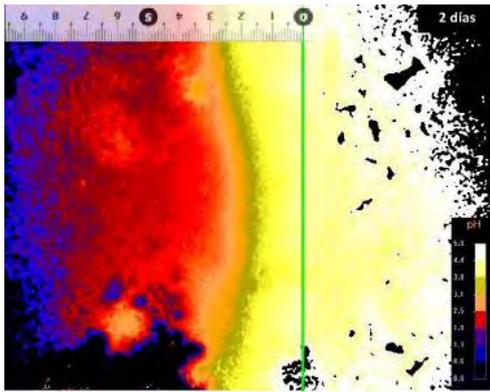


Figura 4

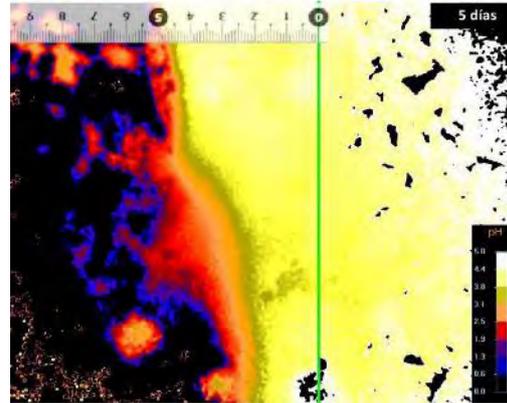


Figura 5

A los 2 días (figura 4) se observa que la disolución ha penetrado hasta los 3 mm de profundidad dominados por colores amarillos, pH 3,8 a 4,4. El pH del frente de humedad tiene colores más verdosos, pH=3,1. La madera después del frente de humedad está entre 2,5-3,1. En el resto de la madera se observa una gran diferencia con la imagen anterior, ya que esta tiene colores más rojizos (pH=1,9-2,5) y más azules (pH=0,6-1,3). Al disolver los compuestos de la madera su pH disminuye. Tras 5 días el frente de humedad alcanza los 5 mm, siguiendo el radio medular y por ello en la zona inferior el frente solo ha penetrado 2 mm. En la imagen se observa que no solo el pH de la madera ha cambiado, también el de la disolución, disminuyendo hasta valores de 3,8. El pH de los 5 mm de madera y el de la disolución es el mismo (figura 5).

Relación entre la humedad y el pH. La relación entre la variación del pH de la madera y su humedad puede ser empleada para medir la impregnación de la madera en contacto con un líquido. Por ello, se ha realizado una calibración del sistema con trozos de la misma madera sometida a 6 distintas humedades a los que se han realizado cinco medidas fotografías y se ha realizado un análisis ratiométrico. La calibración se ha aplicado a las imágenes previamente realizadas obteniéndose entonces la escala de humedad comprendida entre 1 y 25%, que es el punto de saturación de la fibra en las condiciones de trabajo.

En la figura 6 se observa que la humedad de la madera en el frente de humedad tiene color verdoso %H=15. En el primer milímetro la humedad es de 12%. El agua está penetrando por los poros de la madera y su pH el primer milímetro es de 2,5. Se observa el frente de humedad ha avanzado 1 mm siguiendo el radio medular, al tratarse de roble francés, en el frente la humedad esta entre 15-18% (figura 7). A medida que el frente de humedad avanza el pH de la madera pasa de las tonalidades naranjas (pH=2,5) del principio a colores rojizos (pH=1,9) (figura 8).

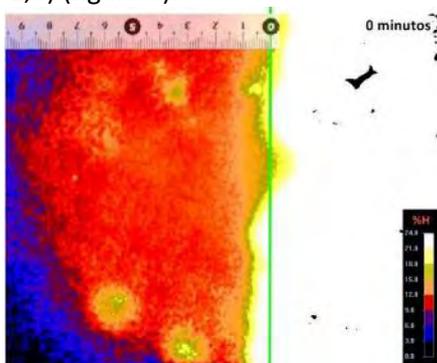


Figura 6

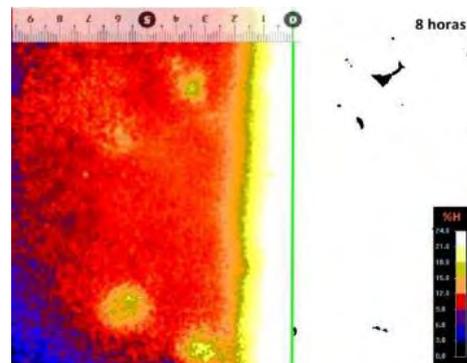


Figura 7

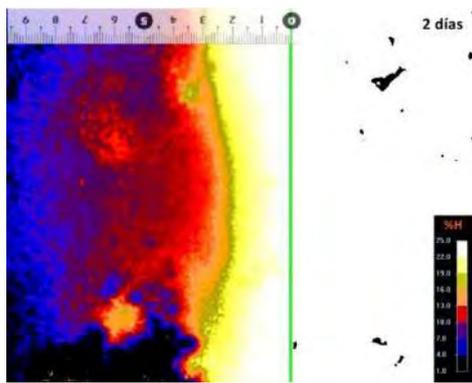


Figura 8

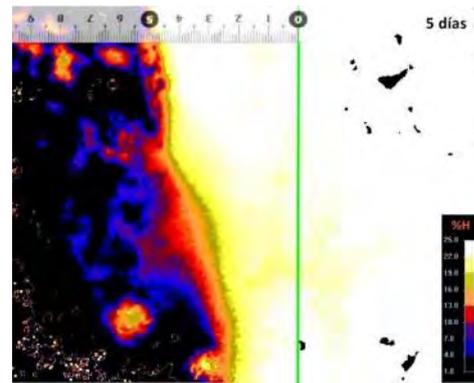


Figura 9

A los dos días el frente de humedad llega hasta los 2-3 mm, con una humedad entre 18-21% y un pH =4,4. Entre los 3 y 4 mm la humedad es de 9-12% con un pH 2,5-3,1. A partir de los 5 mm de espesor predomina la coloración morada y azul, una humedad mucho más baja 3-6%. Después de 5 días (Figura 9) el frente de humedad ha alcanzado los 4-5 mm aproximadamente (%H= 21-24%). Cuando nos alejamos hacia el interior de la madera adquiere tonalidades rojizas (%H=12%) y empiezan a aparecer los tonos azulados (%H=4-7). El pH de la madera también empieza a adquirir tonos azules en los últimos milímetros (pH=0,6).

4. Conclusiones

Se ha observado que a medida que la humedad de la madera aumenta debido a su contacto con el líquido en una de sus caras, el frente de agua libre avanza y disuelve compuestos de la madera. Estas sustancias extraídas con carácter ácido provocan la disminución del pH, tanto de la madera como del líquido. En la madera francesa se observa que el avance de la humedad está muy influenciado por la geometría estructural de la madera y es paralelo al radio medular. El mayor avance de la humedad se produce en las primeras 8 horas, después aumenta más lentamente, encontrándose que tras 5 días el frente ha alcanzado un máximo de 5-6 mm. El sistema puesto a punto se comporta razonablemente bien, ya que las correlaciones entre el pH y el contenido en humedad de la madera son buenas.

El aspecto más relevante es la capacidad del sistema para conocer el alcance del frente con un nivel de humedad, por encima de su punto de saturación de la fibra a partir del que empieza a haber agua libre dentro de la madera, de forma no destructiva, valores que por otro lado están en el límite de medida de los sistemas resisitivos o capacitivos.

5. Bibliografía

1. del Alamo-Sanza, M., & Nevares, I. 2014. Recent advances in the evaluation of the oxygen transfer rate in oak barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(35), 8892-8899.
2. Sara Hernández. 2014. Medida del grado de humectación de la madera mediante el control de la variación de su pH. TFG-Universidad de Valladolid.

6. Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Tonelería Duero, a la JCyL (VA124U14) y al MINECO (AGL2011-26931 y AGL2014-54602-P) por la ayuda recibida.

CE05 - MODIFICACION DE LA ENTRADA DE OXÍGENO POR LA MADERA DE LAS BARRICAS DE ROBLE DURANTE LA CRIANZA DE VINOS. EFECTO DE LOS ELAGITANINOS

Roberto Martín¹, Estrella Cadahía², Brígida Fernández de Simón², Ignacio Nevares¹, María del Álamo-Sanza¹

¹Universidad de Valladolid, UVaMOX, ETS Ingenierías Agrarias (Avda. Madrid, 44, 34001 Palencia, España) delalamo@qa.uva.es

²Centro de Investigación Forestal, CIFOR-INIA (Ctra. de la Coruña km. 7,5, 28080 Madrid, España)

RESUMEN:

La entrada de oxígeno por la madera de las barricas es un proceso que se produce durante todo el envejecimiento del vino. Algunos autores han postulado que los elagitaninos de la madera actúan como agentes bloqueantes de esta entrada, sin embargo en base a los recientes resultados obtenidos, se puede indicar que la relación entre la disminución de la entrada de oxígeno y los elagitaninos no es clara.

Palabras clave: barrica, elagitaninos, oxígeno, vino, madera

1. Introducción

La elección de la barrica se realiza en base a lo que la madera aporta al vino y a su evolución que está determinada por la disponibilidad de oxígeno, lo que define las propiedades finales del vino envejecido. El oxígeno puede entrar en la barrica por las uniones entre duelas y por la madera. Algunos autores han postulado que no es posible la entrada de oxígeno por la madera debido al bloqueo que sufre por los elagitaninos, fenómeno que sólo se produce en el caso de tener la madera húmeda, es decir empapada de vino. Según esta teoría, los elagitaninos bloquean la entrada de oxígeno porque lo consumen oxidándose impidiendo por tanto la oxigenación de los vinos (1). Nuestros trabajos previos han puesto de manifiesto que el oxígeno sí entra por la madera durante todo el proceso de envejecimiento (2, 3), tanto cuando se trata de barricas de roble americano, como de roble francés. La tasa de oxigenación que ofrecen las barricas a los vinos se modifica con el tiempo, por lo que se hace necesario definir una tasa dinámica de oxigenación, para no sobreestimar la dosis de oxígeno que reciben los vinos. Se ha encontrado que en los primeros dos meses la barrica dosifica al vino casi el 40% de todo el oxígeno que aportará en un año (4), aspecto muy importante en el proceso de envejecimiento. Con el fin de evaluar si efectivamente los elagitaninos consumen el oxígeno del aire, generando una barrera que impide el acceso del oxígeno al vino, en este trabajo se ha analizado el perfil de elagitaninos y de oxígeno de la duela de las barricas durante el proceso de envejecimiento.

2. Material y métodos

Maderas. Suministradas por la tonelería Duero (Aranda de Duero, Burgos) de *Q petraea* sin tostar, 15 duelas de madera cruda del mismo lote guardadas a 15 ± 1 °C y un 85 ± 2

% de humedad relativa. Se han extraído 12 muestras de estas 15 pre-duelas para el estudio tras 0, 1, 3, 6 y 9 meses de envejecimiento (4), analizándose los elagitaninos en un total de 75 piezas de madera y la tasa de entrada de oxígeno (OTR) en las otras 75 piezas. Con el fin de simular el proceso de envejecimiento a las diferentes piezas de madera se las ha sometido a contacto con vino sintético (14% v/v, pH=3.5) para evaluar exclusivamente el efecto en la madera. Todas las piezas cuentan con el mismo grosor, el habitual de las duelas empleadas en tonelería (27mm).

La medida de los elagitaninos de la madera se ha realizado siguiendo el método de Fernández de Simón y col. (5). Se ha evaluado el contenido en la zona inundada de la duela, en los diferentes momentos del estudio. Se han evaluado 8 elagitaninos (roburinas A, B, C, D, E, grandinina, vescalagina y castalagina), y posteriormente la suma de estos 8 compuestos ha permitido el cálculo de los elagitaninos totales, expresada en mg/g de madera.

Medida de la permeabilidad al oxígeno. Se ha realizado de acuerdo a la metodología propuesta por Navares y Del Alamo (4) y con el dispositivo patentado por estos autores (6) que se muestra en la figura 1. La evaluación del oxígeno que se acumula en la cámara permite calcular la tasa de entrada de oxígeno (OTR, expresada en mg/L.año) por la madera de la duela en condiciones de envejecimiento, para ello es necesario emplear un líquido que no consuma oxígeno, por lo que se emplea un vino sintético.

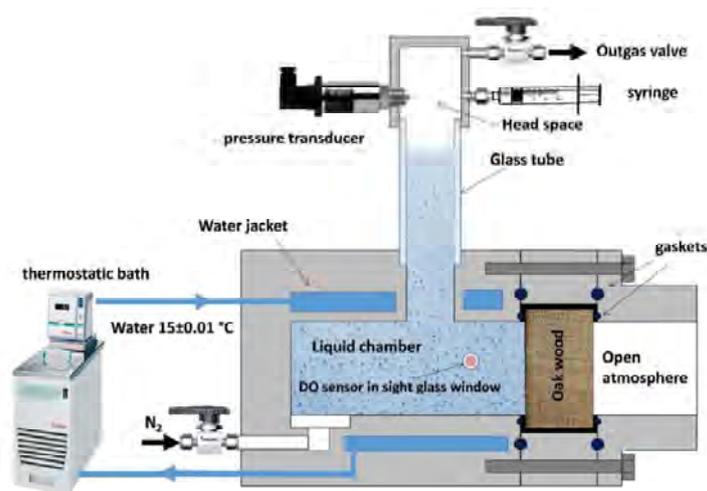


Figura 1. Dispositivo para la medida de la permeabilidad al oxígeno de la madera (4)

3. Resultados

Los resultados del análisis del OTR de la madera indican que la tasa de oxigenación de la madera seca es mucho más elevada que en el caso de la madera humectada. La variabilidad encontrada en la tasa de las 15 maderas crudas del mismo lote se puede deber a que la madera es un material natural, por lo que su estructura no es exactamente la misma en todas las preduelas estudiadas, y por ello tampoco su tasa de oxigenación. Se ha encontrado que la madera tras 1 año de permanencia con vino sintético sí deja pasar el oxígeno (figura 2), resultado que también se ha observado en otra experiencia con maderas tostadas.

El análisis del contenido en elagitaninos en la zona inundada de la madera de las distintas piezas, durante el proceso de humectación (contacto con vino sintético), se muestra en la figura 2. Se puede observar que en general la suma de los elagitaninos estudiados

disminuye con el tiempo, debido al proceso propio del envejecimiento de vinos en el que se produce la extracción y disolución hacia el líquido.

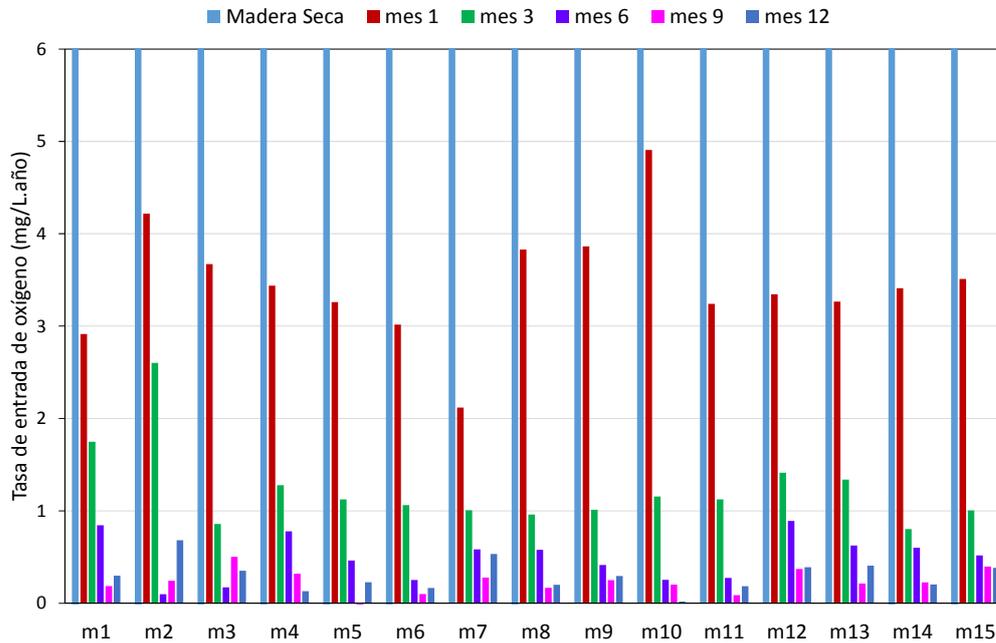


Figura 1.- Evolución de la tasa de entrada de oxígeno en 15 maderas.

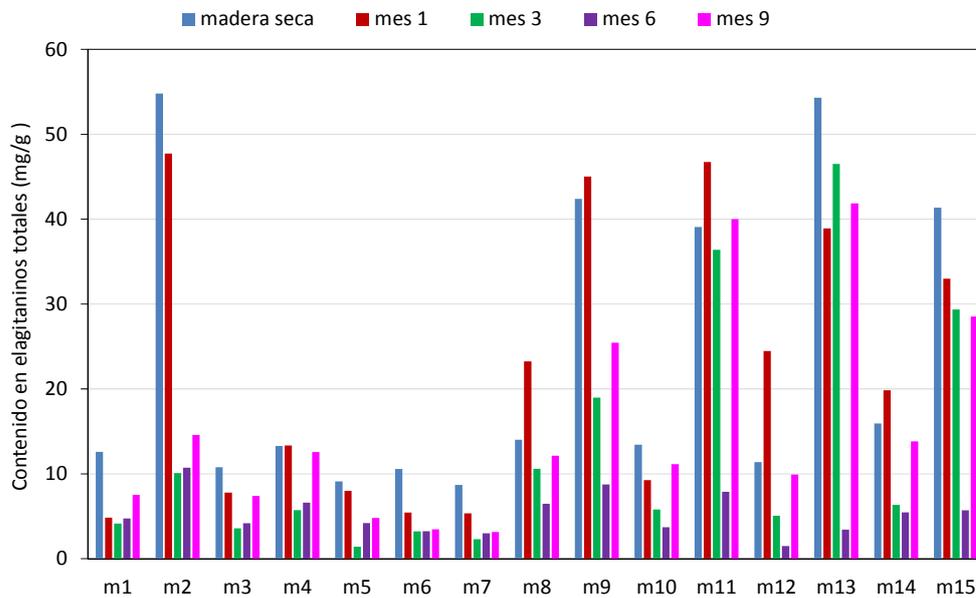


Figura 2.- Evolución del contenido en la suma de elagitaninos en 15 maderas.

Se ha evaluado la relación entre la variación del OTR de la madera en cada momento (mes 1, mes 3, mes 6 y mes 9) estudiado respecto al OTR inicial de la madera y la variación del contenido en elagitaninos de la madera de la capa inundada en cada momento (mes 1, mes 3, mes 6 y mes 9) respecto a su valor inicial en la madera seca. Se ha encontrado que no guardan una relación estadísticamente significativa en ninguno de los meses estudiados (mes 1: $r=0.4506$, $p=0.0919$, mes=3: $r=0.2803$, $p=0.3116$, mes=6: $r=-0.0553$, $p=0.8448$ y mes=9: $r=0.3744$, $p=0.1692$).

4. Conclusiones

Los resultados nos indican que no hay una relación directa entre el descenso en la tasa de entrada de oxígeno por la madera y la variación en el contenido de los elagitaninos de la madera, que son extraídos o que pudieran ser oxidados.

5. Bibliografía

3. Singleton, V. L. (1995). Maturation of Wines and Spirits: Comparisons, Facts, and Hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(1), 98-115
4. Nevares, I., Crespo, R., Gonzalez, C., & del Alamo-Sanza, M. (2014). Imaging of oxygen transmission in the oak wood of wine barrels using optical sensors and a colour camera. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20(3), 353-360.
5. del Alamo-Sanza, M., & Nevares, I. (2014). Recent advances in the evaluation of the oxygen transfer rate in oak barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(35), 8892-8899.
6. Nevares, I., & del Alamo-Sanza, M. (2015). Oak Stave Oxygen Permeation: A New Tool To Make Barrels with Different Wine Oxygenation Potentials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(4), 1268-1275.
7. Fernández de Simón, B., Sanz, M., Cadahia, E., Poveda, P., & Broto, M. (2006). Chemical Characterization of Oak Heartwood from Spanish Forests of *Quercus pyrenaica* (Wild.). Ellagitannins, Low Molecular Weight Phenolic, and Volatile Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 8314-8321.
8. Del Alamo Sanza, M., & Nevares Domínguez, I. (2012). Device for measuring the permeability and diffusivity of gases in porous materials and method for measuring said parameters using the device. WO2012107625 A1.

6. Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Tonelería Duero, a la JCyL (VA124U14) y al MINECO (AGL2014-54602-P) por la ayuda recibida para el desarrollo de esta experiencia.

CE06 - APLICACIÓN DE LA MICROOXIGENACIÓN AL ENVEJECIMIENTO DEL VINAGRE DE JEREZ

Adrián Luís Leonés Gil, Enrique Durán Guerrero, Remedios Castro Mejías, Carmelo García Barroso, Ramón Natera Marín

Universidad de Cádiz, Campus de Excelencia Agroalimentario, Facultad de Ciencias-CAIV,
Departamento de Química Analítica, Polígono Río San Pedro, 11510 Puerto Real, España.
ramon.natera@uca.es

RESUMEN:

El envejecimiento en madera es una práctica usualmente empleada en Enología con el fin de proporcionar al producto joven ciertas características, tanto organolépticas como fisicoquímicas, que lo transforma en otro de mayor calidad y más apreciado por el consumidor. El objetivo del trabajo fue el de controlar el proceso natural de envejecimiento del vinagre en botas de roble pero acelerándolo con el aporte externo de oxígeno mediante un dispositivo de microoxigenación. El estudio contempló seis semanas, con un muestreo semanal. Los análisis llevados a cabo han sido: oxígeno disuelto, parámetros CIELab y compuestos volátiles. Este estudio ha permitido evaluar la influencia de tiempo y dosis de oxígeno sobre parámetros directamente relacionados con la calidad del producto obtenido.

Palabras clave: Microoxigenación, compuestos volátiles, vinagre de Jerez.

1. Introducción

El envejecimiento en madera es una práctica usualmente empleada en Enología con el fin de proporcionar al producto joven ciertas características, tanto organolépticas como fisicoquímicas, que lo transforma en otro de mayor calidad y más apreciado por el consumidor. Sin embargo, es un proceso lento y costoso. En el caso del vinagre de Jerez, el vinagre joven se envejece por un período mínimo de seis meses, llegando a períodos de diez años o más. Durante este proceso, fundamentalmente, dos factores entran en juego de manera conjunta. Por un lado, el contacto del producto con la madera de la bota y, por otro, gracias a la porosidad de ésta, la difusión de oxígeno al interior, en pequeñas cantidades (1). Este proceso podría emularse y acelerarse, manteniendo el contacto con la madera mediante el uso de la microoxigenación en bota. Esta técnica consiste en la aplicación de oxígeno en forma de microburbujas (2-5).

El objetivo del trabajo ha sido el de controlar el proceso natural de envejecimiento del vinagre de Jerez en botas de roble americano pero acelerándolo con el aporte externo de oxígeno mediante un dispositivo de microoxigenación. Se realizaron análisis de los compuestos volátiles, parámetros CIELab y tratamiento estadístico de los resultados obtenidos.

2. Material y métodos

2.1 Muestras.

Se contó con cinco botas de roble americano, de 600 litros de capacidad, conteniendo cada una de ellas 500 litros de vinagre joven apto de la D.O. Vinagre de Jerez. Se tomó una de

las botas como testigo, y a las demás se le aplicó oxígeno bajo dos flujos distintos, por duplicado, de 40 y 70 mL/L/mes, respectivamente, mediante un dispositivo de microoxigenación. La experiencia tuvo una duración 42 días y se tomaron muestras semanalmente (0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días). El equipo de microoxigenación, DosiOx modelo SX1, ha sido suministrado por Productos Agrovín (Alcázar de San Juan, España). Se empleó oxígeno agroalimentario, suministrado por Abelló Linde S.A. En todas las experiencias y en cada toma de muestra se midió la cantidad de oxígeno disuelto mediante un oxímetro CRISON OXI 45 P (HACH LANGE, S.L.U., España).

2.2 Compuestos volátiles.

2.2.1 Extracción por absorción en barra agitadora.

Los compuestos volátiles se determinaron mediante la técnica de extracción por absorción en barra agitadora en espacio de cabeza, desorción térmica y cromatografía gaseosa con detector de espectrometría de masas (HSSE-TD-GC-MS). El método de extracción empleado para el caso de volátiles cedidos por la madera (whisky lactona, vainillina, 4-etilguaicol, furfural, 5-metilfurfural, butirolactona, furfurilalcohol, eugenol, guaiacol, y Maltol) contempló: barra agitadora de PDMS (20 mm de longitud y 0.5 mm de anchura; Gerstel (Mülheim a/d Ruhr, Germany)); 5 mL de muestra con 100 µl de una disolución de 4-metil-2-pentanol (2.516 g/l en solución hidroalcohólica al 15 % v/v); NaCl hasta saturación; y agitación a 2000 rpm durante 120 minutos a temperatura ambiente. Tras la extracción, se llevó a cabo la desorción térmica. Para el caso del resto de constituyentes volátiles se empleó el método descrito con anterioridad por los autores (6).

2.2.2. Análisis por cromatografía de gases con detector de masas.

La desorción térmica y el posterior análisis, de todos los constituyentes volátiles, por cromatografía de gases con detector de masas se llevó a cabo bajo las condiciones detalladas por los autores (6). La identificación de los picos se llevó a cabo usando la librería Wiley (Wiley Registry of Mass Spectral Data, 7th Edition, 2000), por analogía con los espectros de masas y confirmados por comparación con los tiempos de retención de patrones comerciales. Los datos cuantitativos de los compuestos identificados se obtuvieron midiendo el área relativa del ion molecular de cada compuesto, en relación a la del 4-metil-2-pentanol, el patrón interno.

2.3 Análisis del color.

Se registró el espectro UV-vis de las diferentes muestras, cada 10 nm, en el intervalo de 380-770 nm, empleando un espectrofotómetro JASCO V-530 UV/VIS para posterior cálculo de los parámetros CIELab. Como iluminante se utilizó el D65 con un ángulo de observación de 10°.

2.4 Estudios estadísticos.

Los datos analíticos han sido sometidos a análisis de la varianza (ANOVA) considerando como factores independientes tiempo de permanencia en bota y dosis de oxígeno suministrada. Como técnica multivariante, a fin de observar posibles similitudes entre las distintas muestras, se ha empleado el análisis de clusters (método de Ward; distancia euclídea al cuadrado). Para ello se ha empleado el paquete estadístico Statgraphics Centurion, versión 15.0 (Statpoint Inc., VA, USA).

3. Resultados

El estudio de la varianza llevado a cabo sobre el contenido en compuestos volátiles cedidos por la madera puso de relieve que eran pocos los compuestos que mostraban verse afectados significativamente por estos dos factores ($p < 0,05$). La variable dosis de oxígeno mostró influencia significativa sobre whisky lactona y etilguaicol, con valores más altos para dosis más altas. La variable tiempo, sin embargo, se mostró significativa sobre un mayor número de compuestos: vanillina, furfural, butirolactona, furfural alcohol y eugenol. Varios de estos compuestos incrementan su presencia en los vinos hasta el día 35, para descender posteriormente (datos no mostrados).

El análisis de clusters al que se sometieron estos datos puso de relieve que las muestras no mostraban claros agrupamientos en función de tiempo o dosis de oxígeno, dejando ver nuevamente que ambos factores no habían sido decisivos en las cantidades encontradas para los compuestos considerados. Si bien, son las muestras correspondientes a 35 días de envejecimiento las que demuestran una mayor diferenciación respecto al resto de muestras, hecho éste que ya fue adelantado por el ANOVA (datos no mostrados).

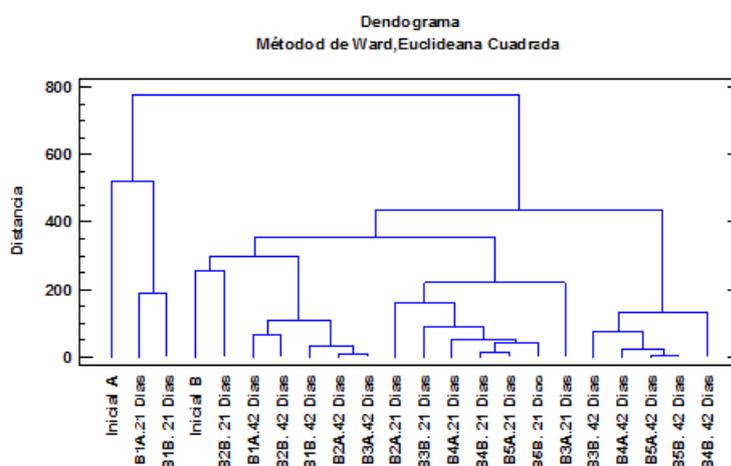


Figura 7: Análisis de clusters. Compuestos volátiles propios del vinagre de partida.

Ante los pocos cambios significativos sobre la fracción volátil estudiada, constituida por compuestos característicos por la cesión de la madera, se decidió ampliar el estudio al resto de constituyentes volátiles. En este caso, las muestras analizadas han sido, las iniciales, tras 21 días y tras 42 días de permanencia en bota. Los datos fueron sometidos a un nuevo análisis de clusters (Figura 1). Como se puede observar en el dendrograma obtenido, son tres los clusters obtenidos: uno correspondiente a las muestras iniciales sin microoxigenación (inicial, B1.21 días); otro correspondiente a muestras sometidas a 40 mL/Lmes de oxígeno tras 21 y 42 días (B2.21 días, B2.42 días, B3.21 días, B3.42 días) junto a muestras sometidas a mayor dosis de oxígeno (70 mL/Lmes) pero tras solo 21 días, (B4.21 días y B5.21 días); y un tercer grupo correspondiente a las muestras sometidas a mayor dosis de oxígeno y tiempo de permanencia en bota (B4. 42 días y B5. 42 días). Es de destacar que las muestras sometidas a menor dosis de oxígeno (B1, B2 y B3) y más tiempo de permanencia en bota (42 días) muestran mayor similitud con aquellas sometidas a mayor dosis de oxígeno (B4 y B5) y permanencia en bota intermedia (21 días).

En cuanto a color, el ANOVA ha permitido detectar diferencias en los parámetros cromáticos a partir de 21 días de envejecimiento en madera. Para tiempos superiores a 21 días, los vinos tienen menos luminosidad, con valores más altos de a^* (más rojo) y de b^* (más amarillo). Estos resultados fueron corroborados en el posterior análisis de clusters, en el que se obtuvo un claro agrupamiento en función del tiempo de permanencia en madera, observándose dos claros clusters, uno correspondientes a muestras de menos de 28 días de permanencia en bota y otro con muestras de 28, 35 y 42 días de permanencia en bota.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos han puesto de relieve pocos cambios en compuestos volátiles propios de la madera de roble, si bien se han detectado cambios significativos en aquellos constituyentes volátiles ya presentes en el vinagre de partida, posiblemente fruto de una mayor influencia del aporte adicional de oxígeno. En el caso del color, sí se observan mayores diferencias entre las muestras estudiadas, si bien estas parecen obedecer a tiempo de permanencia en bota.

5. Bibliografía

1. Durán Guerrero, E.; Castro Mejías, R.; Natera Marín, R.; Ruiz Bejarano, M.J.; Rodríguez Doderó, M.C.; Barroso, C.G. (2011) Accelerated aging of a Sherry wine vinegar on an industrial scale employing microoxygenation and oak chips. *Eur Food Res Technol*, 232, 241–254.
2. Cano-López, M.; Pardo-Mínguez, F.; Schmauch, G.; Saucier, C.; Teissedre, P.L.; López-Roca, J.M.; Gómez-Plaza, E. (2008) Effect of micro-oxygenation on color and anthocyanin-related compounds of wines with different phenolic contents. *J Agric Food Chem*, 56, 5932–5941.
3. Llaudy, MC.; Canals, R.; González-Manzano, S.; Canals, JM.; Santos-Buelga, C; Zamora, F. (2006) Influence of micro-oxygenation treatment before oak aging on phenolic compounds composition, astringency, and color of red wine. *J Agric Food Chem*, 5, 4246–4252
4. Ortega, M.; Rivero-Pérez, MD.; Pérez-Magariño, S.; González-Huerta, C.; González-Sanjosé, ML. (2008) Changes in the volatile composition of red wines during aging in oak barrels due to microoxygenation treatment applied before malolactic fermentation. *Eur Food Res Technol*, 226, 1485–1493.
5. Pérez-Magariño, S.; Sánchez-Iglesias, M.; Ortega-Heras, M.; González-Huerta, C.; González-Sanjosé, ML. (2006) Color stabilization of red wines by microoxygenation treatment before malolactic fermentation. *Food Chem*, 101, 881–893.
6. Durán, E.; Natera, R.; Castro, R.; García-Barroso, C. (2006). Optimisation of stir bar sorptive extraction applied to the determination of volatile compounds in vinegars. *Journal of Chromatography A*, 1104, 47-53.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen a la empresa AECОВI, Soc. Cop., el suministro de las muestras y las facilidades dadas para la realización del estudio.

CE07 - DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ENVEJECIMIENTO ACCELERADO A ESCALA PLANTA PILOTO. APLICACIÓN AL ENVEJECIMIENTO DE VINOS OLOSOSOS

Manuel M^a Sánchez Guillén, Daniel Butrón Benítez, M^a Carmen Rodríguez Dodero, M^a Valme García Moreno, Dominico A. Guillén Sánchez, Carmelo García Barroso

Centro Andaluz de Investigaciones Vitivinícolas, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), Ed. Institutos de Investigación 1^a Planta, Campus Universitario Río San Pedro, cp 11510 Puerto Real, Cádiz
manuel.sanchez@gm.uca.es

RESUMEN:

En los últimos años se han desarrollado una serie de técnicas alternativas que permiten desarrollar procesos de envejecimiento de una forma más eficiente y controlada. Sin embargo, ninguna de estas alternativas ha conseguido por sí sola reducir apreciablemente los tiempos necesarios para alcanzar las características organolépticas debidas a una larga crianza tradicional. En este artículo se exponen el diseño de una planta piloto para el envejecimiento acelerado de vino. Se realizaron distintos ensayos con vinos olorosos jóvenes (sobretablas) para optimizar el proceso. Los resultados confirman que se trata de un procedimiento efectivo para envejecer en cortos períodos vinos de crianza oxidativa

Palabras clave: Envejecimiento acelerado, ultrasonidos, microoxigenación, planta piloto

1. Introducción

Desde la Antigüedad, los vinos han sido envejecidos, si bien el comienzo de este procedimiento fue más una consecuencia que un objetivo. Cuando el vino era transportado desde las regiones productoras hasta los centros de consumo pasaban largos períodos confinados en los barriles que los contenían, cambiando durante el proceso sus características organolépticas. Este hecho permitió que durante la Edad Antigua se apreciaran los vinos envejecidos sobre los jóvenes. Sin embargo no fue hasta la Época de los Descubrimientos que el añejamiento volvió a hacerse imprescindible dado los largos viajes que se hacían entre las tierras descubiertas y el Viejo Continente. Además, el aumento de consumo en el Norte de Europa de vinos viejos como jereces y oportos, favoreció todavía más la inclusión de la etapa de crianza como necesaria en el proceso global de elaboración de vinos. Consecuentemente los consumidores han interiorizado las características de los vinos envejecidos como sinónimas de calidad, añadiendo un valor suplementario al producto final.

Desde que los fenómenos relacionados con el envejecimiento han sido estudiados y comprendidos se ha intentado reproducirlos de forma más eficiente. El mayor avance en este sentido ha sido la microoxigenación [1], existente desde mediados de los años 80. Sin embargo, ésta no es capaz de acortar de forma sensible por sí sola los tiempos de envejecimiento.

En este artículo se expone el diseño y la operación de un sistema de envejecimiento acelerado a escala planta piloto con el que se han realizado diversos ensayos a fin de optimizar su funcionamiento aplicado a la elaboración de vinos olorosos de Jerez.

2. Material y métodos

Los vinos usados han sido olorosos con menos de 1 año de crianza, suministrados por González Byass S.A. (Jerez de la Frontera, Cádiz España), Bodegas Luis Caballero S.A. (El Puerto de Santa María, Cádiz, España) y Bodegas Barbadillo S.L. (Sanlúcar de Barrameda, Cádiz, España).

La madera necesaria se ha usado en forma de virutas de roble español, francés y americano, con tamaño medio (12 x 6,5 x 1,5 mm) y tostado medio según el fabricante.

La planta piloto se compone de un sistema de generación de ultrasonidos, con 8 salidas de 1 kW de potencia sónica cada una (sonotrodos), controlado mediante un autómata (PLC) (Ultrasonidos Lover, Massalfassar, Valencia, España), un sistema de inyección de oxígeno de 4 electroválvulas abierta/cerrada, controladas por el mismo PLC que los ultrasonidos (Al Air Liquide España, S.A., Madrid, España) y 7 depósitos de acero inoxidable AISI 316 con un diámetro de 21 cm y una altura de 2 m, y una capacidad efectiva tras introducir el sonotrodo de 50 L. La madera se coloca según la cantidad en bolsas de gasa de algodón lastradas a fin de que no floten y se distribuyan a lo largo de la altura del depósito.

El color de las muestras se caracterizó mediante un espectrofotómetro Helios UV-VIS (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EEUU), midiendo el espectro entre 380 y 750 nm. El índice de polifenoles totales (IPT) según el método de Folin-Ciocalteu [2] se determinó usando el mismo espectrofotómetro, y como reactivos se emplearon reactivo de Folin y carbonato sódico (Panreac Química S.L.U., Castellar del Vallès, Barcelona, España). Se cuantificaron polifenoles individuales mediante UPLC-PDA [3], con agua MilliQ (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, EEUU), acetonitrilo y ácido acético (Panreac Química S.L.U., Castellar del Vallès, Barcelona, España) como componentes en las fases móviles. Los ácidos orgánicos de cadena corta se midieron mediante HPLC-Conductimetría [4] usando agua MilliQ y ácido trifluoroacético (TFA), ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) y 2,2-Bis(hidroximetil)-2,2',2''-nitriлотrietanol (BIS-TRIS) (Sigma-Aldrich Química, S.L., Tres Cantos, Madrid, España). Las muestras también fueron evaluadas por un panel de cata semientrenado (UNE 87 024-1) en una sala de cata normalizada (UNE-EN ISO 8589), donde se minimiza la influencia de estímulos externos en los juicios emitidos. La Tª de la sala se fijó en 22 °C. Se aplicó para ello una prueba descriptiva, consensuándose previamente los descriptores analizados.

3. Resultados

Se realizaron tres experimentos distintos a fin de comprobar el funcionamiento del sistema y poder optimizar las condiciones de inyección de oxígeno y aplicación de ultrasonidos.

El primer ensayo se usó para caracterizar el propio sistema de ultrasonidos. Para ello los tres olorosos fueron envejecidos sin adición de oxígeno. Las condiciones de operación fueron: 50 L de vino oloroso, sometido a una potencia de ultrasonidos de 1kW durante un

minuto seguido de 4 minutos de pausa, durante un mes con muestreos semanales. La madera utilizada fueron 10 g/L de virutas nuevas de roble americano. Bajo estas condiciones los tres vinos ensayados aumentaron sensiblemente su carga fenólica. El UPLC confirmó como hechos más destacado el aumento de ácido gálico, el aumento de ácido vainílico y la disminución de vainillina (similar al envejecimiento tradicional) y la rápida extracción de aldehídos aromáticos (siringaldehído, coniferilaldehído y sinapaldehído). Los ácidos orgánicos de cadena corta (tartárico, málico, succínico, láctico y acético) aumentan ligeramente respecto las muestras iniciales. En cuanto al color, el parámetro L* disminuyó, y a* y b* aumentaron, como cabría esperar en un vino envejecido [5]. Por último en cuanto al análisis sensorial, las muestras preferidas por el panel de cata fueron las de 2 semanas de tiempo de envejecimiento, frente a las envejecidas durante 3 y 4 semanas, debido a la aparición de un aroma descrito como “herbáceo, madera verde” y catalogado como defecto.

Con el segundo ensayo se puso a punto la unidad de oxigenación, una vez que se consiguió configurar el PLC según nuestros requerimientos para que la inyección de oxígeno se pudiera realizar en dos intervalos y controlar el tiempo de separación entre la inyección de oxígeno y la aplicación de ultrasonidos. Tras los resultados anteriores se decidió reducir el tiempo de aplicación de ultrasonidos, quedando el ciclo de operación de la siguiente forma: 1 min ultrasonidos, 5 min pausa, 1 min de oxigenación, 30 min de pausa, 1 min de oxigenación, 30 min de pausa. Además, en este ensayo se quiso probar el efecto de la cantidad de virutas empleada y su tratamiento previo. Para ello se usaron 3 depósitos de 50 L llenos del mismo vino oloroso, a los que se les añadió respectivamente 10 g/L de chips nuevos (dosis empleada en el ensayo anterior), 5 g/L de chips nuevos (media dosis) y 10 g/L de chips provenientes del ensayo anterior (usados), de roble americano en todos los casos. De forma general se observa un incremento leve en el IPT de los tres tipos de muestras, siendo mayor para la viruta nueva 10 g/L, seguido por la viruta usada 10 g/L y la viruta nueva 5 g/L. Sin embargo al comparar los polifenoles mediante UPLC se comprueba que la viruta usada es la que menos cede en comparación con las otras dos, siendo además su evolución a lo largo del proceso distinta. Los ácidos orgánicos apenas varían durante el proceso. El color también permaneció constante si bien la coordenada a* tendió a reducir ligeramente su valor. El análisis sensorial determinó la preferencia de los jueces por las muestras con viruta usada frente a las otras dos, ya que ésta poseía un nivel de defecto (aroma herbáceo, madera verde) significativamente inferior y un nivel del carácter denominado “maderizado” evaluado como débil frente al medio-intenso que poseían los ensayos con viruta nueva. Todas estas características positivas de la muestra con viruta usada se mantienen durante las dos primeras semanas de envejecimiento, ya que en la tercera, aun siendo débil comienza a notarse el defecto antes mencionado y a incrementarse el valor del descriptor “maderizado”. A partir de estos resultados se planteó usar un método de envinado acelerado para virutas y usarlas posteriormente [6].

La tercera prueba, que se realizó simultáneamente con la segunda, sirvió para ensayar chips de roble español y roble francés. Las condiciones de aplicación de oxígeno y ultrasonidos fueron las mismas que en el experimento anterior. Se usaron dos vinos olorosos distintos a los que se les añadió 10 g/L de viruta nueva, de ambos robles respectivamente. Dada la preferencia de los jueces del panel de cata por las muestras envejecidas durante dos semanas se decidió que para este tercer experimento ésa fuera la duración. En este caso se muestra una clara diferencia entre los dos olorosos en su origen. De forma general el roble español genera una mayor concentración de polifenoles al final del proceso respecto al roble francés. Sin embargo, en lo relativo a polifenoles individuales, el francés destaca en la cesión de ácido siríngico en el oloroso que menos poseía en el origen. El análisis de polifenoles individuales, muestra que es el tipo de vino, más que la madera, el que marca la evolución de dichos

compuestos durante el envejecimiento: para el oloroso de González Byass, el ácido siríngico crece al final del proceso en ambas maderas mientras que para Luis Caballero decrece, al igual que la vainillina. En cambio, coniferilaldehído en el oloroso de González Byass presenta un descenso de concentración al final del proceso, mientras que los de Luis Caballero crecen. En cuanto a los ácidos orgánicos, lo más destacable es el descenso en todas las muestras en ácido succínico. Las muestras se oscurecieron (descenso del parámetro L*) más intensamente con el roble español, mientras que los parámetros a* y b* de color permanecieron constantes. Por último los jueces evaluaron positivamente las muestras, aunque se decantaron por las de roble francés, remarcando especialmente el carácter “especiado”.

4. Conclusiones

A la vista de los resultados, puede afirmarse que el método propuesto cumple con el fin que se diseñó. Los experimentos han demostrado un enriquecimiento de los vinos en sustancias polifenólicas y la evolución de dichas sustancias hacia valores en los que se encuentran en vinos envejecidos de forma tradicional. Los análisis sensoriales, sin embargo, muestran como la excesiva aplicación de ultrasonidos puede conducir a la aparición de aromas no deseables. El sistema permite la elaboración de vinos en 2 semanas con marcadas características de envejecimiento, si bien es necesario optimizar el método para poder ofrecer un producto afinado al punto de lo que se espera como vino oloroso.

5. Bibliografía

1. Roig, G., Yerle, S. 2003. Balance y perspectivas de 10 años de microoxigenación. *In: ACE Enología. Associació Catalana d'Enòlegs*.<http://www.acenologia.com/>.
2. Singleton, V.L., Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *In: American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144–158.
3. Schwarz, M., Rodríguez, M.C., Guillen, D.A., Barroso, C.G. 2009. Development and validation of UPLC for the determination of phenolic compounds and furanic derivatives in Brandy de Jerez. *In: Journal of Separation Science*. 32-11, 1782-1790.
4. Guillen, D.A., Barroso, C.G., Zorro, L., Carrascal, V., Perez-Bustamante, J.A. 1998. Organic acids analysis in "Brandy de Jerez" ion-exclusion chromatography, "post-column" buffering and conductimetric detection. *In: Analisis* 26-4, 186-189.
5. Schwarz, M., Rodríguez, M.C., Guillen, D.A., Barroso, C.G. 2012. Evolution of the colour, antioxidant activity and polyphenols in unusually aged Sherry wines. *In: Food Chemistry*. 133-2, 271-276.
6. Schwarz, M., Rodríguez, M.C., Sanchez, M., Guillen, D.A., Barroso, C.G. 2014. Development of an accelerated aging method for Brandy. *In: LWT-Food Science and Technology*. 59-1, 108-114.

6. Agradecimientos

Los autores desean agradecer el apoyo al proyecto FEDER INNTERCONECTA “INNTERVINANDAL ITC20131018 ITC-20131018” y a las Bodegas González Byass S.L.U, Bodegas Luis Caballero S.L. y Bodegas Barbadillo S.L.

CE08 - DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ENVEJECIMIENTO ACCELERADO A ESCALA PLANTA PILOTO. APLICACIÓN AL ENVEJECIMIENTO DE DESTILADOS

Manuel M^a Sánchez Guillén, Daniel Butrón Benítez, M^a Carmen Rodríguez Dodero, M^a Valme García Moreno, Dominico A. Guillén Sánchez, Carmelo García Barroso

Centro Andaluz de Investigaciones Vitivinícolas, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (ceiA3), Ed. Institutos de Investigación 1^a Planta, Campus Universitario Río San Pedro, cp 11510 Puerto Real, Cádiz
manuel.sanchez@gm.uca.es

RESUMEN:

La revolución que ha supuesto la implantación de técnicas alternativas al envejecimiento tradicional como la microoxigenación no se ha visto reflejada al mismo nivel en el mundo de los destilados. Existen pocas empresas que apliquen una tecnología alternativa en este campo. Dada la cantidad de tiempo, dinero, espacio y personal que requiere la crianza tradicional, una alternativa que redujera todas esas necesidades podría ser rentable. El objetivo de este artículo es el estudio y aplicación de una planta piloto para la elaboración de vinos y espirituosos envejecidos de forma acelerada, con la que se han conseguido muestras con rasgos de aroma y gusto similares a brandis envejecidos de forma tradicional.

Palabras clave: Envejecimiento acelerado, ultrasonidos, microoxigenación, planta piloto, destilados, brandis

1. Introducción

Muchas de las bebidas destiladas más conocidas en el mundo (whisky, ron, brandy, etc.) requieren una etapa de añejamiento en madera, dado que las características organolépticas del producto final fundamentalmente se generan durante esta etapa. Ello implica la generación de unos altos costes de producción, debidos principalmente al tiempo, al espacio y la mano de obra implicada, así como el coste de inmovilizado de los stocks creados. Todo lo anterior hace que los espirituosos envejecidos alcancen elevados precios de venta al público, a la vez que paulatinamente los productores reducen el volumen en la etapa de envejecimiento. Una segunda consecuencia es la poca o nula disposición de los productores a desarrollar nuevos productos que precisen envejecimiento, dado el riesgo inherente de elaborar una cantidad de dicho producto durante el tiempo necesario con los costes asociados sin conocer la respuesta que los consumidores le darían a ese nuevo producto. Por estas dos razones (económica y tecnológica) se han ido proponiendo diversos métodos de envejecimiento acelerado, registrado especialmente como patentes, si bien ninguno de ellos ha conseguido implantarse exitosamente en la industria de bebidas destiladas.

El método propuesto se basa en el aumento de la tasa de extracción de compuestos de la madera a través de ultrasonidos y su posterior oxidación controlada, siendo estas las reacciones principales que tienen lugar en un envejecimiento tradicional, aunque,

evidentemente, a menor ritmo. La principal diferencia de este método es el uso de energía mecánica (ultrasonidos) en lugar de energía electromagnética o térmica, las cuales pueden afectar de forma crítica a los compuestos aromáticos de importancia en las características finales del producto. Los ultrasonidos actúan a dos niveles. El primero, favoreciendo la transferencia de materia en la interfase sólido-liquido. El segundo, rompiendo las paredes celulares en la madera, lo cual aumenta la cantidad neta de compuestos extraídos. Por otra parte, la saturación en oxígeno que se consigue acelera la cinética de las reacciones con los compuestos extraídos, consiguiendo un envejecimiento efectivo en pocas semanas.

2. Material y métodos

Los espirituosos usados han sido holandas y aguardientes vínicos, suministrados por González Byass S.L.U. (Jerez de la Frontera, Cádiz España) y Bodegas Luis Caballero S.L. (El Puerto de Santa María, Cádiz, España). La holandá proveniente de la Bodega de Luis Caballero poseía un grado alcohólico de 65°. Los aguardientes procedentes de la Bodega González Byass presentaban dos orígenes distintos: columna y doble destilación, además de un grado alcohólico mayor, 71,4°, siendo necesario rebajarlos a 65° para poder realizar los estudios planteados.

La madera necesaria se ha usado en forma de virutas de roble español, francés y americano, con tamaño medio (12 x 6,5 x 1,5 mm) y tostado medio según el fabricante. Las virutas fueron envinadas con oloroso sobretabla, siguiendo un procedimiento acelerado [1].

La planta piloto se compone de un sistema de generación de ultrasonidos, con 8 salidas de 1 kW de potencia sónica cada una (sonotrodos), controlado mediante un autómata (PLC) (Ultrasonidos Lover, Massalfassar, Valencia, España), un sistema de inyección de oxígeno de 4 electroválvulas abierta/cerrada, controladas por el mismo PLC que los ultrasonidos (Al Air Liquide España, S.A., Madrid, España) y 7 depósitos de acero inoxidable AISI 316 con un diámetro de 21 cm y una altura de 2 m, y una capacidad efectiva tras introducir el sonotrodo de 50 L. La madera se coloca en bolsas de gasa de algodón lastradas a fin de que no floten y se distribuyan a lo largo de la altura del depósito.

El color de las muestras se caracterizó mediante un espectrofotómetro Helios UV-VIS (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, EEUU), midiendo el espectro entre 380 y 750 nm. El índice de polifenoles totales (IPT) según el método de Folin-Ciocalteu [2] se determinó usando el mismo espectrofotómetro, y como reactivos se emplearon reactivo de Folin y carbonato sódico (Panreac Química S.L.U., Castellar del Vallès, Barcelona, España). Se cuantificaron polifenoles individuales mediante UPLC-PDA [3], con agua MilliQ (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, EEUU), acetonitrilo y ácido acético (Panreac Química S.L.U., Castellar del Vallès, Barcelona, España) como componentes de las fases móviles. Los ácidos orgánicos de cadena corta se midieron mediante HPLC-Conductimetría [4] usando agua MilliQ y ácido trifluoroacético (TFA), ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) y 2,2-Bis(hidroximetil)-2,2',2"-nitrilotrietanol (BIS-TRIS) (Sigma-Aldrich Química, S.L., Tres Cantos, Madrid, España). Las muestras también fueron evaluadas por un panel de cata semientrenado (UNE 87 024-1) en una sala de cata normalizada (UNE-EN ISO 8589), donde se minimiza la influencia de estímulos externos en los juicios emitidos. La Tª de la sala se fijó en 22 °C. Se aplicó para ello una prueba descriptiva, consensuándose previamente los descriptores a analizar.

3. Resultados

El primer ensayo consistió en comprobar el funcionamiento del sistema para el caso específico de destilados. Como punto de partida se tomaron las condiciones de operación del sistema obtenidas en ensayos anteriores pero aplicados a vinos. Éstas fueron: 1 min ultrasonidos, 5 min pausa, 1 min de oxigenación, 30 min de pausa, 1 min de oxigenación, 30 min de pausa por cada ciclo de operación; 1 mes de duración global para el ensayo, con muestreos semanales; dosis de 10 g/L en 50 L de holanda (Caballero) de chips de roble americano envinado con dos oloresos distintos, a fin de poder comparar también los efectos del envinado. La evolución del contenido total de polifenoles (IPT) fue similar en ambos casos, con la misma tasa de crecimiento, aunque distintos valores finales que pueden achacarse exclusivamente a la diferencia en el envinado. Al analizar individualmente los polifenoles mediante UPLC se observa que la evolución vista para el IPT se confirma para cada uno de ellos, es decir, no existen tendencias distintas en la variación de un determinado polifenol debida al envinado. Llama la atención la subida en la concentración en ácido gálico, vainillina, siringaldehído, coniferilaldehído y sinapaldehído, provenientes principalmente de la madera. Furfural y 5-metilfurfural se mantuvieron estables. Se encontraron dos ácidos orgánicos de cadena corta, láctico y acético, cuyas concentraciones permanecieron relativamente constantes durante el proceso. En cuanto al color, con el tiempo descendieron los parámetros L^* y a^* y aumentó el b^* , tal y como cabría esperar en un proceso de envejecimiento, aunque en este caso si hubo diferencias significativas en función del envinado, sobre todo en el parámetro a^* , en el que uno de los brandis alcanzó un valor negativo al final del proceso (predominio de tonos verdes frente a rojos). Las muestras fueron sometidas a análisis sensorial, siendo mejor calificadas por los jueces a partir de la segunda semana de envejecimiento, cuando detectaron con claridad notas a “vainilla” y “caramelo, dulce”, descriptores que en catas anteriores se relacionaron con brandis envejecidos de calidad.

Los siguientes ensayos consistieron en aplicar las condiciones antes descritas a volúmenes de distintos aguardientes con distintas maderas. A diferencia del primer ensayo, las muestras se envejecieron por un tiempo de dos semanas, tras concluir a partir del ensayo anterior que era tiempo suficiente para alcanzar una calidad organoléptica aceptable. Para los tres tipos de aguardiente ensayados el IPT creció a lo largo del proceso en todas las muestras. Se comprobó que en igualdad de condiciones es el roble español el que más cesión de compuestos fenólicos genera, seguido del roble francés y por último el roble americano. No parece que el origen del destilado haga que surjan diferencias significativas en el contenido polifenólico para los mismos períodos de tiempo. El análisis de polifenoles individuales por UPLC vuelve a confirmar la mayor concentración en cualquier compuesto debida al roble español, seguido nuevamente por el francés y el americano. Los compuestos con una mayor concentración vuelven a ser furfural, el cual parece que se extrae inmediatamente hasta su valor máximo, y los aldehídos vainillina, siringaldehído, coniferilaldehído y sinapaldehído. Los únicos ácidos orgánicos posibles de cuantificar han sido láctico y acético. El efecto observado es una pequeña disminución entre el inicio y el final del proceso en todos los casos, sin que existan diferencias significativas debidas a la madera usada. El color de los brandis evolucionó ligeramente hacia tonos envejecidos. La contribución de los robles español y francés al color es mayor que la del americano, y en el caso específico del aguardiente de columna ha sido el roble francés quien aportó más matices de color a lo largo del proceso. Por último, en cuando al análisis sensorial, en primer lugar se confirmó que el tipo de destilado influye en el perfil aromático final de las muestras, percibiéndose diferencias en descriptores no relacionados con la composición aromática de partida (caso de la nota a vainilla). Los brandis envejecidos con roble francés presentaron significativamente menores valores en los descriptores relacionados

con el envejecimiento (vainilla, madera) que el roble americano y el roble español. Se confirma además que a los 14 días se alcanzan intensidades media-altas para los descriptores antes mencionados. Estos perfiles se correlacionan con calificaciones de “bueno” en la escala utilizada para la valoración global de los brandis. Los brandis de envejecimiento acelerado se compararon con los mismos aguardientes envejecidos de forma tradicional en barricas de 16 L durante 6 meses. Los brandis de dos semanas de envejecimiento acelerado presentaron una mayor intensidad en “vainilla” mientras que los envejecidos tradicionalmente presentaban mayores notas de “madera” y “amargor”, lo cual se valoró como un mejor perfil aromático en los de envejecimiento acelerado. La impresión en boca no fue significativamente distinta entre ambos grupos de muestras.

4. Conclusiones

Con los datos obtenidos podemos afirmar que el sistema puesto a punto envejece los aguardientes de una forma efectiva, necesitando con las condiciones descritas un tiempo mínimo de 2 semanas, muy inferior al tiempo necesario para producir un destilado envejecido tradicionalmente. Las impresiones de los jueces del panel de cata confirman el buen desarrollo del método, evaluando positivamente la presencia de descriptores de envejecimiento (vainilla, madera) en la medida en la que éstos están presentes en muestras de referencia. Podría afirmarse que la planta piloto aquí descrita está en disposición de elaborar un destilado envejecido con características similares a las de un producto tradicional. En nuestro caso, tomando como referencia los Brandis de Jerez, el tiempo empleado ha sido 1/12 del envejecimiento mínimo requerido por la Denominación Específica.

5. Bibliografía

1. Schwarz, M., Rodriguez, M.C., Sanchez, M., Guillen, D.A., Barroso, C.G. 2014. Development of an accelerated aging method for Brandy. *In: LWT-Food Science and Technology*. 59-1, 108-114.
2. Singleton, V.L., Rossi J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *In: American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144–158.
3. Schwarz, M., Rodriguez, M.C., Guillen, D.A., Barroso, C.G. 2009. Development and validation of UPLC for the determination of phenolic compounds and furanic derivatives in Brandy de Jerez. *In: Journal of Separation Science*. 32-11, 1782-1790.
4. Guillen, D.A., Barroso, C.G., Zorro, L., Carrascal, V., Perez-Bustamante, J.A. 1998. Organic acids analysis in "Brandy de Jerez" ion-exclusion chromatography, "post-column" buffering and conductimetric detection. *In: Analisis* 26-4, 186-189.

6. Agradecimientos

Los autores desean agradecer el apoyo al proyecto Plan Nacional I+D+i AGL2012-40112 (MINECO y FEDER), al Proyecto INNTERCONECTA “INNTER-VINANDAL ITC20131018” y a Bodegas Gonzalez Byass Jerez S.L.U., Luis Caballero S.L. y Bodegas Barbadillo S.L.

CE09 - INFLUENCIA DEL ORIGEN Y DEL TOSTADO EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MADERA DE CASTAÑO Y LA MADERA DE ROBLE *Quercus pyrenaica*

M.E. Alañón¹, L. Castro-Vázquez², M.C. Díaz-Maroto¹, M.S. Pérez-Coello²

¹Área de Ciencia y Tecnología de los alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Castilla la Mancha, Avd. Camilo José Cela s/n 13071, Ciudad Real, España

²Área de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad de Castilla la Mancha, Paseo de los Estudiantes, s/n, 02071 Albacete, España.

mariaelena.alanon@uclm.es

RESUMEN:

Con el fin de evaluar la influencia del origen y del tostado de las maderas de castaño, *Castanea sativa*, y roble, *Quercus pyrenaica*, se llevó a cabo un estudio de la fracción fenólica de maderas de ambas especies procedentes de España y Portugal. Los resultados mostraron que las maderas de castaño fueron las que presentaron mayor contenido en compuestos fenólicos, especialmente aquellas maderas procedentes de Portugal caracterizándose por su alto contenido en vescalagina, ácido gálico, ácido vainillínico y siringladehído principalmente. Además, el análisis de compuestos fenólicos después del proceso de tostado evidenció una mayor degradación térmica en la madera de roble *Q. pyrenaica* que en la del castaño. Por lo que se concluye que la madera de castaño posee mejores cualidades intrínsecas para soportar los procesos de tostado aplicados en tonelería.

Palabras clave: Madera, *Quercus pyrenaica*, *Castanea sativa*, composición fenólica, origen geográfico, tostado.

1. Introducción

Las maderas de roble utilizadas en tonelería para llevar a cabo los procesos de envejecimiento del vino son especialmente ricas en elagitaninos y compuestos fenólicos de bajo peso molecular. Las especies de maderas de roble más comúnmente utilizadas para estos fines han sido tradicionalmente *Quercus alba*, *Q. Petraea* y *Q. Robur* [1]. El efecto que tanto el origen geográfico como el tratamiento térmico poseen en la composición química de estas especies de madera ha sido ampliamente estudiado [1].

Sin embargo la intensiva explotación de estas especies de maderas junto con la incesante búsqueda de nuevos “bouquets” en los últimos años, han provocado la necesidad de buscar nuevas especies de madera alternativas a las tradicionalmente utilizadas.

Estudios recientes han demostrado el potencial, desde el punto de vista aromático, de la madera de castaño así como de la madera de roble *Q. Pyrenaica* [2, 3], siendo esta última especie autóctona de la Península Ibérica. Sin embargo, el efecto que determinados factores como el origen, y el grado de tostado pueden tener en la composición fenólica de estas maderas no ha sido completamente estudiado. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue el de llevar a cabo un estudio de la composición fenólica de estas especies procedentes de los

dos países que conforman la Península Ibérica, España y Portugal, con el fin de evaluar la influencia geográfica, así como el efecto del tostado en el perfil fenólico de las muestras.

2. Material y métodos

Muestras de maderas.

El set de muestras estaba compuesto por 18 muestras de madera de ambas especies ($n = 11$ *Q. Pyrenaica* y $n = 7$ *C. Sativa*). Las muestras españolas fueron facilitadas por el Departamento Agroforestal de la Universidad de Santiago de Compostela en Lugo (España), mientras que las muestra portuguesas fueron proporcionadas por la tonelería J.M. Gonçalves Lda, Palaçoulo (Portugal). Para evaluar el efecto del tostado parte de las muestras recibieron un tostado medio a 160-170 °C durante unos 30 minutos. Posteriormente las muestras fueron molidas con un molinillo con el fin de obtener un serrín de tamaño de partícula lo más homogéneo posible.

Extracción de la fracción fenólica.

500 miligramos de serrín fueron extraídos con 10 mL de una mezcla agua/acetona (3:7 v/v) a temperatura ambiente en constante agitación durante 180 minutos. Alícuotas de 2 mL fueron filtradas a través de filtros con un diámetro de poro de 0.45 μm [5]. Posteriormente, el filtrado fue concentrado bajo corriente de nitrógeno para eliminar la acetona. La resultante fase acuosa fue fraccionada mediante una extracción líquido-líquido con 2 mL de acetato de etilo y 2 mL de dietil éter. Después de la separación de ambas fases por congelación, la fase orgánica fue evaporada mediante un rotaevaporador y el residuo se redisolvió en 1 mL de etanol, de los cuales 20 μL fueron inyectados en el HPLC para la determinación de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular. Mientras que, por otro lado, la fase acuosa fue ajustada a 3 mL con agua bi-distilada y de los cuales 20 μL fueron inyectados en el HPLC para la determinación de los elagitaninos [5].

HPLC analysis

El análisis de los elagitaninos fue llevado a cabo mediante un 500B HPLC con detector de diodos array. Se utilizó una columna C_{18} en fase reversa de dimensiones de 250 x 4 mm y tamaño de partícula de 5 μm . El método cromatográfico utilizado fue aquel propuesto por Fernández de Simón y col. [5]. Debido a que estos compuestos no se encuentran comercialmente disponibles, la identificación de los elagitaninos fue llevada a cabo en base a su espectro ultravioleta, tiempo de retención, orden de elución y perfil chromatográfico descritos en bibliografía [5, 6]. Los resultados fueron expresados en mg g^{-1} equivalentes de ácido elágico.

El análisis de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular fue llevado a cabo en el mismo equipo siguiendo el método propuesto por Fernández de Simón y col. [6]. La identificación de los picos se realizó por comparación de los espectros y tiempos de retención de los patrones, mientras que la cuantificación se llevó a cabo mediante el empleo de curvas de calibrado. Los resultados se expresaron en mg g^{-1} de madera.

Análisis estadístico

A los datos analíticos obtenidos se les aplicó un análisis de la varianza y el test de Student-Newman-Keuls. Con el fin de clasificar las muestras en función de su origen se realizó un análisis de componentes principales. Todo ello gracias al programa estadístico SPSS 17.0.

3. Resultados

El test de Student-Newman-Keuls reveló diferencias significativas desde el punto de vista cuantitativo entre los 11 elagitaninos detectados en las muestras de ambas especies. Mayores contenidos de roburina B, C, grandinina, roburina D y el elagitanino I fueron detectadas en las muestras pertenecientes a la especie *Q. Pyrenaica*. La castalagina fue el principal elagitanino encontrado en las muestras de madera de roble, mientras que la vescalagina fue mayoritario en las muestras de castaño. De hecho, las muestras de ambas especies se diferenciaron por su ratio en vescalagina/castalagina que fue de 2.03 y 3.36 para muestras españolas y portuguesas de castaño respectivamente, mientras para el roble el ratio calculado fue de 0.58 y 0.82 para las muestras españolas y portuguesas respectivamente. Respecto a la diferenciación en base al origen geográfico de las muestras, se observó que para ambas especies, las muestras procedentes de Portugal poseían mayor contenido en vescalagina, aunque este hecho fue menos pronunciado en el caso de las maderas *Q. Pyrenaica*. El análisis de componentes principales permitió la discriminación de los cuatro grupos de maderas analizadas en base a los comentarios anteriormente descritos con un 83 % de la varianza total explicada.

Respecto a los compuestos fenólicos de bajo peso molecular, el análisis de componentes principales de los datos analíticos reveló una diferenciación entre las muestras de castaño y de roble en base al contenido de ácido vainillínico, ácido gálico, ácido caféico, siringaldehído y ácido siríngico. Por otro lado, las muestras españolas de castaño presentaron mayor contenido en vainillaldehído y ácido ferúlico mientras que las muestras portuguesas se caracterizaron por un mayor contenido en ácido gálico. Estas diferencias permitieron llevar a cabo una separación entre muestras de castaño de diferentes orígenes geográficos. Sin embargo, en el caso de las muestras *Q. Pyrenaica*, aunque algunas diferencias fueron observadas en la composición de los fenoles de bajo peso molecular, éstas no fueron suficientemente significativas como para poder llevar a cabo una diferenciación a nivel de origen geográfico.

En cuanto al efecto del tostado en la composición fenólica de las muestras, éste causó notables degradaciones térmicas. Los elagitaninos experimentaron una degradación térmica de un 63.8 % en el caso del castaño mientras que esta degradación fue considerablemente mayor en el caso de las muestras de roble (75.5 %). De entre todos los elagitaninos la vescalagina resultó ser la más propensa a la degradación térmica por el proceso de tostado (78.8 % y 89.5 % para las muestras de castaño y roble respectivamente).

Respecto a los compuestos de bajo peso molecular, el proceso de tostado también provocó la degradación térmica de prácticamente casi todos ellos a excepción de algunos ácidos y aldehídos fenólicos como son el ácido elágico, siringaldehído, vainillaldehído, coniferaldehído y sinapaldehído, los cuales aumentaron considerablemente sobre todo en las muestras de castaño. Sin embargo, para el resto de compuestos, se observó una degradación térmica mayor en las muestras de la especie *Q. pyrenaica* en comparación con las muestras de castaño.

4. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos puede concluirse que tanto la madera de castaño como la de la especie *Q. pyrenaica* son especialmente ricas en compuestos fenólicos por lo que son una importante alternativa a la maderas tradicionalmente utilizadas en tonelería para llevar a cabo los procesos de envejecimiento en vinos. Además, se ha puesto de manifiesto una importante diferenciación a nivel de especie, siendo el castaño una madera más ricas en compuestos fenólicos que la madera de roble de la especie *Q. pyrenaica*. Además de esta diferenciación, en el caso de las muestras de castaño, también fue posible llevar a cabo una diferenciación a nivel de origen geográfico siendo las muestras portuguesas las que mayor contenido en compuestos fenólicos presentaron. Sin embargo, la diferenciación geográfica no fue tan notable para la muestras de *Q. pyrenaica*.

El estudio de la composición química antes y después del tostado puso de manifiesto que los compuestos fenólicos de la madera de castaño sufrieron una menor degradación térmica, de lo que se deduce una mayor aptitud para soportar los procesos de tostado llevados en tonelería.

5. Bibliografía

1. Vivas, N. 2002. Manuel de tonnellerie À L'usage Des Utilisateurs De Futaille, 2ème édition; Féret Éditions, France.
2. Alañón, M.E., Pérez-Coello, M.S., Díaz-Maroto, I.J., Martín-Alvarez, P.J., Vila-Lameiro, P., Díaz-Maroto. 2011. Influence of geographical location, site and silvicultural parameters, on the volatile composition of *Quercus pyrenaica* Willd. Wood used in wine aging. For. Ecol. Manag. 262, 124-130.
3. Alañón, M.E., Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C. Pérez-Coello, M.S. 2012. Aromatic potential of *Castanea sativa* Mill. Compared to *Quercus* species to be used in cooperage. Food Chem. 130, 875-881.
5. Jordão, A.M. Ricardo-Da Silva, J.M., Laureano, O. 2007. Ellagitannins from Portuguese oak Wood (*Quercus pyrenaica* Willd.) used in cooperage: influence of geographical origin, coarseness of the grain and toasting level. Holzf. 61, 155-160.
6. Fernández de Simón, B., Cadahía, E., Conde E., García-Vallejo, M.C. 1999. Evolution of phenolic compounds in Spanish oak wood during natural seasoning. First results. J. Agric. Food Chem. 47, 1687-1694.

6. Agradecimientos

Los autores quieren expresar su agradecimiento a la tonelería J.M. Gonçalves Lda (Palaçoulo, Portugal) y al Departamento agroforestal de la Universidad de Santiago de Compostela (Lugo, España) por las muestras facilitadas así como también agradecer a la Junta de Comunidades de Castilla la Mancha la financiación económica otorgada a través del proyecto P II 2109-0245-6645.

CE10 - EVOLUCIÓN DE LA COMPOSICIÓN NO VOLÁTIL DE VINOS DE TINTOS DURANTE LA ETAPA DE ENVEJECIMIENTO EN BOTELLA. EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE OXÍGENO

José Miguel Avizcuri^{1,2}, María Pilar Sáenz-Navajas², Vicente Ferreira², Purificación Fernández-Zurbano¹

¹ Instituto de las Ciencias de la Vid y el Vino (UR-CSIC-CAR), Departamento de Química, Universidad de La Rioja, c/ Madre de Dios 51, 26006 Logroño, La Rioja, España

² Laboratorio de análisis del aroma y enología. Departamento de Química Analítica, Universidad de Zaragoza, Instituto de Investigación e Ingeniería de Aragón (I3A), asociado con el ICVV (UR-CSIC-CAR), c/ Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza

puri.fernandez@unirioja.es

RESUMEN:

El presente estudio tuvo como objetivo estudiar la evolución de la composición no volátil de 16 vinos tintos tras un envejecimiento acelerado de 6 meses con 5 dosis de oxígeno. Los resultados muestran que existe un patrón general de evolución que implica un aumento de la tonalidad, de las proantocianidinas precipitables con proteína, pigmentos poliméricos, así como una disminución en la concentración de ácido tartárico, acetaldehído, de los polifenoles de bajo peso molecular, del grado medio de polimerización de los taninos así como una drástica disminución de sulfuroso. Las desviaciones encontradas de este comportamiento se han encontrado relacionadas con el contenido inicial de polifenoles totales, siendo los vinos de menor IPT y mayor pH los más afectados. En general el oxígeno parece acentuar los cambios observados durante el envejecimiento.

Palabras clave: vino, oxígeno, envejecimiento, botella, composición no-volátil

1. Introducción

El vino es una bebida enormemente compleja tanto en su composición como en las respuestas sensoriales que produce. En general, es posible actuar y controlar casi todas las operaciones del proceso de elaboración, sin embargo, el envejecimiento en botella hoy en día resulta difícil de controlar y predecir. El enólogo no cuenta con herramientas objetivas que le permitan predecir la evolución de los vinos embotellados y la mayor parte de las decisiones con respecto a éste están basadas en la tradición y experiencia. La evolución del vino durante esta fase depende de diferentes condiciones como son el tiempo de envejecimiento, temperatura, humedad, exposición del vino al oxígeno, así como factores intrínsecos al propio vino como la concentración de polifenoles. En esta línea, la gestión del oxígeno durante el envejecimiento en botella se considera un factor clave que influye en el desarrollo de las propiedades químicas y sensoriales del vino. La disolución de oxígeno en un vino embotellado es generalmente muy baja y puede variar mucho dependiendo del tipo de cierre utilizado. En la bibliografía existen trabajos donde se ha evaluado la influencia de diferentes OTRs (tasa de transferencia de oxígeno) sobre la composición química [1, 2]. Sin embargo, todos estos estudios se han llevado a cabo con un limitado número de vinos y bastante homogéneos.

2. Material y métodos

Vinos y dosificación de oxígeno. El estudio se llevó a cabo con 16 vinos tintos españoles de 6 denominaciones de origen diferentes, distintas variedades, procesos de elaboración y diferentes tipos de envejecimiento. De cada tipo de vino se llenaron 5 botellas de 1150 mL de color ambar, a las cuales se les dosificaron cinco dosis de oxígeno diferentes (entre 0-30 mg L⁻¹) imitando situaciones reales y extremas en el embotellado. Estas muestras fueron almacenadas durante 6 meses a 25 °C.

Análisis de la matriz no volátil antes y después del envejecimiento. El análisis de los parámetros enológicos convencionales se realizó mediante espectrometría de infrarrojos con transformada de Fourier (IRFT). El análisis de los polifenoles de bajo peso molecular se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. La estimación del contenido total de proantocianidinas (TPAs) se realizó mediante el índice de la vainillina, las proantocianidinas precipitables con proteína (PPAs) mediante la precipitación con ovoalbúmina, el grado medio de polimerización (mDP) por la reacción de tólisis y la concentración de pigmentos poliméricos, tanto los de alto (LPP) como bajo peso molecular (SPP), todo ello mediante la metodología llevada a cabo por Gonzalo-Diago y col. [3].

3. Resultados

Caracterización de los vinos antes del envejecimiento. La gran diversidad de orígenes, añadas, variedades y elaboraciones de los vinos permitieron tener una muestra muy heterogénea y con grandes diferencias en su composición. Con el objetivo de evaluar la similitud entre las 16 muestras de estudio, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) seguido de un análisis cluster (HCA) con los parámetros analizados. La partición más natural reteniendo la mayor información dio lugar a 4 grupos como se muestra en la Figura 1.

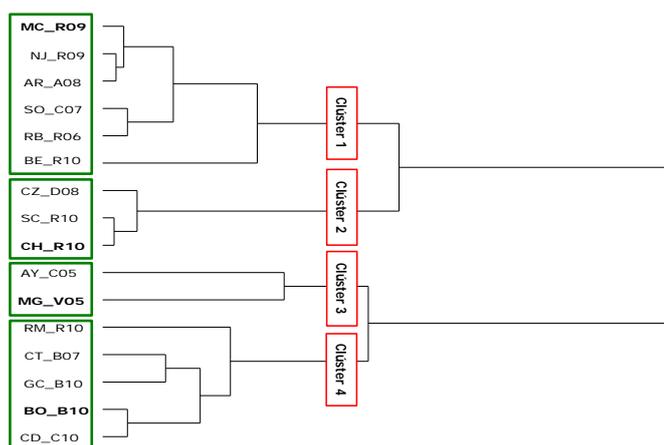


Figura 1. Diagrama de árbol y clústeres obtenidos a partir del análisis clúster (HCA). Los centroides de cada clúster están marcados en negra.

El **clúster 1** se caracterizó por tener un mayor mDP, bajo índice de polifenoles totales (IPT), baja intensidad de color (IC), baja concentración de acetaldehído, baja concentración de

SPP y baja concentración de flavonoles. Además, los vinos de este clúster presentaron un grado alcohólico y una concentración de flavanoles por debajo de la media y presentaron concentraciones superiores de ácido láctico y de ácido tartárico.

El **clúster 2** se caracterizó por una alta concentración de ácido láctico, alto pH y por una baja concentración de PPAs y glicerol. Además presentaron una baja concentración de azúcares reductores (AR).

El **clúster 3**, formado por los dos vinos más viejos, se caracteriza por una alta concentración de SPP, PPAs y glicerol, un alto IPT y por un bajo mDP. Además, son los vinos que presentan mayor grado alcohólico, mayor concentración de AR, IC, concentración de flavanoles y de acetaldehído. Contrariamente son los vinos que menor concentración de ácido láctico y tartárico presentan.

Finalmente, el **clúster 4** resultó caracterizado por una alta concentración de flavonoles y SPP, por una baja tonalidad (T) y una baja concentración de ácido láctico. Además, presentan un elevado grado alcohólico, una alta concentración de flavanoles, ácido tartárico e IC.

Efecto del envejecimiento en la composición no volátil. El efecto del envejecimiento se evaluó mediante la comparación de la evolución química de los 16 vinos tras los 6 meses con las distintas dosis de oxígeno. Las consecuencias del envejecimiento, analizando todas las muestras en conjunto, se tradujeron en un aumento significativo de la T, de las PPAs, de la concentración de LPP, así como un descenso en el mDP, anhídrido sulfuroso libre y combinado, ácido tartárico, acetaldehído y de todos los polifenoles de bajo peso molecular analizados. Sin embargo, se observaron evoluciones diferentes en función de las características iniciales de los vinos.

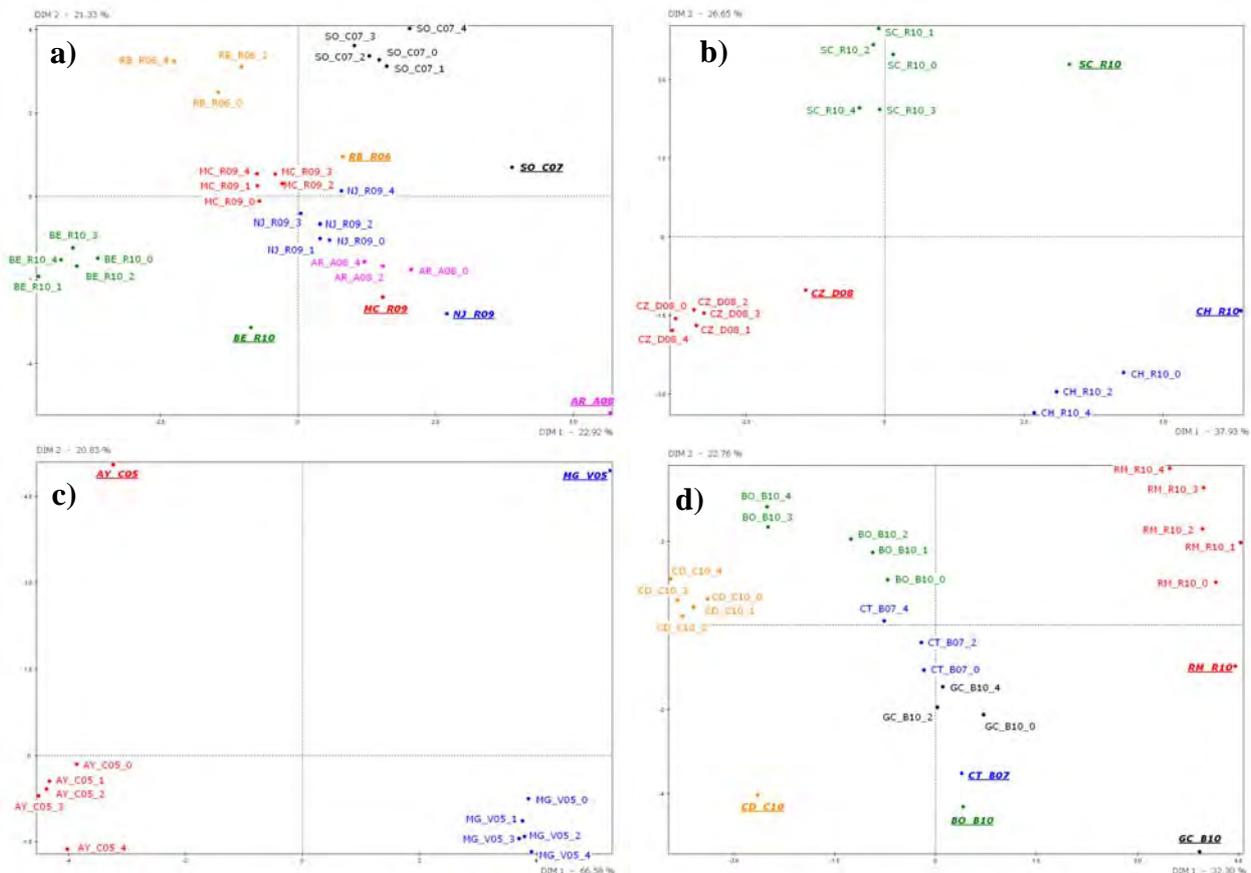


Figura 2. Proyección de las muestras de cada cluster, 1 (a), 2 (b), 3 (c) y 4 (d) obtenido del PCA. Los vinos antes del envejecimiento aparecen subrayados, el resto de muestras corresponde con los mismos vinos después del envejecimiento en botella embotellados con 5 dosis de oxígeno.

Los vinos del **clúster 1** (vinos con menor IPT), a parte de los cambios observados de manera común para todos los vinos sufren un aumento en la concentración de glicerol, de SPP y un descenso en el índice de etanol. Además son los vinos que presentan una mayor disminución en el mDP y un menor descenso en la concentración de acetaldehído.

Los vinos del **clúster 2** (vinos con mayor pH del ensayo) además sufren una disminución en el IPT, en la concentración de ácidos y derivados y son los vinos que presentan una mayor disminución de la concentración de ácidos hidroxicinámicos.

Los vinos del **clúster 3** (vinos de la añada más vieja) además experimentan una disminución en los SPP, un aumento en la concentración de ácido fumárico y no sufren un aumento de la T durante el envejecimiento. Además es el clúster donde se produce la mayor disminución de la concentración de acetaldehído y flavanoles y es el único donde no existe una disminución significativa de la concentración de flavonoles.

Finalmente, los vinos del **clúster 4** (la mayoría vinos jóvenes con alto IPT), también presentan la mayor pérdida de flavonoles y ácido tartárico y el mayor aumento del índice de etanol. Por otro lado, junto al clúster 3 (ambos con mayor IPT) son los únicos clusters donde aumenta la concentración de LPP, sin embargo, en el clúster 3 no existe una disminución de los SPP.

La segunda consecuencia del ensayo es que el efecto que ejerce el oxígeno frente al que ejerce el tiempo durante el envejecimiento resulta residual, ya que los desplazamientos observados (Figura 2) en los planos obtenidos del PCA (Figura 2) son menos acusados entre las distintas dosis de oxígeno (xx_xx_0, xx_xx_1,...xx_xx_4) que respecto al vino original y la dosis 0 (xx_xx frente xx_xx_0). El oxígeno, cuando tiene efecto, siempre acentúa los procesos observados en el envejecimiento (mayor desplazamiento en los planos, Figura 2). Es destacable que los vinos más afectados por el oxígeno en cada clúster corresponden con los vinos con menor IPT y/o mayor pH.

4. Conclusiones

De manera general, el envejecimiento ha provocado un aumento de la T, de la PPA, de la concentración de LPP y una disminución en la concentración de ácido tartárico, de acetaldehído, del mDP, en la concentración de todas las familias de polifenoles de bajo peso molecular y una drástica disminución/desaparición de la concentración de anhídrido sulfuroso. Sin embargo, se han encontrado comportamientos diferentes en función de la concentración inicial de polifenoles totales, del pH y de la añada de los vinos.

El efecto de la presencia de diferentes dosis de oxígeno suministradas en el momento del embotellado es bastante limitado y los vinos con menor IPT y de mayor pH resultan ser los más influenciados. El oxígeno en general, parece acentuar los cambios observados durante el envejecimiento.

5. Bibliografía

1. Wirth, J., Morel Salmi, C., Souquet, J. M., Dieval, J. B., Aagaard, O., Vidal, S., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2010). The impact of oxygen exposure before and after bottling on the polyphenolic composition of red wines. *Food Chemistry*, 123, 107-116.
2. Godden, P. W., Francis, L., Field, J., Gishen, M., Coulter, A. D., Valente, P., Hoj, P., & Robinson, E. (2001). Wine bottle closures: Physical characteristics and effect on composition

and sensory properties of a Semillon wine. 1. Performance up to 20 months postbottling. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7, 64–105.

3. Gonzalo-Diago, A., Dizy, M., Fernández-Zurbano, M.P., (2013). Taste and mouthfeel properties of red wines proanthocyanidins and their relation to the chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 8861-8870.

6. Agradecimientos

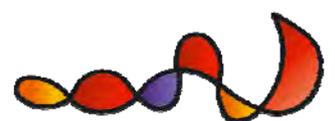
Este trabajo se ha realizado dentro del proyecto del Plan Nacional de I+D financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación AGL2010-22355-C02-01/02.



AC

Análisis y control de calidad del vino

ENOLOGIA2.015
INNOVACIÓN VITIVINÍCOLA



AC01 - PERFIL AROMATICO DE VINOS BLANCOS ELABORADOS CON VARIEDADES MINORITARIAS DE LA D.O.Ca. RIOJA

Juana Martínez¹, Ana Gonzalo¹, Eva López¹, Pilar Rubio¹, Elisa Baroja¹, Enrique García-Escudero¹

¹Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (Gobierno de La Rioja, Universidad de La Rioja, CSIC),
Finca La Grajera (Carretera de Burgos, Km. 6, 26007, Logroño, España)

jmartinezg@larioja.org

RESUMEN:

En este trabajo se estudió el perfil aromático de vinos blancos elaborados con variedades minoritarias de la D.O.Ca. Rioja (Tempranillo blanco, Maturana blanca y Turruntés) en comparación con otras tradicionales de la zona (Viura, Garnacha blanca y Malvasía riojana). Se observaron importantes diferencias varietales en la concentración de compuestos con gran incidencia organoléptica. Tempranillo blanco destacó por una concentración elevada de acetato de isoamilo, butirato de etilo y diacetilo. Maturana blanca presentó un alto contenido en acetato de isoamilo y Turruntés alcanzó la concentración más elevada de alcoholes superiores y de 2-feniletanol. El análisis discriminante permitió la separación de los vinos varietales, y mostró similitudes entre algunas variedades según la función considerada.

Palabras clave: variedad minoritaria, vino blanco, aromas, calidad

1. Introducción

En los vinos blancos el aroma es considerado el principal atributo de calidad. Atendiendo a su origen los compuestos aromáticos se clasifican en primarios o varietales, secundarios o fermentativos y terciarios o de envejecimiento. En las variedades neutras la mayor parte de las sustancias aromáticas del vino se generan durante la fermentación alcohólica debido al metabolismo de las levaduras (1). Su contenido está muy influenciado por las características de la uva (variedad, estado sanitario, grado de madurez...) y por las condiciones de desarrollo del proceso fermentativo (levaduras, aminoácidos, temperatura, desfangado...).

Son numerosos los estudios (2, 6) que indican el importante papel que desempeña la variedad de uva en la calidad aromática de los vinos blancos. Por otra parte, la recuperación y el mantenimiento de las variedades minoritarias en las diferentes zonas vitícolas puede aportar un valor añadido de diferenciación y tipicidad a los vinos de cada región. En la D.O.Ca. Rioja desde el año 2008 están autorizadas las variedades minoritarias blancas: Tempranillo blanco, Maturana blanca y Turruntés. La variedad Tempranillo blanco, deriva de Tempranillo tinto por mutación natural, y fue localizada en La Rioja en 1988. Maturana blanca y Turruntés se cultivaron desde antiguo en la zona y fueron recuperadas en viñedos viejos. Las variedades Tempranillo blanco y Maturana blanca únicamente están autorizadas en la D.O.Ca. Rioja. Se trata de variedades aptas para la elaboración de vinos de calidad, que además pueden aportar un valor añadido de diferenciación y tipicidad a los blancos de esta región (4). La variedad

Turruntés es una sinonimia de Albillo mayor, y como tal se cultiva en diferentes zonas españolas.

En este trabajo se ha estudiado el perfil aromático fermentativo de vinos blancos elaborados con las variedades minoritarias de la D.O.Ca. Rioja en comparación con las variedades más tradicionales de la zona.

2. Material y métodos

El estudio se llevó a cabo durante ocho campañas entre 2005 y 2013 en vinos elaborados con uva de diferentes variedades blancas procedente de la Finca La Grajera (Logroño, La Rioja), propiedad del Gobierno de La Rioja. Las variedades minoritarias estudiadas fueron: Tempranillo blanco, Maturana blanca y Turruntés, y las variedades tradicionales: Viura, Garnacha blanca y Malvasía riojana. La uva se recogió en el momento óptimo de madurez y en perfecto estado sanitario. El mosto obtenido mediante estrujado y suave prensado se desfangó con enzimas pectolíticas (1 g/hl) a baja temperatura (10 °C) durante 20 horas. Posteriormente, se distribuyó en depósitos de acero inoxidable de 100 l, en los que se desarrolló la fermentación alcohólica con siembra de levaduras (Zymaflore X16, Laffort) a temperatura controlada (18-20 °C). Una vez concluida los vinos se trasegaron, se sulfitaron y se conservaron a 5° C durante un mes para favorecer su estabilización.

Los compuestos volátiles fermentativos se determinaron por Cromatografía de Gases mediante extracción con diclorometano (5). Para el estudio estadístico de los resultados se aplicó el análisis de varianza ANOVA, mediante el programa estadístico SPSS versión 20.2. En caso de existir diferencias significativas, $p < 0.05$, se utilizó el test de Tukey para la separación de medias. Asimismo, se realizó el análisis discriminante de los resultados obtenidos.

3. Resultados

La composición volátil de los vinos (Tabla 1) mostró diferencias significativas entre las variedades estudiadas en numerosos compuestos (1-propanol, 1-butanol, 2-feniletanol, alcoholes superiores, 1-hexanol, *cis*-3-hexenol, acetato de isoamilo, 3-hidroxibutirato de etilo, butirato de etilo y diacetilo), algunos de ellos con gran incidencia sensorial en el vino. El acetato de isoamilo, uno de los principales compuestos impacto (2) (aromas a plátano y banana) superó el umbral de percepción aromática (3) en todos los vinos, excepto en la variedad Malvasía, y fue más elevado en Tempranillo blanco y Maturana blanca. El diacetilo, compuesto impacto con un papel bastante controvertido, únicamente estuvo por encima del umbral aromático en Tempranillo blanco. Los ésteres etílicos de ácidos grasos son responsables de los aromas afrutados, en los vinos de Garnacha blanca se obtuvo un contenido total más elevado, siendo etil-3-hidroxibutirato y butirato de etilo (aromas a piña, kiwi y fresa) significativamente superiores a Malvasía. El 2-fenil-etanol (aroma a rosa) alcanzó un contenido más elevado en los vinos de Malvasía y Turruntés, sin diferencias respecto a Viura, y en todos los casos estuvo por encima del umbral de percepción. Otros autores (6) también encontraron elevados contenidos de este compuesto en vinos varietales blancos. Los alcoholes C6 (hexanol y *cis*-3-hexenol), con aromas herbáceos, alcanzaron un contenido más elevado en los vinos de Garnacha blanca y Viura respectivamente.

Tabla 1. Composición volátil (mg/l) de los vinos elaborados con diferentes variedades.

Media \pm desviación (n = 8)

Compuestos	Tempranillo blanco	Maturana blanca	Turruntés	Garnacha blanca	Malvasía	Viura	G.S.
1-Propanol	26.0 \pm 4.6 a	24.3 \pm 3.8 a	10.8 \pm 1.9 c	20.0 \pm 4.4 ab	10.1 \pm 2.0 c	13.4 \pm 2.8 bc	***
Isobutanol	23.4 \pm 7.1	25.6 \pm 6.5	31.0 \pm 6.6	29.2 \pm 10.6	26.9 \pm 4.7	30.7 \pm 6.6	NS
1-Butanol	0.56 \pm 0.23 ab	0.63 \pm 0.10 a	0.48 \pm 0.30 ab	0.57 \pm 0.13 ab	0.28 \pm 0.01 b	0.43 \pm 0.16 ab	**
Alc. amílicos	166 \pm 34	181 \pm 48	213 \pm 42	212 \pm 48	204 \pm 29	219 \pm 43	NS
2-Fenil-etanol	20.1 \pm 8.2 b	27.6 \pm 16 b	63.6 \pm 13 a	29.5 \pm 9.1 b	57.5 \pm 9.7 a	42.3 \pm 11 ab	***
Σ Alcoholes sup	236 \pm 46 b	260 \pm 57 ab	319 \pm 47 a	291 \pm 61 ab	299 \pm 34 ab	306 \pm 51 ab	*
1-Hexanol	0.60 \pm 0.27 ab	0.72 \pm 0.18 ab	0.44 \pm 0.19 b	1.43 \pm 0.93 a	0.64 \pm 0.21 ab	0.62 \pm 0.27 ab	***
cis-3-Hexenol	0.41 \pm 0.18 ab	0.07 \pm 0.04 c	0.07 \pm 0.02 c	0.12 \pm 0.07 bc	0.06 \pm 0.04 c	0.52 \pm 0.28 a	***
Acet. isoamilo	6.92 \pm 3.6 a	6.97 \pm 3.6 a	3.28 \pm 1.7 ab	5.67 \pm 3.0 ab	2.50 \pm 1.6 b	3.91 \pm 2.1 ab	*
Acet. hexilo	0.49 \pm 0.31	0.31 \pm 0.22	0.42 \pm 0.33	0.87 \pm 0.62	0.17 \pm 0.07	0.26 \pm 0.21	NS
Acet. 2-feniletilo	0.53 \pm 0.53	0.74 \pm 0.61	0.97 \pm 0.57	0.43 \pm 0.25	0.96 \pm 0.83	0.48 \pm 0.29	NS
Σ Acetatos	7.94 \pm 3.51	8.02 \pm 4.00	4.68 \pm 2.14	6.97 \pm 3.82	3.62 \pm 1.56	4.65 \pm 2.31	NS
Propionato etilo	0.08 \pm 0.04	0.07 \pm 0.02	0.17 \pm 0.35	0.09 \pm 0.04	0.06 \pm 0.03	0.07 \pm 0.03	NS
3-OH-butilato etilo	0.29 \pm 0.09 ab	0.23 \pm 0.08 ab	0.23 \pm 0.09 ab	0.38 \pm 0.13 a	0.19 \pm 0.05 b	0.23 \pm 0.04 ab	**
Isobutilato etilo	0.04 \pm 0.02	0.04 \pm 0.02	0.04 \pm 0.02	0.04 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.02	NS
Butirato etilo	0.32 \pm 0.09 a	0.26 \pm 0.07ab	0.21 \pm 0.07 ab	0.32 \pm 0.12 a	0.17 \pm 0.07 b	0.23 \pm 0.11 ab	*
Hexanoato etilo	0.44 \pm 0.22	0.43 \pm 0.12	0.46 \pm 0.15	0.50 \pm 0.28	0.39 \pm 0.22	0.45 \pm 0.19	NS
Octanoato etilo	0.31 \pm 0.18	0.28 \pm 0.09	0.37 \pm 0.17	0.29 \pm 0.22	0.39 \pm 0.27	0.31 \pm 0.19	NS
Σ Esteres	1.47 \pm 0.53	1.29 \pm 0.21	1.48 \pm 0.53	1.62 \pm 0.59	1.23 \pm 0.54	1.32 \pm 0.46	NS
Ac. isobutírico	1.58 \pm 0.87	2.21 \pm 0.51	2.02 \pm 1.0	1.95 \pm 0.61	1.76 \pm 0.94	1.87 \pm 0.79	NS
Ac. butírico	1.44 \pm 0.68	1.28 \pm 0.63	1.13 \pm 0.45	1.31 \pm 0.53	0.94 \pm 0.53	1.09 \pm 0.45	NS
Ac. isovalérico	0.79 \pm 0.80	1.26 \pm 0.71	1.96 \pm 1.43	1.06 \pm 0.78	1.86 \pm 1.58	1.45 \pm 1.00	NS
Ac. hexanóico	4.79 \pm 0.49	4.47 \pm 0.75	3.72 \pm 0.98	4.67 \pm 0.92	3.75 \pm 0.70	4.39 \pm 0.97	NS
Ac. octanoico	4.94 \pm 0.97	4.42 \pm 1.16	4.46 \pm 1.55	5.18 \pm 1.49	4.42 \pm 1.09	4.92 \pm 2.56	NS
Σ Ácidos	14.4 \pm 2.85	14.3 \pm 1.80	14.5 \pm 3.21	15.0 \pm 3.08	13.2 \pm 2.73	14.8 \pm 3.69	NS
Butirolactona	1.91 \pm 1.63	1.91 \pm 1.23	2.97 \pm 1.3	2.01 \pm 2.03	1.27 \pm 1.58	1.74 \pm 1.15	NS
Acetoína	3.85 \pm 3.61	3.00 \pm 3.45	0.728 \pm 0.69	2.10 \pm 2.04	1.38 \pm 2.29	0.771 \pm 0.56	NS
Diacetilo	0.72 \pm 0.60 a	0.48 \pm 0.22 b	0.22 \pm 0.14 b	0.39 \pm 0.22ab	0.33 \pm 0.42ab	0.24 \pm 0.13ab	*
Metionol	0.52 \pm 0.31	0.68 \pm 0.36	1.25 \pm 1.34	0.54 \pm 0.49	0.81 \pm 0.61	1.05 \pm 1.17	NS

G.S.: (*) p<0.05, (**) p<0.01, (***) p<0.001 y NS no significativo. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas

El análisis canónico discriminante de los resultados (Figura 1) permitió la separación de los vinos varietales en tres grupos según la función 1 (56.3 % varianza), siendo las variables con mayor poder discriminante: butirato de etilo, 1-butanol, butirolactona y 1-propanol. Según esta función por un lado se agruparon los vinos de Tempranillo blanco y Maturana blanca, por otro los de Turruntés, Malvasía y Viura, mientras que los de Garnacha blanca aparecieron separados del resto.

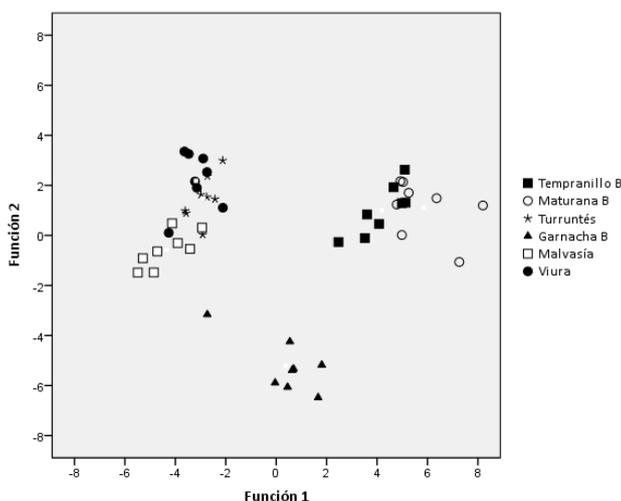


Figura 1. Análisis canónico discriminante de la composición aromática de los vinos

La función 2 (12.7 % varianza) estuvo definida por el contenido de metionol, alcoholes amílicos, butirato de etilo y acetato de isoamilo, y dio lugar a una buena separación de los vinos de Garnacha blanca.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo han puesto de manifiesto la existencia de notables diferencias en la composición aromática de los vinos blancos elaborados con las variedades autorizadas en la D.O.Ca. Rioja. Se ha observado que las variedades minoritarias Tempranillo blanco y Maturana blanca pueden contribuir a la diferenciación aromática de los vinos de la zona, por el contrario la variedad Turruntés ha mostrado un perfil aromático bastante similar a las variedades tradicionales (Viura y Malvasía). Por otra parte, Garnacha blanca ha dado lugar a vinos con una composición aromática característica bastante diferente al resto, por lo que puede considerarse una variedad interesante a nivel aromático.

5. Bibliografía

1. Dubourdieu D., Tominaga T., Masneuf I., Peyrot C., Murat M.L. 2006. The role of yeasts in grape flavour development during fermentation: the example of Sauvignon Blanc. *In: Am. J. Enol. Vitic.*, 57: 81-88.
2. Ferreira, V., López, R., Cacho, J. 2000. Quantitative determination of the odorans of young red wines from different grape varieties. *In: Journal of Science Food and Agriculture*, 80: 1659-1667.
3. Guth, H. 1997. Identification of character impact odorants of different white wine varieties. *In: Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 3027-3032.
4. Martínez, J., López, E., Baroja, E., Pérez, D., Chavarri, J.B., García-Escudero, E. 2014. Evaluación agronómica y enológica de la variedad Tempranillo blanco (*Vitis vinifera* L.) y de otras variedades minoritarias blancas de la D.O.Ca. Rioja. *En: Actas de Horticultura /70*. Ed. Enrique García-Escudero e Ignacio Martín, 27-33.
5. Ortega, C., López, R., Cacho, J., Ferreira, V. 2001. Fast analysis of important wine volatile compounds: development and validation of new method based of gas chromatographic-flame ionization detection analysis of dicloromethane microextracts. *In: J. Cromatogr. A* 923: 205-214.
6. Vilanova, M., Genisheva, Z., Graña, M., Oliveira, J.M. 2013. Determination of odorants in varietal wines from international grape cultivars (*Vitis vinifera*) grown in NW Spain. *In: S. Afr. J. Enol. Vitic.*, Vol. 34, 2: 212-222.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la Consejería de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente del Gobierno de La Rioja durante los años 2005-2013.

AC02 - PERFIL AMINOACÍDICO DE MOSTOS BLANCOS DE VARIEDADES MINORITARIAS DE LA D.O.Ca. RIOJA

Juana Martínez¹, Ana Gonzalo¹, Eva López¹, Enrique García-Escudero¹

¹Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (Gobierno de La Rioja, Universidad de La Rioja, CSIC),
Finca La Grajera (Carretera de Burgos, Km. 6, 26007, Logroño, España)
jmartinezg@larioja.org

RESUMEN:

En este trabajo se estudió el perfil aminoacídico de mostos blancos de variedades minoritarias de la D.O.Ca. Rioja (Tempranillo blanco, Maturana blanca y Turruntés) en comparación con otras tradicionales de la zona (Viura, Garnacha blanca y Malvasía riojana). Los resultados obtenidos mostraron importantes diferencias varietales, con contenidos más elevados en Maturana blanca (sin diferencias respecto a Tempranillo blanco) y más bajos en Malvasía y Turruntés. En todas las variedades, arginina, prolina y glutamina fueron los aminoácidos más abundantes, representando el 67% del contenido total. La ratio prolina/arginina presentó valores más elevados en Tempranillo blanco y Viura y más bajos en Garnacha blanca y Malvasía. El análisis discriminante clasificó los mostos varietales en diferentes grupos, y mostró algunas similitudes varietales según la función considerada.

Palabras clave: variedad minoritaria, mosto, aminoácidos

1. Introducción

Los aminoácidos constituyen una de las principales fuentes de nitrógeno de los mostos (30-40% del total), por lo que influyen en la multiplicación de las levaduras y determinan el correcto desarrollo de la fermentación alcohólica (1). Además, también pueden influir de forma decisiva en el aroma del vino, ya que la formación de los principales compuestos volátiles fermentativos (alcoholes superiores, aldehídos, ésteres y ácidos) se ve afectada por los compuestos nitrogenados presentes en el mosto (1, 3 y 5). El contenido de aminoácidos está estrechamente relacionado con la variedad de uva, y se ve influenciado por gran número de factores vitícolas (clima, suelo, prácticas culturales, nutrición, campaña, estado sanitario...). Asimismo, algunos procesos prefermentativos, como el desfangado de los mostos blancos, influyen significativamente en su contenido (2 y 6).

Son numerosos los estudios que muestran las diferencias existentes en el perfil aminoacídico de diferentes variedades de uva (1, 5 y 6), e indican que puede ser una herramienta de clasificación. Por otra parte, la recuperación de las variedades minoritarias en las diferentes zonas vitícolas puede aportar un valor añadido de diferenciación y tipicidad a los vinos de cada región. Sin embargo, muchas de estas variedades no están completamente caracterizadas, por lo que es necesario llevar a cabo estudios para profundizar en su composición, con el objetivo de potenciar la calidad de sus vinos.

En este trabajo se ha estudiado la composición de aminoácidos de mostos blancos de las variedades minoritarias de la D.O.Ca. Rioja en comparación con las variedades más tradicionales de la zona.

2. Material y métodos

El estudio se llevó a cabo durante tres campañas (2012-2014) en mostos obtenidos a partir de diferentes variedades blancas procedente de la Finca La Grajera (Logroño, La Rioja), propiedad del Gobierno de La Rioja. Las variedades minoritarias estudiadas fueron: Tempranillo blanco, Maturana blanca y Turruntés, y las variedades tradicionales: Viura, Garnacha blanca y Malvasía riojana. La uva se recogió en el momento óptimo de madurez y en perfecto estado sanitario. El mosto se extrajo mediante estrujado y prensado suave de la uva y se desfangó con enzimas pectolíticas (1 g/hl) a baja temperatura (10 °C) durante 20 horas. Las muestras de mostos desfangados, con una turbidez aproximada de 80 NTU, se congelaron y posteriormente se analizaron.

La determinación analítica del contenido de aminoácidos en los mostos desfangados se realizó por HPLC, mediante derivatización automática en precolumna con OPA y FMOC (4). Para el estudio estadístico de los resultados se aplicó el análisis de varianza ANOVA, mediante el programa estadístico SPSS versión 20.2. En caso de existir diferencias significativas, $p < 0.05$, se utilizó el test de Tukey para la separación de medias. Asimismo, se realizó el análisis discriminante de los resultados obtenidos.

3. Resultados

La concentración de aminoácidos en los mostos (Tabla 1) presentó diferencias significativas entre las variedades estudiadas en todos los compuestos menos en cinco (GABA, cistina, isoleucina, ornitina y lisina), que en general alcanzaron contenidos muy bajos excepto el GABA. En los mostos de Maturana blanca se encontró el mayor contenido total de aminoácidos (sin diferencias respecto a Tempranillo blanco), destacando treonina, alanina y metionina por ser significativamente superiores al resto de variedades. En los mostos de Turruntés y Malvasía se obtuvo la concentración más baja de aminoácidos totales, aproximadamente un 50% inferior a la observada en Maturana blanca. A nivel global estas variedades no mostraron diferencias significativas con respecto a Viura y Garnacha blanca.

El aminoácido más abundante en todos los casos fue la arginina, seguido de la prolina y la glutamina, estos tres compuestos representaron un 67% del contenido total. En cuarta posición el ácido glutámico fue más abundante en Tempranillo blanco y Garnacha blanca, la treonina en Maturana blanca y Malvasía, el GABA en Turruntés y la alanina en Viura. Todos ellos, con excepción de la prolina, son buenas fuentes nitrogenadas para el desarrollo de la fermentación por *Saccharomyces cerevisiae*. El rango de concentraciones observadas en este trabajo coincide con el indicado por otros autores (1).

La ratio prolina/arginina es característica de la variedad de uva (1), aunque también depende de otros factores, y es un indicador de la proporción de nitrógeno no asimilable (prolina) frente al asimilable (arginina). En este trabajo los mostos de Tempranillo blanco y Viura presentaron ratios con valores más elevados que el resto, y significativamente superiores a Garnacha blanca y Malvasía. Las variedades Maturana blanca y Turruntés no mostraron diferencias en este ratio con respecto al resto.

Tabla 1. Concentración de aminoácidos (mg/l) de mostos desfangados procedentes de diferentes variedades blancas. Media \pm desviación (n = 6)

Compuestos	Tempranillo blanco	Maturana blanca	Turruntés	Garnacha blanca	Malvasía	Viura	G.S.
Ac. aspártico	26.7 \pm 2.7 a	28.0 \pm 5.9 a	14.7 \pm 3.9 b	19.9 \pm 4.4 ab	11.7 \pm 4.3 b	19.8 \pm 6.0 ab	***
Ac. glutámico	73.7 \pm 20.1 a	50.8 \pm 10.5 ab	30.1 \pm 9.4 b	45.5 \pm 14.3 ab	25.1 \pm 7.9 b	42.0 \pm 12.6 ab	***
Aspargagina	6.10 \pm 2.5 ab	7.42 \pm 3.1 ab	2.38 \pm 0.7 b	6.40 \pm 1.6 ab	9.48 \pm 3.1 a	6.95 \pm 1.5 ab	***
Serina	35.0 \pm 15.1 ab	58.2 \pm 24.3 a	20.3 \pm 4.3 b	19.4 \pm 2.8 b	21.0 \pm 6.3 b	27.7 \pm 7.1 ab	***
Glutamina	162 \pm 30.6 ab	232 \pm 47.1 a	62.6 \pm 17.2 c	115 \pm 20.7 bc	54.3 \pm 27.8 c	124 \pm 49.0 bc	***
Histidina	19.1 \pm 3.3 ab	23.2 \pm 4.9 a	10.1 \pm 1.6 c	14.7 \pm 1.8 bc	8.23 \pm 3.9 c	7.52 \pm 1.6 c	***
Glicina	4.82 \pm 3.3 ab	5.66 \pm 1.9 a	2.17 \pm 0.3 b	1.81 \pm 0.3 b	1.72 \pm 0.9 b	2.21 \pm 0.3 b	**
Treonina	45.3 \pm 6.3 b	75.8 \pm 12.3 a	30.0 \pm 2.2 b	24.7 \pm 4.8 b	39.4 \pm 12.3 b	28.5 \pm 8.8 b	***
Citrulina	9.48 \pm 1.6 a	6.1 \pm 1.0 ab	3.67 \pm 0.8 b	6.00 \pm 1.4 ab	6.24 \pm 2.45 ab	8.96 \pm 3.5 a	***
Arginina	363 \pm 51.2 ab	471 \pm 93.0 a	262 \pm 23.4 ab	423 \pm 40.2 ab	291 \pm 118 ab	230 \pm 60.6 b	***
Alanina	67.5 \pm 18.8 b	108 \pm 24.0 a	27.8 \pm 3.74 c	34.3 \pm 3.0 bc	28.0 \pm 9.5 c	45.0 \pm 15.9 bc	***
GABA	41.3 \pm 19.4	29.5 \pm 9.5	36.8 \pm 0.8	32.7 \pm 10.1	25.4 \pm 6.1	40.9 \pm 11.8	NS
Tirosina	13.1 \pm 5.3 a	11.5 \pm 2.2	4.84 \pm 1.2 bc	7.43 \pm 1.3 abc	9.57 \pm 2.5 abc	3.84 \pm 0.9 c	***
Cistina	8.53 \pm 6.1	11.3 \pm 7.3	6.24 \pm 3.6	7.19 \pm 3.1	4.50 \pm 3.8	4.45 \pm 2.4	NS
Valina	11.2 \pm 4.2 ab	15.8 \pm 3.2	7.03 \pm 1.5 b	8.40 \pm 0.8 b	7.24 \pm 1.8 b	8.64 \pm 2.4 ab	***
Metionina	3.37 \pm 1.3 b	6.73 \pm 1.7 a	1.71 \pm 1.1 b	3.07 \pm 0.8 b	2.04 \pm 1.0 b	1.73 \pm 0.9 b	***
Triptófano	22.8 \pm 4.4 a	20.9 \pm 5.9 a	16.2 \pm 5.7 ab	11.1 \pm 5.8 ab	13.7 \pm 4.7 ab	4.76 \pm 2.0 b	***
Fenilalanina	8.53 \pm 1.8 ab	8.26 \pm 2.2 b	7.81 \pm 2.7 b	11.2 \pm 1.9 ab	16.0 \pm 5.8 a	8.96 \pm 3.2 ab	**
Isoleucina	3.37 \pm 1.2	3.81 \pm 1.5	2.67 \pm 0.7	2.74 \pm 0.6	3.48 \pm 1.2	2.48 \pm 0.9	NS
Ornitina	1.93 \pm 0.7	1.89 \pm 0.5	1.32 \pm 0.8	1.57 \pm 0.6	1.76 \pm 0.9	1.45 \pm 0.6	NS
Leucina	7.30 \pm 1.6 ab	10.2 \pm 1.6 ab	5.60 \pm 1.9 b	7.73 \pm 1.3 ab	11.6 \pm 3.7 a	5.95 \pm 2.1 ab	***
Lisina	1.71 \pm 0.3	2.15 \pm 0.3	2.67 \pm 1.1	2.16 \pm 0.9	2.49 \pm 0.5	2.20 \pm 0.8	NS
Prolina	281 \pm 20.2 a	234 \pm 34.9 ab	192 \pm 62.9 ab	140 \pm 56.7 bc	95.0 \pm 41.2 c	210 \pm 21.5 ab	***
Σ Aminoácidos	1226 \pm 136 ab	1425 \pm 186 a	756 \pm 36.5 c	948 \pm 36.4 bc	691 \pm 245 c	843 \pm 185 bc	***
Prolina/arginina	0.79 \pm 0.1 a	0.52 \pm 0.2 ab	0.75 \pm 0.3 ab	0.34 \pm 0.3 b	0.34 \pm 0.1 b	0.96 \pm 0.2 a	***

G.S.: (*) p<0.05, (**) p<0.01, (***) p<0.001 y NS no significativo. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas

El análisis canónico discriminante de los resultados (Figura 1) permitió la separación de los mostos varietales en cuatro grupos según la función 1 (58% varianza), siendo las variables con mayor poder discriminante: histidina, metionina y leucina.

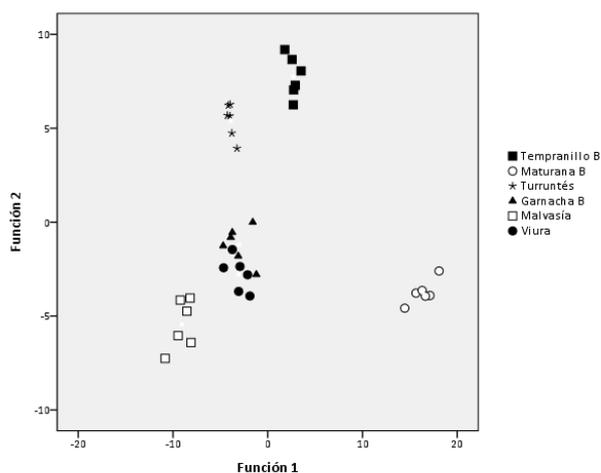


Figura 1. Análisis canónico discriminante de la composición aminoacídica de los mostos

La función 1 permitió la separación de los mostos de Maturana blanca, Tempranillo blanco y Malvasía, y el resto de variedades (Turruntés, Garnacha blanca y Viura), que no mostraron diferencias entre si. La función 2 (21% varianza) dio lugar a la clasificación de las variedades en dos grupos, en la parte positiva del eje se agruparon Tempranillo blanco y Turruntés, y en la negativa el resto de variedades. Los compuestos con mayor peso en dicha función fueron triptófano, treonina y fenilalanina.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo han puesto de manifiesto la existencia de importantes diferencias en la concentración de aminoácidos en los mostos de las variedades blancas autorizadas en la D.O.Ca. Rioja. Las variedades minoritarias Maturana blanca y Tempranillo blanco han presentado el mayor contenido de estos compuestos, claramente superior al observado en Turruntés y Malvasía. Estas diferencias pueden incidir en el correcto desarrollo del proceso fermentativo y contribuir a la consecución de un perfil aromático característico en los vinos obtenidos.

5. Bibliografía

1. Bell, S.J., Henschke, P.A. 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *In: Australian J. Grape Wine Research*, 11: 242-295.
2. Burin, V.M., Gomes, T.M., Caliar, V., Rosier, J.P., Bordignon, M.T. 2015. Establishment of influence the nitrogen content in musts and volatile profile of white wines associated to chemometric tools. *In: Microchemical Journal*, 122: 20-28.
3. Garde-Cerdán, T., Ancín-Azpilicueta, C. 2008. Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols and acids during wine alcoholic fermentation. *In: LWT-Food Sci. Technol.*, 41: 501-510.
4. Garde-Cerdán, T., López, R., Portu, J., González-Arenzana, L., López-Alfaro, I., Santamaría, P. 2014. Study of the effects of proline, phenylalanine, and urea foliar application to Tempranillo vineyards on grape amino acid content. Comparison with commercial nitrogen fertilisers. *In: Food Chemistry*, 163: 136-141.
5. 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. *In: J. Agric. Food Chem.*, 50: 2891-2899.
6. Valdés, E., Vilanova, M., Sabio, E., Benalte, M.J. 2011. Clarifying agents effect on the nitrogen composition in must and wine during fermentation. *In: food Chemistry*, 125: 430-437.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la Consejería de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente del Gobierno de La Rioja durante los años 2012-2014.

AC03 - ESTUDIO DEL CONTENIDO EN IONES METÁLICOS DE VINOS DE LA ISLA DE FOGO (CABO VERDE)

**Juan P. Pérez Trujillo^{1*}, Sara Vega Pérez¹, José E. Conde¹,
Zulimar Hernández², Carlos de Pina³**

¹Departamento de Química, Universidad de La Laguna, 38.207-La Laguna, Tenerife, España

²Departamento de Geología y Geoquímica. Universidad Autónoma. Cantoblanco. Madrid

³Centro Formativo Profesional en San Felipe. Universidad de Cabo Verde, Fogo, Cabo Verde
jperez@ull.edu.es

RESUMEN:

Se establece el contenido en once metales (K, Na, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Sr, Li y Rb) de 24 muestras de vinos blancos, rosados y tintos de la isla de Fogo en el archipiélago de Cabo Verde. Las determinaciones se llevaron a cabo haciendo uso de las técnicas de espectroscopía de absorción y emisión atómica. Se estudian las diferencias de contenido entre los distintos tipos de vino comprobándose que, en general, los vinos tintos presentan un contenido medio superior a los vinos blancos y rosados. Asimismo, se realiza un estudio comparativo con vinos de la región macaronésica (Canarias, Madeira, Azores) comprobándose que los vinos de Cabo Verde se distinguen del resto por presentar los mayores contenidos en K, Fe y Sr, y los menores contenidos en Na, Zn y Mn.

Palabras clave: vinos, metales, espectroscopía atómica, Fogo

1. Introducción

El archipiélago de Cabo Verde está situado en el océano atlántico, enfrente de Senegal, a unos 600 Km de sus costas. Forma parte, junto con los archipiélagos de Canarias, Madeira y Azores, de la región denominada Macaronesia. Todos estos archipiélagos son de origen volcánico. El archipiélago de Cabo Verde está formado por 10 islas grandes y 5 menores. De todas ellas, en la actualidad solo se cultivan viñas en la isla de Fogo. Esta isla está situada en el paralelo 15° de latitud Norte y en el meridiano 24,5° de longitud Oeste. Fogo tiene una extensión de 476 Km² y unos 37000 habitantes, está dominada por un volcán activo (Volcán de Fogo) que alcanza los 2800 m de altura, que da origen a laderas de fuerte pendiente y presenta una caldera de unos 8 Kms de ancho (Châ das Calderias) a 1700 m de altura, donde se plantan viñas. Su clima es subtropical templado seco, con una media de temperatura de 20-25°C. La época de lluvias comprende de julio a octubre con una media de 123 mm anuales. Los suelos se desarrollan bajo condiciones xéricas, con poca vegetación. El cultivo de la vid tiene lugar en las laderas del volcán y en el interior de la caldera sobre Antrosoles vítricos y Andosoles. Entre las variedades más usadas están la moscatel (clon europeo ya desaparecido) en las variedades blancas y la tinta preto (tinta tradicional originaria de Setúbal) en las variedades tintas.

Si bien existen diferentes publicaciones referidas a vinos de los archipiélagos de Canarias (1-3), Madeira (4) y Azores (4), hasta el presente no hay ninguna publicación que haga referencia a estudios analíticos de los vinos del archipiélago de Cabo Verde (isla de Fogo). En este trabajo se establece por primera vez la composición en once iones metálicos (K, Na, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Sr, Li y Rb) de los vinos de la isla de Fogo (archipiélago de Cabo Verde), con

objeto de conocer su composición, ver si cumplen con las recomendaciones de organismos internacionales, y estudiar las diferencias existentes entre estos vinos y otros procedentes de otras regiones de la macaronesia.

2. Material y métodos

2.1. Muestras de vinos. Se tomaron un total de veinticuatro muestras de vino procedentes de las diferentes bodegas elaboradores de vino de la isla. De estas muestras, nueve eran blancos, seis rosados y nueve tintos.

Los parámetros básicos de estas muestras, según tipo de vino, se recogen en la tabla 1.

Tabla 1. Valor medio y desviación estándar de diferentes parámetros básicos para los distintos tipos de vino.

Parámetro	Blanco		Rosado		Tinto	
pH	3,61	± 0,18	3,45	± 0,04	4,04	± 0,31
Acidez total (g · L ⁻¹)	6,6	± 0,8	6,8	± 1,3	5,2	± 0,3
Acidez volátil (g · L ⁻¹)	0,66	± 0,27	0,38	± 0,12	0,95	± 0,29
Ácido tartárico (g · L ⁻¹)	1,7	± 0,4	2,6	± 0,0	1,7	± 0,6
Ácido láctico (g · L ⁻¹)	1,4	± 1,0	0,6	± 0,2	3,4	± 0,8
% alcohol (% vol)	14,52	± 1,10	13,15	± 1,51	15,10	± 1,05
Masa volúmica (g · cm ⁻³)	0,9897	± 0,0009	0,9893	± 0,0013	0,9924	± 0,0025
Az. Reductores (g · L ⁻¹)	5,7	± 3,8	1,8	± 1,5	4,9	± 1,8
Extracto seco (g · L ⁻¹)	35	± 8	27	± 1	43	± 9
Glicerol (g · L ⁻¹)	7,8	± 1,8	6,8	± 1,0	11,0	± 1,7

2.2. Procedimiento analítico. Las muestras se trataron previamente con HNO₃ concentrado en un horno microondas para eliminar la matriz. Las determinaciones analíticas de los metales Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn y Sr se realizaron por espectroscopía de absorción atómica, y las de Li y Rb mediante espectroscopía de emisión atómica.

3. Resultados

3.1. Contenido mineral de las muestras de vino

Los valores medios y la desviación estándar de los diferentes metales según el tipo de vino analizado se recogen en la tabla 2.

Los elementos determinados presentan contenidos medios en los diferentes tipos de vino conformes a los descritos en la bibliografía por otros autores (5). Asimismo, cumplen con los requisitos de límite máximo para determinados elementos establecido por organismos internacionales como la OIVV.

En general, los vinos tintos presentan un contenido medio superior a los vinos blancos y rosados, lo cual puede ser debido a que el mayor tiempo de contacto del líquido con los hollejos permite una mayor extracción de metales, si bien no todas las diferencias de

contenido son significativas. Así, el hierro, zinc y litio no presentan diferencias significativas de contenido medio entre los tres tipos de vino.

Los elementos calcio y estroncio presentan diferencias significativas de contenido medio entre los tres tipos de vino, correspondiendo los mayores y menores contenidos medios a los vinos tintos y blancos, respectivamente. Por su parte el potasio, magnesio, manganeso y rubio presentan un contenido medio significativamente mayor en los tintos que en los blancos y rosados. Por último, el cobre presenta un contenido medio significativamente menor en los vinos blancos con respecto a los otros dos tipos de vino.

Tabla 2. Valor medio y desviación estándar ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) de los diferentes metales para los diferentes tipos de vino (blancos, rosados y tintos) de Cabo Verde, así como diferencias significativas entre ellos

	Blancos (1)		Rosados (2)		Tintos (3)		Dif sig
K	1037	± 266	994	± 329	1680	± 625	1-3, 2,3
Na	13,8	± 3,9	16,5	± 4,1	10,0	± 4,5	2-3
Ca	54,8	± 10,3	64,0	± 2,1	77,8	± 8,0	1-2, 1-3, 2-3
Mg	72,8	± 4,1	73,3	± 4,3	110,0	± 7,9	1-3, 2-3
Fe	2,62	± 1,30	3,96	± 1,45	4,28	± 1,94	--
Cu	0,13	± 0,10	0,03	± 0,00	0,04	± 0,02	1-2, 1-3
Zn	0,30	± 0,10	0,30	± 0,09	0,37	± 0,28	--
Mn	0,34	± 0,04	0,37	± 0,05	0,43	± 0,05	1-3, 2-3
Sr	0,68	± 0,19	0,95	± 0,05	1,65	± 0,21	1-2, 1-3, 2-3
Li*	5,26	± 1,35	5,57	± 1,98	7,00	± 2,36	--
Rb	1,91	± 0,83	1,32	± 0,16	2,85	± 1,20	1-3, 2-3

* ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

3.2. Comparación con vinos de otros archipiélagos de la Macaronesia.

Teniendo en cuenta que los archipiélagos de Canarias, Madeira y Azores forman parte de una misma región atlántica, denominada Macaronesia, y que todos ellos son de origen volcánico, hemos considerado oportuno comparar los resultados obtenidos en los vinos de Cabo Verde con los obtenidos en los otros archipiélagos. En la tabla 3 se recogen los valores medio y desviación estándar de los diferentes elementos para vinos pertenecientes a los diferentes archipiélagos de la Macaronesia. Los datos de los vinos de los archipiélagos de Canarias, Madeira y Azores son los publicados en la referencia (4).

Tabla 3. Valor medio y desviación estándar ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) de los diferentes elementos para los vinos de los cuatro archipiélagos de la Macaronesia.

	Canarias (1)	Madeira (2)	Azores (3)	Cabo Verde (4)	Dif sig
K	835 ± 335	936 ± 215	923 ± 217	1267 ± 540	1-4, 2-4, 3-4
Na	92,0 ± 45,4	51,0 ± 30,1	52,0 ± 16,1	13,1 ± 4,8	1-2, 1-3, 1-4, 2-4, 3-4
Ca	68,7 ± 15,0	73,1 ± 23,8	80,5 ± 15,7	65,7 ± 12,8	1-3, 3-4
Mg	84,0 ± 17,0	101,2 ± 13,9	112,5 ± 41,8	86,9 ± 19,1	1-2, 1-3, 2-3, 2-4, 3-4
Fe	2,59 ± 1,29	2,35 ± 1,37	1,55 ± 0,96	3,58 ± 1,72	1-3, 1-4, 2-3, 2-4, 3-4
Cu	0,17 ± 0,21	0,63 ± 0,66	0,22 ± 0,41	0,07 ± 0,08	1-2, 2-3, 2-4
Zn	0,56 ± 0,32	1,02 ± 0,60	0,63 ± 0,55	0,32 ± 0,18	1-2, 1-4, 2-3, 2-4, 3-4
Mn	1,01 ± 0,46	1,93 ± 0,76	0,71 ± 0,22	0,38 ± 0,06	1-2, 1-3, 1-4, 2-3, 2-4, 3-4
Sr	0,67 ± 0,29	0,66 ± 0,25	0,76 ± 0,29	1,11 ± 0,47	1-4, 2-4, 3-4
Li*	8,67 ± 6,12	3,92 ± 4,53	4,87 ± 4,83	5,99 ± 2,02	1-2, 1-3, 1-4
Rb	1,92 ± 1,08	1,99 ± 0,61	2,69 ± 0,70	2,12 ± 1,07	1-3, 2-3, 3-4

* ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

Como puede observarse todos los elementos analizados presentan diferencias significativas de contenido medio entre archipiélagos.

Es de señalar el bajo contenido en sodio de los vinos de Cabo Verde en relación a los vinos de los otros archipiélagos, lo cual es debido a que al encontrarse el viñedo de Cabo Verde a una mayor altura (unos 1700 msnm) y en el interior de una caldera no llega el aerosol, cosa que si ocurre en los otros archipiélagos.

Los vinos de Cabo Verde se distinguen de los vinos de los otros archipiélagos por poseer un contenido medio significativamente mayor en potasio, hierro y estroncio, y significativamente menor en sodio, zinc y manganeso.

4. Conclusiones

Los vinos tintos de Cabo Verde (isla de Fogo) destacan frente a los vinos blancos y rosados por poseer un contenido medio significativamente mayor en K, Ca, Mg, Mn, Sr y Rb.

Los vinos de Cabo Verde se diferencian de los vinos del resto de archipiélagos de la Macaronesia por poseer un contenido medio significativamente mayor en K, Fe y Sr, y significativamente menor en Na, Zn y Mn que los otros archipiélagos.

El menor contenido en sodio de los vinos de Cabo Verde se debe a que el aerosol marino no ejerce ningún efecto debido a la mayor altitud del cultivo de la vid (600 - 1700 msnm).

5. Bibliografía

1. Frías, S., Conde, J.E., Rodríguez, M.A., Dohnal, V., Pérez Trujillo, J.P. 2002. Metallic content of wines from the Canary Islands (Spain). Application of artificial neural networks to the data analysis. *In: Nahrung/Food*. Wiley-VCH. 46 (5), 370-375.
2. Barbaste, M., Medina, B., Sarabia, L., Ortiz, M.C., Pérez Trujillo, J.P. 2002. Analysis and comparison of SIMCA models for denominations of origin of wines from the Canary Islands (Spain) builds by means of their trace and ultratrace metals content. *In: Analytica Chimica Acta*. Elsevier. 472. 161-174.
3. Frías, S., Conde, J.E., Rodríguez-Bencomo, J.J., García-Montelongo, F., Pérez Trujillo, J.P. 2003. Classification of commercial wines from the Canary Islands (Spain) by chemometric techniques using metallic contents. *In: Talanta*. Elsevier. 59. 335-344.
4. Pérez Trujillo, J.P., Conde, J.E., Pérez Pont, M.L., Câmara, J., Marques, J.C. 2011. Content in metallic ions of wines from the Madeira and Azores archipelagos. *In: Food Chemistry*. Elsevier. 124, 533-537.
5. Cabanis, J.C., Cabanis, M.T., Cheynier, V. Teissedre, P.L. 1999. Tables de composition. *In: Oenologie: Fondaments scientifiques et technologiques*. Tec & Doc. 316-336.

6. Agradecimientos

Proyectos SEMACA (PCT-MAC 2007-2013), sub-proyecto Ecoviticave, y CGL2008-04296.

AC04 - ANÁLISIS SECUENCIAL DEL ESPACIO DE CABEZA PARA EL ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DEL AROMA DEL VINO

Wen Yan, Ricardo López, Vicente Ferreira

Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología, Universidad de Zaragoza, Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias (Edif. D), Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, España
wenyan1126@hotmail.com

RESUMEN

Se ha desarrollado un método de análisis basado en un sistema de espacio de cabeza dinámico (DHS) combinado con desorción térmica y acoplado a un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas, para caracterizar la evolución temporal de los compuestos volátiles. En el método propuesto, dos estándares internos se adicionan a 50 mL de vino bajo atmósfera inerte y a continuación se trasvasan 5 mL a un vial estándar de espacio de cabeza. Las condiciones de DHS para el análisis de volátiles son temperatura de incubación 30 °C durante 5 min, volumen de purga de 100 mL y volumen de secado de 50 mL. El método desarrollado muestra una buena reproducibilidad y respuesta lineal para compuestos en un amplio intervalo de polaridades y volatilidades. Los resultados muestran que los compuestos en la cabeza del vino cambian a lo largo del tiempo y dan una posible explicación de por qué concentraciones totales de volátiles idénticas en el vino producen diferentes percepciones en el aroma.

Palabras clave: vino, espacio de cabeza dinámico, compuestos volátiles, evolución

1. Introducción

Entender la evolución que sufre la percepción sensorial de los vinos durante su consumo es un desafío. El llamado proceso de “apertura” es acompañado por cambios en la concentración de volátiles en el espacio de cabeza, que pueden estar relacionados con mecanismos complejos [1]. Trabajos previos han mostrado que existen diferencias significativas en la volatilidad relativa de los odorantes [2]. Sin embargo, las condiciones experimentales de este trabajo previo [2] estaban alejadas del perfil de liberación real que sucede en la copa. La técnica de espacio de cabeza dinámico (DHS) es una opción con potencial para capturar “instantáneas” de los perfiles aromáticos a lo largo del tiempo.

En el presente estudio, hemos desarrollado un método de extracciones consecutivas basado en DHS y hemos aplicado este método al análisis de un vino tinto para cuantificar los cambios que los compuestos volátiles sufren en el espacio de cabeza a lo largo del tiempo.

2. Material y métodos

En el presente estudio se analizó un vino tinto crianza mediante la técnica de espacio de cabeza dinámico. 200 µg/L de dos estándares internos se adicionan a 50 mL de vino bajo atmósfera inerte. Los estándares internos eran 2-metilbutirato de etilo (MBM) y 2,6-dicloroanisol (DCA). A continuación se toman 5 mL y se depositan en un vial estándar de espacio de cabeza. En el sistema de DHS se programa una cola de muestras en la que el mismo vial se analiza de forma consecutiva 10 veces (cada 70 minutos).

La extracción de los volátiles se realizó usando un sistema de DHS con un muestreador automático Gerstel MPS (Mülheim der Ruhr, Dinamarca). El material sorbente utilizado fue Tenax TA (Gerstel) acondicionado antes de su uso según la recomendación del fabricante. Las condiciones de DHS son temperatura de incubación 30 °C durante 5 minutos, volumen de purga de 100 mL y volumen de sacado de 50 mL. Splitless en el TDU, la temperatura inicial es 20 °C durante 1 min, rampa a 200 °C/min hasta 300 °C durante 5 min. Solvent vent en PTV, caudal de venteo es 60 mL/min, la presión en columna permanece 0 psi hasta la finalización de desorción. Split en CIS (1:20), la temperatura inicial es -100 °C durante 0,2 min, rampa a 60 °C/min hasta 150 °C, rampa 12 °C/s hasta 250 °C durante 25 min. La columna es J&W DB-Wax de Agilent (60 m × 0,25 mm × 0.25 µm). El programa de temperatura es como sigue, 40 °C durante 3 min luego a 10 °C/min hasta 220 °C durante 20 min. Modos de adquisición Scan y SIM simultáneos, el rango de barrido es 33-250 m/z y iones selectivos 44, 47, 62, 64, 100, 106 m/z para compuestos particulares.

3. Resultados

El método desarrollado muestra una buena reproducibilidad para los estándares internos (RSD del 9 % para MBM y 14 % para DCA). Los resultados dentro de vinos van del 5 al 9 % para el MBM y del 7 al 14 % para el DCA. Estos resultados coinciden con un estudio previo en el que se utilizaron los mismo estándares internos [3].

Los datos de la linealidad del método para algunos compuestos seleccionados puede observarse en la Tabla 1. Ácido butírico, butirato de etilo, 1-butanol y 4-etilfenol mostraron una adecuada respuesta lineal en el rango estudiado. Otros métodos basados en DHS con condiciones parecidas al nuestro han encontrado respuestas lineales para decanoato de etilo en intervalos similares de concentración [4]. Es posible que el problema pueda estar relacionado con una mala solubilización del decanoato durante la adición del patrón.

En el caso del acetaldehído el ajuste lineal fue peor y los estándares internos no mejoraban el error del ajuste. Una explicación para la peor respuesta lineal en este caso puede deberse a una potencial interacción con el sulfuroso libre del vino.

Tabla 1. Valores de linealidad del método de análisis DHS en compuestos seleccionados

Compuesto	Rango lineal (mg/l)	Ecuación de regresión lineal	R ²
Ácido butírico	0,97 - 17,83	$y=0,0105x+0,0242$ ^a	0,9952
1-butanol	0,72 - 14,96	$y=0,6219x+1,0814$ ^b	0,9986
4-etilfenol	0,34 - 6,27	$y=0,0685x+0,0184$ ^b	0,9995
Butirato de etilo	0,12 - 2,45	$y=2,0756x+0,5621$ ^a	0,9945
Decanoato de etilo	0,08 - 1,46	$y=1,5133x+0,1538$ ^a	0,9878
Acetaldehído	1,55 - 16,39	$y=610,87x+13143$ ^c	0,9690

^a, área relativa de compuesto respecto a MBM frente a concentración añadida. ^b, área relativa de compuesto respecto a DCA frente a concentración añadida. ^c, área absoluta de compuesto frente a concentración añadida.

Los diferentes comportamientos en el espacio de cabeza de volátiles representativos de diferentes familias químicas pueden observarse en la figura 1. Es notable como los compuestos de volatilidad alta y polaridad baja (p.ej. ésteres etílicos o acetatos) presentan caídas exponenciales. Sin embargo, compuestos de mayor polaridad como los alcoholes de fusel permanecen esencialmente constantes en el espacio de cabeza. Un caso particular son los compuestos muy volátiles azufrados (metanotiol o sulfuro de dimetilo) que aumentan hasta la segunda extracción y después decaen.

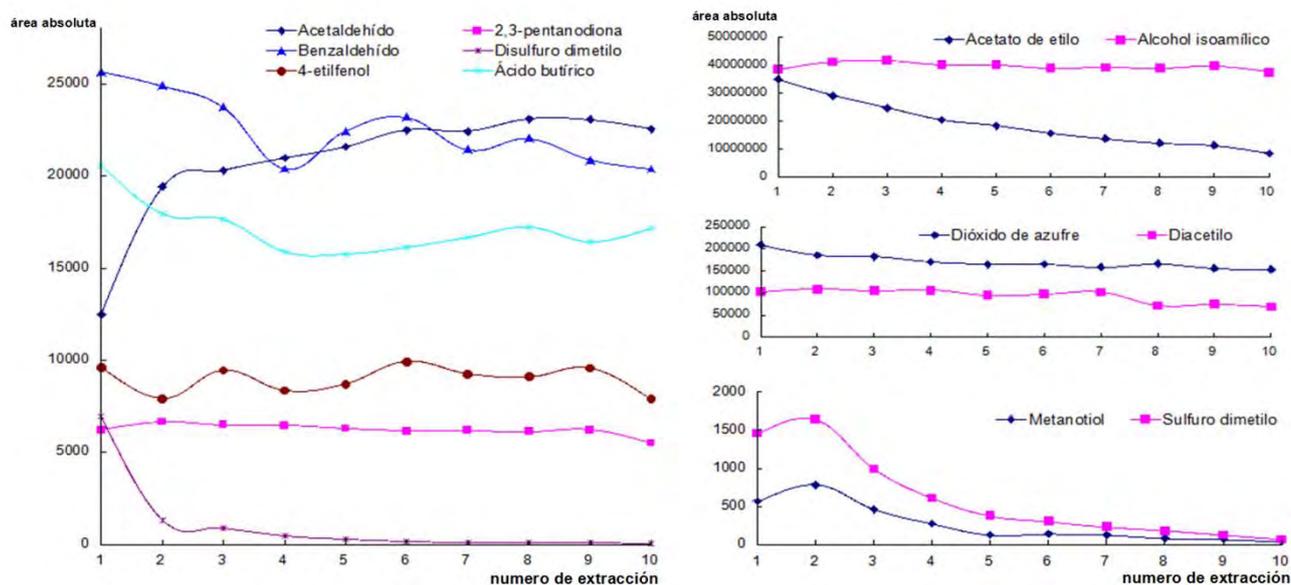


Figura 1. Evoluciones de las compuestos en el espacio de cabeza del vino tinto crianza a lo largo del tiempo en 10 extracciones consecutivas.

4. Conclusiones

El método desarrollado es suficientemente sensible y reproducible para determinar la mayor parte de compuestos implicados en el aroma del vino.

Los resultados obtenidos demuestran que la concentración en el HS de un compuesto determinado puede aumentar o disminuir a lo largo del tiempo, y que compuestos de diferentes familias químicas se comportan de manera distinta. Esta información será utilizada en posteriores trabajos para encontrar una explicación al cambio en el perfil sensorial que se percibe cuando el vino evoluciona en la copa.

5. Bibliografía

1. Villamor, RR; Ross, CF. 2013. Wine matrix compounds affect perception of wine aroma. *Annual Review of Food Science and Technology*. 4, 1-20.
2. Zapata, J.; Lopez, R.; Herrero, P.; Ferreira, V. 2012. Multiple automated headspace in-tube extraction for the accurate analysis of relevant wine aroma compounds and for the estimation of their relative liquid-gas transfer rates. *Journal of Chromatography A*. 1266, 1-9.
3. Bueno, M.; Zapata, J.; Ferreira, V. 2014. Simultaneous determination of free and bonded forms of odor-active carbonyls in wine using a headspace solid phase. *Journal of chromatography A*. 1369, 33-42.
4. Marquez, A.; Serratosa, MP.; Merida, J.; Zea, L.; Moyano, L. 2014. Optimization and validation of an automated DHS-TD-GC-MS method for the determination of aromatic esters in sweet wines. *Talanta*. 123, 32-38.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España (proyecto CICYT 230183). Wen Yan ha recibido una beca del China Scholarship Council (Num.201306300012).

AC05 - COMPARACIÓN DE TÉCNICAS DE ANÁLISIS SENSORIAL EN LA CATA DE VINOS UTILIZANDO CONSUMIDORES

Josefina Vila-Crespo¹, Encarnación Fernández-Fernández², José Manuel Rodríguez-Nogales²

¹Universidad de Valladolid, Área de Microbiología, Avda. Madrid 57, 34004 Palencia, España.

²Universidad de Valladolid, Dpto. Ing. Agrícola y Forestal, Avda. Madrid 57, 34004 Palencia, España.

jvila@pat.uva.es

RESUMEN:

Dentro de las técnicas de evaluación sensorial para el desarrollo de nuevos productos, control de calidad, así como en la investigación de mercados, el análisis descriptivo es el método más utilizado. Estos métodos clásicos de análisis sensorial descriptivo requieren de un extenso entrenamiento de catadores y son costosos. En consecuencia, no son muy aplicables en ciertas industrias como la vinícola, en donde la caracterización sensorial la realizan los propios enólogos. El objetivo de este trabajo es utilizar y comparar distintos métodos alternativos al análisis sensorial descriptivo usando un grupo de consumidores para proporcionar un posicionamiento rápido de vinos, y así evitar las etapas que consumen tiempo como el entrenamiento del panel.

Palabras clave: Análisis sensorial, consumidores, vinos

1. Introducción

Uno de los objetivos fundamentales de la industria agroalimentaria, y en concreto de la industria del vino, es la aceptación de sus productos por parte de los consumidores. Por esta razón el análisis sensorial es una herramienta muy importante y la más eficaz para evaluar las características organolépticas de los productos a través de los sentidos. El instrumento de medida que se utiliza en la evaluación sensorial es el ser humano, y los datos obtenidos dependen, en gran parte, de su buen estado de calibración y funcionamiento, es decir, una de las claves son las personas que participan en ella.

Dentro de las técnicas de evaluación sensorial para el desarrollo de nuevos productos, control de calidad, así como en la investigación de mercados, el análisis descriptivo es el método más utilizado (Lawless y Heymann, 2010). El objetivo de este método es describir las características sensoriales de un producto y usar esas características para cuantificar las diferencias sensoriales entre productos utilizando un grupo de catadores expertos, seleccionados por sus habilidades sensoriales, y entrenados para describir y evaluar sensorialmente diferencias entre productos. Sin embargo, en contrapartida al éxito de los resultados obtenidos, estos métodos clásicos de análisis sensorial descriptivo requieren de un extenso entrenamiento de catadores y son costosos (Varela y Ares, 2012). En consecuencia, no son muy aplicables en ciertas industrias como la vinícola, en donde la caracterización sensorial la realizan los propios enólogos.

Por lo tanto, existe una presión desde el punto de vista industrial para desarrollar métodos alternativos que eviten la necesidad de entrenar un panel de catadores entrenados, así como recopilar información sensorial directamente de los consumidores (Faye et al., 2006). En este contexto, durante la última década han aumentado su popularidad el uso de varias metodologías de perfiles sensoriales con consumidores.

Por ejemplo, realizar análisis descriptivo con los consumidores, es decir, pidiéndoles que evalúen la intensidad de diferentes atributos sensoriales para que proporcionen una información similar a los perfiles sensoriales clásicos realizados con catadores entrenados (Worch et al., 2010).

Otra alternativa para obtener perfiles con consumidores es la aplicación del Napping® con el objetivo de cuantificar percepciones individuales de similitud y disimilitud globales entre productos (Pagès, 2005). En esta metodología a los consumidores se les pide que proporcionen la proyección, en un mantel de dos dimensiones, de un grupo de muestras de acuerdo con sus propios criterios de similitud.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es comparar los resultados de distintos métodos alternativos al análisis sensorial descriptivo usando un grupo de consumidores para proporcionar un posicionamiento rápido de vinos, y así evitar las etapas que consumen tiempo como el entrenamiento del panel.

2. Material y métodos

Un grupo de 21 consumidores no entrenados, pero con experiencia en la cata de vinos, y con edades comprendidas entre los 18 y los 45 años, evaluaron 6 muestras de vino de la variedad Verdejo. Las pruebas se realizaron en la sala de cata de la ETSIIAA del Campus de Palencia (Universidad de Valladolid) y en cabinas individuales. Las 6 muestras se sirvieron aleatoriamente según un diseño de bloques completos, en copas para la degustación de vinos según la Norma UNE 87022:1992, con códigos de tres cifras elegidos al azar.

Para cada muestra, los consumidores evaluaron en primer lugar la aceptabilidad del color, olor, persistencia y aceptabilidad global utilizando una escala hedónica de 9 puntos. A continuación los consumidores realizaron un análisis descriptivo utilizando una ficha de cata de 9 descriptores agrupados en fase visual (intensidad del color), fase olfativa (intensidad del olor) y fase en boca (volumen en boca, sabor ácido y amargo, fruta, hinojo, herbáceo y persistencia). Todos los atributos los evaluaron utilizando una escala no estructurada de 10 cm. Por último, mediante la técnica del Napping®, los consumidores tenían que colocar las muestras de vino en una hoja en blanco de 40 cm x 60 cm según sus propios criterios y según la importancia relativa que cada consumidor quisiera dar, de tal manera que dos vinos están muy cerca si son percibidos como idénticos y distantes entre sí si son percibidos como diferentes.

El análisis de los datos obtenidos en la prueba de aceptabilidad se realizó utilizando mapas de preferencia internos (MPI), y con los datos del análisis descriptivo un análisis de componentes principales (ACP). En ambos casos se utilizó el programa Statgraphics Plus for Windows 4.0 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD 20852-4999 USA). Los datos del Napping® se analizaron mediante análisis factorial múltiple (AFM) usando el lenguaje R (R Development Core, 2007) y el paquete FactoMineR.

3. Resultados

En la figura 1 se representa mediante MPI las relaciones entre los distintos vinos en función de la aceptabilidad del color, olor, persistencia y aceptabilidad global. Los vinos se localizaron perfectamente en la dimensión vectorial definida por las dos primeras componentes, las cuales explicaron el 93,01% de la varianza total. Se observa que los vinos 1 y 2 están agrupados y se caracterizan, al igual que los vinos 6 y 4, porque presentaron mayor aceptabilidad en todos los descriptores evaluados. Por otra parte las muestras de vino 3 y 5 forman otro subconjunto homogéneo.

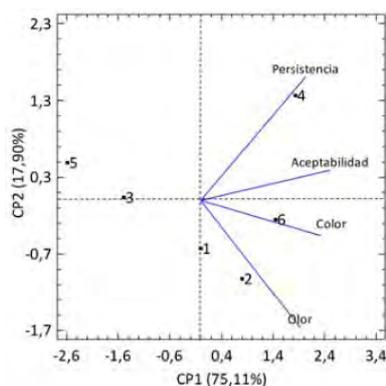


Figura 1. Mapa de preferencia interno (MPI) de la prueba de aceptabilidad: representación de muestras y atributos

Por otra parte, en la figura 2 se puede observar el diagrama de dispersión de las muestras de vino y de los descriptores sensoriales después de aplicar ACP. Las dos primeras componentes principales explican el 73,48% de la varianza total. Como en el caso anterior, los vinos 1 y 2 aparecen agrupados y se caracterizan por una mayor intensidad de color y olor, mayor volumen en boca, sabor amargo y herbáceos. El vino 3 posee mayor sabor ácido y a hinojo. Los vinos 4 y 5 mayor intensidad de fruta, y el vino 6 es el más persistente.

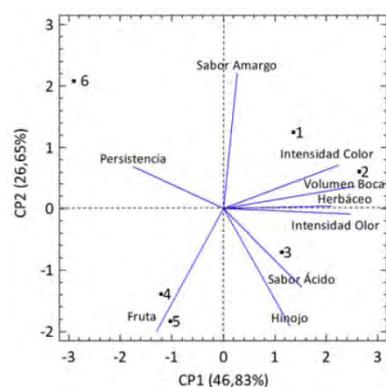


Figura 2. Representación del análisis de componentes principales (ACP) de los datos del análisis descriptivo

Finalmente, los vinos se ordenaron en cuatro grupos en las dos primeras dimensiones del AFM con los datos obtenidos con la técnica del Napping® (Fig. 3). Al igual que en la prueba de aceptabilidad (Fig. 1), aparecen dos subgrupos claramente diferenciados, los vinos 1 y 2 y, por otra parte, los vinos 3 y 5. Sin embargo, con esta prueba no se caracterizan los vinos desde el punto de vista sensorial, por lo que tendría que completarse con otros métodos de análisis sensorial (Pagès, 2005).

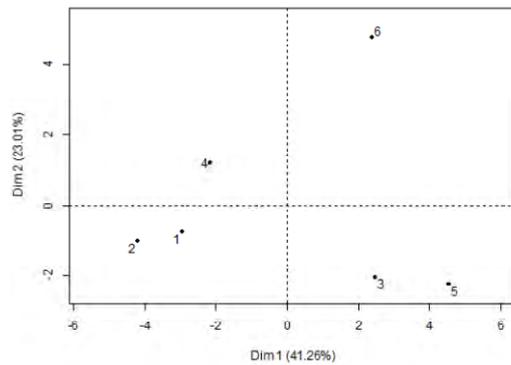


Figura 3. Representación de las muestras de vino en las dos primeras dimensiones del análisis factorial múltiple (AFM)

4. Conclusiones

Los dos primeros métodos de análisis sensorial (prueba de aceptabilidad y análisis descriptivo) proporcionan un perfil sensorial de las muestras y son capaces de discriminar entre muestras, lo que sugiere que ambas metodologías pueden detectar diferencias en la percepción de los consumidores.

La información proporcionada por el método Napping® fue similar a la prueba de aceptabilidad, si bien con esta última también se pueden caracterizar las muestras desde un punto de vista hedónico. Por lo tanto, se puede decir que los resultados de ambas metodologías mostraron mapas muy similares en la representación de las muestras, lo que indica su alta concordancia.

5. Bibliografía

1. Faye, P.; Brémaud, D.; Teillet, E.; Courcoux, P.; Giboreau, A.; Nicod, H. 2006. An alternative to external preference mapping based on consumer perceptive mapping. In: *Food Quality and Preference*, 17, 604–614.
2. Lawless, H. T.; Heymann, H. 2010. *Sensory evaluation of food. Principles and practices* (2nd ed.). In: New York: Springer.
3. Pagès, J. 2005. Collection and analysis of perceived product inter-distances using Multiple Factor Analysis: Application to the study of 10 white wines from the Loire Valley. In: *Food Quality and Preference*, 16, 642–649.
4. Varela, P.; Ares, G. 2012. Sensory profiling, the blurred line between sensory and consumer science. A review of novel methods for product characterization. In: *Food Research International*, 48, 893–908.
5. Worch, T.; Le, S.; Punter, P. 2010. How reliable are the consumers? Comparison of sensory profiles from consumers and experts. In: *Food Quality and Preference*, 21, 309–318.

AC06 - EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE FUNGICIDAS DE NUEVA GENERACIÓN EN VINOS INTERNACIONALES MEDIANTE INMUNOENSAYOS

F.A. Esteve-Turrillas¹, A. Abad-Fuentes¹, C. Agulló², A. Abad-Somovilla²,
J.V. Mercader¹

¹Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA-CSIC), Departamento de Biotecnología, c/Agustín Escardino, 7, 46980, Paterna, València, España.

²Universitat de València, Departamento de Química Orgánica, c/Doctor Moliner, 50, 46100, Burjassot, València, España.

faet@iata.csic.es

RESUMEN:

En este estudio hemos explorado la aplicación de inmunoensayos desarrollados en nuestro laboratorio para la determinación multiresiduo de azoxystrobin, boscalid, cyprodinil, fenhexamid y pyrimethanil en vino. Se ha desarrollado un extenso muestreo de vinos comerciales de diverso tipo, procedencia geográfica y variedad de uva. Los resultados obtenidos evidenciaron la presencia de fungicidas en el 38% de las muestras analizadas, con contenidos superiores a 10 µg/L. Se ha encontrado una interesante correlación entre la concentración de fungicidas en vinos y su origen, probablemente como consecuencia de las condiciones climatológicas de cada zona y la mayor necesidad de tratamientos fitosanitarios. En definitiva, este estudio demuestra que la presencia de residuos de fungicidas en vinos puede ser fácilmente monitorizada mediante técnicas inmunoquímicas.

Palabras clave: Residuos, Fungicidas, Vino, Inmunoensayo, ELISA

1. Introducción

Azoxystrobin, boscalid, cyprodinil, fenhexamid y pyrimethanil son fungicidas de nueva generación que se emplean asiduamente en el tratamiento de la vid para combatir y prevenir diversas plagas. Existen numerosos estudios que demuestran la presencia de residuos de estos compuestos en uva como consecuencia de su elevado uso, y que ponen de manifiesto que estos compuestos pueden ser transferidos posteriormente al mosto y al vino.¹⁻² En la actualidad existen diversas metodologías analíticas disponibles para el análisis de residuos de plaguicidas en vino, basadas principalmente en técnicas cromatográficas.³ El empleo de inmunoensayos para realizar análisis cuantitativos de residuos en alimentos está en auge, debido a la elevada sensibilidad y especificidad que proporcionan. Además, no requieren de instrumentación sofisticada y son portátiles, por lo que pueden usarse en bodegas o incluso directamente en el campo.

En este estudio hemos explorado la utilidad de los inmunoensayos de tipo ELISA (inmunoensayo enzimático sobre soporte sólido) para la determinación multiresiduo de fungicidas en vinos. Para ello, se ha desarrollado un extenso muestreo de vinos embotellados comerciales, incluyendo muestras de muy diversa procedencia geográfica, y elaborados con diferentes variedades de uva.

2. Materiales y métodos

La concentración de fungicidas se determinó por ELISA competitivo en formato indirecto empleando placas de 96 pocillos previamente tapizadas con 100 µL por pocillo de disolución de conjugado de OVA en tampón carbonato (50 mM, pH 9.6) e incubación durante toda la noche. Todas las etapas se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Tras lavar las placas con NaCl 150 mM (conteniendo 0.05% v/v Tween 20) se adicionaron 50 µL por pocillo de patrón/muestra en agua y 50 µL por pocillo de anticuerpo específico en PBST (tampón fosfato 20 mM, pH 7.4, conteniendo NaCl 280 mM y 0.05% v/v Tween 20). Tras 1 h de reacción competitiva, las placas se lavaron, y a continuación se adicionaron 100 µL por pocillo de anticuerpo secundario (HRP-RAM dilución 1/2000 en PBST), dejando 1 h de reacción. Se lavaron nuevamente las placas y se determinó la actividad peroxidasa retenida con 100 µL por pocillo de *o*-fenilendiamina (2 g/L) y H₂O₂ (0.012% v/v) en tampón de revelado (citrato 25 mM, fosfato 62 mM, pH 5.4). Tras 10 min se paró la reacción enzimática con 100 µL por pocillo de ácido sulfúrico 1 M y se midió la absorbancia a 492 nm. Las curvas de calibrado se ajustaron a un modelo sigmoideo logarítmico de cuatro parámetros. Las muestras de vino se diluyeron 50 veces con agua Milli-Q para eliminar el efecto matriz, y se analizaron por duplicado mediante el ELISA competitivo descrito empleando una placa independiente para el análisis de cada fungicida.

3. Resultados

Un total de 250 botellas de vino de distinto tipo, procedencia, y variedad de uva empleada se adquirieron en supermercados y tiendas especializadas para determinar la presencia y concentración de los fungicidas azoxystrobin, boscalid, cyprodinil, fenhexamid y pyrimethanil. Las muestras de vino incluyeron 134 tintos, 96 blancos, y 20 rosados, siendo 35 de ellos espumosos. Los países de procedencia fueron: España (n = 80), Francia (n = 33), Italia (n = 29), Argentina (n = 27), Chile (n = 23), Alemania (n = 14), Portugal (n = 12), EEUU (n = 9), Australia (n = 7), Sudáfrica (n = 4), Austria (n = 4), y otros (n = 10). Un 65% eran monovarietales, mientras el resto empleaban una mezcla de distintas uvas. Las variedades de uva mayoritarias fueron cabernet sauvignon (15.2%), tempranillo (14.8%), chardonnay (12.4%), merlot (10.4%), garnacha tinta (5.6%), malbec (5.6%) y riesling (5.2%).

El límite de cuantificación (LOQ) de fungicidas en vino de los ensayos utilizados es de 10 µg/L. En total 120 muestras de vino (38%) contenían residuos de los fungicidas evaluados por encima del LOQ. El número de fungicidas diferentes encontrados en una misma muestra fueron: uno (23.5%), dos (10.5%), tres (3.8%), y cuatro (0.3%). La **Tabla 1** muestra un resumen de los resultados obtenidos según el tipo de vino.

Tabla 1
Presencia y concentración de fungicidas en los vinos analizados.

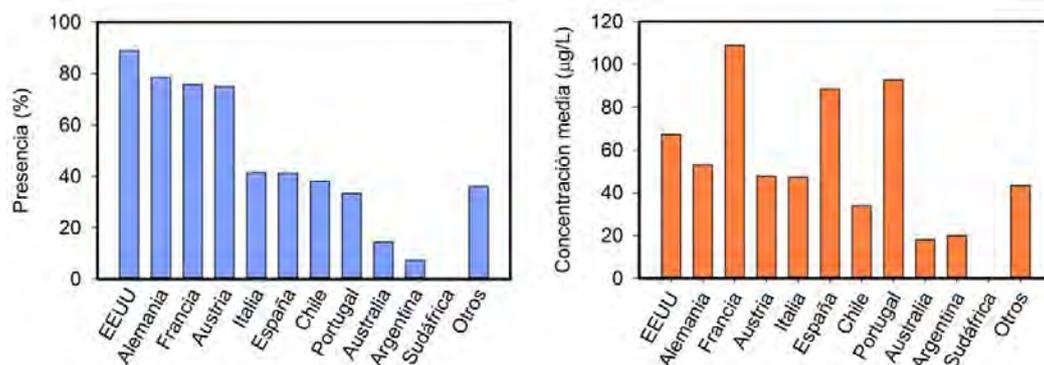
Fungicida	[Residuo] (µg/L)		Muestras positivas (%)				
	Máxima	Media	Total	Tinto	Blanco	Rosado	Espumoso
Azoxystrobin	54	30	1.2	2.2	- ^a	- ^a	- ^a
Boscalid	136	32	19.2	13.4	28.1	15.0	18.2
Cyprodinil	88	25	6.8	11.2	2.1	- ^a	- ^a
Fenhexamid	267	48	18.8	17.2	22.9	10.0	18.2
Pyrimethanil	920	69	22.4	17.2	31.3	15.0	30.3
Total	967	71	44.4	42.5	52.1	20.0	36.4

^a Concentración menor de 10 µg/L.

La concentración máxima de residuos encontrada para cada fungicida fue de 920 $\mu\text{g/L}$ pyrimethanil, 267 $\mu\text{g/L}$ fenhexamid, 136 $\mu\text{g/L}$ boscalid, 88 $\mu\text{g/L}$ cyprodinil, y 54 $\mu\text{g/L}$ azoxystrobin. Siendo los fungicidas más frecuentemente encontrados pyrimethanil (22%), boscalid (19%), y fenhexamid (19%). Respecto a la presencia de fungicidas por tipo de vino, el porcentaje de presencia de los fungicidas evaluados oscila entre 20% en vinos rosados y 52% en vinos blancos. Como muestra la **Tabla 1**, se observaron diferentes porcentajes de presencia considerando cada fungicida individualmente, debido probablemente a que la transferencia del fungicida de la uva al vino depende fuertemente del proceso de vinificación.

Figura 1

Presencia y concentración media de residuos de fungicidas en vino según su origen.



Las muestras analizadas fueron clasificadas según su país de origen y como se puede ver en la **Figura 1**, los vinos que mostraron una mayor frecuencia de residuos de fungicidas procedían de: EEUU (89%), Alemania (79%), Francia (76%) y Austria (75%), mientras que los vinos producidos en Italia, Chile, Portugal y España tenían una menor incidencia de residuos (33–41%). Finalmente, vinos de Australia (14%), Argentina (7%), y Sudáfrica (0%) mostraron los menores porcentajes de presencia de los cinco fungicidas analizados. La incidencia de plagas producidas por hongos depende fundamentalmente de factores climatológicos, así que el tratamiento fitosanitario para asegurar la calidad de la uva será más intenso en aquellas zonas con clima más desfavorable (húmedo y frío), lo que aumenta la probabilidad de encontrar residuos de fungicidas en el vino.

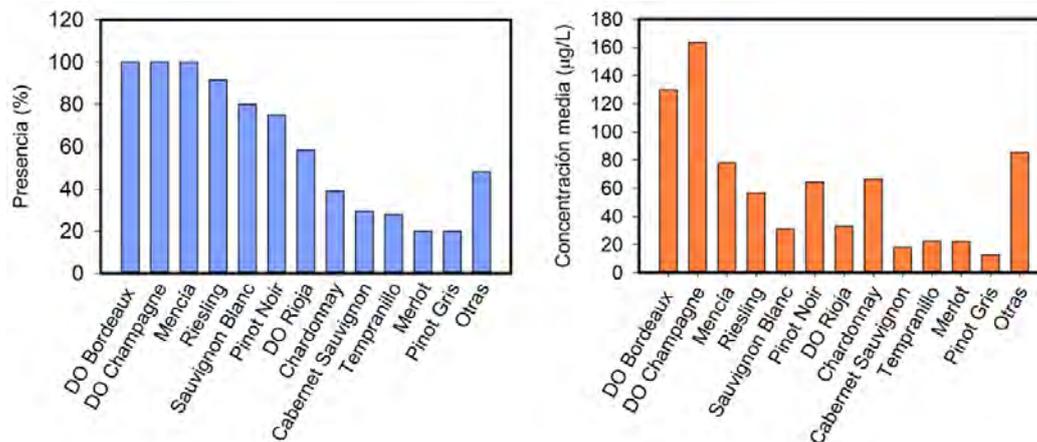
Otro parámetro evaluado fue la concentración media de residuos en las muestras positivas (**Figura 1**). Los vinos procedentes de Francia mostraron la concentración media más elevada (109 $\mu\text{g/L}$), aunque también hay que hacer hincapié en los elevados valores promedio encontrados para vinos portugueses (93 $\mu\text{g/L}$) y españoles (89 $\mu\text{g/L}$), a pesar de la relativamente baja presencia de fungicidas.

Asimismo, los resultados se clasificaron según la variedad de uva empleada (**Figura 2**). Para ello solo se consideraron vinos monovarietales y también mezclas típicas de denominaciones de origen (DO) tradicionales como: Bordeaux (cabernet franc, cabernet sauvignon, y merlot), Champagne (chardonnay, pinot meunier, y pinot noir), Cava (macabeo, parellada, y xarello) y Rioja (garnacha tinta, tempranillo, y mazuelo/graciano). De este estudio destaca la presencia de residuos en el 100% de vinos elaborados con uva mencía y las mezclas de uva característica de DO Champagne y Bordeaux, así como porcentajes elevados para uva riesling (92%), sauvignon blanc (80%) y pinot noir (75%). Los vinos elaborados con uvas tipo DO Rioja mostraron residuos en el 58% de las muestras. La incidencia de los cinco fungicidas analizados en vinos producidos a partir de uva chardonnay, cabernet sauvignon, tempranillo, merlot y pinot gris fue del 20 al 39%. Finalmente, indicar que los vinos elaborados con uva lambrusco, malbec, torrónés y mezcla típica de DO Cava no presentaron residuos de los cinco

fungicidas estudiados. Respecto a la concentración promedio, cabe destacar los elevados valores encontrados en vinos elaborados con mezcla de uva típica de DO Champagne (164 µg/L) y Bordeaux (130 µg/L).

Figura 2

Presencia y concentración media de residuos de fungicidas en vino según variedad de uva.



4. Conclusiones

Los inmunoensayos pueden ayudar a las bodegas a controlar la calidad de sus vinos y del proceso productivo, enfocando los análisis hacia aquellos productos fitosanitarios empleados en campo. En este estudio, se ha realizado un muestreo de 250 vinos embotellados de diferente tipo, procedencia y variedad de uva y se ha evaluado la presencia de residuos de fungicidas. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto una contaminación generalizada y global de los vinos con residuos de fungicidas, que en muchos casos son superiores a 100 µg/L. Los niveles encontrados están en consonancia con anteriores estudios, y ponen de manifiesto que, si bien el problema de salud pública es limitado, los consumidores están preocupados y las bodegas deberían esforzarse por mejorar este producto de tan alto valor añadido.

5. Bibliografía

1. Pesticide Action Network Europe. 2008. Message in a Bottle. www.pan-europe.info
2. Cugier, J.P.; Bruchet, S. 2005. Plan de surveillance résidus en Viticulture (Campagnes viticoles 1990–2003). Direction Générale de l'Alimentation. (France).
3. Vaquero–Fernández, L.; Sanz–Asensio, J.; Fernández–Zurbano, P.; López–Alonso, M.; Martínez–Soria, M.T. 2013. Determination of fungicide pyrimethanil in grapes, must, fermenting must and wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93, 1960–1966.

6. Agradecimientos

Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2006-12750-C02-00),
Ministerio de Economía (AGL2009-12940-C02-00).

AC07 - MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS DE ANÁLISIS SIMPLES Y RÁPIDOS PARA GARANTIZAR LA SEGURIDAD ALIMENTARIA

F.A. Esteve-Turrillas¹, J.V. Mercader¹, A. Abad-Somovilla², C. Agulló²,
A. Abad-Fuentes¹

¹Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IATA-CSIC), Departamento de Biotecnología, c/Agustín Escardino, 7, 46980, Paterna, València, España.

²Universitat de València, Departamento de Química Orgánica, c/Doctor Moliner, 50, 46100, Burjassot, València, España.

aabad@iata.csic.es

RESUMEN:

En este estudio presentamos los inmunorreactivos que ha producido nuestro grupo de investigación y los respectivos inmunoensayos que se han desarrollado para el análisis de residuos de sustancias de uso agroquímico de distintas familias, como estrobilurinas, anilino pirimidinas, o inhibidores de la succinato deshidrogenasa. El empleo de inmunoensayos tipo ELISA (inmunoensayos enzimáticos sobre soporte sólido), permite la determinación simple, rápida, sensible y específica de residuos químicos en alimentos. Los métodos desarrollados se han validado para el análisis de distintos alimentos en términos de sensibilidad, exactitud, precisión y robustez.

Palabras clave: Plaguicidas, ELISA, Anticuerpo, Seguridad Alimentaria

1. Introducción

Con el objetivo de aumentar el rendimiento de las cosechas se requiere un uso intensivo de plaguicidas, los cuales pueden permanecer en los alimentos constituyendo un factor de riesgo toxicológico. Atención especial requieren los fungicidas, que frecuentemente son aplicados en las etapas finales antes de la recolección e incluso en etapas poscosecha, lo cual hace más probable la presencia de residuos de estos compuestos en los alimentos. En consecuencia, la UE ha establecido niveles máximos de residuos permitidos, y periódicamente se realizan estudios de monitoreo de distintas familias de alimentos, lo que requiere el análisis de un elevado número de muestras.¹ El empleo de inmunoensayos para garantizar la seguridad alimentaria está ampliamente extendido como herramienta de cribado, pero también pueden proporcionar información cuantitativa de la concentración de fungicidas presentes en alimentos con elevada exactitud y precisión. Para ciertas aplicaciones, los inmunoensayos en formato ELISA (inmunoensayo enzimático sobre soporte sólido) presentan grandes ventajas frente al empleo de métodos tradicionales cromatográficos, lo que los hace atractivos para su uso en laboratorios con escasa instrumentación e incluso directamente in situ.

En este estudio presentamos los inmunorreactivos que ha producido nuestro grupo de investigación y los respectivos inmunoensayos que se han desarrollado y validado para el análisis de residuos de fungicidas de nueva generación y otros productos fitosanitarios en una gran variedad de alimentos.

2. Materiales y métodos

Un gran número de haptenos han sido diseñados y sintetizados, tomando como modelo la molécula diana a la que se le ha añadido un brazo espaciador (una cadena hidrocarbonada lineal de 2 a 6 carbonos) funcionalizado con un grupo carboxilo para su conjugación posterior a proteínas. Con el objetivo de alcanzar la mejor respuesta inmunoquímica posible se prepararon varios derivados funcionalizados de cada fungicida con diferente posición del espaciador.

Los haptenos se activaron con *N,N'*-disuccinimidil carbonato y se acoplaron covalentemente a distintas proteínas: albúmina sérica bovina (BSA) para su empleo como inmunógeno, y ovoalbúmina (OVA) y peroxidasa de rábano picante (HRP) para su empleo como antígenos de ensayo. Todos los bioconjugados fueron purificados y su relación molar hapteno-proteína se evaluó espectrofotométricamente o por MALDI-TOF-MS.

Los anticuerpos policlonales se obtuvieron por purificación del suero tras inmunizar conejos, y los anticuerpos monoclonales mediante la tecnología de hibridomas a partir de linfocitos de ratones inmunizados.²

Los inmunoensayos tipo ELISA se desarrollaron empleando el formato directo de anticuerpo inmovilizado, y el formato indirecto de conjugado inmovilizado. Para ello se optimizaron las concentraciones de inmunorreactivos para obtener simultáneamente la máxima señal y la mayor sensibilidad posible. A continuación se evaluó la robustez del ensayo frente a variaciones del pH, fuerza iónica y presencia de disolventes orgánicos. La selectividad del inmunoensayo fue confirmada por estudios de reactividad cruzada frente a compuestos análogos o de la misma familia y otros agroquímicos potencialmente presentes en el alimento.

Las muestras líquidas fueron analizadas directamente tras una dilución con agua, mientras que para las muestras sólidas fue necesaria una extracción basada en el método QuEChERS.³ Los métodos inmunoquímicos propuestos fueron validados siguiendo las directrices establecidas por la UE (SANCO/12571/2013),⁴ usando muestras fortificadas a diferentes niveles de concentración para evaluar la precisión y exactitud del método. Adicionalmente, se analizaron muestras reales por el inmunoensayo propuesto y por un método de referencia (GC-MS o LC-MS-MS) obteniendo resultados estadísticamente comparables.

3. Resultados

En la actualidad, nuestro grupo de investigación ha desarrollado y validado diferentes inmunoensayos para el análisis de residuos de los siguientes agroquímicos: azoxystrobin, pyraclostrobin, kresoxim-methyl, trifloxystrobin, picoxystrobin, forchlorfenuron, fenhexamid, cyprodinil, pyrimethanil, boscalid y fludioxonil. Diferentes alimentos han sido evaluados, desde muestras líquidas como zumos, mosto, vino, cerveza y sidra; hasta muestras sólidas como frutas, hortalizas, harinas y mermeladas. En la **Tabla 1** se muestra en detalle los ensayos desarrollados y la elevada sensibilidad obtenida, con límites de cuantificación (LOQ) entre 1 y 100 µg/Kg, dos o tres órdenes de magnitud por debajo de los límites máximos de residuos (LMR) establecidos por la Unión Europea.¹

Adicionalmente, también se han producido inmunorreactivos específicos de mepanipyrim, proquinazid, penthiopyrad, fluopyram, y fluxapyroxad, los cuales se están caracterizando y se están empleando en el desarrollo de inmunoensayo para el análisis de los residuos de estas sustancias en alimentos de interés.

Tabla 1. Inmunoensayos desarrollados y validados para el análisis de residuos en alimentos.

Analito	Anticuerpo	Alimento	LOQ ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	LMR ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
Azoxystrobin	mAb AZo#49	Zumo tomate	3	3000
		Zumo melocotón	2	2000
		Zumo uva tinta	2	2000
		Zumo de plátano	5	2000
		Fresa	4	10000
Pyraclostrobin	mAb PYs#14	Zumo uva tinta	10	1000
		Zumo manzana	10	300
	mAb PYs#11	Mermelada fresa	50	1000
		Mermelada frambuesa	50	2000
		Mermelada arándano	50	3000
		Mermelada albaricoque	50	200
		Mermelada melocotón	50	200
Kresoxim-methyl	mAb KMo#117	Tomate	10	500
		Pepino	10	50
		Fresa	10	1000
Trifloxystrobin	mAb TFo#17	Tomate	10	500
		Pepino	10	200
		Fresa	10	500
Picoxystrobin	mAb PCa#21	Harina trigo	25	200
		Harina maíz	25	50
		Harina avena	50	200
		Harina cebada	25	200
	pAb rPCo#1	Harina soja	50	50
		Brotos soja	5	50
		Cerveza	100	200
Forchlorfenuron	mAb p6#42	Kiwi	5	50
		Uva	5	50
	mAb s3#51	Mosto uva	5	50
		Kiwi	17	50
		Uva	17	50
Fenhexamid	mAb FHo#27	Mosto tinto	75	5000
		Mosto blanco	30	5000
		Vino	75	5000
		Kiwi	10	10000
		Fresa	25	5000
Cyprodinil	pAb rCDp#2	Zumo manzana	20	1000
		Zumo uva tinta	20	5000
		Vino blanco	1	5000
		Vino tinto	5	5000
		Sidra	1	1000
		Fresa	10	5000
Pyrimethanil	mAb CDm#21	Zumo zanahoria	40	1000
		Fresa	50	5000
	pAb rPMp#1	Tomate	5	1000
		Pepino	5	1000
Boscalid	pAb rBLa#1	Mosto uva	10	5000
		Zumo melocotón	50	3000
		Zumo manzana	10	2000
		Zumo tomate	10	3000
	pAb BLb#2	Tomate	5	3000
Fludioxonil	mAb FDn#23	Pepino	5	3000
		Zumo manzana	5	5000
		Mosto uva tinta	5	5000

Abreviaturas: LMR, Límite máximo de residuos; LOQ, límite de cuantificación; mAb, anticuerpo monoclonal; pAb, anticuerpo policlonal.

Las ventajas que ofrecen los inmunoensayos tipo ELISA, frente a los métodos tradicionales, basados principalmente en métodos cromatográficos, son múltiples, de las que podemos destacar:

- Simplicidad y bajo coste. No requieren tratamiento complejo de la muestra, ni operadores cualificados, lo que reduce costes operativos.
- Sensibilidad y selectividad. Ofrecen una excelente sensibilidad y selectividad comparable a técnicas de referencia como LC-MS-MS.
- Robustez y portabilidad. Los inmunoensayos presentan una elevada robustez, que junto a su carácter portátil permiten su empleo in situ.
- Frecuencia de análisis. El mínimo tratamiento previo de la muestra y el empleo de placas de 96 pocillos, permite el análisis simultáneo de un elevado número de muestras por hora.

4. Conclusiones

En los últimos años, hemos generado una extensa colección de haptenos funcionalizados, bioconjugados y anticuerpos que están actualmente disponibles para el desarrollo de diversas herramientas analíticas como inmunoensayos, inmunosensores o sistemas de purificación y concentración basados en columnas de inmunoafinidad. Hasta la actualidad se han desarrollado, optimizado y validado diversos inmunoensayos tipo ELISA para el análisis de residuos de sustancias de uso agroquímico en alimentos de relevancia. Nuestra extensa experiencia en este campo nos permite asegurar la viabilidad de los inmunoensayos para su empleo en laboratorios de control de calidad no solo como métodos de cribado, sino también como métodos que permiten cuantificar xenobióticos en alimentos de manera exacta y precisa.

5. Bibliografía

1. EU Pesticides Database. http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/
2. Suárez-Pantaleón, C., Mercader, J.V., Agulló, C., Abad-Somovilla, A., Abad-Fuentes, A. 2008. Production and characterization of monoclonal and polyclonal antibodies to forchlorfenuron. In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56(23), 11122-11131.
3. Lehotay, S. J. 2007. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. In: Journal of AOAC International. 90(2), 485-520.
4. European Commission (2013) Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANCO/12571/2013.

6. Agradecimientos

Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2012-39965-C01-02)
Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2009-12940-C01-02)
Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2006-12750-C01-02).

AC08 - PERFIL DE AMINOÁCIDOS Y ALCOHOLES SUPERIORES EN MOSTOS Y VINOS DE LA VARIEDAD BRANCELLAO

Yolanda Bouzas Cid^{1,2}, Elena Falqué López², Emiliano Trigo Córdoba^{1,3}, Emilia Díaz Losada¹, Ignacio Orriols Fernández¹, José Manuel Mirás Avalos¹

¹ Estación de Viticultura e Enología de Galicia (EVEGA-INGACAL), Ponte San Clodio s/n, 32427-Leiro, Ourense

² Depto. Química Analítica. Facultad de Ciencias, Universidad de Vigo, Ourense 32004

³ GI-1716, Proyectos y Planificación. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Santiago de Compostela, campus de Lugo
emilia.diaz.losada@xunta.es

RESUMEN:

Los aminoácidos de los mostos tienen un efecto importante sobre el aroma final del vino por ser precursores de alcoholes superiores. El objetivo de este trabajo es describir el perfil de aminoácidos de una variedad tinta (Brancellao) durante dos campañas consecutivas, así como el contenido en alcoholes superiores de vinos elaborados con esta variedad. La determinación de aminoácidos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución, siendo arginina y glutamina, los dos más abundantes en el mosto. Los vinos de 2013 destacaron por su elevado contenido en metanol y 2-feniletanol, compuesto que aporta aroma de rosas. El contenido en aminoácidos en mostos varió fuertemente en función de las condiciones climáticas de cada año.

Palabras clave: Brancellao, aminoácidos, vino tinto, aroma, alcoholes superiores

1. Introducción

Los aminoácidos de la uva, y consecuentemente del mosto, constituyen una fuente de nitrógeno primordial para el crecimiento y desarrollo de las levaduras durante la fermentación alcohólica, influyendo en las características organolépticas del vino. Los alcoholes superiores, compuestos volátiles que forman parte del aroma del vino, derivan del metabolismo de los aminoácidos a partir de la reacción de Ehrlich [1]. Por tanto, el estudio del contenido en aminoácidos del mosto resulta relevante para estimar el perfil aromático de un vino [2].

Brancellao, variedad tinta cultivada en la Denominación de Origen (DO) Ribeiro (Galicia, España), permite la obtención de mostos con un alto contenido en azúcares y una acidez media, produciendo vinos aromáticos, con cuerpo, grasos y untuosos [3].

El objetivo del presente trabajo fue describir el perfil de aminoácidos de la variedad tinta Brancellao durante dos años consecutivos. Asimismo, se ha determinado el contenido en alcoholes superiores que presentaban los vinos elaborados a partir de esta variedad.

2. Material y métodos

El experimento se realizó en una finca cultivada con *Vitis vinifera* L. var. Brancellao dentro de la Estación de Viticultura y Enología de Galicia (EVEGA), situada en Leiro (Ourense), durante dos campañas consecutivas.

Durante el ciclo de cultivo (abril a octubre), se registraron un total de 352,8 mm de precipitación en 2012 y 269 mm en 2013. Además, la temperatura media anual fue de 17,2 °C y 17,9 °C, para 2012 y 2013, respectivamente. Por lo tanto, las condiciones climáticas fueron ligeramente diferentes entre ambas campañas, siendo la primera más lluviosa que la segunda.

Las uvas se vendimiaron manualmente y se llevaron a la bodega experimental de la EVEGA, donde se realizaron microvinificaciones (tres repeticiones cada año de estudio), utilizando los procedimientos habituales para la elaboración de vinos tintos.

En los mostos se analizaron los siguientes parámetros: grado alcohólico probable, acidez total, pH, ácidos málico y tartárico; y en los vinos: grado alcohólico adquirido, acidez total, pH, ácidos málico y tartárico, empleando un multianalizador automático calibrado según los métodos oficiales [4].

Siguiendo la metodología descrita por Garde-Cerdán *et al.* [5], se llevó a cabo la determinación de un total de 22 aminoácidos y del ión amonio en los mostos y vinos de la variedad Brancellao mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con derivatización previa de la muestra y detección por absorción de radiación ultravioleta (DAD) a longitudes de onda de 269 y 280 nm.

El análisis de alcoholes superiores en los vinos se llevó a cabo mediante inyección directa de 2 µL de muestra en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (FID). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza de una vía considerando como factor de variación la campaña de estudio, empleando el software Statistical Product and Service Solutions (SPSS), versión 11.5.

3. Resultados

Los parámetros de los mostos (Tabla 1) reflejan el efecto de las condiciones climáticas ya que, en 2013, la uva se vendimió con más grado por ser una campaña más seca y cálida. No hubo diferencias significativas para estos parámetros entre las campañas. Los mostos del año 2013 fueron ligeramente más ácidos que el año anterior debido a un mayor contenido en ácidos málico y tartárico.

El contenido total en aminoácidos en los mostos fue bastante más elevado en 2012, probablemente debido a las diferentes condiciones climáticas ocurridas en cada uno de los años estudiados, tal y como ya han apuntado otros autores para otras variedades [6]. Todos los aminoácidos presentaron un mayor contenido en los mostos de 2012, excepto dos: glutamina y cisteína. Sin embargo, no se han detectado diferencias significativas entre campañas para la suma de aminoácidos.

Se ha comprobado que los aminoácidos más abundantes en los mostos de la variedad Brancellao son arginina y glutamina. Se considera que la arginina es el aminoácido mayoritario en uvas [7].

Tabla 1. Parámetros básicos de mostos de Brancellao para cada campaña estudiada.

Año	Grado probable (% vol.)	Acidez total (g L ⁻¹)	pH	Ácido málico (g L ⁻¹)	Ácido tartárico (g L ⁻¹)	Aminoácidos totales (mg L ⁻¹)
2012	13,3 a	5,9 a	3,23 a	1,6 a	6,6 a	520,1 a
2013	13,9 a	6,3 a	3,23 a	2,1 a	7,3 a	402,6 a

Letras iguales en las columnas indican ausencia de diferencias significativas a $p < 0,05$.

En los parámetros básicos analizados en los vinos (Tabla 2) se cumple lo observado en los mostos. Los vinos de 2013 fueron más ácidos ya que el contenido en ácidos málico y tartárico es mayor que en los vinos de 2012. No se detectaron diferencias significativas entre los distintos parámetros químicos excepto para el grado alcohólico.

Con respecto al contenido total de aminoácidos en vinos, la cantidad fue más elevada en el año 2012 que en 2013, resultando ser significativamente diferentes. Todos los aminoácidos presentaron diferencias significativas entre los dos años con excepción de serina, glutamina, glicina y ornitina, además del ión amonio.

Tabla 2. Parámetros básicos de vinos de Brancellao para cada campaña estudiada.

Año	Grado alcohólico (% vol.)	Acidez total (g L ⁻¹)	pH	Ácido málico (g L ⁻¹)	Ácido tartárico (g L ⁻¹)	Aminoácidos totales (mg L ⁻¹)	Alcoholes superiores (mg L ⁻¹)
2012	14,5 b	5,4 a	3,53 a	0,6 a	2,1 a	49,5 b	414 a
2013	13,0 a	6,3 a	3,52 a	1,5 a	3,0 a	37,8 a	461 b

Letras iguales en las columnas indican ausencia de diferencias significativas a $p < 0,05$.

En cuanto a los compuestos volátiles, el contenido total en alcoholes superiores es significativamente mayor en los vinos de 2013. Los alcoholes que no presentaron diferencias significativas en su concentración entre campañas fueron metanol e isopropanol. Destacó el elevado contenido en metanol, 2-metil-1-butanol y 2,3-butanodiol que poseen los vinos obtenidos con esta variedad.

4. Conclusiones

Los parámetros químicos básicos analizados en los mostos y vinos obtenidos de la variedad Brancellao, no presentaron diferencias significativas entre campañas, excepto para el grado alcohólico de los vinos. Sin embargo, tanto los mostos como los vinos obtenidos presentaron diferencias significativas en la concentración de algunos aminoácidos entre campañas. Estas diferencias pueden deberse a las condiciones climáticas dominantes en cada uno de los años estudiados. El contenido en alcoholes superiores de los vinos ha sido ligeramente mayor en 2013.

Este es el primer estudio sobre el perfil de aminoácidos de esta variedad tinta autóctona de Galicia. Los resultados obtenidos indican el gran potencial que presenta esta

variedad para producir vinos aromáticos, si bien esta potencialidad se ve influida por otros factores y serán las técnicas de vinificación las que permitan obtener su máxima expresión.

5. Bibliografía

1. López Rituerto, E.; Avenzoza, A.; Busto, J.H.; Peregrina, J.M. 2010. Evidence of metabolic transformations of amino acids into higher alcohols through ¹³C NMR studies of wine alcoholic fermentation. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 4923–4927.
2. Malherbe, S.; Watts, V.; Nieuwoudt, H.H.; Bauer, F.F.; du Toit, M. 2009. Analysis of volatile profiles of fermenting grape must by headspace solid-phase dynamic extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPDE GC-MS): Novel application to investigate problem fermentations. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 5161–5166.
3. Consello Regulador do Ribeiro. 2015. <http://www.ribeiro.es/nuestros-vinos/variedades-de-uva/> (consultada el 27/02/2015).
4. O.I.V. (Office International de la Vigne et du Vin). 2009. Compendium of international methods of wine and must analysis vols. 1 and 2. Office International de la Vigne et du Vin (Ed.), París, Francia.
5. Garde-Cerdán, T.; Lorenzo, C.; Lara, J.F.; Pardo, F.; Ancín-Azpilicueta, C.; Salinas, M.R. 2009. Study of the evolution of nitrogen compounds during grape ripening. Application to differentiate grape varieties and cultivated systems. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 2410–2419.
6. Ortega-Heras, M.; Pérez-Magariño, S.; del-Villar-Garrachón, V.; González-Huerta, C.; Moro González, L.C.; Guadarrama Rodríguez, A.; Villanueva Sánchez, S.; Gallo González, R.; Martín de la Helguera, S. 2014. Study of the effect of vintage, maturity degree, and irrigation on the amino acid and biogenic amine content of a white wine from the Verdejo variety. *J. Sci. Food Agric.*, 94, 2073–2082.
7. Bell, S.J.; Henschke, P.A. 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Austr. J. Grape Wine Res.*, 11, 242–295.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA2011-00041-C02-01 del INIA, con 80% fondos FEDER y forma parte del "Programa de Desenvolvemento Rural, acción E001-2014-2015". Y. Bouzas Cid y E. Trigo Córdoba agradecen al INIA sus respectivas becas FPI. J.M. Mirás Avalos agradece a la Xunta de Galicia la financiación de su contrato dentro del marco del programa "Isidro Parga Pondal".

AC09 - ESTRATEGIAS PARA EL ESTUDIO DE LA FORMACIÓN “DE NOVO” DE ALDEHÍDOS DURANTE LA OXIDACIÓN DEL VINO

Mónica Bueno¹, Almudena Marrufo-Curtido¹, Marta Extremera¹, Vicente Ferreira¹

¹Universidad de Zaragoza, Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología, Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A), c/ Pedro Cerbuna 12, 50009, Zaragoza, España
mobueno@unizar.es

RESUMEN:

Los cambios en las propiedades aromáticas ligadas a procesos de oxidación de un vino están muchas veces relacionados con la cantidad de aldehídos presentes. Dichos aldehídos pueden liberarse de sus complejos no volátiles con el SO₂ o formarse por oxidación directa a partir de sus diversos precursores. Se ha perfeccionado un procedimiento para la determinación de la formación de aldehídos “*de novo*” y se ha estudiado el efecto de la dosificación de oxígeno en dicho proceso. Para ello se ha comparado en 4 vinos de diferentes características, la disposición “*ad libitum*” de oxígeno durante 7 días frente a una microoxigenación controlada durante 6 semanas.

Palabras clave: Aldehídos, oxidación, anhídrido sulfuroso

1. Introducción

Los aldehídos son el conjunto de moléculas más diverso desde el punto de vista sensorial en el vino, jugando un papel relevante en su calidad. Los cambios en las propiedades aromáticas ligadas a procesos de oxidación están muchas veces relacionados con la formación de dichos aldehídos (1). En el caso del vino, el metional, el fenilacetaldehído y el acetaldehído son los componentes con mayor responsabilidad en esta evolución del aroma, transformándolo de fruta fresca a fruta pasa y dando lugar finalmente a vino oxidado.

También se sabe que los aldehídos forman complejos estables con el SO₂ en forma de combinaciones bisulfíticas no volátiles y por lo tanto no aromáticas (2). Una vez terminada la vinificación, estos complejos no volátiles actúan como una reserva de aldehídos, desplazándose el equilibrio hacia la forma libre conforme el SO₂ desaparece por oxidación. Al romperse los complejos, los aldehídos se liberan, contribuyendo a la aparición de notas oxidadas (3). Además los vinos pueden formar aldehídos por oxidación directa de sus diversos precursores (formación “*de novo*”), una vez que el SO₂ libre sea inferior a 5 mg/L (4).

El objetivo fundamental del presente trabajo fue perfeccionar un procedimiento para la determinación de la formación de aldehídos “*de novo*” durante la oxidación del vino y controlar la evolución del resto de compuestos carbonílicos. Por otra parte, se estudió el efecto de la dosificación de oxígeno en dicha formación.

2. Material y métodos

2.1. Estándares, disolventes, reactivos y muestras

Los estándares puros (>99%) han sido adquiridos en Aldrich (Madrid, España), Fluka (Madrid, España), ChemService (WestChester, PA, USA) y Firmenich (Suiza).

El etanol LiChrosolv calidad de cromatografía líquida fue proporcionado por Merk (Darmstadt, Alemania), el ácido tartárico 99%, glicerol (99.5%), 1,2-propanodiol por Panreac (Barcelona, España), el hidróxido de sodio 99% por Scharlau (Barcelona, España) y el glioxal al 40% en agua por Aldrich (Madrid, España). El agua fue purificada en un sistema Milli-Q de Millipore (Berford, Alemania).

El vino sintético se compone de 11% (v/v) de etanol, 5 g/L de ácido tartárico, 10 g/L de glicerol, 1,5 % (v/v) de 1,2-propanodiol y se ajustó hasta pH 3,5 con hidróxido de sodio 1M.

2.2. Vinos

Se seleccionaron 4 vinos (tres tintos y un blanco) de diferentes Denominaciones de Origen españolas por sus diversas características.

Tintos: Campo de Borja (Garnacha, 2009, Tinto reserva, 14% v/v), Rioja (Tempranillo, 2010, Tinto reserva, 13.5 % v/v), Ribera del Duero (Tempranillo, 2013, Tinto joven roble, 13.5 % v/v). Blanco: Rueda (Verdejo, 2013, 12.5% v/v).

2.3 Metodología

Se abrieron dos botellas de cada vino dentro de una cámara de atmósfera controlada con argón, Jacomex (Dagneux, Francia), que asegura un medio con concentración de oxígeno inferior a 0,002%. El contenido de las botellas se mezcló en el interior de la cámara facilitando así su saturación en argón. Se realizaron los análisis iniciales, y el resto del volumen de vino se dividió en dos fracciones, cada una de ellas fue destinada a uno de los dos sistemas de oxidación.

Oxidación “*ad libitum*”. Se adicionaron 300 mL de vino a botes de pyrex con un espacio de cabeza de aire de 300 mL. Cada vino se preparó por duplicado y todos los botes se sellaron con cola blanca para asegurar su estanquidad. Los botes se incubaron a 40°C durante 7 días.

Microoxigenación: En el interior de la cámara en ausencia de oxígeno, se adicionaron 300 mL de vino a botes de poliestireno de permeabilidad predeterminada experimentalmente (3,89 mg/L día a 40°C) con un espacio de cabeza inicial de argón de 300 mL. Cada vino se preparó por duplicado y todos los botes se sellaron con cola blanca para asegurar su estanquidad a través del cierre. Los botes se incubaron a 40°C durante 6 semanas.

Todos los botes (pyrex y microoxigenadores) llevaban un sensor Pst6 (PreSens, Alemania) colocado en la zona del espacio de cabeza. Cada día se controló el consumo de oxígeno con el analizador Nomasense (Nomacorrc S.A., Bélgica). Para el sistema *ad libitum* el cálculo del oxígeno consumido ha sido la diferencia entre el oxígeno inicial y el medido cada día. Para los microoxigenadores se calculó como la diferencia entre el oxígeno permeado y el medido.

Los análisis que se llevaron a cabo al inicio y final del proceso de oxidación fueron: índice de polifenoles totales (IPT) estimados con la absorbancia a 280 nm (5); absorbancia a 320 nm, 420 nm y 520 nm; aldehídos libres y totales mediante la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza y su análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS) (3); sulfuroso libre y total y acetaldehído libre y total. Para el análisis de éstos dos últimos se utilizó un método basado en análisis directo del espacio de cabeza (HS-GC-MS). La cuantificación en aminoácidos y metales (Mn y Zn) se llevó a cabo sólo en el momento inicial (6-7).

3. Resultados

Se han evaluado los distintos sistemas de oxidación (*ad libitum* y microoxigenación) a través de diversos parámetros calculados en base a los resultados obtenidos de concentración de aldehídos, oxígeno consumido y SO₂. La Tabla 1 presenta la formación *de novo* de aldehído calculada como la diferencia de aldehído total en el momento final y aldehído total en el momento inicial. Puesto que en ambos procedimientos se aportó el oxígeno de diferente forma, se han normalizado los datos por mg/L de oxígeno consumido. El tercer parámetro considerado es la normalización de la formación de aldehído descontando la cantidad de oxígeno invertido en oxidar el SO₂.

Tabla 1. Rango de formación *de novo* de aldehídos (μg/L), formación por mg/L de oxígeno consumido y formación por mg/L de oxígeno consumido descontando la cantidad de oxígeno invertido en oxidar el SO₂.

	Formación <i>de novo</i>				Formación/O ₂ consumido				Formación/O ₂ consumido no invertido en SO ₂ ^(b)			
	<i>ad libitum</i>		microox.		<i>ad libitum</i>		microox.		<i>ad libitum</i>		microox.	
	ma	ma	ma	ma	ma	ma	ma	ma	min	max	min	max
	min	x	min	x	min	x	min	x	min	max	min	max
	-	-	-	-								
Acetaldehído ^(a)	18,3	18,5	0,41	30,9	-1,45	1,83	0,01	0,48	-7,31	1,13	0,02	0,54
Isobutanol	3,14	10,1	2,2	70,2	0,37	0,80	0,52	1,31	0,49	2,04	0,78	1,57
2-Metilbutanal	0,36	1,43	2,07	10,10	0,04	0,09	0,44	0,99	0,08	0,23	0,08	0,23
Isovaleraldehído	16,9	39,2	7,3	18,1	1,35	2,75	1,20	3,42	2,24	3,39	1,38	4,85
Metional	1,17	3,49	5,94	16,1	0,14	0,25	0,10	0,30	0,21	0,63	0,11	0,43
Fenilacetaldéhid	16,7	44,9	5,8	11,1	1,90	2,29	0,89	2,37	2,68	5,12	1,02	4,82

^(a) Los resultados del acetaldehído se presentan en mg/L

^(b) Resultados mostrados sólo para vinos tintos

En ambos sistemas de oxidación las concentraciones de SO₂ libre fueron inferiores a 5 mg/L y como se observa en la Tabla 1, se ha logrado en ambos casos llegar hasta el punto en el que comienza la formación de aldehídos *de novo*. Cabe destacar la desaparición del acetaldehído, como ya se ha observado para otros aldehídos previamente (4), más acusado en la oxidación *ad libitum*.

El sistema *ad libitum*, *a priori* más sencillo, fue más impreciso a la hora de controlar el oxígeno en el espacio de cabeza del bote y por esa razón su consumo ha sido corregido en términos de incremento de absorbancia a 420 nm. Este tipo de correcciones han sido validadas y anteriormente utilizadas (8). El consumo de oxígeno en condiciones *ad libitum* osciló entre 8-22 mg/L, mientras que para los microoxigenadores fue de 47-65 mg/L.

La Tabla 1 muestra que la formación neta ha sido mayor en los microoxigenadores mantenidos 6 semanas a 40°C. Cuando esta formación se normaliza con el oxígeno consumido las diferencias se minimizan, y todavía se minimizan más e incluso se invierten en algunos casos cuando se tiene en cuenta el oxígeno invertido en oxidar el sulfuroso. Este resultado

sorprende ya que en función de estos datos podría plantearse la hipótesis de que la formación de aldehídos es independiente del sistema de oxidación que se ha usado.

4. Conclusiones

En ambos sistemas de oxidación se ha alcanzado la formación de aldehídos *de novo*. No se ha observado un efecto claro de la dosificación del oxígeno sobre la formación de aldehídos una vez normalizados los datos. Sin embargo, los microoxigenadores ofrecieron mejor precisión en la medida del oxígeno en el espacio de cabeza. Hecho a tener en cuenta para el diseño de futuros experimentos.

5. Bibliografía

1. Jaime-Baró, A. L.; Quiros-Carrasco, J. A. 1977. Les conditions de formation des aldehydes dans les vins. Relation et importance en rapport avec les phénomènes d'oxydation et les caractéristiques organoleptiques. *In*: boletín de l'Organisation Internationale de la vigne et du Vin (O.I.V.). 50, 253-267.
2. Culleré, L.; Ferreira, V.; Cacho, J. 2011. Analysis, occurrence and potential sensory significance of aliphatic aldehydes in White wines. *In*: Food Chemistry. Elsevier. 127, 1397-1403.
3. Bueno, M.; Zapata, J.; Ferreira, V. 2014. Simultaneous determination of free and bonded forms of odor-active carbonyls in wine using a headspace solid phase microextraction strategy. *In*: Journal of Chromatography A. Elsevier. 1369, 33-42.
4. Bueno, M.; Franco-Luesma, E.; Carrascón, V.; Ferreira, V. 2014. Evaluation of key free and bound aroma carbonyls in wine for a better understanding of their release or formation through oxidation. *In*: Book of Abstracts of 14th Weurman Flavour Research Symposium.
5. Ribéreau-Gayon, P. 1970. Le dosage des composés phénoliques totaux dans es vins rouges. *In*: Chimie Analytique. 52, 627-631.
6. Hernandez-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. *In*: Chromatographia. Springer. 58, 29-35.
7. Gonzalez, A.; Armenta, S.; Pastor, A.; de la Guardia, M. 2008. Searching the most appropriate simple pretreatment for the elemental analysis of wines by inductively coupled plasma-based techniques. *In*: Journal of Agricultural and Food Chemistry. ACS Publications. 56, 4943-4954.
8. Ferreira, V.; Bueno, M.; Franco-Luesma, E.; Culleré, C.; Fernández-Zurbano, P. 2014. Key changes in wine aroma active compounds during bottle storage of Spanish red wines under different oxygen levels. *In*: Journal of Agricultural and Food Chemistry. ACS Publications. 62, 10015-10027.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España (proyecto CICYT 230183).

AC10 - POTENCIAL ENOLÓGICO DEL NUEVO GENOTIPO “TINTO FRAGOSO”

I. Hermosín-Gutiérrez¹, S. Gómez-Alonso^{1,2}, P.M. Izquierdo-Cañas^{2,3}, J. Martínez-Gascueña³, J.L. Chacón-Vozmediano³, Esteban García-Romero³

¹Universidad de Castilla-La Mancha, IRICA, Avda. Camilo José Cela s/n, 13071, Ciudad Real, ES

²Parque Científico y Tecnológico de Castilla-La Mancha, Paseo de la Innovación, 1, 02006 Albacete, ES.

³Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha (IVICAM). Crta. Toledo-Albacete s/n, 13700, Tomelloso, ES.

isidro.hermosin@uclm.es

RESUMEN:

El Banco de Germoplasma de Vid de Castilla-La Mancha, recoge hasta 44 nuevos genotipos de vid nunca antes descritos que corresponden a variedades tradicionales, autóctonas de Castilla-La Mancha, en peligro de extinción. El nuevo genotipo denominado “Tinto Fragoso” se caracteriza por un alto potencial para producir vinos tintos con un color más intenso y estable: contenido elevado en antocianos con alta proporción de derivados *p*-cumarilados; alto contenido en flavonoles; y alto contenido en derivados de ácidos hidroxicinámicos. En el aspecto sensorial produce vinos de color intenso con tonos rojo-violáceos apreciados por los catadores. En nariz son intensos y afrutados, con matices florales y balsámicos. En boca se muestran equilibrados y persistentes, dejando una sensación final muy agradable.

Palabras clave: Variedades minoritarios, banco de germoplasma, vino, Tinto Fragoso.

1. Introducción

El patrimonio vitícola castellano-mancheño atraviesa un periodo de empobrecimiento por la continua pérdida de material cuyo cultivo puede considerarse minoritario al verse desplazado cada vez más por cultivares foráneos. Por este motivo, con la intención de reconocer, conservar y caracterizar estos cultivares, se creó el Banco de Germoplasma de Vid de Castilla-La Mancha (BGVCM) con sede en el Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha (IVICAM), en Tomelloso (Ciudad Real).

Los estudios de prospección y caracterización varietal llevados a cabo para crear el BGVCM han permitido identificar algunas variedades de vid autóctonas de Castilla-La Mancha con genotipos nuevos, que no se encuentran registrados en ninguna de las bases de datos disponibles, tanto nacionales como internacionales. Ello permite sugerir que en Castilla-La Mancha disponemos de un conjunto de variedades de vid únicas, que podrían contribuir a la singularidad de los vinos producidos en nuestra región.

Entre las variedades tintas recuperadas, la variedad “Tinto Fragoso” llamó nuestra atención por sus características y así, durante varias vendimias consecutivas, las uvas de este nuevo genotipo han sido caracterizadas en cuanto a sus parámetros vitícolas y su composición fenólica y aromática. Paralelamente, también se han elaborado vinos experimentales para explorar su potencial enológico.

2. Material y métodos

Las uvas de la variedad Tinto Fragoso fueron obtenidas del Banco de Germoplasma del IVICAM (Tomelloso), en su momento óptimo de madurez tecnológica (grado alcohólico potencial del orden de 13-14 %) en las vendimias de los años 2011, 2012, 2013 y 2014. Tras su entrada en bodega se tomaron tres muestras de uva representativas, para la determinación de parámetros convencionales del mosto, para el análisis de compuestos fenólicos y para el análisis de compuestos volátiles.

Se elaboró un vino tinto joven. La uva en la bodega se estrujo, despalilló y se le añadió sulfuroso en dosis de 5 g/HL encubándose la pasta en depósitos autovaciantes de acero inoxidable de 100 L de capacidad. La fermentación se realizó a 22 °C inoculándose la vendimia con la levadura comercial Uvaferm VN. Para favorecer la extracción del color diariamente se practicaron varios remontados. El descube se realizó a aproximadamente 995 de densidad. Una vez agotados todos los azúcares los vinos se trasegaron y se sembraron con una cepa comercial de *Oenococcus oeni* para llevar a cabo la fermentación maloláctica. Los vinos finales fueron estabilizados y filtrados antes de su embotellado.

Los parámetros analíticos convenciones del mosto y vino (contenido alcohólico, acidez total, pH, acidez volátil, SO₂ total, glicerina y características cromáticas CIEL*a*b*) se determinaron de acuerdo a los métodos recomendados por la OIV (2014) [1]. La composición fenólica se analizó mediante cromatografía HPLC-DAD-ESI-MS/MS. Las muestras de uva se procesaron de acuerdo a las técnicas habituales del nuestro grupo para el análisis de flavonoles y ácidos hidroxicinámicos [2]. El análisis de flavan-3-oles y la caracterización de sus unidades estructurales se realizaron, según la metodología previamente descrita [3], por despolimerización en medio ácido y empleando pirogalol como reactivo nucleófilo. Los compuestos volátiles de los mostos se extrajeron empleando la metodología descrita por Ibarz y col. [4] y el análisis mediante GC-MS se realizó de acuerdo a los métodos habitualmente empleados por nuestro grupo [5]. La determinación del perfil sensorial de los vinos se realizó de acuerdo a la norma ISO 11035:1994, con un panel de cata formado por 10 catadores expertos.

3. Resultados

El estudio de los parámetros vitícolas de la variedad Tinto Fragoso indica que es una variedad bien adaptada al cultivo de espaldera en las condiciones climáticas de Castilla-La Mancha, de producción media y maduración más bien tardía. El análisis de los parámetros físico-químicos clásicos de los mostos y vinos determinó que todos se encontraban dentro de los habituales para variedades de uva tinta de vinificación.

Respecto a su contenido en compuestos fenólicos (Tabla 1), esta variedad posee un alto potencial para producir vinos tintos con un color intenso y estable: contenido elevado en antocianos, superior al valor medio descrito para la variedad emblemática castellano-manchega (Cencibel), con alta proporción de derivados *p*-cumaroilados; alto contenido en flavonoles, que estabilizan y dan lugar a colores más intensos por su capacidad de copigmentación con los antocianos, con una considerable contribución de derivados trisustituídos en el anillo B [5]; un alto contenido en derivados de ácidos hidroxicinámicos, que también participan en fenómenos de copigmentación y, además, son precursores de compuestos que contribuyen a la estabilización del color como los piranoantocianos [2].

Tabla 1. Contenido en antocianos flavonoles y derivados de ácidos hidroxicinámicos de la uva de la variedad Tinto Fragoso (mg/kg uva).

	Vendimia 2011		Vendimia 2012	
Antocianos Totales	1125.4	± 56.5	1274,25	± 50,47
No acilados (%)	64.61	± 0.42	59,63	± 0,63
Acetilados (%)	4.43	± 0.03	5,20	± 0,17
<i>p</i> -Cumaroilados (%)	30.22	± 0.17	33,94	± 0,54
Cafeilados (%)	0.73	± 0.29	1,23	± 0,42
Flavonoles Totales	179.9	± 20.9	177,87	± 7,84
Monosustituidos (%)	5.64	± 0.02	5,09	± 0,18
Disustituidos (%)	41.20	± 0.50	39,65	± 0,35
Trisustituidos (%)	53.16	± 0.52	55,27	± 0,20
DAHC Totales	91.06	± 6.00	86,96	± 9,36

Las concentraciones de compuestos volátiles en los mostos Tinto Fragoso son moderadas y sitúan a ésta en el conjunto de variedades de aroma más neutro (Tabla 2). El potencial de compuestos ligados a azúcares es importante y su liberación durante el proceso de vinificación mediante enzimas β -glucosidasas (procedentes de las propias uvas, levaduras, bacterias lácticas o adicionadas) podría complementar de forma importante el aroma de tipo fermentativo de los vinos finales.

Tabla 2. Contenido medio en compuestos volátiles libres y ligados y desviación estándar de los mostos de la variedad Tinto Fragoso ($\mu\text{g/L}$).

Familia	Compuestos libres		Compuestos ligados		Porcentaje Ligado
Aldehídos C6	397.7	± 69.2	1302.9	± 788.2	77
Alcoholes C6	227.9	± 20.9	326.1	± 96.1	59
Alcoholes lineales	24.2	± 1.4	222.0	± 123.8	90
Terpenos	6.1	± 0.5	117.2	± 49.5	95
Oxidos terpénicos	0.9	± 0.2	4.2	± 1.2	83
Bencénicos	27.0	± 2.9	848.5	± 417.1	97
Norisoprenoides	4.0	± 1.3	165.9	± 87.5	98
Metoxifenoles	63.3	± 34.1	181.6	± 87.8	74

Desde el punto de vista sensorial, son vinos de color intenso e interesantes tonos rojo-violáceos. En nariz son intensos y afrutados, con matices florales y balsámicos (Figura 1). En boca se muestran equilibrados y persistentes, dejando una sensación final muy agradable. Sin embargo, son vinos excesivamente ligeros, aunque esto podría deberse en parte a las condiciones de elaboración, en una bodega experimental en la que se trabaja con depósitos y volúmenes de uva reducidos. Esa falta de cuerpo fue más marcada en la vendimia 2014 debido a una climatología adversa que dificultó la maduración.

4. Conclusiones

Los resultados de los estudios realizados hasta la fecha sugieren que el nuevo genotipo de uva Tinto Fragoes una variedad bien adaptada al cultivo de espaldera en las condiciones climáticas de Castilla-La Mancha, de producción media y maduración más bien tardía que produce uvas de elevado contenido fenólico y con potencial aromático. Los vinos tintos secos elaborados son de gran calidad desde el punto de vista visual, color intenso e interesantes tonos rojo-violáceos, y olfativo, con intenso aroma de matices afrutados, florales y balsámicos.

Quizás, el punto más débil de estos vinos es su carencia de cuerpo, aunque esto es en parte explicable por las condiciones de elaboración.

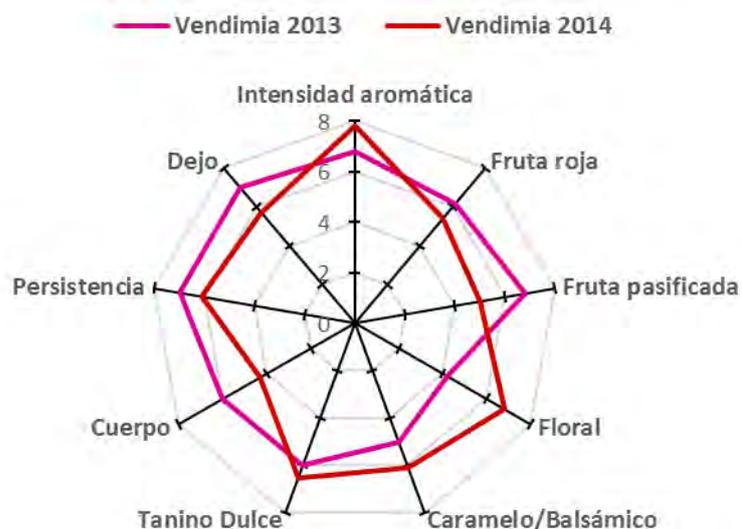


Figura 1. Resultados del análisis sensorial descriptivo de los vinos secos de la variedad Tinto Fragoso elaborados en la vendimias 2013 y 2014.

5. Bibliografía

1. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. 2014. Methods of analysis of wines and must. Compendium of international methods of wine and must analysis. OIV, Paris.
2. Castillo-Muñoz, N., Fernández-González, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I. 2009. Red-color related phenolic composition of Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) grapes and red wines. *J. Agric. Food Chem.* 57, 7883-7891.
3. Lago-Vanzela, E.S., Da-Silva, R., Gomes, E., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I. 2011. Phenolic composition of the edible parts (flesh and skin) of Bordô grape (*Vitis labrusca*) using HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 59, 13136-13146.
4. Ibarz, M., Ferreira, V., Hernández-Orte, P., Loscos, N., Cacho J. 2006. Optimization and evaluation of a procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of the aromas generated by fast acid hydrolysis of flavors precursors extracted from grapes. *J. Chrom. A.* 1116, 217-229.
5. Hermosín-Gutiérrez, I.; Castillo-Muñoz, N.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E. Flavonol Chapter 8. Flavonol Profiles for Grape and Wine Authentication. En *Progress in Authentication of Food and Wine*; Ebeler, S. E., Takeoka, G. R., Winterhalter, P.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2011, pp. 113-129.

6. Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada por la Consejería de Educación, Cultura y Deportes de la JCCM a través del proyecto POII-2014-008-P, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional. Los autores S. Gómez-Alonso y P.M. Izquierdo-Cañas agradecen al Fondo Social Europeo y la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha la cofinanciación de sus contratos a través del programa INCRECYT.

AC11 - POTENCIAL ENOLÓGICO DEL NUEVO GENOTIPO “MOSCATEL SERRANO”

I. Hermosín-Gutiérrez¹, S. Gómez-Alonso^{1,2}, P.M. Izquierdo-Cañas^{2,3}, J. Martínez-Gascueña³, J.L. Chacón-Vozmediano³, Esteban García-Romero³

¹Universidad de Castilla-La Mancha, IRICA, Avda. Camilo José Cela s/n, 13071, Ciudad Real, ES

²Parque Científico y Tecnológico de Castilla-La Mancha, Paseo de la Innovación, 1, 02006 Albacete, ES.

³Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha (IVICAM). Crta. Toledo-Albacete s/n, 13700, Tomelloso, ES.

isidro.hermosin@uclm.es

RESUMEN:

El cultivo de uva de vinificación tiende a concentrarse en un número limitado de variedades, sin que existan estudios que justifiquen el abandono del cultivo de variedades autóctonas tradicionales. El Banco de Germoplasma de Vid de Castilla-La Mancha recoge hasta 44 variedades de vid con genotipos minoritarios, que han sido recientemente localizados en nuestra región y recuperados, entre ellos el “Moscatel Serrano”. Esta variedad permite elaborar unos vinos blancos secos de gran calidad, que destacan por un contenido medio-alto en flavonoles y relativamente bajo en derivados hidroxicinámicos y un alto contenido en compuestos volátiles, especialmente terpenos. Son vinos pálidos, con irisaciones verdosas, muy aromáticos y francos, equilibrados y con buen volumen en boca.

Palabras clave: Variedades minoritarios, banco de germoplasma, vino, moscatel serrano.

1. Introducción

La especie *Vitis vinifera* L. incluye un elevado número de variedades, aún no completamente esclarecido. Sin embargo, debido a causas naturales y/o humanas, en la actualidad, su cultivo tiende a concentrarse en un número limitado de variedades, poniendo en peligro la conservación del rico patrimonio genético vitícola.

Conformado por varias decenas de cultivares tradicionales y un número importante y creciente de cultivares foráneos (tanto nacionales como internacionales), el patrimonio vitícola castellano-manchego atraviesa un periodo de empobrecimiento por la continua pérdida de material cuyo cultivo puede considerarse minoritario al verse desplazado cada vez más por los cultivares foráneos. Estos cultivares foráneos, en algunos casos llamados “variedades mejorantes”, se han impuesto sin que en muchos casos haya habido oportunidad de demostrar si la calidad enológica de las variedades autóctonas tradicionales castellano-manchegas, a las que han ido desplazando, realmente justifica su sustitución.

El Banco de Germoplasma de Vid de Castilla-La Mancha, ubicado en la sede del Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha, recoge hasta 44 variedades de vid con genotipos distribuidos localmente, que han sido recientemente localizados en nuestra región y recuperados. Uno de ellos, nombrado denominado “Moscatel Serrano”, ha resultado corresponder a una antigua variedad cuya presencia en la península ibérica no estaba

constatada: el Moscatel d'Istambul. Aunque su presencia aquí está confirmada y, por lo que sabemos, no sólo en nuestra Región, el desconocimiento sobre su potencial enológico es palpable y por ello la hemos seleccionado como interesante variedad que puede contribuir a la mejora de nuestros vinos blancos. Durante varias vendimias sucesivas se caracterizaron sus parámetros vitícolas, la composición fenólica y aromática de la uva y se elaboraron vinos experimentales para explorar su potencial enológico.

2. Material y métodos

Las uvas de la variedad Moscatel Serrano fueron obtenidas del Banco de Germoplasma del IVICAM (Tomelloso), en su momento óptimo de madurez tecnológica (grado alcohólico potencial del orden de 13-14 %) en las vendimias de los años 2010, 2011 y 2012. Tras su entrada en bodega se tomaron tres muestras de uva representativas, para la determinación de parámetros convencionales del mosto, para el análisis de compuestos fenólicos y para el análisis de compuestos volátiles.

Para la elaboración de los vinos, la vendimia fue despallada, estrujada y sulfitada a razón de 5g/HL y la pasta resultante se sometió a maceración prefermentativa en frío a 4 °C durante 24 horas. Posteriormente tras el prensado de la uva se desfangaron los mostos a 15 °C durante 24 horas. El mosto desfangado se encubo, inoculándose con una cepa de levadura comercial. La fermentación se realizó a 18 °C. Acabada la fermentación alcohólica y tras el primer trasiego se realizó un removido de lías durante 25 días. Finalmente el vino se estabilizó por frío, se filtró y embotello.

Los parámetros analíticos convenciones del mosto y vino (contenido alcohólico, acidez total, pH, acidez volátil, SO₂ total, glicerina y características cromáticas CIEL^{a*}b^{*}) se determinaron de acuerdo a los métodos recomendados por la OIV (2014) [1]. La composición fenólica se analizó mediante cromatografía HPLC-DAD-ESI-MS/MS. Las muestras de uva se procesaron de acuerdo a las técnicas habituales de nuestro grupo para el análisis de flavonoles y ácidos hidroxicinámicos [2]. El análisis de flavan-3-oles y la caracterización de sus unidades estructurales se realizaron, según la metodología previamente descrita [3], por despolimerización en medio ácido y empleando pirogalol como reactivo nucleófilo. Los compuestos volátiles de los mostos se extrajeron empleando la metodología descrita por Ibarz y col. [4] y el análisis mediante GC-MS se realizó de acuerdo a los métodos habitualmente empleados por nuestro grupo [5]

La determinación del perfil sensorial de los vinos se realizó de acuerdo a la norma ISO 11035:1994, con un panel de cata formado por 10 panelistas expertos.

3. Resultados

El estudio de los parámetros vitícolas de la variedad Moscatel Serrano indica que es una variedad bien adaptada al cultivo de espaldera en las condiciones climáticas de Castilla-La Mancha, de buena producción y maduración media. El análisis de los parámetros físico-químicos clásicos de los mostos y vinos determinó que todos se encontraban dentro de los habituales para variedades de uva blanca de vinificación.

Moscatel Serrano es una uva de contenido medio-alto en flavonoles [6], aunque se observan grandes diferencias entre vendimias, debido a que la síntesis de estos compuestos se ve afectada por diversos factores como el grado de exposición al sol de la baya (Tabla 1). Predominan los flavonoles derivados de quercetina e isoramnetina (disustituidos) frente a los monosustituidos derivados del kaempferol. Por otra parte, presenta un contenido relativamente bajo en derivados de ácidos hidroxicinámicos (DHAC), lo que ayudaría a la prevención del pardeamiento oxidativo que puede desarrollarse durante el almacenamiento de los vinos blancos elaborados a partir de esta variedad.

Tabla 1. Contenido en flavonoles y derivados de ácidos hidroxicinámicos de la uva de la variedad Moscatel Serrano (mg/kg uva).

	Vendimia 2010	Vendimia 2011	Vendimia 2012
Flavonoles Totales	170.44 ± 32.47	61.1 ± 2.9	44,20 ± 10,18
Monosustituidos (%)	28.59 ± 2.31	27.31 ± 1.22	22,52 ± 1,96
Disustituidos (%)	71.40 ± 2.31	72.69 ± 1.22	77,48 ± 1,96
DAHC Totales	63.34 ± 9.34	27.86 ± 2.25	40,25 ± 1,12
Pulpa (%)	---	---	89,49 ± 5,12

En la tabla 2 se observa que los mostos de Moscatel Serrano presentan una alta concentración de compuestos volátiles en general y de terpenos en particular, lo que efectivamente encuadra esta variedad en la familia de las variedades tipo Muscat. Comparada con la Moscatel de grano menudo el contenido de compuestos terpénicos es menos elevado por lo que los vinos elaborados a partir de esta variedad mantendrán el aroma floral, amoscatelado, de este tipo de variedades, pero con menor expresión terpénica.

Tabla 2. Contenido medio en compuestos volátiles y desviación estándar de mostos de las variedades Moscatel Serrano y Moscatel de Grano Menudo ($\mu\text{g/L}$).

Familia	Moscatel Serrano	Moscatel de Grano Menudo
Aldehídos y alcoholes C6*	1473 ± 53	2975 ± 83
Terpenos*	1402 ± 27	8571 ± 64
Oxidos terpénicos*	346 ± 2	1093 ± 22
Hidroxiterpenos*	48 ± 3	981 ± 14
Bencénicos*	105 ± 2	205 ± 8

*Denota diferencias estadísticamente significativas entre variedades de uva ($\alpha = 0.05$; test de la t de Student).

Desde un punto de vista sensorial los vinos de Moscatel Serrano elaborados fueron pálidos, con irisaciones verdosas, y muy aromáticos (Figura 1). Las notas florales, terpénicas, de moscatel aparecen aquí presentes aunque suavizadas y matizadas por notas afrutadas de albaricoque, piña y cítricos. En boca resultaron vinos francos, con volumen, bien equilibrados en lo referente a la relación alcohol-acidez, de notable persistencia y agradable dejo.

4. Conclusiones

Los resultados sugieren que variedad de uva Moscatel Serrano, sinonimia de variedad Moscatel d'Istanbul, es una variedad bien adaptada al cultivo de espaldera en las condiciones climáticas de Castilla-La Mancha, de buena producción y maduración media, que permite elaborar unos vinos blancos secos de gran calidad: pálidos, con irisaciones verdosas, muy aromáticos y francos, equilibrados y con volumen en boca. Desde el punto de vista de su composición destacan por su contenido en compuestos volátiles y flavonoles.

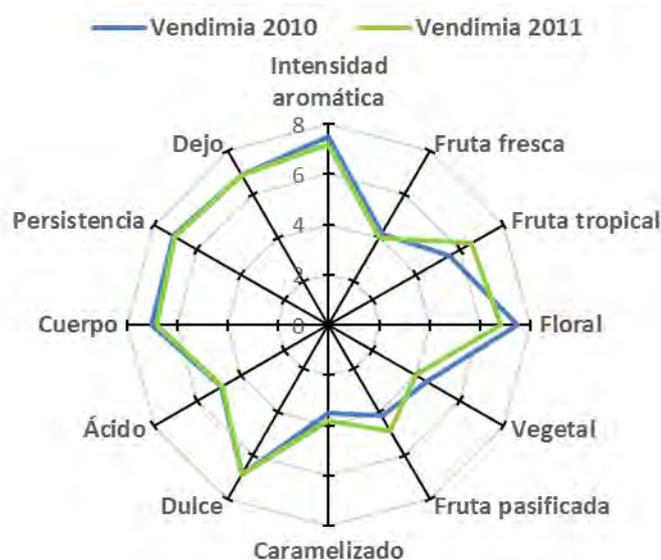


Figura 1. Resultados del análisis sensorial descriptivo de los vinos secos de la variedad Moscatel Serrano elaborados en la vendimias 2010 y 2011.

5. Bibliografía

1. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. 2014. Methods of analysis of wines and must. Compendium of international methods of wine and must analysis. OIV, Paris.
2. Castillo-Muñoz, N., Fernández-González, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I. 2009. Red-color related phenolic composition of Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) grapes and red wines. *J. Agric. Food Chem.* 57, 7883-7891.
3. Lago-Vanzela, E.S., Da-Silva, R., Gomes, E., García-Romero, E., Hermosín-Gutiérrez, I. 2011. Phenolic composition of the edible parts (flesh and skin) of Bordô grape (*Vitis labrusca*) using HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 59, 13136-13146.
4. Ibarz, M., Ferreira, V., Hernandez-Orte, P., Loscos, N., Cacho J. 2006. Optimization and evaluation of a procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of the aromas generated by fast acid hydrolysis of flavors precursors extracted from grapes. *J. Chrom. A.* 1116, 217-229.
5. Chacón, J.L., García, E., Martínez, J., Mena, A., Izquierdo P.M. 2012. Comparison of aromatic composition of an endangered variety ('AlbillaDorada') with other recognized aromatic varieties. *Vitis* 51, 15-17.
6. Castillo-Muñoz, N.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Hermosín-Gutiérrez, I. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* white grape cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* 2010, 23, 699-705.

6. Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada por la Consejería de Educación, Cultura y Deportes de la JCCM a través del proyecto POII-2014-008-P, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional. Los autores S. Gómez-Alonso y P.M. Izquierdo-Cañas agradecen al Fondo Social Europeo y la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha la cofinanciación de sus contratos a través del programa INCRECYT.

AC12 - ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS FENÓLICOS Y ATRIBUTOS SENSORIALES DE LOS VINOS TINTOS DE BOBAL UTILIZANDO EL MÉTODO DE REGRESIÓN DE MÍNIMOS CUADRADOS (PLS)

José Luis Aleixandre-Tudó, Inmaculada Alvarez, María José García, Victoria Lizama,
José Luis Aleixandre

*Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Universitat Politècnica de València.
Camino de Vera s/n, 46023 Valencia. vlizama@tal.upv.es*

RESUMEN:

La evaluación sensorial de los vinos mediante paneles de cata presenta algunos inconvenientes. En primer lugar resulta complicado evaluar un número elevado de muestras. Además es también necesario disponer de personal especializado cuya formación puede ser larga y costosa. El objetivo de este trabajo es estudiar la posibilidad de predecir la calidad sensorial de los vinos tintos de Bobal, elaborados utilizando diferentes técnicas de vinificación, mediante análisis por regresión de mínimos cuadrados parciales. Para ello se han determinado los parámetros característicos de los vinos, la composición fenólica y los atributos sensoriales. Los resultados ponen de manifiesto que el modelo obtenido utilizando el grado alcohólico (% vol), la acidez total (g/L ácido tartárico), el pH, el índice de Folin y el contenido en antocianos (mg/L), como variables de predicción, aparece como el más exacto para predecir la calidad sensorial de los vinos. La incorporación de la intensidad colorante y el contenido en taninos totales (g/L) como variables de predicción también se presenta como una alternativa con buenos resultados.

Palabras clave: compuestos fenólicos, análisis sensorial, Bobal, análisis multivariante, regresión por mínimos cuadrados

1. Introducción

Los compuestos fenólicos, especialmente antocianos y taninos, juegan un papel primordial en la calidad sensorial de los vinos tintos, siendo los procesos de maceración y fermentación los responsables de su concentración final en los vinos. Durante la vinificación tiene lugar la difusión de antocianos desde las vacuolas celulares de los hollejos de la uva. Esta difusión está influenciada principalmente por los factores tiempo y temperatura aunque otras variables pueden también jugar un papel importante [1]. Con respecto a los taninos, estos compuestos son extraídos de los hollejos durante las primeras fases de la fermentación, y de las semillas a medida que esta avanza y se incrementa el contenido en alcohol. Por lo tanto diferentes maceraciones darán lugar a diferentes proporciones de taninos de los hollejos y de las semillas, condicionando las propiedades organolépticas de los vinos [2]

La variedad Bobal, que se cultiva principalmente en la Comunidad Valenciana, ha sido seleccionada por ser la variedad principal en la Denominación de origen Utiel-Requena y porque a pesar de haber sido tradicionalmente utilizada para la producción de vinos rosados y doble pasta y de ser comercializada como vino de mesa, en los últimos años han aparecido en el mercado vinos de gran calidad, mostrando el gran potencial que tiene esta variedad [3].

El método estadístico multivariante de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS por sus siglas en inglés) ha sido previamente utilizado en tecnología de alimentos con el objetivo de obtener modelos de predicción alternativos a otros métodos estadísticos [4]. La regresión por mínimos cuadrados parciales ha sido también recientemente utilizada en

combinación con análisis quimiométricos para predecir un gran número de componentes del vino [5, 6, 7].

El objetivo principal de este estudio es evaluar el potencial de la técnica multivariante de regresión por mínimos cuadrados (PLS) para predecir la calidad sensorial de los vinos de Bobal, elaborados con diferentes técnicas de vinificación, a partir de uvas vendimiadas con diferentes estados de madurez, basándose en sus características químicas y fenólicas.

2. Material y métodos

Uvas de la variedad Bobal de la vendimia 2010 fueron despalilladas y estrujadas previamente a su distribución en depósitos de acero inoxidable de 50 L de capacidad. Al final de la fermentación alcohólica, fueron inoculadas bacterias lácticas *Oenococcus oeni* OE 104 (Agrovin, Spain).

Tres diferentes grados de madurez fueron incluidos en el estudio, concretamente la vendimia se llevó a cabo a 11,6, 12,3 and 13,2 °Bé. Para cada uno de los grados de madurez tres diferentes tipos de maceración fueron evaluados. En el primer tratamiento se realizó una maceración corta de una semana de duración (MC), mientras que en el segundo y el tercer tratamiento se realizaron una maceración intermedia de dos semanas (MI) y por último una maceración larga de tres semanas (ML). Finalmente se elaboraron 27 vinos, realizándose los análisis correspondientes una vez completada la fermentación maloláctica.

El grado Beaumé (°Bé), pH, acidez total (g/L ácido tartárico) o grado alcohólico (% v/v) se determinaron mediante los métodos propuestos por la Unión Europea [8]. La intensidad colorante y el tono [9], índice de Folin [10], antocianos totales [11] y taninos [12], el índice de polivinilpirrolidona (PVPP) y la astringencia fueron determinados con el método descrito por Canals et al. [13], los índices de ácido clorhídrico, etanol y polimerización [14] fueron también cuantificados mediante espectrofotometría

El análisis sensorial se realizó con nueve catadores expertos que evaluaron (utilizando una escala de 1 a 10) los 27 vinos elaborados. El color, la intensidad y calidad del aroma, la intensidad y calidad del gusto y por último la evaluación global fueron valorados. Para ello por medio de un ANOVA se utilizaron LSD tests para separar las medias (valor $P < 0.01$) cuando éstas eran significativas. Para ello se utilizó el software Statgraphics Plus 5.1.

El tratamiento estadístico por mínimos cuadrados parciales es una técnica estadística de regresión multilinear basada en variables latentes, cuyo objetivo es obtener modelos de regresión lineal entre un grupo de variables predictivas (parámetros químicos y fenólicos) y un grupo de variables respuesta (evaluación global). La regresión por mínimos cuadrados parciales busca las direcciones en las variables predictivas que explican la mayor parte de la variación pero evitando aquellas que no están correlacionadas con la variable respuesta, para obtener la mayor capacidad de predicción posible.

Con el objetivo de predecir la evaluación global de los vinos elaborados, fueron evaluados los siguientes parámetros estadísticos: el error cuadrático medio de calibración mediante validación cruzada ($ECMC_{VC}$), el coeficiente de correlación (R^2) entre los valores medidos y los valores predichos por el modelo, la desviación predictiva residual (DPR) y el coeficiente de variación (CV). El $ECMC_{VC}$ es una medida del error promedio entre los valores obtenidos del análisis sensorial y aquellos predichos por el modelo y aparece expresado en las mismas unidades que el análisis sensorial. La desviación predictiva residual se define como la desviación estándar de la población (DS) dividida por el error cuadrático medio de calibración en validación cruzada ($DPR = DS / ECMC_{VC}$) y se utiliza para evaluar la capacidad del modelo de predecir nuevas muestras. Cuanto más alto es el DPR más alta será la probabilidad del modelo de predecir de forma exacta la variable de interés. Los cálculos se realizaron con el software estadístico Unscrambler, version 9.2 (CAMO, AS, Trondheim, Norway).

3. Resultados

La mayoría de los parámetros analizados presentan un coeficiente de variación superior al 10% (Tabla 1) por lo que los datos fueron considerados como aptos para ser evaluados por la técnica de regresión por mínimos cuadrados parciales.

Tabla 1. Media, desviación estándar, mínimo, máximo y coeficiente de variación de los parámetros químicos y fenólicos determinados.

	Mínimo	Máximo	Media	DS	CV
Etanol (% v/v)	11,85	13,70	12,75	0,71	5,55
AT (g/L)	5,55	7,05	6,16	0,55	8,88
pH	3,25	3,46	3,36	0,08	2,31
Índice de Folin	31,36	47,31	36,71	4,71	12,83
Intensidad colorante (IC)	8,22	11,65	10,38	1,19	11,43
Antocianos(mg/L)	262,00	597,00	418,56	110,82	26,48
Taninos (g/L)	1,63	2,53	1,99	0,30	15,27
Índice de HCl	5,34	27,01	15,69	7,54	48,04
Índice de EtOH	5,92	14,30	11,36	2,85	25,09
Índice de gelatina	34,95	66,85	53,86	11,54	21,42
Índice de PVPP	44,10	57,76	50,83	5,04	9,92
Índice de polimerización	26,73	46,17	36,00	6,13	17,04

DS: desviación estándar, Min.: mínimo, Max.: máximo, CV: coeficiente de variación

Respecto al análisis sensorial únicamente aparecieron diferencias significativas cuando los vinos fueron evaluados en función de los diferentes estados de madurez (Tabla 2). Vinos elaborados con uvas vendimiadas a 13,2 Bé mostraron puntuaciones más altas para los atributos color, intensidad del aroma, calidad del gusto y evaluación global.

Tabla 2. Valores medios y desviación estándar de los atributos sensoriales evaluados mediante una escala 1-10. Efecto de la madurez fenólica y de la duración de la maceración.

	Color	Int. aroma	Cal. aroma	Int. gusto	Cal. Gusto	Ev. Global
Madurez 1 (11,60 Bé)	7,46±0,44 a*	5,85±0,16 a	5,74±0,12	6,41±0,51	5,96±0,61a	6,22±0,28 a
Madurez 2 (12,30 Bé)	7,41±0,17 a	6,19±0,16 ab	5,78±0,19	6,15±0,41	5,85±0,41a	6,04±0,41 a
Madurez 3 (13,20 Bé)	8,04±0,29 b	6,48±0,84 b	6,41±0,88	6,67±0,50	7,11±0,73b	6,81±0,69 b
MC (1 semana)	7,48±0,65	6,41±0,71	6,22±0,94	6,33±0,79	6,26±1,41	6,37±1,07
MI (2 semanas)	7,54±0,11	6,19±0,50	6,00±0,39	6,30±0,23	6,22±0,69	6,39±0,17
ML (3 semanas)	7,85±0,27	5,93±0,35	5,70±0,16	6,59±0,39	6,44±0,11	6,31±0,08

*Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas

Diferentes modelos de predicción fueron evaluados tal y como aparece en la Tabla 3. En todos ellos la evaluación global ha sido utilizada como método de referencia. El modelo en el que únicamente se incluyen 5 parámetros (5P) mostró el coeficiente de correlación más elevado ($R^2 = 0,94$). Además este coeficiente fue también elevado para los modelos donde se incluyen todos los parámetros (Vino) y en aquel donde solo se consideraron 7 de los parámetros evaluados (7P). La misma tendencia fue también observada para el $ECMC_{VC}$, es decir cuanto mayor es el coeficiente de correlación menor es el error cuadrático medio de calibración. El valor más elevado para el DPR fue observado en el 5P modelo (DPR = 2,92) junto con el menor CV.

Tabla 3. Parámetros estadísticos para la calibración por mínimos cuadrados parciales (PLS)

	N	R ²	ECMC _{VC}	DPR	CV
Vino (W)	27	0,93	0,07	2,51	1,03
5 parametros (5P)	29	0,94	0,06	2,92	0,98
7 parametros (7P)	29	0,92	0,08	2,19	1,19
Indices (I)	26	0,48	0,15	1,17	2,39

N: numero de muestras, R²: coeficiente de correlación, ECMC_{VC}: error cuadrático medio en validación cruzada, DPR: desviación predictiva residual, CV: coeficiente de variación. W: parámetros analizados (12), 5P: etanol (% v/v), AT (g/L), pH, índice de Folin, antocianos (mg/L); 7P: 5 parámetros + Densidad colorante (DC), taninos (g/L), I: índices de HCl, EtOH, gelatina, PVPP y polimerización .

4. Conclusiones

En definitiva el modelo en el que se incluyen 5 parámetros aparece como la opción más válida, debido a la importante reducción obtenida en el tiempo de análisis. DPR superiores a 2,5 son considerados válidos para predicciones aunque la inclusión de la intensidad colorante y los taninos totales podría también ser considerada como un modelo válido de predicción de la calidad sensorial de los vinos de Bobal.

5. Bibliografía

- [1] Kennedy, J.A.; Matthews, M.A.; Waterhouse, A.L. 2002. **Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids**. Am. J. Enol. Vitic. 53, 268-274.
- [2] Cortell, J.M.; Halbleib, M.; Gallagher, A.V., Righetti, T.; Kennedy, J.A. 2005. **Influence of vine vigor on grape (Vitis Vinifera L. cv. Pinot noir) and wine proanthocyanidins**. J. Agric. Food Chem. 53, 5798-5808.
- [3] Gómez Gallego, M.A.; Gómez García-Carpintero, E.; Sánchez-Palomo, E.; González Viñas, M.A.; Hermosín-Gutierrez, I. 2012. **Effect of co-winemaking in phenolic composition, color and antioxidant capacity of Young red wines from La Mancha region**. Eur. Food Res. Tech. 235, 155-167.
- [4] Poveda, J.M.; Garcia, A.; Martín-Ávarez, P.J.; Cabezas, L. 2004. **Application of partial least square (PLS) regression to predict the ripening time of Manchego cheese**. Food Chem. 84, 29-33.
- [5] Cozzolino, D.; Kwiatkowski, M.J.; Damberg, R.G.; Cynkar, W.U.; Janik, L.J.; Skouroumounis, G.; Gishen, M. 2008. **Analysis of elements in wine using near infrared spectroscopy and partial least squares regression**. Talanta. 74, 711-716.
- [6] Tarantilis, P.A.; Troianou, V.E.; Pappas, C.S.; Kotseridis, Y.S.; Polissiou, L.G. 2008. **Differentiation of Greek red wines on the basis of grape variety using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy**. Food Chem. 111, 192-196.
- [7] Lorenzo, C.; Garde-Cerdan, T.; Pedroza, M.A.; Alonso, G.L.; Salinas, M.R. 2009. **Determination of fermentative volatile compounds in aged red wines by near infrared spectroscopy**. Food Research International Food Res. Inter. 42, 1281-1286.
- [8] EU Official Methods for Wine Analyses, Regulation 440/2003.
- [9] Blouin, J. 1992. **Manuel pratique d'analyses des vins**. Chambre d'Agriculture de la Gironde, France.
- [10] Singleton, V.L.; Rossi, J.A. 1965. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents**. Am. J. Enol. Vitic. 16, 144-158.
- [11] Ribéreau-Gayon, P.; Stronestreet, E. 1965. **Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge**. Bulletin de la Société Chimique 9, 119-142.
- [12] Saint-Cricq de Gaulejac, N.; Vivas, N.; Glories, Y. 1998. **Maturité phénolique: définition et contrôle**. Revue Française d'œnologie. 173, 22-25.
- [13] Canals, R.; Llaudy, M.; Valls, J.; Canals, J.M.; Zamora, F. 2005. **Influence of ethanol concentration on the extraction of colour and phenolic compounds from the skin and seeds of Tempranillo grapes at different stages of ripening**. J. Agric. Food Chem. 53, 4019-4025.
- [14] Glories, Y. 1984. **La couleur des vins rouges. Mesure, origine et interpretation**. Connaiss. Vigne Vin 18(4), 253-271.

AC13 - COMPARACIÓN ENTRE LA EFICACIA DE UN NUEVO BIOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO L-MÁLICO CON EL MÉTODO ENZIMÁTICO

Elena González-Royo, Andrea Moreno, Laura Medina, María Navarro, Francesca Fort, Joan Miquel Canals y Fernando Zamora

Universitat Rovira i Virgili/Facultat d'Enologia, departament de Bioquímica i Biotecnologia C/
Marcel·lí Domingo 1. 43007-Tarragona, España.

fernando.zamora@urv.cat

RESUMEN:

En el presente trabajo se compara la eficacia de un biosensor amperométrico portátil para la determinación de la concentración de ácido L-málico con el método más usado en bodega, el método enzimático (con determinación espectrofotométrica). Para ello se trabajó con cuatro matrices distintas: una solución sintética similar al vino, mosto, vino blanco y vino tinto mediante el método de las adiciones estándar. Asimismo se compararon los resultados de ambos métodos en varios vinos comerciales. Los resultados indican que el biosensor presenta una eficacia analítica similar a la del método enzimático. Este biosensor presenta además la ventaja de no necesitar filtrar la muestra, de proporcionar resultados en un minuto y de ser portátil, lo que facilita enormemente su uso.

Palabras clave: Ácido L-málico; Biosensor; Método enzimático

1. Introducción

La determinación del ácido L-málico en bodega es imprescindible para el correcto control de la fermentación maloláctica [1]. Existen diversos métodos analíticos para la estimación de ácido L-málico [2] entre los que se puede destacar la cromatografía en papel [3], HPLC [4] e incluso la electroforesis capilar [5]. Sin embargo, todos estos métodos son difícilmente aplicables en bodegas porque requieren mucho tiempo y técnicos altamente capacitados. Más adecuado para su uso en bodegas son técnicas FT-IR [6] y los métodos enzimáticos [7]. Probablemente, en la actualidad, el método enzimático es el método más utilizado en el análisis preciso del ácido L-málico en vino, mientras que el método de infrarrojos de transformada de Fourier (FT-IR) se utiliza para su control rápido si bien con un menor grado de precisión.

Otra posible técnica de análisis del ácido L-málico consiste en el empleo de biosensores amperométricos [8,9]. Estos métodos se basan en la medida de la intensidad de corriente generada a través de una reacción enzimática de oxido-reducción, que en condiciones de concentración del analito no saturantes, es proporcional a su concentración. Estos métodos son tan específicos como los métodos enzimáticos y además tienen la ventaja de ser mucho más rápidos al no precisar que la reacción se complete. Estos métodos se basan en la medida de la intensidad de corriente generada a través de una reacción enzimática de oxido-reducción que es proporcional a la velocidad de la reacción. De acuerdo con la cinética de Michaelis-Menten, en condiciones de concentración no saturantes, la velocidad de reacción es proporcional a la concentración del sustrato. Por tanto midiendo la intensidad de la corriente podemos determinar el analito. Estos métodos son tan específicos como los métodos

enzimáticos y además tienen la ventaja de ser más rápidos al no precisar que la reacción se complete.

Recientemente la empresa BIOLAN Micro Biosensores SL (Bilbao, España) ha desarrollado un nuevo equipo portátil (BIOSENS) que utiliza un biosensor serigrafado que permite la determinación de ácido L-Málico en alrededor de un minuto. El objetivo del presente trabajo fue el de determinar la eficacia de este biosensor en comparación con la del método más usual, el método enzimático.

2. Material y métodos

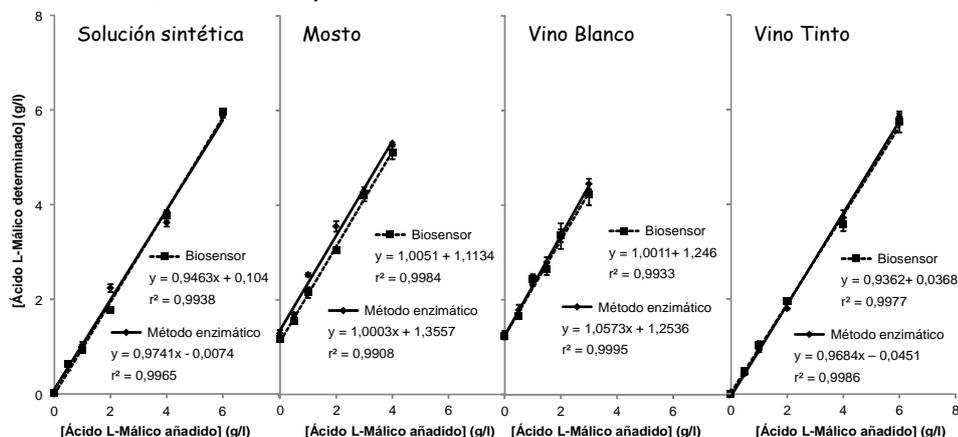
Equipos y reactivos. La determinación del ácido L-málico en las diferentes muestras mediante el método enzimático se realizó con el kit comercial para ácido L-málico comercializado por R-Biopharm (Roche Yellow Line L-Málic Acid) de acuerdo con las instrucciones aconsejadas por la empresa suministradora. Las medidas espectrofotométricas se realizaron con un espectrofotómetro Helios Alpha UV-vis (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltman, MA, USA). La determinación del ácido L-málico en las diferentes muestras mediante el método amperométrico-enzimático se realizó mediante el uso del biosensor portátil de Biolan (BIOSENS, Biolan Microbiosensores SL, Bilbao, España) de acuerdo con las instrucciones de uso aconsejadas por la empresa suministradora.

Muestras. Se analizaron 8 vinos (4 blancos y 4 tintos), todos ellos comerciales de diversos orígenes con precios de venta entre 1,5 y 8,0 €/botella. Para las pruebas de adiciones estándar se procedió a enriquecer en ácido L-málico una solución sintética similar al vino (ác. tartárico: 4 g/l; Etanol: 13 %, pH ajustado a 3,5 con NaOH), un mosto, un vino blanco y un vino tinto hasta 2,0 g/l. Las muestras fueron centrifugadas 10.000 rpm durante 5 minutos solo para las determinaciones mediante el método enzimático. Todas las muestras se analizaron por triplicado y los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar.

3. Resultados

La Figura 1 muestra los resultados correspondientes a la comparación de la eficacia de ambos métodos analíticos mediante el método de las adiciones estándar en las cuatro matrices estudiadas.

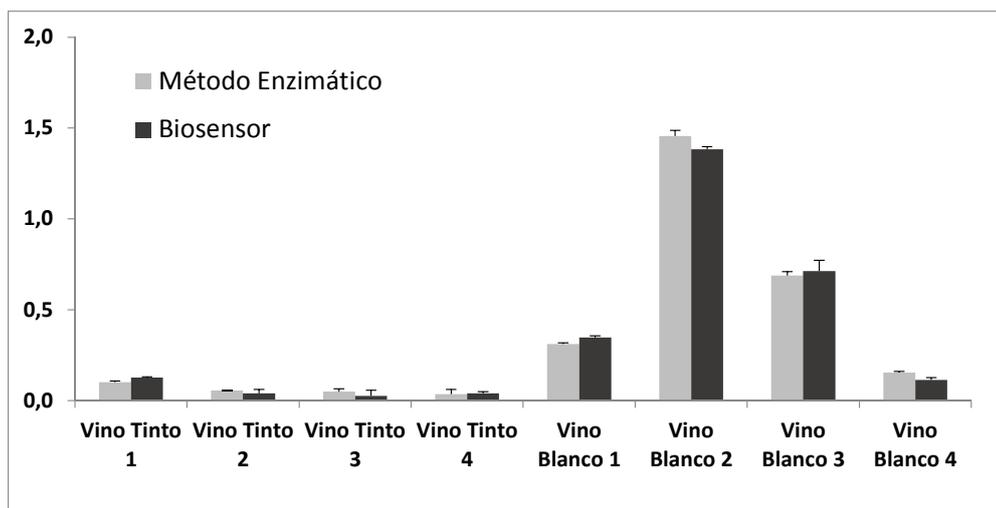
Figura 1. Comparación entre el método enzimático y el biosensor en solución sintética, mosto, vino blanco y vino tinto mediante adiciones estándar



Como se puede ver, los resultados analíticos muestran claramente que ambos métodos presentan resultados muy similares, siendo en la práctica las rectas de regresión obtenidas prácticamente indistinguibles tanto en solución sintética, como en mosto, vino blanco o vino tinto. Asimismo, los errores obtenidos en las determinaciones presentaron en ambos métodos.

La Figura 2 muestra la concentración en ácido L-málico obtenida mediante el método enzimático y el biosensor de 5 vinos blancos y 5 vinos tintos comerciales.

Figura 2. Comparación entre el método enzimático y el biosensor



Como se puede ver claramente el método enzimático y el biosensor proporcionaron resultados prácticamente idénticos tanto en los vinos tintos como en los vinos blancos con errores en ambos casos muy bajos. Cabe señalar que todos los vinos tintos, como era de esperar, presentaban niveles de ácido L-málico muy bajos ya que habían realizado la fermentación maloláctica. En vinos blancos la fermentación maloláctica suele inhibirse para mantener su frescor. Por esta razón los vinos blancos analizados presentan niveles de ácido L-málico superiores a los vinos tintos si bien los vinos blancos 1 y 2 presentan valores muy bajos que indicarían una fermentación maloláctica parcial.

4. Conclusiones

Los resultados indican que el biosensor proporciona una precisión y exactitud muy similares al método enzimático. El Biosensor presenta además las ventajas de una mayor rapidez de medida, una mayor sencillez en su manejo y que no requiere la centrifugación ni la filtración de la muestra. Asimismo el hecho de que sea un equipo portátil lo hace especialmente útil para el control de la fermentación maloláctica en bodega especialmente para aquellos enólogos consultores que de este modo podrían determinar el final de la fermentación maloláctica de forma rápida sin la demora que implica enviar muestras a laboratorios externos.

5. Bibliografía

1. Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A., Glories, Y., Bertrand, A., Maujean, A. 1998. *In: Traité d'Œnologie*. 2 Toms, Ed. Dunod, París.
2. Mato, I., Suárez-Luque, S., Huidobro, J.F., 2005. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*, 38, 1175-1188.
3. García-Barceló, J. 1990. Técnicas analíticas para vinos. Ed. GAB, Moja-Olédola (Barcelona), pag. 2.58-2.59. Scherer, R., Poloni-Rybka, A.C., Ballus, C.A., Dillenburger-
4. Schneider, A., Gerbi, V., Redoglia, M. 1987. Rapid HPLC Method for Separation and Determination of Major Organic Acids in Grape Musts and Wines. *American Journal of Enology and Viticulture.*, 38, 151-155.
5. Saavedra, L., García, A., Barbas, C. 2000. Development and validation of a capillary electrophoresis method for direct measurement of isocitric, citric, tartaric and malic acid as adulteration markers in orange juice. *Journal of Chromatography A*, 881, 395-401.
6. Max, J.J., Chapados, C. 2002. Infrared Spectroscopy of Aqueous Carboxylic Acids: Malic Acid. *Journal of Physical Chemistry A*, 106, 6452-6461
7. Peynaud, E., Blouin, J., Lafon-Lafourcade, S. 1966. Review of Applications of Enzymatic Methods to the Determination of some Organic Acids in Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 17, 218-224.
8. Gilis, M., Durliat, H., Comtat, M. 1996. Electrochemical Biosensors for Assays of L-Malic and D-Lactic Acids in Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, 11-16.
9. Gamella, M., S. Campuzano, S., Conzuelo, F., , Curiel, J.A., Muñoz, R., Reviejo, A.J., Pingarrón, J.A. 2010. Integrated multienzyme electrochemical biosensors for monitoring malolactic fermentation in wines. *Talanta*, 81, 925-933.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Economía y Competitividad Programa INNPACTO; Proyecto HIBRILAN; ref: IPT-2011-1622-010000) y a la empresa Biolan Microbiosensores S.L. por su financiación.

AC14 - ATRIBUTOS SENSORIALES CON CAPACIDAD PREDICTIVA EN EL AMARGOR DE VINOS TINTOS

**Purificación Fernández-Zurbano¹, José Miguel Avizcuri¹², Ana Gonzalo¹, Marivel Gonzalez¹,
Marta Dizy¹, María Pilar Sáenz-Navajas², Vicente Ferreira¹²**

¹ Instituto de las Ciencias de la Vid y el Vino (Universidad de La Rioja-CSIC-Gobierno de la Rioja), Carretera de Burgos, Km 6, 26007 Logroño, La Rioja, España

² Laboratorio de análisis del aroma y enología. Departamento de Química Analítica, Universidad de Zaragoza, Instituto de Investigación e Ingeniería de Aragón (I3A),c/ Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza
puri.fernandez@unirioja.en

RESUMEN:

En la bibliografía, muy habitualmente, se asigna como responsables del sabor amargo de los vinos a los compuestos fenólicos de bajo peso molecular como flavanoles, ácidos fenólicos y proantocianidinas constituidas por menos de 3-4 unidades. Sin embargo, existen pocos trabajos en los que se muestre la capacidad predictiva del sabor amargo de los vinos en base a la composición química citada. La evaluación sensorial de 6 fracciones amargas obtenidas a partir de 6 vinos distintos no mostró correlación con el amargor evaluado en los vinos. Por esto, un mayor número de vinos fueron evaluados sensorialmente en boca y nariz y analizada la composición fenólica de bajo peso molecular. Los resultados muestran que los atributos aromáticos “vegetal”, “animal” y “fruta seca” y los atributos en boca “acidez”, “astringencia” y “persistencia” están significativamente correlacionados con el amargor evaluado en los vinos. El modelo matemático que retiene los atributos “vegetal”, “acidez” y “astringencia” tiene una alta capacidad predictiva y los atributos “acidez” y “astringencia” mejora el modelo construido únicamente con los compuestos fenólicos de bajo peso molecular.

Palabras clave: Amargor, vinos, PLS, compuestos fenólicos, atributos aromáticos, acidez y

1. Introducción

El concepto de la calidad de un vino es un aspecto multidimensional relacionado tanto con las propiedades del propio producto como con las características de la persona que lo consume o evalúa. A pesar de que la evaluación de la calidad por consumidores, expertos o gurus puede ser muy diferente, en todos los casos las propiedades organolépticas (color, aroma y sabor) juegan un papel fundamental en la construcción del concepto y éste puede cambiar de unas personas a otras, sin embargo cualquier defecto sea visual, en nariz o en boca hace disminuir el concepto de calidad del vino. En esta línea, y en relación con las características en boca, muy habitualmente se utiliza la expresión “estructura del vino”, si ésta es adecuada se incrementará la calidad percibida, en el caso contrario muy probablemente la evaluación de la calidad será baja. No hay una definición única para la estructura del vino, pero puede decirse que una buena estructura en boca significa que los sabores y las sensaciones en boca aparecen a la vez potentes y equilibrados. Entre los atributos evaluados en boca y que

contribuyen a la estructura de los vinos el amargor es, a día de hoy, el sabor sobre el que menor conocimiento existe acerca de los compuestos químicos responsables del mismo y, de hecho, en la bibliografía se encuentran resultados controvertidos en relación con los compuestos implicados en el mismo [1-3]. En general, se apunta a los compuestos polifenólicos como compuestos responsables del sabor amargo, en concreto los compuestos polifenólicos de bajo peso molecular, así como las proantocianidinas más pequeñas (dímeros y trímeros). Sin embargo, muchos de estos compuestos están presentes en los vinos por debajo del umbral sensorial del sabor amargo, aunque Hufnagel y Hofmann [3] apuntan que, a pesar de esto, compuestos como los ésteres etílicos de los ácidos fenólicos y flavanoles contribuyen al sabor amargo de los vinos tintos. Recientemente se ha publicado que los cambios que el amargor experimenta durante el almacenamiento de los vinos en botella no están correlacionados con los cambios en la composición fenólica anteriormente citada, sin embargo significativas correlaciones se han encontrado con los atributos aromáticos “herbal” y “especiado” [4]. En esta línea, el objetivo de este trabajo ha sido profundizar en el conocimiento del sabor amargo de los vinos y determinar la contribución que la composición química y las características sensoriales en dicho sabor.

2. Material y métodos

El análisis sensorial se realizó de acuerdo con Sáenz-Navajas et al. [5]

El análisis de polifenoles de bajo peso molecular se realizó mediante UHPLC-MS-DAD [6]

El fraccionamiento del vino se realizó de acuerdo con Gonzalo et al. [7]

3. Resultados

Seis vinos tintos jóvenes con muy diferente contenido en polifenoles totales (entre 30-63 IPTs) fueron analizados sensorialmente en boca por un panel entrenado (Figura 1a) y la composición química polifenólica de bajo peso molecular mediante UHPLC. Además, estos vinos fueron fraccionados en dos fracciones: Fracción H (compuestos de alto peso molecular) y Fracción L (compuestos de bajo peso molecular). El amargor de la fracción H fue residual [7], mientras que la fracción L fue descrita muy ácida, amarga (Figura 1b) y persistente.

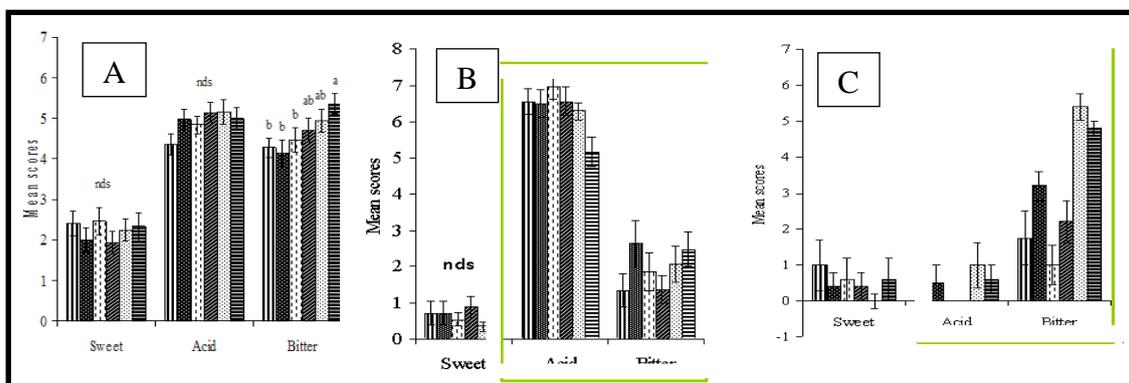


Figura 1: Evaluación en boca de 6 vinos y sus correspondientes 6 fracciones L: A) vinos B) fracción L C) fracción L2 (Fracción L sin ácidos)

Con el fin de minimizar la influencia de la excesiva acidez percibida en el resto de los atributos en boca, los ácidos orgánicos fueron eliminados de las fracciones mediante extracción en fase sólida. Las dos subfracciones (L1 y L2) obtenidas a partir de cada fracción L fueron nuevamente evaluadas en boca por el panel sensorial entrenado. La fracción L1 fue descrita como ácida y persistente con valores residuales para los atributos amargor y astringencia, mientras que la fracción L2 fue descrita como amarga, ligeramente astringente y persistente con valores residuales para la acidez (Figura 1c). El amargor evaluado en los vinos no mostró correlación ni con el amargor de las fracciones Ls ni con la fracciones en la que se eliminaron los ácidos (Fracción L2).

De los compuestos polifenólicos analizados fueron seleccionados los compuestos con posible actividad en el sabor amargo en base a los criterios: 1) concentración max/min > 2 y 2) la existencia de correlaciones significativas ente la concentración de los compuestos y el amargor de las fracciones L2. Así con el fin de construir un modelo predictivo para el amargor se realizó una regresión por mínimos cuadrados parciales con validación cruzada. La función de predicción obtenida explica una varianza del 86% (82% por validación cruzada), siendo el error de predicción del 0,588 %. El modelo obtenido se muestra a continuación:

$$\text{AMARGOR (Fracción L): } 1.036 + 0.014 \cdot \text{Cut} - 3.928 \cdot \text{Procat} + 0.020 \cdot \text{PCB1} + 0.009 \cdot \text{Cat} + 0.015 \cdot \text{PCB2} + 1.273 \cdot \text{Q-rut} + 0.126 \cdot \text{Ant-flav} + \text{Pet-ace-glu} + 0.656 \cdot \text{Mv-glu-pir} + 0.155 \cdot \text{Pet-cou-glu}$$

Los resultados sensoriales con la fracción amarga muestran que el amargor evaluado en esta fracción no permite explicar el amargor percibido en los vinos uniciales, por lo que otros atributos sensoriales podrían estar implicados en la percepción de dicho sabor. Para profundizar en esta cuestión se realizó el análisis sensorial y químico de 34 vinos tintos jóvenes. En primer lugar se realizaron las correlaciones entre el amargor de los vinos con los compuestos químicos analizados. Los resultados muestran que el sabor amargo esta correlacionado significativamente con la procianidinas B1 y A2, ácidos trans-caftárico y gálico, catequina, epicatequina, la quercetina-3-O-glucósido, la miricetina y los pigmentos de mediano y gran tamaño (MP). El modelo predictivo obtenido explica el 69% de la varianza (61% por varianza cruzada) con un raíz del error cuadrático medio (RMSE) de 0,164.

$$\text{AMARGOR} = 14.082 + 0.278 \text{ Procianidina B1} - 0.446 \text{ Ácido trans-caftárico} + 0.177 \text{ Quercetina-3-O-glucósido} + 0.380 \text{ Miricetina} + 0.261 \text{ MP}$$

En segundo lugar se realizaron las correlaciones entre el amargor de los vinos y el resto de atributos sensoriales (aroma y boca). Los resultados muestran que el amargor se correlaciona significativa y positivamente con los atributos “fruta pasa”, “animal”, “vegetal”, “astringencia” y “persistencia”. El PLS realizado con dichos atributos retuvo en el modelo los atributos “vegetal”, “acidez” y “astringencia”. Este modelo predictivo explica el 80% de la varianza original (76% por varianza cruzada) con un raíz del error cuadrático medio (RMSE) de 0,149.

$$\text{AMARGOR} = 5.019 + 0.369 \text{ Vegetal} + 0.162 \text{ Acidez} + 0.678 \text{ Astringencia}$$

En tercer lugar se construyó un modelo teniendo en cuenta tanto los compuestos químicos como los atributos sensoriales correlacionados con el amargor. El modelo obtenido explica el 76 % de la varianza original (68% por varianza cruzada).

$$\text{AMARGOR} = 5.957 + 0.189 \text{ Procianidina B1} - 0.206 \text{ Ácido trans-caftárico} + 0.083 \\ \text{Quercetina-3-O-glucósido} + 0.277 \text{ Miricetina} + 0.150 \text{ MP} + 0.299 \text{ Acidez} + \\ 0.288 \text{ Astringencia}$$

4. Conclusiones

Los atributos sensoriales tanto aromáticos como el sabor y las sensaciones en boca juegan un papel importante en el amargor de los vinos, el cual por lo tanto, no depende únicamente del contenido polifenólico de bajo peso molecular, tal y como habitualmente es asumido.

5. Bibliografía

1. Peleg, H.; Gacon, K.; Schlich, P.; Noble, A.C. 1999. Bitterness and astringency of flavan3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 1123-1128.
2. Kallithraka, S.; Bakker, J.; Clifford, M.N. 1997. Evaluation of bitterness and astringency of (+)-catechin and (-)-epicatechin in red wine and in model solution. *Journal of Sensory Studies* 12, 25-37.
3. Hufnagel, J.C.; Hofmann, T. 2008. Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9190-9199.
4. Sáenz-Navajas, M.P.; Avizcuri-Inac, J.M.; Ferreira, V.; 2011. Fernández-Zurbano, P. 2014. Sensory changes during bottle storage of Spanish red wines under different initial oxygen doses. *Food Research International*, 66, 235-246.
5. Sáenz-Navajas, M.P.; Martín-López, C.; Ferreira, V.; 2011. Fernández-Zurbano, P. Sensory properties of premium Spanish red wines and their implication in wine quality perception. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17, 9-19.
6. González-Hernández, M.; Avizcuri-Inac, J.M.; Dizy, M.; Fernández-Zurbano, P. 2013. Ultra performance liquid chromatographic coupled to ultraviolet-vis and mass spectrometry detectors for the screening of organic acids and polyphenols in red wine. In *High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles, Practices and Procedures*, Nova Science Publishers, Inc: Hauppauge, New York, 267-299.
7. Gonzalo-Diago, A., Dizy, M., Fernández-Zurbano, P. 2013. Taste and mouthfeel properties of red wines proanthocyanidins and their relation to the chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 8861-8870.

6. Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado dentro del proyecto del Plan Nacional de I+D financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación AGL2010-22355-C02-02.

AC15 - MODELADO DE DESCRIPTORES SENSORIALES DEL VINO CON FUSIÓN DE DATOS DE TÉCNICAS INSTRUMENTALES. SIMULACIÓN DE PANEL DE CATA ELECTRÓNICO

Alba Valls^{1a}, Eva Borràs^{1a}, Ricard Boqué^{1b}, Joan Ferré^{1b}, Anna Brull²,
Montserrat Mestres^{1a}, Laura Aceña^{1a}, Olga Busto^{1a}

¹Universitat Rovira i Virgili, Dpto. de Química Analítica y Química Orgánica, Campus Sescelades, 43007 Tarragona. ^aGrupo de Sensometría Instrumental; ^b Grupo de Quimiometría, Cualimetría y Nanosensores.

²VITEC, Parque Tecnológico del Vino. Crta. Porrera, Km.1, 43730 Falset (Tarragona).

alba.valls@estudiants.urv.cat

Resumen: La calidad sensorial del vino es el resultado de la percepción simultánea de diversos atributos de color, olor y gusto, resultado de combinaciones de compuestos químicos. El análisis sensorial, basado en paneles de cata, es lento, caro y hasta cierto punto subjetivo, lo que ha motivado que en los últimos años haya habido un interés creciente en la búsqueda de sistemas para relacionar los atributos sensoriales descritos por los paneles con medidas instrumentales objetivas. En este trabajo se han combinado tres instrumentos, una nariz-e HS-MS, una lengua-e FT-MIR y un ojo-e UV-Vis, para predecir descriptores sensoriales en vinos tintos de la DOC Priorat. Los conjuntos de datos resultantes se han procesado mediante técnicas quimiométricas y se han desarrollado modelos de calibración multivariante PLS para la predicción de los descriptores.

Palabras clave: vino, PLS regresión, panel electrónico, nariz electrónica, lengua electrónica, análisis multivariante. fusión de datos. sensometría

1. Introducción

El análisis sensorial implica la medida, interpretación y comprensión de las respuestas humanas a los estímulos percibidos por los sentidos de la vista, olor y gusto [1-2]. El análisis sensorial se lleva a cabo en muchos tipos de bebidas alcohólicas [1,3], siendo el vino una de las más representativas debido a su compleja composición, la cual contribuye a sus características sensoriales únicas [1]. El análisis sensorial lo realizan catadores entrenados, siendo una herramienta muy útil para la clasificación de los vinos y su control de calidad. Sin embargo, dicho proceso es lento, costoso y hasta cierto punto subjetivo [2]. Debido a ello, existe un interés creciente en el desarrollo de métodos instrumentales capaces de predecir atributos sensoriales en alimentos de una forma objetiva, económica, rápida, reproducible e ininterrumpida [1-2].

En los últimos años se han aplicado diferentes métodos instrumentales para establecer una relación entre los atributos sensoriales y la composición química del vino. La espectrometría de masas con espacio de cabeza (HS-MS) y las técnicas espectroscópicas como el infrarrojo medio (FT-MIR) y el ultravioleta-visible (UV-Vis) se han adaptado para ser utilizadas como instrumentos sensoriales [4-5]. La combinación de los resultados de diferentes técnicas instrumentales se denomina “fusión de datos” y ha surgido como una alternativa para incrementar la fiabilidad en la clasificación o la predicción de propiedades en alimentos, respecto a la utilización de técnicas instrumentales individuales. La estrategia más simple de fusión se denomina de bajo nivel (*low-level*) y en ella los datos instrumentales de las diferentes técnicas se concatenan manteniendo en común la dimensión de las muestras para dar lugar a una sola matriz [5]. Después, sobre dicha matriz se aplican los métodos quimiométricos tradicionales de clasificación y/o predicción.

El objetivo de nuestro estudio fue combinar los datos provenientes de tres técnicas instrumentales (HS-MS, MIR y UV-Vis) para mejorar los resultados de predicción alcanzados por las técnicas individuales. Se estudiaron tres atributos sensoriales: la calidad de tanino, la evolución de color y la madera en nariz. Se desarrollaron modelos de calibración multivariante utilizando el método de regresión PLS (*Partial Least Squares*) para relacionar los datos instrumentales con las puntuaciones sensoriales proporcionadas por un panel de cata de VITEC (Parque Tecnológico del Vino) para una serie de vinos de la misma vendimia y denominación de origen (DOC Priorat).

2. Material y métodos

Muestras de vino. Un total de 78 vinos tintos y envejecidos proporcionados por 41 bodegas de la DOC Priorat, todos ellos de la misma vendimia (2009), fueron catados por un panel sensorial y analizados mediante FT-MIR, HS-MS y UV-visible. Las bodegas se localizan en 12 pueblos de la comarca del Priorat (Tarragona) y los vinos de estudio tienen diferente composición varietal, con predominancia de las variedades Garnacha y Cariñena.

Panel sensorial. Hasta 24 atributos sensoriales (visuales, olfatorios y gustativos) fueron evaluados por 42 catadores. Los atributos estudiados se pueden dividir en parámetros generales como la evolución de color, la calidad de tanino, la intensidad aromática o la madera en nariz (valorados de 1 a 6) y en aromas específicos como animal, vegetal o especiado, entre otros (valorados de 1 a 4). Las puntuaciones con valores de 1 son bajas y las de 4/6 son altas, con excepción del atributo *evolución de color* donde 1 se refiere a más evolución y 6 a menos evolución.

Análisis instrumental. La composición volátil se determinó mediante espectrometría de masas con espacio de cabeza (HS-MS). Los volátiles se extrajeron y concentraron usando un espacio de cabeza estático (G1888 Network Headspace Sampler) y se detectaron con un detector selectivo de masas HP5973N. Se prepararon muestras de vino (5 ml) con 0.58 g de NaCl y se depositaron en viales de 10 ml cerrados con un septum de PRFE/silicona. Después de la extracción, se llevó a cabo una desorción térmica de la fibra. Para transferir los volátiles de la fibra al detector de MS sin separación cromatográfica, se mantuvo la columna HP-5MS en un cromatógrafo de gases a la temperatura adecuada. Los espectros de masas se obtuvieron con el modo de impacto electrónico (70 eV) en un rango de masas de 50 a 200 uma.

La composición líquida se analizó mediante espectroscopia de infrarrojo medio (MIR) con un espectrómetro FT-MIR Nexus (Thermo Nicolet, USA) equipado con un detector de sulfato de triglicina deuterado (dTGS). Los espectros de transmitancia se registraron a temperatura ambiente en el rango de 4000-400 cm^{-1} , a una resolución de 4 cm^{-1} y con 32 escaneos tanto para el fondo como para las muestras. Se utilizó el software OMNIC (versión 6.2) de Thermo Nicolet para la adquisición de los espectros, el control instrumental y la manipulación preliminar de los archivos.

Finalmente, las medidas de color se obtuvieron con un espectrofotómetro (Thermo) Helios Gamma de un solo haz equipado con tecnología de diodos en fila. Los espectros ultravioleta visible (UV-vis) se obtuvieron a temperatura ambiente en el rango de longitudes de onda de 250-700 nm, con una resolución de 1 nm. Todas las muestras se analizaron por duplicado en una cubeta de cuarzo con un camino óptico de 1 mm.

Análisis estadístico de los datos. Los espectros obtenidos en primer lugar se preprocesaron usando métodos quimiométricos, para eliminar el ruido y la información irrelevante. Como análisis exploratorio preliminar, se usó PCA (Análisis de Componentes Principales) para revelar posibles agrupaciones de muestras y para detectar muestras discrepantes. A continuación, se construyeron los modelos de calibración para predecir tres atributos sensoriales generales: evolución de color, madera en nariz y calidad de tanino, mediante las técnicas individuales y a partir de las técnicas combinadas (fusionadas). El método utilizado fue la regresión PLS (Mínimos Cuadrados Parciales) [5,6]. Los espectros de

cada técnica se trataron de forma específica dependiendo de sus características. Los datos fusionados necesitaron un pre-procesado adicional con el objetivo de compensar las diferentes escalas de medida y la variabilidad de cada técnica [5]. Las regiones espectrales más informativas se seleccionaron escogiendo los valores de los índices de las variables importantes de proyección (VIP) mayores que uno [7]. La validación de los modelos se realizó dividiendo 10 veces al azar los conjuntos de datos en conjuntos de calibración y de validación (70:30). La calidad de los modelos se comprobó mediante el valor de RMSECV (*Root Mean Squared Error of Cross-Validation*) y el coeficiente de determinación de predicción (r^2_p). El procesado de los datos y la construcción de los modelos se llevó a cabo usando rutinas de Matlab v.7.8 propias (Mathworks, MA, USA) y el software PLS Toolbox v.6.2 (Eigenvector Research, Manson, WA, USA).

3. Resultados

Los espectros de cada una de las técnicas instrumentales se organizaron en matrices de dimensiones 78x151 (HS-MS), 78x246 (FT-MIR) y 78x410 (UV-visible). Para desarrollar la estrategia de fusión de datos de nivel bajo, los espectros de las tres técnicas se concatenaron obteniendo de este modo una única matriz.

Respecto a cada técnica individual, se aplicó el Análisis de Componentes Principales (PCA) para detectar muestras discrepantes, para comprobar la repetitividad de las medidas y para reconocer patrones en los datos, básicamente relacionados con el pueblo de origen y con la composición varietal. No se observaron patrones y algunos valores atípicos fueron identificados.

A continuación, se calcularon los modelos de regresión PLS con los espectros de cada técnica individual y también con los datos fusionados para cada uno de los tres descriptores. Los parámetros de validación de los modelos finales se encuentran sintetizados en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Parámetros de validación de los modelos de regresión PLS de los datos individuales y combinados para cada descriptor estudiado (*). Las técnicas en negrita son las que proporcionan los mejores resultados.

DESCRIPTOR	TÉCNICA	RMSEP		r^2 de predicción		Número factores PLS
		promedio	D.S	promedio	D.S	promedio
Evolución de color	FT-MIR	0,27	0,04	0,38	0,20	5
	HS-MS	0,28	0,05	0,23	0,12	2
	DF: MIR-MS	0,20	0,04	0,66	0,11	7
	UV-visible	0,15	0,011	0,79	0,05	7
	DF: MS-MIR-UVV	0,15	0,017	0,81	0,05	4
Madera en nariz	FT-MIR	0,34	0,06	0,05	0,05	1
	HS-MS	0,26	0,04	0,38	0,17	4
	UV-visible	0,30	0,014	0,19	0,10	2
	DF: MS-UVV	0,27	0,04	0,45	0,12	4
Calidad de tanino	FT-MIR	0,22	0,03	0,42	0,13	6
	HS-MS	0,24	0,03	0,23	0,15	2
	DF: MIR-MS	0,19	0,04	0,59	0,15	3
	UV-visible	0,25	0,03	0,23	0,10	2

(*). Los resultados se presentan como promedios y desviaciones estándares (D.S.) de los 10 modelos.

MS: headspace/espectrometría de masas, MIR: espectroscopia infra-rojos, UV-vis: espectroscopia UV-visible;

Se probaron diferentes pre-procesados, regiones espectrales y número de factores retenidos por los modelos PLS. En el caso de HS-MS los espectros fueron pre-procesados mediante "row profile" y logaritmo en base diez. Los espectros de FT-MIR y UV-visible se pre-procesaron mediante SNV (*Standard Normal Variate*), corrección de línea base o primera derivada, o

combinación de ellos. Antes de construir el modelo de regresión PLS todos los espectros se centraron y escalaron (*autoscaling o Pareto scaling*). Las regiones espectrales más influyentes fueron identificadas estudiando los valores de los índices VIP. Por su lado, los datos fusionados necesitaron escalado y pre-procesado adicional. Finalmente, se seleccionaron las mejores condiciones buscando obtener los valores óptimos de RMSECV y r^2_p .

Los mejores resultados de predicción para las técnicas individuales se obtuvieron con espectroscopia de UV-visible para *evolución de color* (RMSEP = 0.15), HS-MS para *madera en nariz* (RMSEP = 0.26) y FT-MIR para *calidad de tanino* (RMSEP = 0.22). Las estrategias de fusión de datos de nivel bajo mejoraron los resultados de predicción para *madera en nariz* y *calidad de tanino*. La fusión de datos MS-MIR-UVV proporcionó una ligera mejora de los resultados de *evolución de color*, pero no de forma suficiente para justificar el uso de los tres instrumentos. Es remarcable enfatizar que los valores de RMSEP resultantes son comparables a las desviaciones estándar ponderadas del método de referencia (panel de cata), que son 0.14 para la *evolución de color*, 0.16 para la *madera en nariz* y 0.15 para la *calidad de tanino*.

4. Conclusiones

Este estudio muestra que es posible predecir de forma aceptable descriptores del vino usando técnicas instrumentales y que la estrategia de fusión de datos de nivel bajo mejora los resultados de predicción. Los mejores modelos de regresión PLS se obtuvieron con UV-visible para la *evolución de color*, con datos fusionados de MS-UVV para la *madera en nariz* y datos fusionados MIR-MS para *calidad de tanino*. Futuros estudios, usando estrategias de fusión de datos de nivel medio y alto deberían ser considerados para mejorar los resultados de predicción. Finalmente, la mejora en la exactitud de los resultados proporcionados por el método de referencia (panel de cata), por ejemplo a través de procesos de acreditación, también mejoraría los errores de predicción de los modelos.

5. Bibliografía

- [1] Cozzolino, D., Cowey, G., Lattey, K. A., Godden, P., Cynkar, W. U., Damberg, R. G., Gishen, M. (2008). Relationship between wine scores and visible-near-infrared spectra of Australian red wines. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 975–981.
- [2] Lozano, J., Santos, J., Arroyo, T., Aznar, M., Cabellos, J., Gil, M., Horrillo, M. (2007). Correlating e-nose responses to wine sensorial descriptors and gas chromatography–mass spectrometry profiles using partial least squares regression analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 127(1), 267–276.
- [3] Vera, L., Aceña, L., Guasch, J., Boqué, R., Mestres, M., Busto, O. (2011). Characterization and classification of the aroma of beer samples by means of an MS e-nose and chemometric tools. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399, 2073–2081.
- [4] Vera, L., Aceña, L., Boqué, R., Guasch, J., Mestres, M., Busto, O. (2010). Application of an electronic tongue based on FT-MIR to emulate the gustative mouthfeel “tannin amount” in red wines. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 3043–3049.
- [5] Borràs, E., Ferré, J., Boqué, R., Mestres, M., Aceña, L., Busto, O. (2015). Data Fusion Methodologies for Food and Beverage Authentication and Quality Assessment – a Review. *Analytica Chimica Acta*.
- [6] Cozzolino, D., Smyth, H. E., Lattey, K. A., Cynkar, W., Janik, L., Damberg, R. G., Gishen, M. (2006). Combining mass spectrometry based electronic nose, visible-near infrared spectroscopy and chemometrics to assess the sensory properties of Australian Riesling wines. *Analytica Chimica Acta*, 563, 319–324.
- [7] Mehmood, T., Liland, K. H., Snipen, L., Sæbø, S. (2012). A review of variable selection methods in Partial Least Squares Regression. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 118, 62–69.

6. Agradecimientos

El Ministerio Español de Ciencia y Tecnología (Project AGL2011-26456) es reconocido con agradecimiento por el soporte financiero.

AC16 - MODIFICACIÓN DEL PERFIL AROMÁTICO DE LA GARNACHA BLANCA MEDIANTE TRATAMIENTOS VITIVINÍCOLAS

Pedro Cabanillas, Sergi Fernández, Laura Aceña, Olga Busto,
Montse Mestres, Josep Guasch

Universitat Rovira i Virgili, Dpto. Química Analítica y Química Orgánica. Grupo de Sensometría Instrumental. Campus Sescelades N4. Marcel·lí Domingo 1, 43007 Tarragona (España)
isens@urv.cat

RESUMEN:

La Garnacha blanca ha sido considerada durante muchos años una variedad neutra poco aromática. Sin embargo, en este estudio se muestra que las últimas tendencias en la elaboración de vinos de calidad utilizando esta variedad autóctona permiten expresar su gran potencial organoléptico. Además, también se ha estudiado el efecto de dos tratamientos vitivinícolas sobre la expresión aromática de los vinos obtenidos a partir de esta variedad: la fertilización nitrogenada foliar y el uso de una cepa de levadura específica. Los resultados demuestran que los tratamientos aplicados introducen cambios en la fracción volátil del vino, algunos de los cuales se traducen en cambios organolépticos que pueden favorecer la expresión aromática de la variedad estudiada.

Palabras clave: Garnacha blanca, tipicidad, GCO, perfil aromático, tratamientos vitivinícolas

1. Introducción

La Garnacha blanca es una variedad autóctona muy típica de las zonas mediterráneas y de parte del valle del Ebro. Se caracteriza por ser una variedad muy productiva, de racimos compactos no muy grandes con bayas medianas y de forma redonda. Típicamente da vinos con gran cuerpo y grado alcohólico elevado, pero proclives a la oxidación y con un carácter afrutado bastante neutro. De hecho, debido a esta escasa expresión aromática y a su facilidad de oxidación, hasta hace una década, su uso estaba destinado al *coupage* con otras variedades como el macabeo, la parellada o el moscatel para obtener vinos dulces o generosos. Sin embargo, recientemente y gracias a la creciente tendencia a elaborar vinos de variedades autóctonas que transmitan mejor el carácter de la zona donde son producidos, junto con la evolución de las técnicas vitivinícolas, han permitido la obtención, con éxito, de vinos monovarietales de Garnacha blanca.

En la primera parte de este estudio se analizaron sensorialmente distintos vinos elaborados a partir de esta variedad y, tras su clasificación en tres estilos (floral, mineral y vegetal), se procedió a la caracterización aromática mediante la cromatografía de gases-olfatometría (GCO) de vinos representativos de cada uno de estos tres perfiles aromáticos. Viendo la riqueza aromática que se puede conseguir con esta variedad, se decidió avanzar con un segundo estudio en el que se utilizaron dos tratamientos vitivinícolas de forma individual y combinada con el objetivo de evaluar su efecto sobre la expresión aromática del vino final. Concretamente se estudió el efecto de la fertilización foliar nitrogenada y el uso de una cepa de levadura específica.

2. Material y métodos

2.1. MUESTRAS

Las muestras de vino de la variedad Garnacha blanca utilizadas en la primera parte del estudio fueron obtenidas de distintas bodegas de la D.O. Terra Alta. La segunda parte del estudio, se realizó en la finca experimental Mas dels Frares (Constantí, Tarragona) de la Facultad de Enología de Tarragona de la Universidad Rovira i Virgili.

2.2. TRATAMIENTOS VITIVINÍCOLAS

El diseño experimental para la fertilización nitrogenada se organizó en dos bloques. El bloque 1 (bloque con tratamiento) fue tratado dos veces con el fertilizante EISENPLUS PAE (Würtz España), cuyo porcentaje de nitrógeno orgánico es del 1%. La aplicación del producto se realizó en todas las pasadas mediante pulverización foliar utilizando un atomizador Balven. El bloque 2 (bloque control) no recibió ningún tratamiento de abonado foliar.

Respecto a las cepas empleadas para la fermentación alcohólica se utilizaron dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*: la levadura EC1118 (Lalvin, Lallemand) considerada la levadura estándar o control, y la levadura IOC Revelation Thiols (Institut Oenologique de Champagne, France) con actividad específica de la enzima β -liasa que debería producir un efecto potenciador en la composición del aroma de los vinos obtenidos. Las fermentaciones se realizaron por triplicado para cada cepa y para cada uno de los bloques considerados.

2.3. ANÁLISIS

Para la caracterización aromática mediante GCO se trabajó con un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 con detector de ionización de llama (FID) y equipado con un detector olfatométrico ODO-1 (SGE International). La columna empleada fue una Chrompack CP-WAX, 57 CB (50 m x 0,25 mm x 0,2 μ m), con un flujo de helio de 1 mL/min y la siguiente rampa de temperaturas: 40 °C (2 min), 5 °C/min, 225 °C (30 min). Temperaturas del inyector/detector: 270 °C/250 °C. La división de flujo en el análisis olfatométrico se estableció en una relación 1:10 FID:puerto olfatométrico. Para concentrar los compuestos aromáticos se utilizó la microextracción en fase sólida aplicada al espacio de cabeza (HS-SPME) con fibras 50/30 μ m DVB/CAR/PDMS, StableFlex (Supelco, Sigma-Aldrich). Para proceder con la posterior jerarquización de los aromas extraídos se aplicó la variante de la técnica Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA) desarrollada en nuestro laboratorio [1, 2].

Para evaluar las variaciones de la fracción volátil del vino obtenido según el tratamiento aplicado se utilizó la HS-SPME para extraer y concentrar los compuestos volátiles. Posteriormente, estos extractos se analizaron mediante un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) operando en modo EI (70 eV). La columna empleada fue una HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), con un flujo de helio de 1 mL/min y la rampa de temperaturas: 40 °C (5 min), 4 °C/min, 150 °C (2.5 min), 25 °C/min, 300 °C (5 min). Temperaturas de interfaz/fuente/cuadrupolo: 200 °C/230 °C/150 °C.

Los análisis sensoriales se realizaron con un panel de cata constituido por 24 personas conocedoras de los vinos de esta variedad y entrenadas en el análisis sensorial.

3. Resultados

Para asegurar la fiabilidad de los resultados obtenidos en la evaluación sensorial de los vinos, estos se elaboraron siguiendo un protocolo de vinificación similar y, una vez finalizada la fermentación alcohólica, no fueron sometidos a ningún proceso de estabilización ni filtración con el fin de evitar la formación de cualquier interferencia. Así pues, los vinos evaluados fueron vinos jóvenes en rama que, una vez acabada la fermentación alcohólica, se guardaron en frío a 5 °C durante 1 mes.

Los resultados de la cata demostraron que esta variedad puede dar lugar a vinos de calidad, y más cuando el *terroir* les imprime un carácter propio como sucede con la D.O. Terra Alta. Además, el estudio también permitió clasificar los vinos obtenidos dentro de tres perfiles sensoriales diferenciados: uno más intenso con predominio de un carácter floral, otro de intensidad intermedia y definido como más mineral, y un tercero de intensidad más débil con predominio de notas vegetales.

Por otro lado, y teniendo en cuenta que aunque el panel esté entrenado suele adolecer de cierta subjetividad, se procedió a la caracterización aromática de los vinos de los tres estilos con el fin de detectar, de manera objetiva, las posibles diferencias sensoriales. Los resultados obtenidos en esta parte del estudio no hicieron sino corroborar la existencia de los tres perfiles aromáticos distintos. En líneas generales, y tal y como era de esperar tratándose de vinos elaborados con la misma variedad y cultivados en la misma D.O., las diferencias detectadas no se debían a la presencia de distintos compuestos aromáticamente activos, sino a la distinta proporción de estos en cada vino. Así, los vinos categorizados como más intensos fueron los que proporcionaron valores de factor de dilución más elevados, al contrario de lo que ocurría en los vinos menos aromáticos.

Dado el potencial que esta variedad demostró tener, se consideró adecuado evaluar el efecto de dos tratamientos vitivinícolas sobre la mejora de las cualidades organolépticas: el uso de una cepa específica para potenciar la liberación de aromas y un abonado foliar nitrogenado. Respecto a la primera práctica utilizada, cabe destacar que, aunque la cepa ensayada se describe como reveladora de aromas azufrados, también tiene efecto potenciador de otros aromas. Por otro lado, con el segundo tratamiento se pretendía aumentar el contenido de N para incidir sobre el proceso de la fermentación, pero de manera efectiva. Por ello se descartó la práctica habitual de adición de NH_4^+ sobre el mosto ya que, si no se controla la concentración de N inicial, esto puede provocar un exceso de N, con la consiguiente activación de rutas metabólicas indeseadas. También se descartó la fertilización del suelo, ya que estudios anteriores no han demostrado una eficacia contrastada y además, este tipo de tratamientos pueden implicar la contaminación de acuíferos por la fácil lixiviación de las sales de nitrógeno empleadas [3, 4].

Los parámetros enológicos básicos de los vinos (grado, pH, acidez total y acidez volátil) obtenidos tras aplicar los distintos tratamientos mostraron algunas diferencias significativas dependiendo del tratamiento empleado. Así, mientras que los valores del grado y el pH eran comparables para todas las muestras, la acidez volátil proporcionó valores significativamente más bajos cuando se usó la levadura potenciadora de aromas *Revelation*, independientemente de si había habido o no fertilización foliar. Respecto a la acidez total, los valores de este parámetro obtenidos fueron significativamente más elevados cuando se aplicó el abonado foliar, independientemente de la levadura utilizada.

Para evaluar sensorialmente las posibles diferencias existentes entre los vinos elaborados tras la aplicación de las distintas condiciones, se escogió como prueba discriminadora el test triangular. Los resultados obtenidos mostraron que tanto el tratamiento foliar como la cepa de levadura empleada aportan notas diferenciadoras al vino. Sin embargo, cabe destacar que a partir de los descriptores proporcionados por los catadores, parece que el tratamiento foliar tiene un mayor impacto sobre el perfil aromático que la cepa de levadura.

Finalmente, y para tener una evaluación más objetiva de estos resultados, los perfiles volátiles de las muestras se analizaron mediante GC-MS tras un proceso previo de HS-SPME. En este caso, los resultados mostraron que, aunque los perfiles cromatográficos son similares para los cuatro vinos analizados, existen diferencias entre las áreas cromatográficas. Concretamente, el vino control mostró unas áreas menores para todos los volátiles, mientras que el vino resultante de la combinación de ambos tratamientos fue el que proporcionó unas áreas mayores. Respecto a los tratamientos estudiados de manera individual, los análisis cromatográficos corroboraron los resultados de los análisis sensoriales, ya que el aumento de los picos cromatográficos es más notorio cuando se aplica un abonado foliar que cuando se utiliza la cepa específica.

4. Conclusiones

Aun siendo una variedad considerada típicamente neutra, la Garnacha blanca permite la obtención de vinos monovarietales con una tipicidad aromática y gustativa armoniosa y diferenciadora, aunque con una graduación alcohólica más elevada de lo considerado como habitual en vinos blancos. Esta tipicidad se puede ver favorecida con tratamientos vitivinícolas específicos, como son el nitrogenado foliar y el uso de cepas de levadura específicas.

5. Bibliografía

1. Martí, M.P., Mestres, M., Busto, O., Guasch, J. 2003. Solid-Phase microextraction and gas chromatography olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the aroma extract dilution analysis applied to the characterization of wine aroma. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7861-7865.
2. Aceña, L., Vera, L., Guasch, J., Busto, O., Mestres, M. 2011. Chemical characterization of commercial Sherry vinegar aroma by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-olfactometry. *J. Agric. Food Chem.* 59, 4062-4070.
3. Ancín-Azpilicueta, C., Nieto-Rojo, R., Gómez-Cordón, J. 2013. Effect of foliar urea fertilisation on volatile compounds in Tempranillo wine. *J. Sci. Food Agric.* 93, 1485-1491.
4. Hernández-Orte, P., Ibarz, M.J., Cacho, J., Ferreira, V. 2005. Effect of the addition of ammonium and amino acids to musts of Airen variety on aromatic composition and sensory properties of the obtained wine. *Food Chem.* 89, 163-174.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Economía y Competitividad la financiación recibida (proyecto AGL2011-26456).

AC17 - ANÁLISIS SENSORIAL A NIVEL GUSTATIVO Y OLFATIVO DE LAS BASES QUÍMICAS DEL DESCRIPTOR MINERALIDAD EN VINOS SINTÉTICOS MODIFICADOS

A. Palacios^{1,2}, D. Molina³, M.P. Fernandez Zurbano², E. Zaldivar.¹

¹ Laboratorios Excell Ibérica S.L. de La Rioja, C/Planillo 12, Pabellón B, 26006, Logroño (La Rioja), España.

² Universidad de La Rioja, departamento de Química analítica, Madre de dios 51, 26006, Logroño, (La Rioja), España.

³ Outlook Wine S.L., C/Cinema Bel, Nº 28, Esc. C, Cornellà de Llobregat (Barcelona), España. apalacios@labexcell.es

RESUMEN:

El concepto de mineralidad en los vinos es ciertamente uno de los atributos más misteriosos desde el punto de vista químico. La mineralidad en los vinos está frecuentemente asociada al concepto "terroir". Habitualmente este descriptor se usa para vincular el término mineralidad a la composición y contenido de minerales presentes en un vino, si bien no existen estudios previos suficientemente fundamentados como para establecer dicha asociación directa. El objeto de este estudio es la caracterización sensorial a nivel tanto gustativo como olfativo de compuestos químicos que se asocian al descriptor mineralidad mediante el uso de dos paneles de cata trabajando sobre vinos sintéticos modificados.

Palabras clave – Mineralidad, prueba triangular, terroir.

1. Introducción

En un estudio previo realizado por este mismo grupo se describieron químicamente 17 vinos que habían sido definidos por el mercado internacional como minerales. El estudio químico consistió en el análisis de más de 100 compuestos químicos diferentes. El análisis estadístico de los resultados indicó que ciertos parámetros enológicos y compuestos químicos, entre los que se encontraban compuestos aromáticos pre-fermentativos y de envejecimiento, podrían ser, en parte responsables de la categorización de un vino como mineral. Para estudiar cómo algunos de estos compuestos químicos juegan un rol en la percepción por parte del consumidor relacionada con el término mineralidad, tanto a nivel gustativo como olfativo, se reclutaron dos paneles de catadores. Los paneles de cata se constituyeron uno en Rioja (elaboradores) y otro en Barcelona (no elaboradores), formados por 20 y 23 jueces. Las muestras de cata consistieron en una base hidroalcohólica neutra, que se distribuyeron a lo largo de 18 puestos de cata triangular.

2. Material y métodos

Las dos sesiones de cata desarrolladas por los panelistas de jueces seleccionados se diseñaron siguiendo la metodología de prueba triangular. Se realizó un estudio de validación de uno de los dos paneles de cata participantes (grupo de enólogos) mediante la aplicación del software "Panel Check" desarrollado por la Universidad de Dinamarca. La base hidroalcohólica neutra que configuró la base de las muestras de vinos sintéticos evaluadas por los jueces sensoriales se preparó buscando la mayor similitud con un vino. Para ello, se adicionó hasta un 12 % de etanol sobre una base acuosa con una adición de 4,5 g/L de ácido tartárico y niveles de acidez

ajustados a un pH de 3,75. Para la modificación química de esta base hidroalcohólica se contó con una colección de patrones de compuestos volátiles puros comerciales con un mínimo de 95% de pureza. Con esta combinación se obtuvo el perfil más próximo al de un vino real.

3. Resultados

Se diseñaron 16 puestos de cata triangular, cada uno con una muestra distinta, para que cada panel de jueces evaluara sensorialmente. La elección de las concentraciones a las cuales se adicionó cada compuesto químico sobre la base hidroalcohólica, se realizó tomando en cuenta la concentración media hallada en la caracterización química realizada en un estudio previo sobre 17 vinos estudiados con connotaciones “minerales”.

Puesto nº 1: contenía una mezcla de todos los compuestos químicos añadidos en los puestos del número 2 al 16 a las concentraciones medias halladas previamente. Puesto nº 2: contenía la mezcla de una sal de hierro y cobre añadida al doble de concentración de los niveles medios en el contenido de metales hallada con anterioridad. Puesto nº 3: se añadió una mezcla de los compuestos 4-Etilfenol y 4-Etilguayaacol al doble de las concentraciones medias. Puestos nº 4 al 9: contenían al menos una muestra de cada uno de los compuestos descritos en la tabla 4 al doble de la concentración media hallada en el estudio previo. Puesto nº 10: se modificó la acidez hasta un pH de 3,0 y se adicionó Metabisulfito potásico hasta obtener un nivel de Dióxido de azufre libre de 30 mg/L. Puesto nº 11: se añadió Ácido tartárico hasta obtener una acidez total igual a 7,3 g/L de ácido tartárico. Puesto nº 12: contenía una mezcla de tres compuestos responsables de aromas azufrados en el vino, Etanotiol, Dimetilsulfuro y Mercaptoetanol; las concentraciones adicionadas se detallan en la tabla 5. Puesto nº 13: se presentó una muestra que contenía una mezcla de los compuestos denominados Pirazinas: (IBMP)-2-Isobutil-3-Metoxipirazina y 2-Isopropil-3-Metoxipirazina (PMP). Puesto nº 14: contenía una modificación sobre la base hidroalcohólica con el compuesto Geosmina. Puesto nº 15: contenía una mezcla de tres de los compuestos denominados Tioles: 4-Mercapto-4-4-Metil-2-2-Pentanona, Acetato de 3-Mercaptohexilo y 3-Mercaptohexanol, con olores a boj, maracuyá y pomelo respectivamente. Puesto nº 16: contenía una adición del doble de la concentración media del compuesto m-Cresol, de aroma a pimienta y cuero.

La metodología utilizada en el análisis sensorial fue del tipo cata triangular. En el momento de la evaluación de las muestras, se realizaron dos catas triangulares a ciegas de los mismos vinos sintéticos en dos sesiones bien diferenciadas (cata A y B), una primera sesión (A) sin indicar ningún tipo de objetivo sobre la misma y una segunda sesión (B) de cata de las mismas muestras, pero induciendo a los catadores a encontrar y definir el término “mineral” en las muestras. Todos los puestos de cata fueron evaluados por los panelistas de manera olfativa, sin embargo, se pidió a los catadores que los puestos que contenían Metales (puesto 2), ácido Succínico (puesto 4), pH y Dióxido de azufre modificados (puesto 10), Acidez total modificada (puesto 11) y Geosmina (puesto 14) fueran evaluados también a nivel gustativo. Asimismo, los puestos que contenían los compuestos Acetato de isoamilo (puesto 5), Butirato de etilo (puesto 6), Decanoato de etilo (puesto 7), Succinato de etilo (puesto 8) y los Tioles (puesto 15) fueron utilizados como controles negativos buscando la definición “anti-mineral” del vino o totalmente opuesto al término.

Una vez recopilados los datos de ambas sesiones de cata se realizó una prueba de contraste de hipótesis mediante un test binomial para conocer si existían diferencias significativas. El panel formado por enólogos obtuvo un 62% de aciertos en la primera parte de las sesiones de cata y un 67% en la segunda fase de cata dirigida. En la segunda fase de la cata los jueces del mismo

panel fueron capaces de definir como mineral en un 67% aquellas muestras modificadas con los compuestos químicos evaluados, habiéndose tenido en cuenta únicamente aquellos puestos en los que al menos se obtuvo un nivel de significación del 95%, en los que los panelistas fueron capaces de encontrar diferencias significativas entre las muestras presentadas a ese nivel de confianza. Para el segundo panel formado por profesionales del sector vitivinícola no elaboradores, se obtuvo un 65% de aciertos en la primera parte y un 69% en la segunda fase dirigida. En la segunda fase y siguiendo el mismo criterio que con el primero de los paneles, los jueces definieron acertadamente como minerales aquellas muestras modificadas en un 60%. Según los resultados hallados en la cata del primero de los paneles, la presencia de ácido Succínico y un pH bajo combinado con altos niveles de Dióxido de azufre libre, están directamente relacionadas con el uso del término mineralidad con una probabilidad del 95%. La presencia de Etilfenoles, m-Cresol y Metales obtienen una significación de un 99% para relacionarse como mineralidad en vino. Por último, con la misma probabilidad, aparece el compuesto Geosmina. Asimismo, la presencia de Acetato de isoamilo y Tioles está directamente relacionada en un 99,9% con la aparición del término mineralidad para el panel de enólogos elaboradores, pero se podría decir que tienen un efecto algo ambiguo en este sentido, ya que el panel de cata de profesionales no elaboradores no relacionó el Acetato de isoamilo con la mineralidad, pero sí lo hizo aunque en menor grado con los Tioles. Para el panel de profesionales, no elaboradores, los compuestos denominados azufrados: Etanotiol, Dimetilsulfuro y Mercaptoetanol, mostraron estar relacionados con un 95% de probabilidad con el término mineralidad, al igual que los compuestos 4-Etilfenol y 4-Etilguayacol de aromas a cuero, aunque este compuesto solo se relaciona con la mineralidad durante la cata inducida (B), no durante la cata espontánea (A). Igual que en el caso de los vinos sintéticos modificados con pH bajo y sulfuroso elevado. Según las respuestas obtenidas por el panel de cata de profesionales no elaboradores, la presencia de los Tioles: 4-Mercapto-4-4-metil-2-2-Pentanona, Acetato de 3-Mercaptohexilo y 3-Mercaptohexanol está inversamente relacionada en un 99% con la aparición del término mineralidad, se podrían definir como no minerales. Por último y al igual que en los resultados obtenidos por el panel de elaboradores, un pH bajo combinado con altos niveles de Dióxido de azufre libre y el compuesto Geosmina, están directamente relacionados con el uso del término mineralidad con un 99,9% de probabilidad. De forma sorprendente y al contrario de lo expuesto por el panel de cata formado por elaboradores, este panel no relaciona el Acetato de isoamilo con el término mineralidad aunque sí coinciden respecto a los Tioles. Al igual que ocurría en la sesión de cata de vinos sintéticos modificados del panel de enólogos elaboradores con los Etilfenoles, el pH modificado a la baja y el sulfuroso en rangos elevados, estos solo alcanzaban niveles de significancia suficientes en la cata inducida (B). Este panel de cata muestra el mismo efecto para el Decanoato de etilo.

4. Conclusiones

En el presente estudio se observó un alto porcentaje de aciertos por ambos paneles de cata en las sesiones A y B de cata triangular, así el panel de elaboradores fue correcto en sus respuestas en un 62% para la sesión A y en un 65% el panel de profesionales no elaboradores. La misma situación se produce en las sesiones B de cata dirigidas hacia el descriptor mineralidad. Ambos paneles mostraron aún un mayor porcentaje de aciertos que en la sesión A y con gran similitud entre ambos, lograron un 67% y 69% para enólogos y profesionales no elaboradores respectivamente. El análisis estadístico de los resultados de ambos paneles de cata reveló que ambos grupos de catadores coincidieron en seleccionar de manera estadísticamente significativa, al menos con un nivel de confianza del 95% o superior, los compuestos fenolados 4-Etilfenol, 4-Etilguayacol, los compuestos azufrados Etanotiol,

Dimetilsulfuro y Mercaptoetanol y el compuesto responsable de recuerdos a tierra mojada Geosmina con una relación directa entre su presencia y el uso del término mineral. La misma situación se produjo cuando los niveles de pH fueron disminuidos hasta un valor de 3 y la concentración de Dióxido de azufre libre fue aumentada hasta 30 mg/L. Determinados compuestos mostraron un perfil que se aleja absolutamente de la interpretación de mineralidad. Ambos paneles de cata fueron también coincidentes en señalar una relación, pero en esta ocasión inversa o totalmente opuesto al descriptor mineral, con la presencia de los compuestos Tíolicos: 4-Mercapto-4-4-metil-2-2-Pentanona, Acetato de 3-mercaptohexilo y 3-Mercaptohexanol. Por otra parte, analizando los resultados de cada panel de manera independiente, el panel de enólogos localizó de manera significativa un mayor número de compuestos que se relacionaban con el término mineralidad. Así además de los previamente mencionados y con una significación de al menos el 95% de confianza, se identificaron el puesto adicionado con ácido Succínico, el puesto modificado con el compuesto aromático de envejecimiento m-Cresol y sumaron los puestos adicionados con sales de metales de Cobre y Hierro. A su vez, el panel de profesionales no elaboradores indicó también una relación entre la aparición del término mineralidad y la alta Acidez total. Por tanto, debe remarcar que tanto la componente olfativa como la gustativa, contribuyen al uso del término mineralidad y muy probablemente bajo un efecto de sinergia entre compuestos y de la interpretación sensorial cognitiva.

5. Bibliografía

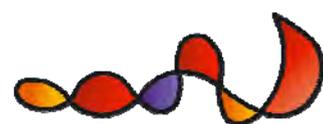
1. Abdil, H. 2007. RV coefficient and congruence coefficient. In Encyclopedia of Measurement and Statistics (N. Salkind, ed.)
 2. Araujo, Ivan E. de, Rolls, Edmund T. Velazco, Maria Inés, Margot, Christian, Cayeux Isabelle, (2005) Cognitive Modulation of Olfactory Processing, Neuron Vol 25, p 671-679, http://www.oxcns.org/papers/381_DeAraujo+Rolls+++05.pdf, (Accessed 15 April, 2012)
 3. Arikawa Y., Kuroyanagi T., Shimosaka M., Muratsubaki H., Enomoto K., Kodaira R., Okazaki M. (1999): Effect of gene disruptions of the TCA cycle on production of succinic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 87:28-36
 4. Ashley, Rachel, Grapevine Nutrition – an Australian perspective, Fosters Wine Estates, <http://ucanr.org/sites/nm/files/76731.pdf>, (Accessed 18 May, 2012)
 5. Ballester, J., Mihnea, M., Peyron, D. and Valentin, D. 2013. Exploring minerality of Burgundy Chardonnay wines: A sensory approach with wine experts and trained panelists. Aust. J. Grape Wine Res. 19, 140–152
 6. Bamforth, C.W. 2006. Scientific Principles of Malting and Brewing, American Society of Brewing Chemists, St Paul, MN
 7. Baron, Mojmir, Fiala, Jaromir, (2012) Chasing after Minerality, Relationship to Yeast Nutritional Stress and Succinic Acid Production, Czech Journal of Food Science, Vol. 30 2012, No.2 pp188-193, Prague, Czech Republic
 8. Bird, David, (2005) Understanding Wine Technology, DBQA Publishing, Newark, Nottinghamshire, UK
 9. Bryant, Jason, (2012) Can you taste minerals in wine? Unscrewed – The Independent New Zealand Wine Review, <http://www.unscrewed.co.nz/can-you-taste-minerals-in-wine/>, (Accessed 1 May 2012)
 10. Campbell, Neil; Reece, Jane, (2004) Biology, 7th Edition, Pearson Education Publishing, Essex, UK
6. Agradecimientos
 A Laboratorios Excell Ibérica S.L. y Outlook Wine S.L. por el apoyo financiero y científico en este estudio. A la profesora Maria Purificación Zurbano por su apoyo científico en el tratamiento estadístico de los resultados.



OT

Otros

ENOLOGIA2.015
INNOVACIÓN VITIVINÍCOLA



OT01 - COMPOSICIÓN FENÓLICA Y AROMÁTICA DE SARMIENTOS DE AIRÉN Y MOSCATEL

Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Alonso, G.L., Salinas, M.R.

Universidad de Castilla-La Mancha. E.T.S.I. Agrónomos y Montes. Cátedra de Química Agrícola.
Avda. de España s/n, 02071 Albacete, España. Tel: 967 599310. Fax: 967 599238.

Rosario.Salinas@uclm.es

RESUMEN:

Hasta el momento, poco se conoce acerca de la influencia del proceso de tostado sobre la generación de compuestos volátiles y aromáticos en la madera de sarmiento. Por ello, este trabajo estudia el efecto del tostado sobre la generación de compuestos de naturaleza similar a los procedentes del tostado de la madera de roble. Con este fin se utilizaron sarmientos de dos viníferas, la neutra Airén y la aromática Moscatel. La composición fenólica de los extractos acuosos obtenidos fue analizada mediante LC-DAD-MS, mientras que la determinación de los compuestos volátiles se hizo con HS-SBSE-GC-MS. Los resultados mostraron que los extractos procedentes de ambas variedades poseen interesantes contenidos en compuestos fenólicos y volátiles, que pueden ser de gran interés para el sector enológico.

Palabras clave: sarmientos, Airén, Moscatel, fenoles, volátiles

1. Introducción

De modo tradicional, la madera de roble se ha utilizado para el almacenamiento y el envejecimiento de los vinos, siendo su composición volátil el objetivo de muchas investigaciones (1). Durante el proceso de tostado de la madera, la lignina, polisacáridos y lípidos, entre otros, forman compuestos volátiles tales como fenoles, aldehídos, alcoholes, cetonas, lactonas, derivados del furano, etc. (2). La generación de tales compuestos está altamente influenciada por las condiciones e intensidades de tostado (3). Recientemente, se ha demostrado que maderas tales como el castaño, cerezo, acacia, etc, al ser sometidas al proceso de tostado, generan compuestos de interés (fenólicos y aromáticos), iguales a los encontrados en la madera de roble (4).

En los países vinícolas, como España, donde Castilla-La Mancha es la zona española con mayor superficie de cultivo destinada al viñedo, millones de toneladas de sarmientos se producen anualmente, los cuales tradicionalmente se queman o son abandonados en la viña, por lo que son una importante fuente de contaminación ecológica y medioambiental. Este hecho ha llevado a un creciente interés por la reutilización de este residuo agrícola, así como ya se ha hecho con otros tipos de subproductos vitivinícolas (5), ya que la posibilidad de aumentar su valor añadido promueve su explotación.

Hasta el momento, no se han encontrado referencias sobre la composición fenólica y aromática de sarmientos cuando son sometidos a un proceso de tostado. Con este fin, se han seleccionado sarmientos de dos variedades de uva, la aromáticamente neutra Airén, que es la más abundante en Castilla-La Mancha, y la aromática Moscatel, cuyo cultivo también es considerable en la mayoría de las zonas vitivinícolas. Dichos sarmientos se han sometido a

unas condiciones de tostado similares a las que se utilizan en la madera de roble y se ha analizado la composición fenólica y aromática de los extractos acuosos resultantes.

2. Material y métodos

Sarmientos de vides cultivadas en espaldera de dos variedades diferentes, Airén y Moscatel, se seleccionaron y secaron a temperatura ambiente. Posteriormente se trituraron hasta obtener un serrín con tamaño de partícula inferior a ≤ 4 mm.

Parte del serrín de cada variedad se almacenó y mantuvo a temperatura ambiente. El resto se sometió a un proceso de tostado alto (180 °C durante 45 minutos), tomando como referencia las condiciones usadas en madera de roble (3,6). Con cada tipo de serrín se realizaron dos extracciones acuosas mediante el sistema convencional sólido-líquido según Sánchez-Gómez et al. (7), siendo los extractos obtenidos:

- **AST:** extracto de sarmientos sin tostar de la variedad Airén.
- **AT:** extracto de sarmientos tostados de la variedad Airén.
- **MST:** extracto de sarmientos sin tostar de la variedad Moscatel.
- **MT:** extracto de sarmientos tostados de la variedad Moscatel.

Tras centrifugar y filtrar, se determinó la composición aromática varietal según el método propuesto por Sánchez-Gómez et al. (7), basado en la extracción de los volátiles mediante HS-SBSE y determinación por GC y MS. De igual modo, la composición fenólica de los extractos, antes y después del tostado, se determinó mediante LC-DAD-MS, según Sánchez-Gómez et al. (7).

3. Resultados

En la Figura 1 se muestra la comparación de la composición aromática de los extractos acuosos de los dos tipos de sarmientos, sin tostar y tostados, agrupados según sus diferentes familias químicas. Se observa un aumento en la concentración de la mayoría de las familias estudiadas con el tostado, a excepción del grupo “otros”, constituido por 1-hexanol, nonanal y estilbenos. Este incremento fue común para ambas variedades, siendo muy significativo en el grupo de los furánicos (furfural, 5-hidroximetilfurfural, 2-furanmetanol y 5-metilfurfural), y bencenoides (acetovanillona, benzaldehído, bencilalcohol, eugenol, 4-etilguaicol, 4-etilfenol, guaiacol, fenilacetaldehido, siringol y vanillina), y donde cabe subrayar el aumento experimentado por la vainillina (Figura 3).

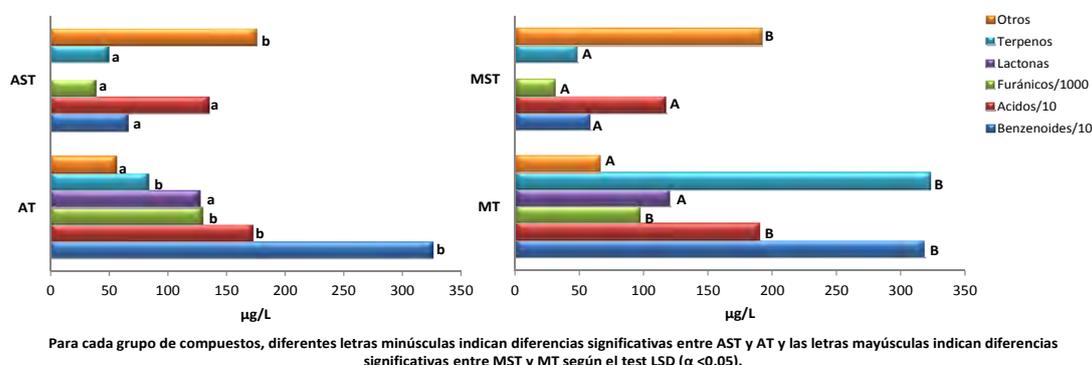


Figura 1. Composición aromática de los extractos acuosos de sarmientos Airén (A) y Moscatel (M), tostados (T) y sin tostar (ST).

La concentración de los dos isómeros de whiskey lactonas en los extractos tostados es similar en ambas variedades. Sin embargo, el grupo de los terpenos, compuesto por óxido de linalol, α -terpineol, linalol y D-limoneno, entre otros, presentó un aumento casi del triple en Moscatel tostado en comparación con Airén tostado, debido esto al importante incremento del óxido de linalol.

La Figura 2 muestra la composición fenólica de los extractos de sarmiento, antes y después del tostado. Como se puede ver, el tratamiento térmico de los sarmientos reduce la concentración de los flavanoles estudiados, (+)-catequina y (-)-epicatequina y la de los ácidos fenólicos, donde destaca el descenso de ésteres hidroxicinámicos (*t*-caftárico y *t-p*-coutárico), ácidos hidroxibenzoicos (elágico, ferúlico, gálico, protocatéuico y vainílico) y ácidos hidroxicinámicos (*t*-cafeico y *t-p*-coumarico) por este orden. Por su parte, mantiene constante el contenido de coniferaldehdo, pirogalol y sinapaldehido, compuestos incluidos en el grupo "otros"; solo los estilbenos (piceido y *t*-resveratrol) aumentan con el tostado. Se observa que la variedad influye en el contenido fenólico inicial, sin embargo el tostado lo iguala.

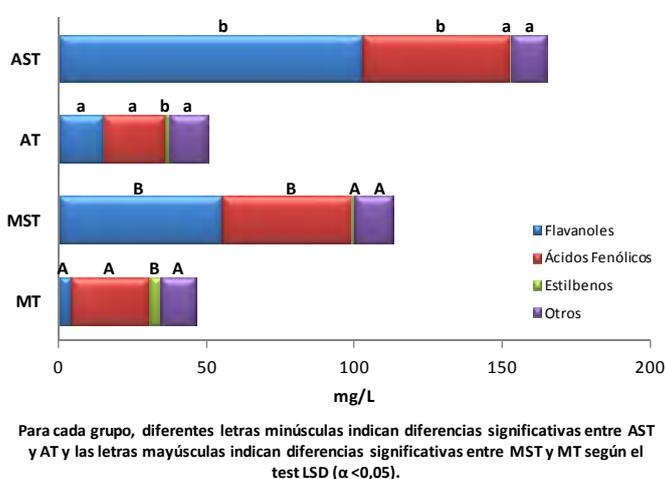


Figura 2. Composición fenólica de extractos acuosos de sarmiento Airén (A) y Moscatel (M), tostados (T) y sin tostar (ST).

La Figura 3 muestra el comportamiento en el tostado de varios compuestos de interés enológico. La vainillina triplica su concentración en ambos tipos de sarmientos con respecto al total de bencenoides. En el caso del óxido de linalol este comportamiento viene influenciado por la variedad ya que, inicialmente no se detecta en ninguna, pero después del tostado aumenta significativamente, llegando a alcanzar casi el 90% del total de terpenos en el caso de los sarmientos de Moscatel. En cuanto al resveratrol, también ve incrementado su contenido como consecuencia del tostado, no existiendo grandes diferencias entre los contenidos finales en las dos variedades estudiadas.

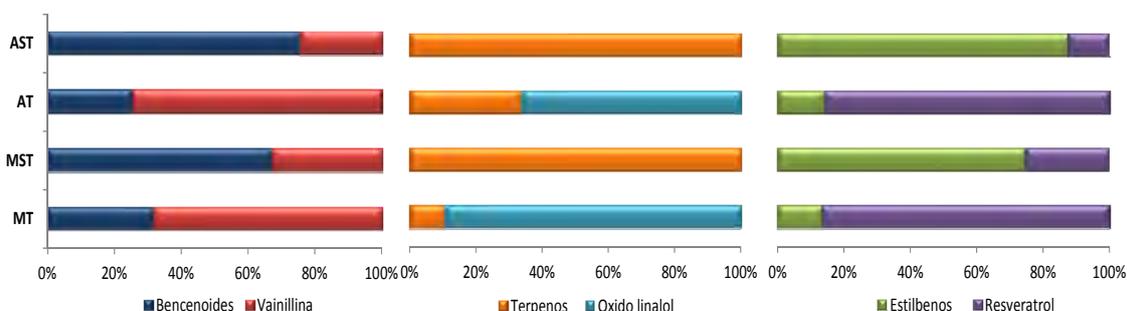


Figura 3. Efecto del tostado de sarmientos sobre algunos compuestos de interés enológico: Airén (A) y Moscatel (M), tostados (T) y sin tostar (ST).

4. Conclusiones

Los resultados mostraron que el efecto de tostado influye de manera diferente a los compuestos estudiados, ya que aumenta el contenido de la mayoría de los compuestos aromáticos, mientras que reduce la mayor parte de los compuestos fenólicos estudiados. Independientemente de la variedad, estos extractos mostraron interesantes contenidos en compuestos fenólicos y aromáticos, comportándose ambas variedades de manera similar frente al efecto de la temperatura. Por tanto, la madera de sarmiento tostada podría tener la posibilidad de ser utilizada como aditivo aromático de interés enológico, en el mismo sentido que se valora la madera de roble para ser usada como barricas o chips.

5. Bibliografía

1. Castro-Vázquez, L., Alañón, M.E., Calvo, E., Cejudo, M.J., Díaz-Maroto, M.C., Pérez-Coello, M.S. 2011. Volatile compounds as markers of ageing in Tempranillo red wines from La Mancha D.O. stored in oak wood barrels. *In: Journal Chromatography A*. 1218, 4910–4917.
2. Doussot, F., De Jeso, B., Quideau, S., Pardon, P. 2002. Extractives content in cooperage oak wood during natural seasoning and toasting. Influence of tree species, geographic location, and singletree effects. *In: Journal Agricultural and Food Chemistry*. 50, 5955–5961.
3. Fernández de Simón, B., Cadahía, E., del Álamo, M., Nevares, I. 2010. Effect of size, seasoning and toasting in the volatile compounds in toasted oak wood and in a red wine treated with them. *In: Analytica Chimica Acta*. 660, 211–220.
4. Culleré, L., Fernández de Simón, B., Cadahía, E., Ferreira, V., Hernández-Orte, P., Cacho, J. 2013. Characterization by gas chromatography-olfactometry of the most odor-active compounds in extracts prepared from acacia, chestnut, cherry, ash and oak woods. *In: LWT-Food Science and Technology*. 53, 240–248.
5. Ruiz-Moreno, M.J., Raposo, R., Cayuela, J.M., Zafrilla, P., Piñeiro, Z., Moreno-Rojas, J.M., Mulero, J., Puertas, B., Giron, F., Guerrero, R.F., Cantos-Villar, E. 2015. Valorization of grape stems. *In: Industrial Crops Products*. 6, 152–157.
6. Fernández de Simón, B., Sanz, M., Cadahía, E., Esteruelas, E., Muñoz, A.M. 2014. Nontargeted GC-MS approach for volatile profile of toasting in cherry, chestnut, false acacia, and ash wood. *In: Journal Mass Spectrometry*. 49, 353–370.
7. Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Alonso, G.L., Salinas, M.R. 2014. Vine-shoot waste aqueous extracts for re-use in agriculture obtained by different extraction techniques: Phenolic, volatile, and mineral compounds. *In: Journal Agricultural and Food Chemistry*. 62, 10861–10872.

6. Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento al Ministerio de Economía y Competitividad-FEDER por la concesión del proyecto AGL2012-33132 que ha permitido financiar este trabajo. R. S-G. también desea agradecer a la Universidad de Castilla-La Mancha el contrato predoctoral PREDUCLM17.

OT02 - BIODISPONIBILIDAD *IN VITRO* DE BOSCALID, KRESOXIM-METIL Y MEPANIPIRIN EN VINOS TINTOS (VAR. TEMPRANILLO Y GRACIANO)

G. Martínez¹, S. Cermeño¹, A. Morales², A. Maestro², J. Oliva¹, A. Barba¹.

¹ Universidad de Murcia, Dpto. Química Agrícola (Campus de Espinardo, 30100, Murcia, España).

² Centro Tecnol. Nacional de la Conserva, Lab. Instrumental (C/Concordia s/n, 30500, Molina de Segura, España).

abarba@um.es

RESUMEN:

La biodisponibilidad nos permite conocer el porcentaje de una sustancia exógena que se absorbe en un organismo cuando éste la ingiere. Para estudiar este proceso en los plaguicidas presentes en vino, los métodos *in vitro* ofrecen una alternativa fiable, simple y rápida. Este estudio se realizó con vinos tintos obtenidos de uvas Tempranillo y Graciano, tratadas ambas de la siguiente forma: 1) Tratamiento bajo Buenas Prácticas Agrícolas con el formulado Collis (Boscalid 20% + Kresoxim-metil 10%); 2) Adición a uva estrujada sin tratar del formulado Frupica (Mepanipirin 50%) a una concentración de 3 ppm en mepanipirin. La biodisponibilidad *in vitro* se realizó mediante una digestión gastrointestinal simulada y posterior proceso de absorción a través de una membrana semipermeable. Los dializados fueron extraídos con el método QuEChERS y las muestras se analizaron por LC-MS/MS QqQ, previa validación de la metodología utilizada. Los porcentajes dializados, calculados en función de la concentración inicial en los vinos de Tempranillo fueron 23,7 % para boscalid, 6,1 % para kresoxim-metil y 24,8 % para mepanipirin; en los vinos de Graciano fueron 36,6 % para boscalid, 33,3 % para kresoxim-metil y 32,2 % para mepanipirin. Las concentraciones iniciales fueron superiores en los vinos Graciano, excepto para mepanipirin donde la mayor concentración es en vino Tempranillo. Como conclusión, podemos indicar que los mayores porcentajes de diálisis se producen en los vinos Graciano, aunque en ningún caso la diálisis supone más de un tercio de lo encontrado en los vinos.

Palabras clave: Biodisponibilidad, fungicidas, vino.

1. Introducción

La biodisponibilidad alude a la porción de la dosis de un fármaco administrado de manera exógena, que llega hasta el órgano o tejido en el que lleva a cabo su acción. Este concepto puede utilizarse también para cuantificar el grado en que una sustancia tóxica es absorbida por el organismo.

En el caso de los plaguicidas este valor viene implícito en los estudios de toxicidad por ingestión, que se realizan en los animales de experimentación, durante el proceso de registro, pero generalmente se aplica la sustancia en estado puro, y se ha demostrado ampliamente que la presencia de los alimentos puede disminuir sensiblemente, o en algunos casos aumentar, la biodisponibilidad de un xenobiótico. Por tanto, el estudio de la biodisponibilidad de un residuo embebido en el medio que llega al organismo es esencial para determinar la dosis que realmente penetra en él. En general, se suelen utilizar dos modelos para el estudio

de la biodisponibilidad oral en fármacos y xenobióticos: a) *In vivo*, usando animales de experimentación y fácilmente correlacionables con los humanos, pero que plantean problemas de coste, tiempo y ética; b) *In vitro*, simulando mediante membranas semipermeables y medios adecuados, el proceso de digestión. Los modelos *in vitro* son aceptables en el estadio inicial de una investigación por ser buenos indicadores de lo que ocurre en un medio fisiológico y son mucho más económicos, sencillos y rápidos (1-3).

Dado que nuestro trabajo estudia el comportamiento de fungicidas de amplia utilización, no podemos acogernos por motivos éticos al modelo *in vivo* por lo que utilizaremos un modelo *in vitro*, para estudiar su biodisponibilidad en vinos.

2. Material y métodos

2.1. Experiencia de campo y vinificación

Se realizaron dos experiencias, una con tratamiento en campo y otra con fortificaciones en bodega. Para ambas, la parcela experimental está ubicada en una finca productora de Aldeanueva del Ebro en La Rioja, plantada de viñedos de uvas tintas Tempranillo y Graciano, pertenecientes a las Bodegas D. Mateos S.L. (adscritos a D.O.Ca. Rioja) tomándose una parcela como control. En la primera, los ensayos con el producto comercial Collis (Boscalid 20% + Kresoxim-metil 10% p/v) se realizaron siguiendo el código de BPA (Buenas Prácticas Agrícolas); respetando las dosis y plazos de seguridad de los plaguicidas. Tras la vendimia, las uvas tratadas se llevaron a la bodega experimental de la Universidad de La Rioja para la elaboración del vino. En la segunda experiencia, en las uvas estrujadas sin tratar de ambas variedades, se realizó una fortificación en bodega, añadiendo la formulación de Frupica (Mepanipirín 50% p/v) a la dosis coincidente con su LMR establecido en la legislación, 3 mg/Kg.

Posteriormente, se realizaron 2 microvinificaciones idénticas por duplicado, para cada uno de los tratamientos y testigo, en depósitos de 50 l siguiendo el proceso de vinificación clásico para la elaboración de un vino tinto en la D.O.Ca. Rioja. Tras el trasiego de los vinos, se llevo a cabo una clarificación de los mismos con gelatina a una dosis de 12 ml/Hl. Por último, los vinos fueron embotellados y quedaron dispuestos para realizar el estudio de biodisponibilidad y los análisis de residuos.

2.2. Biodisponibilidad *in vitro*

Muestras de vino (40 ml) se sometieron al proceso de digestión gástrica simulado con pepsina porcina a pH 2 durante dos horas en baño de agua con agitación a 37 °C. Un alícuota se sometió a continuación a una simulación de la digestión intestinal con pancreatina porcina y sales biliares a pH 7 en las mismas condiciones de tiempo y t^{a} . La absorción intestinal fue simulada en un tubo de diálisis de celulosa sellada (membrana semipermeable) (3). Los residuos de fungicidas se determinaron en los dializados.

2.3. Extracción de los residuos de fungicidas

La extracción, tanto en los vino como en los dializados se realizó usando el método multirresidual QuEChERS (Figura 1) (4).

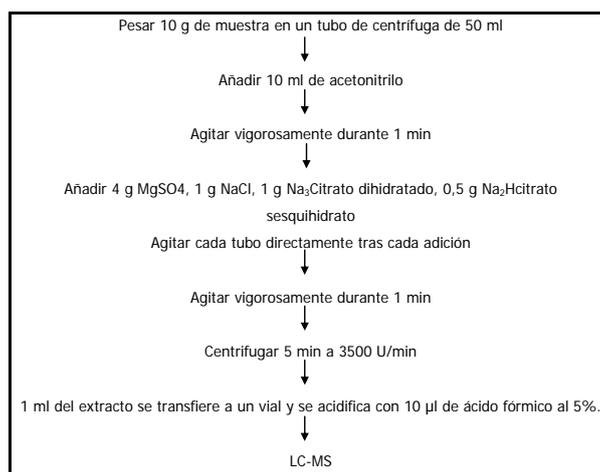


Figura 1. Esquema del método de extracción utilizado.

2.4. Determinación de los residuos de fungicidas

Los residuos de fungicidas se determinaron por cromatografía líquida utilizando un cromatógrafo HPLC Agilent Technologies modelo 1200 Infinity (LC-MS/MS QqQ) equipado con una columna Poroshell 120 EC-C18 (3 mm x100 mm x 2,7 µm), termostatada a 40 °C y con un flujo de 0,6 ml/min, siendo el programa de inyección: 5µl muestra + 95µl de fase móvil. El tiempo de análisis se fijó en 12 minutos dejando 5 minutos de tiempo de estabilización. Las fases móviles empleadas fueron: A) ácido fórmico en acetonitrilo 0,1% (v / v) y B) ácido fórmico al 0,1% y 2 mM de formiato de amonio en, con el gradiente de flujos expuesto en la Tabla I.

Tabla I. Gradientes de flujos utilizados en el análisis LC-MS/MS QQQ.

Tiempo (min)	%A	%B
0	20	80
10	100	0
12	20	80

Para la cuantificación se utilizó un espectrómetro de masas triple cuadrupolo 6410B (Agilent Technologies) equipado con una fuente ESI ESI (electrospray ionization) en modo positivo.

3. Resultados

Los resultados de biodisponibilidad obtenidos al realizar la diálisis de las muestras de vino, se muestran en la Figura 2. Como podemos observar, el vino elaborado con uva Graciano presenta un efecto matriz negativo, respecto al realizado con Tempranillo, aumentando el porcentaje dializado; circunstancia que puede ser debida a la distinta constitución de la matriz de ambas variedades de uva y por tanto de sus vinos (acidez total, azúcares residuales y grado alcohólico alcanzado) y por la concentración de los fungicidas en los vinos, ya que la diálisis está influenciada por la misma. Los porcentajes de diálisis oscilan entre un mínimo de 6.1% para kresoxim metil en vino de Tempranillo, hasta un máximo de 36.6% para boscalid en el de Graciano. En los vinos de Tempranillo el plaguicida que más se dializa es mepanipirin, en cambio en Graciano es boscalid el que pasaría en mayor cantidad al torrente sanguíneo.

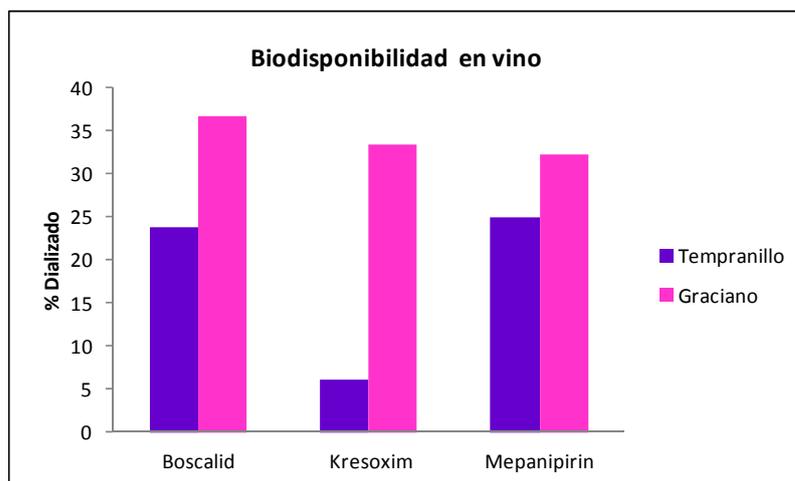


Figura 2. Biodisponibilidad de los fungicidas en vino (% dializado).

También se constata que las diferencias físico-químicas entre fungicidas influyen en el porcentaje dializado, sobre todo para kresoxim-metil.

4. Conclusiones

La biodisponibilidad de los fungicidas estudiados es mayor en los vinos de Graciano que en los de Tempranillo. En los primeros, el comportamiento de los tres fungicidas es similar; sin embargo, en los segundos, kresoxim metil es el que menos se dializa. En ningún caso la dialización supone más de un tercio del contenido en el vino.

5. Bibliografía

1. Bollinger, D.W., Tsunoda, A., Ledoux, D., Ellersieck, M.R.; Veum, T.L. 2005. A comparison of the test tube and the dialysis tubing in vitro methods for estimating the bioavailability of phosphorus in feed ingredients for swine. *In: Journal Agricultural Food Chemistry*. 53, 3287-3294.
2. Payá, P., Oliva, J.; Barba, A. 2009. Disappearance of fungicides in fresh and processed agricultural product. Influence of the elaboration techniques. *In: Fungicides Chemistry, Environmental Impact and Health Effects*. Ed. Nova Science Publishers Inc. USA. 335-360
3. Payá, P., Mulero, J., Oliva, J., Cámara, M.A.; Barba, A. 2013. Influence of the matrix in bioavailability of flufenoxuron, lufenuron, pyriproxyfen and fenoxycarb residues in grapes and wine. *In: Food and Chemical Toxicology*. 60,419-423.
4. Payá, P., Anastassiades, M., Mack, D., Sigalova, I., Tsdelen, B, Oliva, J.; Barba, A. 2007. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *In: Analytical Bioanalytical Chemistry*. 389(6), 1697-1714.

6. Agradecimientos

Trabajo financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (Proy. nº AGL2011-30378-C03-03).

OT03 - ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL VINO. INFLUENCIA DE LA VARIEDAD Y LOS TRATAMIENTOS FITOSANITARIOS.

S. Cermeño¹, G. Martínez¹, J. Mulero², J. Oliva¹, M.A. Cámara¹, A. Barba¹.

¹ Universidad de Murcia, Dpto. Química Agrícola (Campus de Espinardo, 30100, Murcia, España)

² Universidad Católica San Antonio, Dpto. Nutrición (Campus de los Jerónimos, 30107, Murcia, España)

abarba@um.es

RESUMEN:

Entre los compuestos naturales con actividad antioxidante merecen una mención especial los compuestos fenólicos, tanto por su abundancia en la naturaleza, como por su capacidad captadora de radicales libres. La presencia de residuos de plaguicidas en la uva y durante la vinificación, pueden provocar modificaciones en la composición fenólica de los vinos, y por tanto también en su actividad antioxidante. El objetivo de este estudio es evaluar la actividad antioxidante de vinos tintos elaborados con uvas Tempranillo y Graciano tratadas individualmente con los fungicidas: Collis (Boscalid 20% + Kresoxim-metil 10%) bajo Buenas Prácticas Agrícolas (BPA); y con Frupica (Mepanipirin 50%) añadido al mosto de uvas estrujadas sin tratar, a la concentración de 3 ppm. Las vinificaciones se realizaron por duplicado y cada muestra fue analizada por triplicado. La actividad antioxidante se evaluó por reacción de la muestra con el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y cuantificación a $\lambda = 515$ nm. La actividad antioxidante es mayor en el vino testigo de la variedad Tempranillo ($7,53 \pm 0,36$ mM Trolox) que la de Graciano ($5,06 \pm 0,37$ mM Trolox). Igualmente, estas diferencias se mantienen en los vinos obtenidos a partir de las dos variedades de uvas tratadas, con independencia del tipo de fungicida aplicado. La presencia de fungicidas hace disminuir la actividad antioxidante de los vinos, aunque en niveles muy bajos, ya que no existen diferencias significativas entre los ensayos testigo y tratados.

Palabras clave: Actividad antioxidante, fungicidas, vino

1. Introducción

El creciente interés sobre las sustancias antioxidantes, se debe a su relación con la prevención o disminución del desarrollo de distintas enfermedades, como los daños cardiovasculares o el cáncer. Se cree que la ingesta de estos compuestos bioactivos, aumenta la defensa antioxidante del organismo evitando el daño oxidativo causante de dichas patologías (1).

Entre los compuestos naturales con actividad antioxidante, presentes en los alimentos, merece una mención especial los compuestos fenólicos, tanto por su abundancia en la naturaleza como por su capacidad captadora de radicales libres. Estos compuestos se encuentran de manera natural en la uva y el vino, presentando una gran variedad de estructuras químicas y pesos moleculares y cuya cantidad y proporción puede depender, entre otros factores, de la variedad y de la presencia de sustancias exógenas como los residuos de plaguicidas (2,3).

En este trabajo se pretende aportar nuevos datos que determinen la influencia que tiene la variedad de uva y la presencia de residuos de fungicidas de amplia utilización en la actividad antioxidante de vinos tintos de la D.O Ca.Rioja.

2. Material y métodos

2.1. Experiencia de campo y vinificación

Se realizaron dos experiencias, una con tratamiento en campo y otra con fortificaciones en bodega. Para ambas, la parcela experimental está ubicada en una finca productora de Aldeanueva del Ebro en La Rioja, plantada de viñedos de uvas tintas Tempranillo y Graciano, pertenecientes a las Bodegas D. Mateos S.L. (adscritos a D.O.Ca. Rioja) tomándose una parcela como control. En la primera, los ensayos con el producto comercial Collis (Boscalid 20% + Kresoxim-metil 10% p/v) se realizaron siguiendo el código de BPA (Buenas Prácticas Agrícolas); respetando las dosis y plazos de seguridad de los plaguicidas. Tras la vendimia, las uvas tratadas se llevaron a la bodega experimental de la Universidad de La Rioja para la elaboración del vino. En la segunda experiencia, en las uvas estrujadas sin tratar de ambas variedades, se realizó la fortificación en bodega, añadiendo la formulación de Frupica (Mepanipirin 50% p/v) a la dosis coincidente con su LMR establecido en la legislación, 3 mg/Kg.

Posteriormente, se realizaron 3 microvinificaciones idénticas por duplicado, para cada uno de los tratamientos y testigo, en depósitos de 50 l siguiendo el proceso de vinificación clásico para la elaboración de un vino tinto en la D.O.Ca. Rioja. Tras el trasiego de los vinos, se llevo a cabo una clarificación de los mismos con gelatina a una dosis de 12 ml/Hl. Por último, los vinos fueron embotellados y quedaron dispuestos para realizar los distintos análisis.

2.2. Método DPPH

Se utilizó el método de Bondet et al. (4), con ligeras modificaciones: A 5 µl de muestra de vino tinto, diluida 1:1 v/v con metanol, se le añade la cantidad necesaria de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) 0,094 mM en metanol, hasta completar 1 ml. La actividad de eliminación de los radicales libres fue evaluada utilizando el DPPH, mediante la medición de la absorbancia a 515 nm, después de 60 min de reacción a 20 °C, en un espectrofotómetro. La reacción se lleva a cabo en tubos Eppendorf y los resultados fueron expresado como equivalentes mM/ml de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), un análogo de la vitamina E y los análisis se realizaron por triplicado.

3. Resultados

En la Figura 1, se muestran los resultados obtenidos tras la determinación y comparación de la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos en vinos Tempranillo y Graciano tratados frente al testigo.

En ambas variedades, la actividad antioxidante es mayor en el vino testigo que en cualquiera de los procedentes de uvas tratadas con plaguicidas. Respecto a los tratamientos, Collis (Boscalid+Kresoxim-metil), provoca la mayor disminución de actividad antioxidante

frente al testigo en ambos tipos de vino. Siendo el vino Graciano, el que sufre la mayor disminución (0.94 mM Trolox) respecto al testigo. Mepanipirin, induce un menor descenso de la actividad antioxidante en ambas variedades, aunque es algo más de cinco veces superior la disminución en Graciano (0.45 mM Trolox) que en Tempranillo (0.08 mM Trolox).

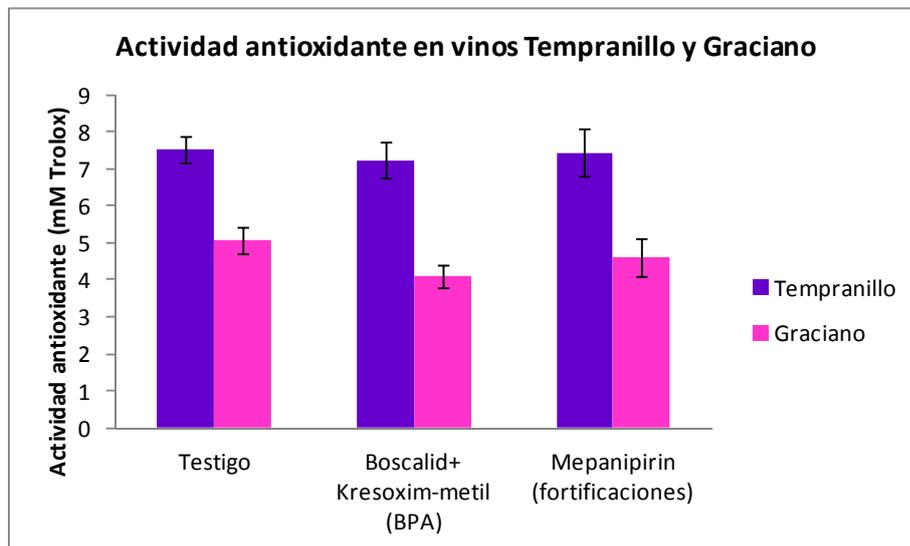


Figura 1. Actividad antioxidante en vinos Tempranillo y Graciano

Realizando el estudio estadístico de los resultados, se observa que en el caso del vino de uva Tempranillo, no hay diferencias significativas entre el testigo y los tratados; sin embargo en el caso de Graciano, existen estas diferencias en el tratamiento con boscalid + kresoxim metil (<0,001).

En lo referente a las variedades de uva, los vinos de Graciano presentan la menor actividad antioxidante. Esta diferencia se ve aumentada en el caso de las uvas tratadas con ambos fungicidas

4. Conclusiones

De manera general, la presencia de residuos provenientes de los tratamientos con los fungicidas estudiados, provocan una ligera disminución de la actividad oxidante en los vinos procedentes de ambas variedades; siendo ligeramente más acusada en Graciano. La variedad de uva también afecta al nivel de actividad antioxidante, siendo mayor en Tempranillo.

5. Bibliografía

1. Obrenovich, M.E., Li, Y. , Parvathaneni, K., Yendluri, B.B., Palacios, H.H., Leszek, J.; Aliev, G. 2011. Antioxidants in Health, Disease and Aging. *In: CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*. 10(2), 192-207.
2. Oliva, J., Mulero, J., Payá, P., Cámara, M.A.; Barba, A. 2009. Influence of several fungicides on the antioxidant activity of red wines (var. Monastrell). *In: Journal of Environmental Science and Health part B*. 44 (6), 546-552.

3. Oliva, J., Mulero, J., Zafrilla, P., Cayuela, J.M.; Barba, A. 2013. Influencia de la variedad y de los residuos de plaguicidas en la actividad antioxidante del vino. *In: Actas VII Congreso de Ciencia y Tecnología de los Alimentos.* 89.
4. Bondet, V., Brand-Williams, W.; Berset, C. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH* free radical method. *In: LWT-Food Science and Technology.* 30(6), 609-615.

6. Agradecimientos

Trabajo financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (Proy. nº AGL2011-30378-C03-03).

OT04 - BIODISPONIBILIDAD *IN VITRO* DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN VINOS TINTOS (VAR. TEMPRANILLO Y GRACIANO)

S. Cermeño¹, G. Martínez¹, J. Mulero², J. Oliva¹, M.A. Cámara¹, A. Barba¹

¹ Universidad de Murcia, Dpto. Química Agrícola (Campus de Espinardo, 30100, Murcia, España)

² Universidad Católica San Antonio, Dpto. Nutrición (Campus de los Jerónimos, 30107, Murcia, España)

josoliva@um.es

RESUMEN:

Se estudia la biodisponibilidad *in vitro* de antocianinas, derivados hidroxicinámicos, flavonoles, estilbenos, actividad antioxidante y total de compuestos fenólicos expresado como Índice de Folin en vinos tintos elaborados con uvas Tempranillo y Graciano tratadas individualmente con los fungicidas: Collis (Boscalid 20% + Kresoxim-metil 10%) y Vivando (Metrafenona 50%) bajo Buenas Prácticas Agrícolas (BPA); y con Teldor (Fenhexamida 50%) y Frupica (Mepanipirin 50%) añadidos al mosto de uvas estrujadas sin tratar a las concentraciones de 5 y 3 ppm respectivamente. Las vinificaciones se realizaron de forma tradicional y por duplicado. Cada muestra fue analizada por triplicado y en todas ellas se controló el nivel final de residuos de plaguicidas. La determinación de los compuestos fenólicos se realizó por LC-DAD, por inyección directa del vino, excepto los estilbenos que se extrajeron previamente con acetato de etilo. La capacidad captadora de radicales libres de las muestras se analiza con el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) por espectrofotometría a 515 nm. Existen diferencias entre la dialización de los vinos, influyendo tanto la variedad de uva como la presencia de los fungicidas estudiados. Para todos los vinos, los estilbenos son los compuestos fenólicos que presentan mayor porcentaje de dialización (cercano al 50%). Los menores porcentajes en los dializados corresponden a los valores de actividad antioxidante, oscilando entre el 1,08 al 3,86 %.

Palabras clave: Biodisponibilidad *in vitro*, compuestos fenólicos, actividad antioxidante, fungicidas, vino.

1. Introducción

Los compuestos fenólicos presentes en los vinos son componentes endógenos que diversos estudios han demostrado que tienen un efecto beneficioso para la salud, ya que muestran citotoxicidad selectiva sobre las células de cáncer, pueden compensar la aterosclerosis e impedir el desarrollo de enfermedades coronarias (1). También estos compuestos son los responsables de la capacidad antioxidante de los vinos, que impiden el desarrollo de radicales libres en el organismo.

La ingestión de todos estos compuestos no presupone que nuestro organismo los absorba en su totalidad, ya que, lo que se produce es un proceso conocido como "ADME" o absorción, distribución, metabolismo y eliminación del compuesto en el organismo. La absorción es por tanto la barrera que debe superar la sustancia para llegar a su diana celular y la biodisponibilidad el proceso que mide esa capacidad de superación (2).

Este trabajo tiene la finalidad de aportar datos sobre el porcentaje del total ingerido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante dializados mediante pruebas *in vitro*.

2. Material y métodos

2.1. Experiencia de campo y vinificación

Se realizaron dos experiencias, una con tratamiento en campo y otra con fortificaciones en bodega. Para ambas, la parcela experimental está ubicada en una finca productora de Aldeanueva del Ebro en La Rioja, plantada de viñedos de uvas tintas Tempranillo y Graciano, pertenecientes a las Bodegas D. Mateos S.L. (adscritos a D.O.Ca. Rioja) tomándose una parcela como control. En la primera, los ensayos con los productos comerciales Collis (Boscalid 20% + Kresoxim-metil 10% p/v) y Vivando (Metrafenona 50% p/v) se realizaron siguiendo el código de BPA (Buenas Prácticas Agrícolas); respetando las dosis y plazos de seguridad de los plaguicidas. Tras la vendimia, las uvas tratadas se llevaron a la bodega experimental de la Universidad de La Rioja para la elaboración del vino. En la segunda experiencia, en las uvas estrujadas sin tratar de ambas variedades, se realizó una fortificación en bodega, añadiendo las formulaciones de Frupica (Mepanipirin 50% p/v) y Teldor (Fenhexamida 50 %), a las dosis coincidentes con sus LMR establecidos en la legislación, 3 y 5 mg/Kg, respectivamente.

Posteriormente, se realizaron 5 microvinificaciones idénticas por duplicado, para cada uno de los tratamientos y testigo, en depósitos de 50 l siguiendo el proceso de vinificación clásico para la elaboración de un vino tinto en la D.O.Ca. Rioja. Tras el trasiego de los vinos, se llevo a cabo una clarificación de los mismos con gelatina a una dosis de 12 ml/Hl. Por último, los vinos fueron embotellados y quedaron dispuestos para realizar los distintos análisis.

2.2. Método DPPH

Se utilizó el método de Bondet et al. (3), con ligeras modificaciones: A 5 µl de muestra de vino tinto, diluida 1:1 v/v con metanol, se le añade la cantidad necesaria de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) 0,094 mM en metanol, hasta completar 1 ml. La actividad de eliminación de los radicales libres fue evaluada utilizando el DPPH, mediante la medición de la absorbancia a 515 nm, después de 60 min de reacción a 20 °C, en un espectrofotómetro. La reacción se lleva a cabo en tubos Eppendorf y los resultados fueron expresado como equivalentes mM/ml de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), un análogo de la vitamina E.

2.3. Análisis de la composición fenólica

Los compuestos analizados fueron: antocianinas (cianidina-3-glu, pelargonidina-3-glu, petunidina-3-glu, peonidina-3-glu, malvidina-3-glu y sus derivados acilados); derivados hidroxicinámicos (cafeoil-tartárico, feruloil-tartárico y cumaroil-tartárico); flavonoles (miricetina-3-glu, quercetina-3-glu, kaempferol-3-glu, miricetina y quercetina) y estilbenos (cis y trans resveratrol y piceidos). Se utilizó un cromatógrafo HPLC Shimadzu LC-10AD con detector diodo array SPD-M10A (Agilent Technologies España), equipado con una columna C₁₈ Lichrospher RP-18 de 25 cm x 0,4 cm y 5 µm, acoplada a una pre-columna del mismo material y de 1 cm. Se utilizaron dos disolventes como fases móviles: el disolvente A, agua con ácido

fórmico al 1% (99:1, v/v) y el disolvente B, metanol al 100%. La elución se realizó a un flujo de 1 ml/minuto con el siguiente gradiente: 2% B inicial, incremento a 32% de B a los 30 minutos, 40% de B a los 40 minutos y 95% de B a los 50 minutos, retorno a las condiciones iniciales a los 55 minutos y un tiempo de acondicionamiento de 10 minutos (4). Las antocianinas se cuantifican como cianidina-3 rutinósido a 510 nm., los flavonoles como rutina a 360 nm, los estilbenos como resveratrol a 320 nm y los derivados hidroxicinámicos como ácido clorogénico a 320 nm. Para la extracción de estilbenos se añadió 5 ml de acetato de etilo a 5 ml de muestra, la mezcla se agitó vigorosamente, y la fase orgánica fue concentrada hasta sequedad, redisuelta en 0,5 ml de metanol, filtrada a través de un filtro Millex-HV 0,45 µM e inyectada en el HPLC.

2.4. Biodisponibilidad *in vitro*.

Muestras de vino (40 ml) se sometieron al proceso de digestión gástrica simulado con pepsina porcina a pH 2 durante dos horas en baño de agua con agitación a 37 °C. Un alícuota se sometió a continuación a una simulación de la digestión intestinal con pancreatina porcina y sales biliares a pH 7 en las mismas condiciones de tiempo y t^a . La absorción intestinal fue simulada en un tubo de diálisis de celulosa sellada (membrana semipermeable) (5). En los dializados se determinaron los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante.

3. Resultados

En las figuras 1 y 2 se muestran los porcentajes dializados de las distintas familias de compuestos fenólicos, del índice de Folin y la actividad antioxidante de los vinos de Tempranillo y Graciano.

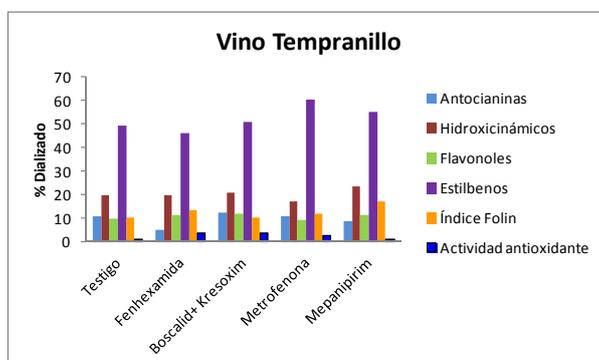


Figura1. Biodisponibilidad de compuestos fenólicos, índice de Folin y actividad antioxidante en vino Tempranillo (% dializado).

Para el vino variedad Tempranillo se observa que la presencia de residuos de fungicidas no afecta al porcentaje dializado con respecto al testigo, excepto para las antocianinas en presencia de fenhexamida y mepanipirín, donde se produce un descenso del mismo. Sin embargo, en vinos de Graciano si se produce un descenso de la biodisponibilidad en los vinos tratados frente al testigo, excepto para el índice de Folin. Para ambas variedades, los estilbenos son los compuestos fenólicos que presentan mayor porcentaje de dialización (cercano al 50%). Los menores porcentajes en los dializados corresponden a los niveles de actividad antioxidante, oscilando entre el 1,08 al 3,86 %.

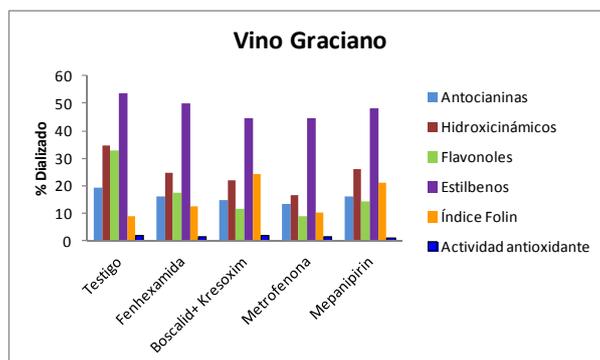


Figura1. Biodisponibilidad de compuestos fenólicos, índice de Folin y actividad antioxidante en vino Graciano (% dializado).

En lo referente a la influencia de la variedad se observa que para la variedad Graciano se produce un aumento considerable del porcentaje dializado con respecto a la Tempranillo, sobre todo en los vinos testigos y tratados con fenhexamida y mepanipirín.

4. Conclusiones

El porcentaje dializado depende de la variedad de vino, del grupo o familia de compuestos fenólicos y de la presencia de residuos de los fungicidas estudiados. Así, los mayores porcentajes de diálisis se producen para los estilbenos y los menores en la capacidad antioxidante. La elevada dialización de los estilbenos, compuestos altamente beneficiosos para la salud, es indicativa de que la mitad de cantidad ingerida pasa al torrente sanguíneo, llegando a los objetivos diana.

5. Bibliografía

1. Iriti, M.; Varoni, E.M. 2014. Cardioprotective effects of moderated red wine consumption: Polyphenols vs. Etanol. *In: Journal of Applied Biomedicine.* 12(4), 193-202.
2. Gil-Izquierdo, A., Zafrilla, P.; Tomás-Barberán, F. 2002. An in vitro method to simulate phenolic compound release from food matrix in tehe gastrointestinal tract. *In: European Food Research Techonology.* 214, 155-159.
3. Bondet, V., Brand-Williams, W.; Berset, C. 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH* free radical method. *In: LWT-Food Science and Technology.* 30(6), 609-615.
4. Cantos, E., García-Viguera, C.; De Pascual-Teresa, S. 2000. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of Cv, Napoleón table grapes. *In: Journal Agricultural Food Chemistry.* 48, 4606-4612.
5. Payá, P., Mulero, J., Oliva, J., Cámara, M.A.; Barba, A. 2013. Influence of the matrix in bioavailability of flufenoxuron, lufenuron, pyriproxyfen and fenoxycarb residues in grapes and wine. *In: Food and Chemical Toxicology.* 60,419-423.

6. Agradecimientos

Trabajo financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (Proy. nº AGL2011-30378-C03-03).

OT05 - EFECTO DE DIVERSOS FUNGICIDAS EN LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE VINOS TINTOS (VAR. TEMPRANILLO Y GRACIANO)

G. Martínez¹, S. Cermeño¹, J. Mulero², J. Oliva¹, M.A. Cámara¹, A. Barba¹

¹ Universidad de Murcia, Dpto. Química Agrícola (Campus de Espinardo, 30100, Murcia, España)

² Universidad Católica San Antonio, Dpto. Nutrición (Campus de los Jerónimos, 30107, Murcia, España)

josoliva@um.es

RESUMEN:

Se estudia el efecto de los residuos de fungicidas sobre los niveles de antocianinas, derivados hidroxicinámicos, flavonoles, estilbenos y total de compuestos fenólicos expresado como Índice de Folin, en vinos tintos elaborados con uvas Tempranillo y Graciano tratadas individualmente con los fungicidas: Collis (Boscalid 20% + Kresoxim-metil 10%) y Vivando (Metrafenona 50%) bajo Buenas Prácticas Agrícolas (BPA); y con Teldor (Fenhexamida 50%) y Frupica (Mepanipirín 50%) añadidos al mosto de uvas estrujadas sin tratar a las concentraciones de 5 y 3 ppm respectivamente. Las vinificaciones se realizaron por duplicado y cada muestra fue analizada por triplicado. La determinación de los compuestos fenólicos se realizó por LC-DAD, por inyección directa del vino, excepto los estilbenos que se extrajeron previamente con acetato de etilo. La cuantificación se realizó a la longitud de onda característica de cada grupo de compuestos. Los resultados obtenidos indican que la presencia de residuos de fenhexamida y la mezcla boscalid + kresoxim-metil no afecta al perfil fenólico, pero sí al índice de Folin en vinos Tempranillo. Para Graciano, aparecen diferencias significativas en el perfil fenólico, para todos los fungicidas. Para ambos vinos, existen diferencias significativas entre parejas de tratamientos, excepto para fenhexamida y boscalid + kresoxim-metil en vinos de Tempranillo.

Palabras clave: Fungicidas, compuestos fenólicos, vino.

1. Introducción

Los factores que influyen en la concentración de los compuestos fenólicos en el vino son: edafoclimáticos (composición, fertilidad y disponibilidad de agua, t^a y pluviometría); genéticos; culturales (poda, abonado, riego, insolación, tratamientos fitosanitarios, etc.) y enológicos, como tiempo y t^a de la vinificación, presencia de SO_2 , pH, fenómenos de copigmentación y presencia de residuos de plaguicidas (1).

Respecto a la influencia de la presencia de residuos de plaguicidas en las uvas y durante el proceso de vinificación, existe escasa bibliografía, aunque nuestro grupo de investigación ha realizado algunos trabajos en los últimos años (1-3). Por ello, en este estudio se pretende aportar nuevos datos que determinen el efecto que tienen los residuos de los fungicidas estudiados en la composición fenólica de vinos tintos de la D.O Ca.Rioja.

2. Material y métodos

2.1. Experiencia de campo y vinificación

Se realizaron dos experiencias, una con tratamiento en campo y otra con fortificaciones en bodega. Para ambas, la parcela experimental está ubicada en una finca productora de Aldeanueva del Ebro en La Rioja, plantada de viñedos de uvas tintas Tempranillo y Graciano, pertenecientes a las Bodegas D. Mateos S.L. (adscritos a D.O.Ca. Rioja) tomándose una parcela como control. En la primera, los ensayos con los productos comerciales Collis (Boscalid 20% + Kresoxim-metil 10% p/v) y Vivando (Metrafenona 50% p/v) se realizaron siguiendo el código de BPA (Buenas Prácticas Agrícolas); respetando las dosis y plazos de seguridad de los plaguicidas. Tras la vendimia, las uvas tratadas se llevaron a la bodega experimental de la Universidad de La Rioja para la elaboración del vino. En la segunda experiencia, en las uvas estrujadas sin tratar de ambas variedades, se realizó la fortificación en bodega, añadiendo las formulaciones de Frupica (Mepanipirin 50% p/v) y Teldor (Fenhexamida 50 %), a las dosis coincidentes con sus LMR establecidos en la legislación, 3 y 5 mg/Kg, respectivamente.

Posteriormente, se realizaron 5 microvinificaciones idénticas por duplicado, para cada uno de los tratamientos y testigo, en depósitos de 50 l siguiendo el proceso de vinificación clásico para la elaboración de un vino tinto en la D.O.Ca. Rioja. Tras el trasiego de los vinos, se llevo a cabo una clarificación de los mismos con gelatina a una dosis de 12 ml/Hl. Por último, los vinos fueron embotellados y quedaron dispuestos para realizar los distintos análisis.

2.2. Análisis de la composición fenólica

Los compuestos analizados fueron: antocianinas (cianidina-3-glu, pelargonidina-3-glu, petunidina-3-glu, peonidina-3-glu, malvidina-3-glu y sus derivados acilados); derivados hidroxicinámicos (cafeoil-tartárico, feruloil-tartárico y cumaroil-tartárico); flavonoles (miricetina-3-glu, quercetina-3-glu, kaempferol-3-glu, miricetina y quercetina) y estilbenos (cis y trans resveratrol y piceidos). Se utilizó un cromatógrafo HPLC Shimadzu LC-10AD con detector diodo array SPD-M10A (Agilent Technologies España), equipado con una columna C₁₈ Lichrospher RP-18 de 25 cm x 0,4 cm y 5 µm, acoplada a una pre-columna del mismo material y de 1 cm. Se utilizaron dos disolventes como fases móviles: el disolvente A, agua con ácido fórmico al 1% (99:1, v/v) y el disolvente B, metanol al 100%. La elución se realizó a un flujo de 1 ml/minuto con el siguiente gradiente: 2% B inicial, incremento a 32% de B a los 30 minutos, 40% de B a los 40 minutos y 95% de B a los 50 minutos, retorno a las condiciones iniciales a los 55 minutos y un tiempo de acondicionamiento de 10 minutos (4). Las antocianinas se cuantifican como cianidina-3 rutinósido a 510 nm., los flavonoles como rutina a 360 nm, los estilbenos como resveratrol a 320 nm y los derivados hidroxicinámicos como ácido clorogénico a 320 nm. Para la extracción de estilbenos se añadió 5 ml de acetato de etilo a 5 ml de muestra, la mezcla se agitó vigorosamente, y la fase orgánica fue concentrada hasta sequedad, redisuelta en 0,5 ml de metanol, filtrada a través de un filtro Millex-HV 0,45 µM e inyectada en el HPLC. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

3. Resultados

En las tablas I y II se muestran los contenidos de las familias de compuestos fenólicos e índice de Folin y las diferencias significativas entre los vinos tratados con respecto al testigo.

Tabla I. Compuestos fenólicos e índice de Folin en vino Tempranillo (mg/l).

Comp. fenólicos	Testigo	Fenhexamida	Boscalid+Kresoxim	Metrafenona	Mepanipirín
Antocianinas	762,98 ± 22,83	776,37 ± 32,51	762,21 ± 45,60	671,70 ± 11,47**	649,30 ± 7,67**
Hidroxicinámicos	150,25 ± 5,75	148,61 ± 12,51	146,85 ± 8,36	229,26 ± 25,61**	140,30 ± 15,67
Flavonoles	116,13 ± 31,18	93,43 ± 12,65	98,67 ± 6,34	120,40 ± 14,32	109,22 ± 4,83
Estilbenos	56,66 ± 6,22	51,32 ± 2,96	53,30 ± 2,99	44,07 ± 1,02***	45,57 ± 0,81***
Índice Folin	2052,20 ± 95,22	1612,90 ± 125,81**	1782,95 ± 171,17*	2113,67 ± 63,67	1383,48 ± 39,39**

*≤0,05 **≤0,01 ***≤0,001

Se comprueba que la presencia de residuos de fenhexamida y la mezcla de boscalid+kresoxim metil no afecta al perfil fenólico, pero sí al índice de Folin, que disminuye. La presencia de metrafenona aumenta los valores de los derivados hidroxicinámicos y el índice de Folin. En cambio, con mepanipirín, se observa una disminución de todo el perfil fenólico y del índice de Folin, siendo este plaguicida el que más afecta a la composición fenólica en vinos de uvas Tempranillo.

Tabla II. Compuestos fenólicos e índice de folin en vino Graciano (mg/l).

Comp. fenólicos	Testigo	Fenhexamida	Boscalid+ Kresoxim	Metrafenona	Mepanipirín
Antocianinas	755,30 ± 13,94	698,54 ± 55,27**	609,22 ± 23,14**	632,56 ± 36,40**	626,61 ± 34,04**
Hidroxicinámicos	108,98 ± 1,45	92,46 ± 6,80**	65,01 ± 5,66**	110,82 ± 0,45**	111,84 ± 3,68**
Flavonoles	64,95 ± 9,26	65,77 ± 3,33**	81,52 ± 4,74**	74,73 ± 0,32**	81,60 ± 4,90**
Estilbenos	50,47 ± 0,60	44,58 ± 1,94**	44,89 ± 1,52**	49,06 ± 2,48**	52,03 ± 1,41*
Índice Folin	2458,98 ± 87,17	1839,50 ± 67,96	1596,55 ± 41,36**	1546,67 ± 103,81**	1611,93 ± 241,21**

*≤0,05 **≤0,01 ***≤0,001

En los vinos Graciano, aparecen diferencias significativas del perfil fenólico con la presencia de todos los fungicidas. Se debe destacar la disminución del contenido de antocianinas y del valor del índice de Folin, en todos los casos. La presencia de fenhexamida y la mezcla kresoxim metil y boscalid hace disminuir los contenidos de derivados hidroxicinámicos y estilbenos. Por el contrario, el contenido en flavonoles, aumenta con la presencia de todos los fungicidas.

El análisis entre parejas de tratamientos en vinos Tempranillo, nos muestra como la comparación entre fenhexamida y Collis, es la única que no produce diferencias significativas en ninguno de los grupos de polifenoles estudiados, ni en el índice de Folin. Solamente las comparaciones de fenhexamida frente a metrafenona, y de Collis frente a metrafenona, muestran diferencias en todos los compuestos fenólicos, y en el índice de Folin (Tabla III).

Tabla III. Diferencias significativas entre parejas de tratamientos en vinos Tempranillo.

	FEN-CO	FEN-MET	FEN-ME	CO-MET	CO-ME	MET-ME
Antocianinas	-	**	**	**	**	*
Hidroxicinámicos	-	**	-	**	-	**
Flavonoles	-	*	-	**	*	-
Estilbenos	-	***	**	***	***	-
Índice Folin	-	**	**	**	**	**

*≤0,05 **≤0,01 ***≤0,001 - No existen diferencias significativas

En el caso de vinos Graciano, se debe señalar que la comparación entre fenhexamida y Collis, así como metrafenona y mepanipirin, producen cambios en todas las familias de compuestos fenólicos, así como en el índice de Folin (Tabla IV). En líneas generales todas las parejas inducen cambios sobre el perfil fenólico e índice de Folin.

Tabla IV. Diferencias significativas entre parejas de tratamientos en vinos Graciano.

	FEN-CO	FEN-MET	FEN-ME	CO-MET	CO-ME	MET-ME
Antocianinas	**	**	**	-	**	**
Hidroxicinámicos	**	**	**	*	**	**
Flavonoles	**	**	-	**	-	**
Estilbenos	**	-	**	**	**	**
Índice Folin	**	**	**	**	*	**

*≤0,05 **≤0,01 ***≤0,001 - No existen diferencias significativas

4. Conclusiones

En general, la presencia de residuos de estos fungicidas en ambos vinos produce diferencias significativas tanto en su perfil fenólico, como en su contenido, donde se produce una apreciable disminución con respecto al testigo. Además el tipo de fungicida utilizado también influye en su concentración final.

5. Bibliografía

1. Oliva, J., Barba, A., San Nicolás, F. T.; Payá, P. 2005. Efecto de residuos de fungicidas en la composición fenólica de vinos de tintos (Var. Monastrell). *In: Tecnología del vino*. 23, 37-41.
2. Oliva, J., Mulero, J., Payá, P., Cámara, M. A.; Barba, A. 2009. Influence of several fungicides on the antioxidant activity of red wines (Var. Monastrell). *In: Journal of Environmental Science and Health part B*. 44 (6), 546-552.
3. Mulero, J., Martínez, G., Oliva, J., Cermeño, S., Cayuela, J.M., Zafrilla, P., Martínez-Cacha, A.; Barba, A. 2015. Phenolic compounds and antioxidant activity of red wine made from grapes treated with different fungicides. *In: Food Chemistry*. 180, 25-31.
4. Cantos, E., García-Viguera, C.; De Pascual-Teresa, S. 2000. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of Cv, Napoleón table grapes. *In: Journal Agricultural Food Chemistry*. 48, 4606-4612.

6. Agradecimientos

Trabajo financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (Proy. nº AGL2011-30378-C03-03).

OT06 – EVALUACIÓN DE PARÁMETROS GEOQUÍMICOS EN SUELOS VITÍCOLAS DE DIFERENTES ISLAS DE LA MACARONESIA

Juan Pedro Pérez Trujillo¹, Ana Beatriz Carmona Rodríguez¹, Zulimar Hernández², Tomás Figueiredo³

¹Departamento de Química, Universidad de La Laguna, 38.207-La Laguna, Tenerife, España

² Departamento de Geología y Geoquímica. Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Cantoblanco. Madrid

³ Escuela Superior Agraria, Instituto Politécnico de Braganza, Portugal
jperez@ull.edu.es

RESUMEN:

Se ha realizado un estudio exploratorio de los suelos vitícolas de diferentes zonas de la Macaronesia. Se seleccionaron 102 muestras de las Islas de Pico y Terceira (Azores, Portugal), Lanzarote y El Hierro (Canarias, España), y Fogo (Cabo Verde). A dichas muestras de suelo se le determinaron los siguientes parámetros: pH, suma de bases intercambiables (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y Na^+), materia orgánica del suelo (MOS), retención de fósforo (P) y contenido de Al_o , Fe_o y Si_o . Se realizó una clasificación de las muestras estudiadas según el tipo de suelo. Así mismo, los resultados obtenidos se relacionaron con su origen geográfico y tipo de suelo.

Palabras clave: suelos, parámetros geoquímicos, Macaronesia y análisis multivariado.

1. Introducción

Hasta el momento no hay ningún estudio publicado acerca de los suelos vitícolas de la isla de Fogo, de ahí la necesidad de realizar un estudio para conocer estos suelos y comparar con otras regiones de la Macaronesia.

El objetivo de este trabajo es estudiar la composición fisicoquímica de una serie de muestras de suelo de diferentes islas de la Macaronesia, evaluar el contenido de C orgánico, determinar el contenido de minerales no-cristalinos, clasificar las muestras según el tipo de suelo y, por último, aplicar técnicas de análisis multivariado para relacionar las muestras con el tipo de suelo y el origen geográfico de las mismas.

2. Material y métodos

2.1. Muestras: Se seleccionaron 102 muestras de suelos vitícolas de diferentes islas, en concreto, de las islas de Fogo (n = 28), (Cabo Verde), El Hierro (n = 30) y Lanzarote (n = 18) (Canarias), Terceira (n = 4) y Pico (n = 22) (Azores). Las muestras fueron tomadas en el horizonte de diagnóstico, 20 – 30 cm.

2.2. Determinaciones: En la tabla 1 se recogen los parámetros determinados así como la técnica empleada.

Tabla 1. Parámetros analizados y técnicas empleadas

Parámetros	Técnicas
pH (H ₂ O)	pH-metro
COS y MOS	Oxidación parcial con K ₂ Cr ₂ O ₇ en medio ácido
Retención de P	Espectroscopía de absorción molecular
Cationes, suma de base	Espectroscopía de absorción y emisión atómica
Extracción de Al, Fe y Si	Espectroscopía de absorción atómica
Al _o +1/2 Fe _o y Al _o /Si _o	Cálculo

3. Resultados

De acuerdo con los estudios de campo, los resultados obtenidos en los análisis de las muestras y los criterios de clasificación de suelos de la WRB (1), se procede a clasificar las muestras según tipo de suelo, tabla 2.

Tabla 2. Clasificación de las muestras según tipo de suelo

Isla	Andosol	Antrosol ándico	Antrosol vítrico	Calcisol
Azores	58 %	42 %	---	---
El Hierro	10 %	---	77 %	13 %
Lanzarote	---	---	44 %	56 %
Fogo	28 %	---	72 %	---

En la tabla 3 se presentan el valor medio y la desviación estándar de los parámetros determinados según zona geográfica, así como las diferencias significativas entre ellas.

Tabla 3. Valor medio y desviación estándar según origen geográfico y diferencias significativas

Isla	Azores (A)		El Hierro (H)		Lanzarote (L)		Fogo (F)		Diferencias Significativas
	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	
pH H ₂ O	5,69	0,68	6,22	1,41	7,53	1,24	7,52	0,39	A-L;A-F;H-L;H-F
COS (%)	15,06	8,46	1,70	0,76	1,01	0,61	2,45	1,59	A-H;A-L;A-F
MOS (%)	25,46	14,20	2,84	1,32	1,66	1,03	3,07	1,72	A-H;A-L;A-F
Calcio	11,82	8,16	12,79	9,98	35,82	19,02	13,74	7,79	L-A;L-H;L-F
Magnesio	1,73	1,15	5,83	3,83	8,93	3,50	3,87	2,55	L-A;L-H;L-F;A-H;A-F;H-F
Potasio	0,91	0,69	1,47	0,99	3,42	1,72	1,08	0,66	L-A;L-H;L-F
Sodio	0,45	0,15	1,20	0,74	1,99	0,98	0,37	0,15	A-H;A-L;H-L;HF-;L-F
Suma Bases	14,94	9,32	21,56	15,00	51,01	23,6	19,16	9,88	L-A;L-H;L-F
Retención P	73,92	14,57	47,33	15,08	39,56	14,5	55,57	23,88	A-H;A-L;A-F
Al _o	1,64	0,69	0,97	0,19	0,43	0,16	1,70	0,61	A-H;A-L;H-L;H-F;L-F
Fe _o	0,87	0,39	0,73	0,14	0,40	0,15	0,80	0,20	L-A;L-H;L-F
Si _o	0,68	0,24	0,38	0,16	0,31	0,07	1,21	0,32	A-L;A-H;A-F;F-H;F-L
Al _o +1/2 Fe _o	1,98	0,62	1,25	0,21	0,63	0,21	2,10	0,67	L-H;L-A;L-F;H-F;A-H
Al _o /Si _o	2,57	1,31	2,47	0,43	1,19	0,17	1,45	0,47	A-L;A-F;H-L;H-F

Unidades: Calcio, magnesio, potasio, sodio y suma de bases (cmol/Kg); Retención de P, Al_o, Fe_o, Si_o, Al_o+1/2Fe_o y Al_o/Si_o (g·100 g⁻¹).

Como puede observarse los suelos vitícolas de Azores presentan pH ácidos y altos contenidos de MOS, COS (que podrían ser debido a la aplicación de enmiendas orgánicas al cultivo por parte de los agricultores), de retención de P y de minerales amorfos; los suelos de El Hierro muestran pH ácido y un alto contenido de suma de bases; los suelos de Lanzarote se

caracterizan por tener un alto valor de pH y de suma de bases (lo cual le confiere una elevada fertilidad química, pero también riesgo de salinización y degradación del suelo) y, bajos valores de retención de P, Al_o y Fe_o y, por último, los suelos de Fogo presentan pH básico, alto contenido de Si_o, y de minerales amorfos.

En la tabla 4 se presentan el valor medio y desviación estándar de las muestras según tipo de suelo, así como las diferencias significativas entre ellos.

Tabla 4. Valor medio y desviación estándar de las muestras según tipo de suelo y diferencias significativas

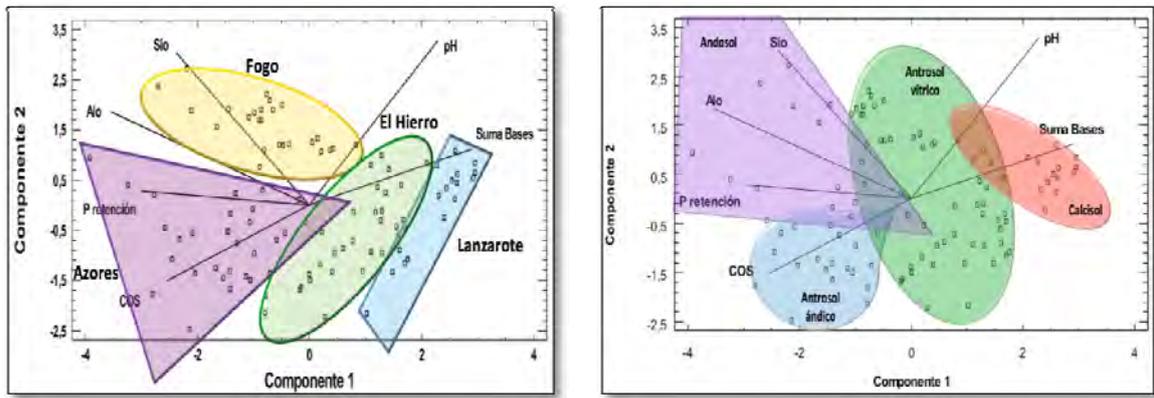
Tipo suelo	Andosol (A)		Antrosol ándico (AA)		Antrosol vítrico (AV)		Calcisol (C)		Diferencias significativas
	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	Media	D. E.	
pH H ₂ O	6,06	1,12	5,60	0,54	6,74	1,13	8,40	0,28	A-AV;A-C;AA-AV;AV-C
COS (%)	7,26	4,19	22,20	7,96	1,62	0,84	0,97	0,53	A-AA;A-AV;A-C;AA-AV;AA-C
MOS (%)	12,71	7,22	38,28	13,73	2,80	1,45	1,66	0,91	A-AA;A-AV;A-C;AA-AV;AA-C
Calcio	12,53	9,55	14,18	9,16	12,21	7,45	44,02	13,45	A-C;AA-C;AV-C
Magnesio	2,60	1,60	1,41	0,80	5,05	3,42	10,63	2,22	A-AV;A-C;AA-AV;AA-C;AV-C
Potasio	0,91	0,59	1,06	0,91	1,34	0,83	3,97	1,60	A-C;AA-C;AV-C
Sodio	0,42	0,15	0,46	0,10	0,85	0,62	2,47	0,81	A-AV;A-C;AA-AV;AA-C;AV-C
Suma Bases	16,59	11,32	17,11	10,28	19,44	10,79	62,76	14,63	A-C;AA-C;AV-C
Retención P	82,19	12,76	68,18	13,96	38,98	9,95	52,50	8,64	A-AA;A-AV;A-C;AA-AV;AA-C;AV-C
Al _o	1,78	0,85	1,59	0,34	1,06	0,47	0,65	0,38	A-AV;A-C;AA-AV; AA-C;AV-C
Fe _o	0,89	0,40	0,78	0,25	0,72	0,16	0,41	0,18	A-C;AA-C;AV-C;A-AV
Si _o	0,80	0,32	0,61	0,20	0,71	0,51	0,34	0,09	NO
Al _o +1/2 Fe _o	2,13	0,85	1,98	0,35	1,38	0,53	0,83	0,42	A-AV;A-C;AA-AV;AA-C;AV-C
Al _o /Si _o	2,19	0,58	3,11	1,72	1,74	0,73	1,63	0,64	A-AA;A-AV;A-C;AA-AV;AA-C

Unidades: Calcio, magnesio, potasio, sodio y suma de bases (cmol/Kg); Retención de P, Al_o, Fe_o, Si_o, Al_o+1/2Fe_o y Al_o/Si_o (g·100 g⁻¹).

Como puede observarse los Andosoles presentan valores altos de Al_o, Fe_o y retención de P; los Antrosoles ándicos muestran los valores más altos de COS y MOS; los Antrosoles vítricos tienen los valores más bajos de retención de P y, por último, los Calcisoles contienen los valores más altos de pH, suma de bases y, bajos contenidos de Fe_o y Al_o.

3.1. Análisis de componentes principales (ACP): Con objeto de establecer la relación existente entre las muestras y su origen geográfico o el tipo de suelo, se realiza un ACP considerando las variables más discriminantes (pH, COS, suma de bases, retención de P, Al_o y Si_o), obteniéndose tres componentes principales, que explican el 86% de la varianza total. En la figura 1 (a y b) se representan las muestras y las variables en el plano de los dos primeros componentes principales que explican un 68% de la varianza total (43% + 25%).

En el gráfico a) las muestras se agrupan según su origen geográfico, observándose cuatro grupos bien definidos: Azores, Fogo, El Hierro y Lanzarote. Se puede apreciar como el primer componente principal tiende a separar las muestras de las islas Canarias (El Hierro y Lanzarote) de las muestras de las islas de Azores y Fogo. El segundo componente principal tiende a separar las muestras de Fogo de las de Azores.



a)

b)

Figura 1. a) ACP según el origen geográfico y b) ACP según el tipo de suelo.

En el gráfico b) las muestras se agrupan según el tipo de suelo, observando cuatro grupos: Calcisoles, Antrosoles vítricos, Antrosoles ándicos y Andosoles.

4. Conclusiones

A pesar de tratarse de suelos desarrollados sobre materiales volcánicos, bajo similares prácticas vitícolas y clima subtropical húmedo-seco, existe una amplia variabilidad en cuanto a su composición fisicoquímica. Los suelos de Azores se caracterizan por presentar pH ácidos, altos contenidos de MOS, COS y retención de P; los suelos de El Hierro por tener pH ácido y un alto contenido de suma de bases; los suelos de Lanzarote por sus valores de pH básicos, alto contenido de suma de bases y bajos valores de retención de P, Al_2O_3 y Fe_2O_3 ; y los suelos de Fogo por presentar pH básicos y alto contenido de SiO_2 .

La alta variabilidad de las propiedades fisicoquímicas de las muestras se recoge en el tipo de suelo. Así, Los Andosoles muestran valores altos de Al_2O_3 , Fe_2O_3 y retención de P; los Antrosoles ándicos presentan los valores más altos de COS y MOS; los Antrosoles vítricos se caracterizan por tener valores bajos de retención de P; y los Calcisoles presentan valores altos de pH y suma de bases y, bajos contenidos de Fe_2O_3 y Al_2O_3 .

La aplicación de técnicas de análisis multivariante indica que las muestras se agrupan según el tipo de suelo y zona geográfica de origen.

5. Bibliografía

1. WRB (World reference base for soil resources). International soil classification system for naming soils and creating legends for soil map, 2007 y 2014.

6. Agradecimientos

Este proyecto ha sido financiado con cargo a los proyectos SEMACA (PCT-MAC 2007-2013), sub-proyecto Ecoviticave, y CGL2008-04296.

OT07 - APLICACIÓN DE EXTRACTO DE TÉ VERDE PARA INCREMENTAR LA CONCENTRACIÓN POLIFENÓLICA DE LOS VINOS DE TEMPRANILLO DE UTIEL-REQUENA

Inmaculada Álvarez, Juan Alberto Anaya, Victoria Lizama, M^a José García, José Luis Aleixandre, José Luis Aleixandre-Tudo

Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Universitat Politècnica de València.
Camino de Vera s/n, 46023 Valencia. inmalva@tal.upv.es

RESUMEN:

La variedad Tempranillo es la segunda en implantación en Utiel-Requena, pero las condiciones edafoclimáticas de esta zona y los clones utilizados no permiten una buena adaptación de la variedad, que se está sustituyendo poco a poco por otras variedades de más fácil adaptación. Para intentar mejorar el comportamiento de la variedad Tempranillo y evitar su desaparición en la zona, se están realizando un gran número de trabajos relacionados con las prácticas de cultivo, métodos de elaboración, crianza, etc. En el presente trabajo se estudia el efecto de la aplicación de té verde en el viñedo con el objetivo de modular la respuesta fisiológica de la planta y mejorar y estabilizar la composición polifenólica de las uvas. Los resultados mostraron que el extracto seco de té verde podría considerarse un importante bioestimulante de los polifenoles de la uva, ya que afectó a su composición, ocasionando uvas más coloreadas, con un mayor potencial de antocianos totales y extraíbles, y en general un mejor extractibilidad de sus polifenoles, lo que nos indica una mejor madurez polifenólica. Después de la fermentación maloláctica, los vinos de las uvas tratadas presentan un mayor color, especialmente de los tonos rojos, un incremento del índice de ionización y del porcentaje de antocianos copigmentados. La adición de té verde, en cambio, no influye de forma significativa en los parámetros relacionados con los taninos.

Palabras clave: té verde, Tempranillo, madurez uva, polifenoles.

1. Introducción

La composición fenólica es determinante en las propiedades organolépticas de los vinos tintos. Es generalmente aceptado que el incremento de color y de la estructura fenólica de los vinos va acompañado de un incremento de la calidad de éstos. Las técnicas de cultivo empleadas en el viñedo, la variedad de uva, su grado de madurez, y las técnicas de vinificación aplicadas, determinan la concentración y composición en polifenoles de los vinos.

La variedad Tempranillo es la segunda en implantación en Utiel-Requena, pero un porcentaje muy importante de la uva aquí cultivada no consigue la calidad deseada para elaborar vinos competitivos, por lo que se relega su utilización a mezclas para vinos comunes, y en muchos casos es sustituida poco a poco por otras variedades de más fácil adaptación. En nuestra zona mediterránea, donde el subsector vitivinícola tiene una importancia capital dentro del sector agrario, es fundamental la investigación para conseguir incrementar la calidad de nuestros vinos.

Una de las vías posibles para incrementar la calidad de estos vinos puede ser la aplicación de soluciones hidroalcohólicas a los racimos durante la maduración, que promueven la síntesis de etileno por parte de la planta con el consiguiente incremento en la síntesis y acumulación de polifenoles [1]. Otra herramienta es la aplicación de extractos vegetales en el viñedo con el objetivo de modular la respuesta fisiológica de la planta y mejorar la composición de las uvas [2, 3], contribuyendo a incrementar la concentración de polifenoles y más concretamente la de antocianos y su extractibilidad [2, 4, 5]. La aplicación de estas

técnicas puede ser una herramienta muy útil en el diseño de sistemas de producción vitivinícola que garanticen la sostenibilidad del cultivo, considerando siempre la mejora de la calidad como un objetivo fundamental. La pulverización con extractos naturales de plantas podría ser también de gran interés para la viticultura orgánica.

Para intentar mejorar el comportamiento de la variedad Tempranillo y evitar su desaparición en la zona, se ha planteado el presente trabajo, en el que se estudia el efecto de la aplicación del extracto alcohólico de té verde con el objetivo de mejorar las características cromáticas de los vinos y estabilizar su composición polifenólica.

El extracto de té verde tiene un alto efecto antioxidante, y gran parte de este poder es debido a su concentración en catequinas, de las cuales la epigallocatequina galato es la más abundante. A su vez, las catequinas tienen una probada acción copigmentante que contribuye al incremento y a la estabilidad del color de los vinos [6, 7, 8, 9]. La copigmentación es un equilibrio que implica la asociación preferencial y no covalente de las formas coloreadas de los antocianos con un grupo de componentes, fenólicos o no, llamados copigmentos, para formar complejos de apilamiento vertical tipo sándwich, unión que se mantiene por enlaces de baja energía, de tipo Van der Waals, o bien mediante enlaces covalentes [10]. La copigmentación afecta mucho al color de los vinos jóvenes e influye sobre las reacciones de oxidación, condensación y polimerización de las sustancias fenólicas, ya que disminuye la cinética de las reacciones que se producen durante el envejecimiento de los vinos [6, 9]. La suplementación prefermentativa con estos copigmentos puede suponer un incremento de los procesos naturales de asociación inter e intra moleculares de los antocianos, constituyendo un primer paso en la formación de pigmentos más estables durante el envejecimiento de los mismos.

2. Material y métodos

El ensayo se realizó en un viñedo de la variedad Tempranillo perteneciente a la Denominación de Origen "Utiel-Requena". El extracto de té verde se aplicó unos 10 días antes de la vendimia mediante pulverización foliar en la zona de los racimos. El diseño experimental de los ensayos fue de tipo factorial, en bloques completos al azar con tres repeticiones.

La concentración de flavanoles presentes en el extracto de té verde (ACOFARMA), se determinó según el método propuesto por Nishitani y Sagesaka [11]. El extracto se disolvió previamente en una disolución hidroalcohólica hasta alcanzar una dilución que nos permita aplicar al viñedo una concentración de 100 mg/kg de uva de flavanoles, y se incorporó junto con un tensoactivo no iónico que favoreció la adherencia a los hollejos (Ealdina S de Bayer). Se consideró, basándonos en la experiencia previa, que esta concentración y este período de tiempo era el óptimo para que se produjeran las reacciones de copigmentación esperadas.

A partir de este momento se realizó el seguimiento de la maduración polifenólica de la uva, tanto de la tratada como del resto de la uva. Con esta última se llevaron a cabo en bodega los ensayos control, y los ensayos con adición prefermentativa de los flavanoles presentes en el extracto de té verde.

La vendimia se realizó 10 días después de la aplicación de los copigmentos, en cajas de 20 kg, encubándose la pasta obtenida de las uvas tratadas directamente en depósitos de 50 L. La pasta procedente de la uva sin tratar se distribuyó en 15 depósitos de 50 litros, tres de los cuales se utilizaron como control, a tres de ellos se les adicionó conjuntamente catequina+epicatequina+galato de epigallocatequina, a tres se les adicionó exclusivamente catequina, a otros tres epicatequina y a tres últimos galato de epigallocatequina. La adición prefermentativa conjunta de catequina, epicatequina y galato de epigallocatequina se realizó aproximando su concentración a la que contenía el extracto de té verde adicionado a las uvas. La adición prefermentativa de catequina, de epicatequina y de galato de epigallocatequina se realizó con el objetivo de estudiar el efecto de estos flavanoles por separado, y para ello se utilizó una concentración de 100 mg/Kg de uva, similar a la que contienen la totalidad de flavanoles del

extracto de té verde. Los compuestos puros fueron suministrados por Sigma-Aldrich. En todas las vinificaciones efectuadas se realizó una fermentación tradicional en tinto, con levaduras seleccionadas, temperatura de fermentación entre 25-27 °C y dos bazuqueos diarios. Al cabo de 10 días de maceración-fermentación se practicó un prensado a baja presión, y se mezcló el vino flor con el vino de primera prensada. La fermentación maloláctica se realizó con bacterias *Oenococcus oeni* comerciales. Una vez concluida la fermentación maloláctica, y previo sulfitado a 30 mg/L de sulfuroso libre, los vinos se trasegaron y homogeneizaron, y se determinó su composición polifenólica al cabo de tres meses.

Para la determinación de los parámetros convencionales, IC e IPT, se siguió el método oficial (Comisión Europea, 1990). El porcentaje de color debido a los antocianos copigmentados, polimerizados y libres se determinó según Levengood y Boulton [12]. La concentración de antocianos totales y sus monoglucósidos se realizó por el método propuesto por Boido *et al.* [13]. La concentración de taninos se determinó según Sommers y Evans. Para conocer el porcentaje de antocianos combinados con taninos se utilizó el índice de PVPP. El grado de polimerización de taninos se calculó con el índice Dmach, y la astringencia de los taninos se estimó por el método referenciado por Llaudy *et al.* [6]. El tratamiento estadístico consistió en análisis ANOVA realizados con el programa informático STATGRAPHICS Plus 5.1.

3. Resultados

En la tabla 1 se muestra la madurez fenólica en el momento de la vendimia de las uvas control y las tratadas con té verde. Se observan diferencias en el potencial de antocianos extraíbles, polifenoles totales y extraíbles. La mayor extractibilidad de las uvas tratadas con té verde posiblemente ocasionará mayor extracción de estos compuestos durante la vinificación.

Tabla 1. Media y desviación estándar de los parámetros de madurez polifenólica de las uvas

	Potencial Total de Antocianos (mg/L)	Potencial de Antocianos Extraíbles (mg/L)	Potencial Total de Intensidad Colorante	Potencial Extraíble de IC	Potencial Total de Polifenoles	Potencial Extraíble de Polifenoles	Extractibilidad d Antocianos (%)
CONTROL	418,54 ± 11,6	214,23 ± 22,9 b	6,65 ± 1,12	5,81 ± 0,15	24,53 ± 2,6 b	15,87 ± 1,8 b	48,82 ± 5,2 a
TE VERDE	417,08 ± 14,3	290,94 ± 7,4 a	6,55 ± 0,36	5,52 ± 0,25	31,93 ± 1,3 a	18,41 ± 1,2a	30,20 ± 2,2 b

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($\alpha=99\%$)

En la tabla 2 se recogen los parámetros determinados en los mostos de las uvas procedentes de los controles sin tratamiento, y de las uvas tratadas con té verde. Los resultados se corresponden con los valores habituales en los mostos de Tempranillo de la zona, que se caracterizan por una baja concentración de azúcar y una deficiente acidez total, que en este caso no se acompaña de un pH muy elevado. Se observan diferencias significativas en la IC y el IPT de los mostos cuyas uvas han sido tratadas con té verde.

Tabla 2. Composición media y desviaciones estándar de los mostos de Tempranillo

	pH	Acidez Total (g/L TH)	º Baumé	Alcohol probable	IC	IPT	Antocianos Totales (mg/L)
CONTROL	3,52 ± 0,01	3,71 ± 0,09	12,25 ± 0,0	12,45 ± 0,03	2,42 ± 0,1 b	11,55 ± 0,1 b	412,45 ± 10,06
TÉ VERDE	3,48 ± 0,06	3,47 ± 0,10	12,21 ± 0,0	12,51 ± 0,01	4,63 ± 0,0 a	13,27 ± 0,02 a	423,08 ± 14,29

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($\alpha=99\%$)

La tabla 3 muestra los parámetros polifenólicos de los vinos elaborados tres meses después de acabada la fermentación maloláctica. Podemos apreciar que los vinos cuyas uvas han sido tratadas con té verde muestran valores significativamente más elevados que los vinos

control para los parámetros relacionados con el color, especialmente los tonos rojos, índice de ionización, antocianos totales, copigmentados y polimerizados. La adición prefermentativa conjunta de los flavanoles que contiene el té verde dio lugar a resultados similares a los observados con la adición de extracto en el viñedo, aunque su efecto no es tan intenso. De los flavanoles ensayados, la epicatequina es la que presenta el mejor comportamiento con relación al mantenimiento del color y de los compuestos polifenólicos.

Tabla 2. Composición polifenólica de los vinos de Tempranillo al cabo de tres meses

	CONTROL	TE VERDE	CAT+ EPICAT+ G-EPIGALOCAT	CATEQUINA	EPICATEQUINA	GALATO DE EPIGALOCATQ
A420	3,59 ± 0,16 b	3,92 ± 0,38 a	3,56 ± 0,05 b	3,45 ± 0,22 b	3,85 ± 0,31 b	3,63 ± 0,20 b
A520	6,46 ± 0,26 c	7,93 ± 0,56 a	7,37 ± 0,10 b	7,04 ± 0,38 b	7,61 ± 0,14 a	7,17 ± 0,23 b
A620	1,62 ± 0,07 ab	1,83 ± 0,19 a	1,37 ± 0,05 b	1,72 ± 0,09 a	1,60 ± 0,08 a	1,73 ± 0,29 a
IC	11,67 ± 0,46 c	13,68 ± 1,12 a	12,30 ± 0,13 bc	12,2 ± 0,6 bc	13,16 ± 0,67 b	12,53 ± 0,86 bc
Matiz	58,70 ± 0,66 a	55,23 ± 1,35 ab	53,80 ± 0,73 b	58,11 ± 2,3 a	61,31 ± 2,02 a	57,42 ± 1,75 a
Índice Ionización	34,35 ± 0,81 c	46,06 ± 3,37 a	41,14 ± 2,60 b	39,8 ± 7,9 bc	41,81 ± 5,97 b	39,53 ± 7,81 bc
Antocianos(mg/L)	599,8 ± 30,3 b	637,6 ± 40,1 a	622,1 ± 11,3 ab	606,4 ± 9,6 b	643,1 ± 19,1 a	650,1 ± 29,1 a
Malvidina (mg/L)	287,5 ± 26,5 a	312,6 ± 16,8 a	307,96 ± 12,7 a	298,6 ± 9,8 a	321 ± 23,5 a	318,5 ± 17,7 a
% Ant. copigmen	17,35 ± 3,35 b	27,79 ± 5,20 a	27,01 ± 3,76 a	21,67 ± 1,8 b	25,67 ± 1,88 a	23,77 ± 1,93 ab
% Ant. Libres	53,47 ± 3,44 a	44,78 ± 1,99 b	48,61 ± 2,76 b	46,33 ± 2,1 b	49,63 ± 3,62 b	49,87 ± 5,61 ab
% Ant polimeriza	29,18 ± 1,17 a	27,43 ± 3,72 a	24,38 ± 1,79 ab	17,99 ± 0,5 b	17,99 ± 0,53 b	17,99 ± 0,53 b
IPT	45,25 ± 0,50 c	54,25 ± 0,50 a	49,50 ± 1,73 b	50,85 ± 0,9 b	49,85 ± 1,67 b	46,25 ± 0,61 bc
Taninos (g/L)	1,66 ± 0,15 a	1,72 ± 0,26 a	1,93 ± 0,11 a	1,96 ± 0,25 a	1,86 ± 0,15 a	1,76 ± 0,08 a
Índice PVPP	75,72 ± 3,50 b	78,48 ± 2,65 a	81,61 ± 2,43 a	76,73 ± 3,9 b	77,32 ± 2,8 b	73,63 ± 5,50 b
Índice DMACH	46,75 ± 4,30 a	43,76 ± 7,37 a	46,82 ± 3,04 a	47,22 ± 4,8 a	45,56 ± 3,74 a	49,72 ± 8,20 a
% Astringencia	60,48 ± 10,1 a	56,14 ± 9,95 a	60,82 ± 6,13 a	61,5 ± 15,1 a	63,27 ± 5,13 a	59,82 ± 11,12 a

Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos ($\alpha = 99\%$)

4. Conclusiones

La pulverización de extracto hidroalcohólico de té verde en el viñedo nos ha permitido incrementar el color de los vinos de Tempranillo, así como la estabilidad de sus antocianos. La adición prefermentativa de los flavanoles que contiene el té verde podría ser también eficaz, pero no es una práctica permitida, ni económicamente rentable, debido a su alto precio.

5. Bibliografía

- Gallegos, J.I.; Martín, P.; Gonzalez, R.M.; Alonso, A. 2005. *Vitic./Enología profesional*, 97, 38-44.
- Parrado, J., Escudero-Gilete, M., Friaza, V. et al. 2007. *J. Sci of Food Agric.*, 87, 2310-2318.
- Parker, M., Osidacz, P., Baldock, G.A., 2012. *J. of Agricultural & Food Chemistry*, 60, 2629-2637.
- Capone, D.L., Jeffery, D.W., Sefton, M.A. 2012. *J. Agric. Food Chemistry*, 60, 2281-2287.
- Peppi, M.C.; Dokoozlian, N.K.. 2002. ASEV 53rd Annual Meeting. Portland. Oregon.
- Álvarez, I.; Aleixandre, J.L.; García, M. J.; Lizama, V. 2009. *Eur. Food Res. Techn.* 228, 501-510.
- Honggao Xu, Xuan Liu, Qiuli Yan, Fang Yuan, Yanxiang Gao. 2015. *Food Chemistry* 166, 50-55.
- Darias-Martín, J.; Carrillo, M.; Díaz, E.; Boulton, R. B. 2001. *Food Chem.* 73, 217- 220.
- Hermosín-Gutiérrez, I.; Sánchez-Palomo, E.; Vicario-Espinosa, A. 2005. *Food Chem.* 92, 269-283.
- Gris, E. F.; Ferreira, E. A.; Falcao, L. D.; Bordignon, M. T. 2007. *Food Chem.* 100, 3, 1289 -1296.
- Nishitani, E.; Sagesaka Y. 2004. *J Food Comp Anal* 17:675-685.
- Levengood, J.; Boulton, R. 2004. American Chemical Society, Washington DC, pp. 35-52.
- Boido, E.; Alcalde-Eón, C.; Carrau, F.; Dellacassa, E. 2006. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6692-6704.

OT08 - INEFLUENCIA DEL REFLUJO DE UNA COLUMNA DE DESTILACIÓN SOBRE LA COMPOSICIÓN DE COMPUESTOS TERPÉNICOS DE LOS AGUARDIENTES

Matias-Guiu, P.¹, Rodríguez-Bencomo, J.J.¹, Orriols, I.², Pérez-Correa, J.R.³, López, F.¹

¹Departament d'Enginyeria Química, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Av. Països Catalans 26, 43007, Tarragona, España.

²Estación Enológica de Galicia, Ponte San Clodio - Leiro, 32427 Leiro, España.

³ASIS, Departamento de Ingeniería Química y Bioprocesos, Pontificia Universidad Católica de Chile, Avenida Vicuña Mackenna 4860, casilla 306, Santiago 22, Chile.

francisco.lopez@urv.cat

RESUMEN:

La calidad organoléptica de destilados de vino depende tanto de la materia prima como del proceso de destilación. El empleo de columnas de rectificación con reflujo variable puede ser una vía para la obtención de destilados o fracciones de destilado con características organolépticas específicas. En este trabajo se han evaluado diferentes estrategias de destilación basadas en la variación del reflujo interno de una columna de destilación con el objetivo de lograr fracciones de destilado con alto contenido en compuestos terpénicos. Los resultados han mostrado que una reducción drástica del reflujo en una etapa temprana del corazón de la destilación produce una fracción de destilado con una alta concentración en compuestos terpénicos.

Palabras clave: Bebidas Alcohólicas, Destilación, Aromas, Terpenos.

1. Introducción

La calidad organoléptica de los destilados de vino depende tanto de la materia prima como del proceso de destilación. Así, la variedad de uva empleada para elaborar el vino puede aportar compuestos varietales del aroma que caractericen el aroma del vino como por ejemplo los compuestos terpénicos de las uvas de Moscatel que aportan al vino aromas florales. Por otro lado, los sistemas de destilación clásicos tipo alambique *Charantais* presentan pocos grados de libertad en su operación y no permiten actuar sobre el proceso de destilación. Una alternativa para mejorar el control de la destilación es el acoplamiento de una columna de rectificación de reflujo variable controlado por un refrigerante parcial de caudal variable (1).

Estudios previos del grupo de investigación han demostrado la capacidad de un destilador acoplado a una columna de rectificación (de reflujo variable) para la obtención de aguardientes con características diferenciadas con respecto a los obtenidos mediante destilación clásica. Así, Arrieta-Garay et al.(2-4) comparó los destilados obtenidos a partir de orujos de uva y fermentados de zumo de pera y kiwi mediante alambique y columna de destilación. Los resultados mostraron importantes diferencias en composición química y en características organolépticas, siendo, en general, los productos de destilación en columna mejor valorados por los catadores. Sin embargo, el sistema de destilación con columna de

reflujo variable podría permitir un control de la composición del destilado en las diferentes etapas de la destilación con el objetivo de concentrar ciertos componentes en determinadas fracciones del destilado.

El objetivo de este estudio es la obtención de destilados o fracciones de destilados con características aromáticas específicas (notas florales) mediante el empleo de estrategias de destilación basadas en la variación de reflujo de una columna equipada con un refrigerante parcial de caudal variable.

2. Material y métodos

Sistema de destilación: Para realizar este estudio se ha dispuesto de un sistema de destilación a escala piloto que consta de un destilador de 50 litros acoplado a una columna de relleno (10 cm de malla de cobre) con un condensador interno parcial de caudal variable que permite modificar/variación el reflujo interno de la columna durante el proceso de destilación.

Estrategias de destilación y análisis: Se utilizó un vino de Macabeo enriquecido con terpenos comerciales de grado alimentario (4 mg/L para los terpenos limoneno, linalol y α -terpineol, y 6 ml/L para los terpenos β -citronelol, geraniol y nerol). Se destilaron 25 litros de vino y se recogieron 3.5 L de destilado en 13 fracciones. En la **Tabla 1** se muestran los caudales de refrigeración parcial de las dos estrategias evaluadas (STR-1 y STR-2) y los grados alcohólicos de cada una de las fracciones destiladas. Las destilaciones se realizaron por duplicado. El grado alcohólico se determinó por densimetría electrónica (Anton Para DSA 5000M). Los compuestos volátiles de los destilados fueron analizados mediante inyección directa de las muestras (ajustadas a 40 v/v) en un cromatógrafo de gases (GC-FID).

Tabla 1. Estrategias de destilación

Fracción	Volumen fracción [mL]	Estrategia-1		Estrategia-2	
		Caudal de refrigeración parcial [mL/min]	Grado alcohólico [v/v]	Caudal de refrigeración parcial [mL/min]	Grado alcohólico [v/v]
F1	100	100	83.3±0.2	180	83.1±0.5
F2	100	100	87.0±0.3	120	89.3±0.6
F3	300	50	87.0±0.9	100	90.5±0.4
F4	300	75	88.8±0.4	25	79.3±1.5
F5	300	100	90.5±0.1	15	70.4±1.5
F6	300	50	84.8±0.4	50	82.0±0.6
F7	300	25	69.9±0.9	15	66.6±0.3
F8	300	50	74.7±0.4	25	66.8±1.4
F9	300	25	61.8±0.6	50	74.0±1.1
F10	300	75	76.0±2.8	75	82.5±2.4
F11	300	50	59.0±1.8	25	53.4±3.0
F12	300	25	38.8±1.5	75	70.6±0.9
F13	300	0	20.4±1.0	0	23.6±3.8

3. Resultados

Los resultados obtenidos para los 6 terpenos estudiados se muestran en la **Figura 1**. Como se puede observar, los contenidos de los terpenos en las primeras fracciones del destilado fueron menores en los casos en los que el caudal de refrigeración parcial fue mayor, logrando así una menor pérdida de estos compuestos en la cabeza de destilación. La única excepción fue el limoneno debido probablemente a que es el terpeno más volátil. Además, se puede observar que la disminución del reflujo en determinadas zonas del corazón de la destilación permite obtener fracciones con alto contenido en terpenos. En particular, la estrategia 2 (STR-2), con valores de caudal de refrigeración parcial de 50, 25 y 15 ml/min entre

los volúmenes de destilado de 500 a 1400 ml generó fracciones con alto contenido en terpenos y con características organolépticas donde la nota floral se percibió.

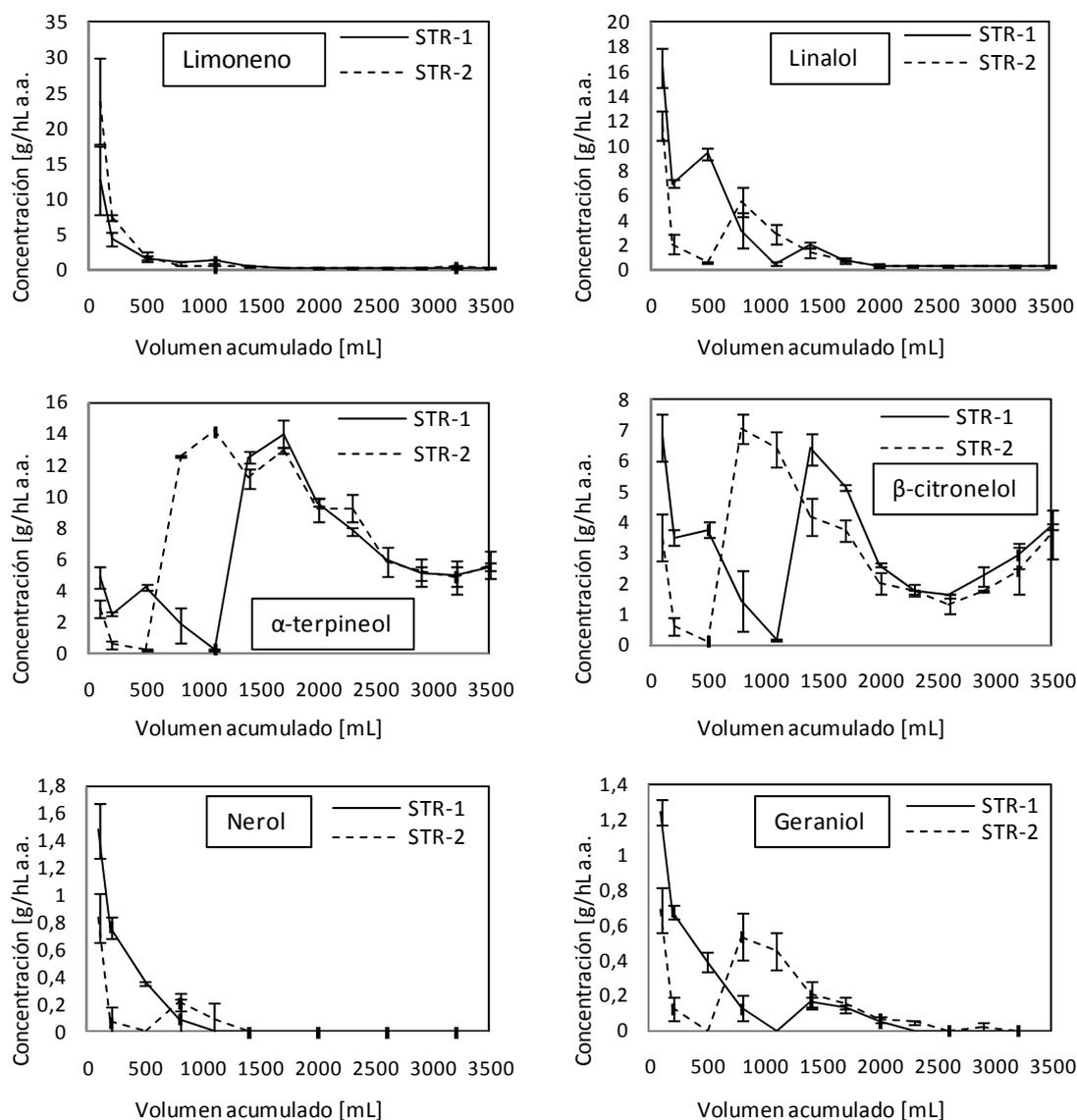


Figura 1: Contenido de terpenos en cada fracción para cada estrategia de destilación.

En función de los resultados obtenidos y del análisis sensorial de las fracciones, se separó como fracción de cabeza del destilado los 500 primeros mL, y como fracción corazón un volumen de 2700 mL (desde 500 a 3200 mL de destilado). A su vez, el corazón se dividió en dos sub-fracciones: CR-1 (desde 500 a 1700 mL de destilado) y CR-2 (de 1700 a 3200 mL de destilado). En la **Tabla 2** se muestran los porcentajes de terpenos y del total de compuestos de cabeza y de cola (en relación a la cantidad total destilada) presentes en las fracciones de cabeza y corazón. Como se puede observar, la sub-fracción CR-1 mostró, para la STR-2, mayores porcentajes de terpenos y menores de compuestos de cabeza que la STR-1. Además, los valores de los compuestos de cola en CR-1 fueron mucho menores que en la sub-fracción CR-2, lo que puede permitir obtener una fracción destilado CR-1 con un marcado carácter floral y libre de notas propia de las colas de destilación.

Tabla 2. Porcentajes máxicos de cada fracción en relación a la cantidad total destilada.

	Cabeza		Corazón		CR-1		CR-2	
	STR-1	STR-2	STR-1	STR-2	STR-1	STR-2	STR-1	STR-2
Limonene	60.1±1.9 a	79.9±1.8 b	39.9±1.9 b	20.1±1.8 a	29.1±1.9 b	10.8±0.9 a	10.7±0.0	9.3±1.0
Linalol	69.6±5.1 b	32.6±1.4 a	30.4±5.1 a	67.4±1.4 b	26.2±5.5 a	59.3±2.4 b	4.2±0.4 a	8.0±1.0 b
α-terpineol	11.6±0.1 b	2.0±0.4 a	88.4±0.1 a	98.0±0.4 b	45.0±1.0 a	59.9±0.9 b	43.4±1.1 b	38.1±0.4 a
β-citronelol	26.5±0.7 b	5.3±1.0 a	73.5±0.7 a	94.7±1.0 b	44.7±3.2 a	67.6±1.7 b	28.8±2.4	27.1±2.7
Nerol	89.2±15.3	54.1±7.4	7.9±11.2	45.9±7.4	7.9±11.2	45.9±7.4	n.d.	n.d.
Geraniol	69.8±6.7 b	17.2±0.4 a	30.2±6.7 a	82.8±0.4 b	27.4±6.6 a	76.3±0.9 b	2.8±0.1	6.5±1.3
Terp ^a	32.5±1.7 b	15.7±1.2 a	67.5±1.7 a	84.3±1.2 b	39.1±2.7 a	55.9±0.0 b	28.4±1.0	28.4±1.2
CCB ^b	57.8±1.1 a	70.2±3.3 b	42.2±1.1 b	29.8±3.3 a	28.3±1.3 b	13.1±2.2 a	14.0±2.4	16.7±1.2
CCL ^c	1.1±0.1	0.9±0.5	98.9±0.1	99.1±0.5	13.2±0.3 a	24.8±2 b	85.8±0.4 b	74.3±1.5 a
Grado alcohólico ^d	86.2±0.4 a	88.8±0.4 b	71.6±0.2 b	71.7±0.7 a	83.5±0.5 b	74.6±1.0 a	62.1±0.0 a	69.5±1.8 b

^a compuestos terpénicos indicados en la tabla. ^b compuestos de cabeza (acetaldehído, acetato de metilo, acetal, acetato de etilo y metanol). ^c compuestos de cola (furfural, lactato de etilo y β-feniletanol). ^dGrado alcohólico expresado en % de alcohol (v/v). Letras diferentes indican diferencias significativas entre estrategias (p<0.05). n.d: no detectado.

4. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que el empleo de una columna de destilación equipada con un refrigerante parcial que controle el reflujo interno de la columna puede permitir obtener sub-fracciones en el corazón del destilado con características organolépticas diferenciadas y con mayor impacto sensorial.

5. Bibliografía

- García-Llobodanin, L., Roca, J., López, J. R., Pérez-Correa, J. R., López, F. 2011. The lack of reproducibility of different distillation techniques and its impact on pear spirit composition. *In: Int. J. Food Sci. Technol.* 46, 1956–1963.
- Arrieta-Garay, García-Llobodanin, L., Perez-Correa, J.R., López-Vazquez, C., Orriols, I. López, F. 2013. Aromatically enhanced pear distillates from blanquilla and conference varieties using a packed column. *In: J. Agric. Food Chem.* 61, 4936-4942.
- Arrieta-Garay, Y., López-Vazquez, C., Blanco, P., Perez-Correa, J.R., Orriols, I. López, F. 2014. Kiwi spirits with stronger floral and fruity characters were obtained with a packed column distillation system. *In: J. Ins. Brewing.* 120, 111-118.
- Arrieta-Garay, Y., Blanco, P., López-Vazquez, C., Rodriguez-Bencomo, J.J., Perez-Correa, J.R., López, F., Orriols, I. 2014. Effects of distillation system and yeast strain on the aroma profile of albariño (*Vitis vinifera* L.) grape pomace spirits. *In: J. Agric. Food Chem.* 62, 10552-10560

6. Agradecimientos

J.J.R.B. agradece la beca del programa “Beatriu de Pinós” con el soporte del Secretariat d’Universitats i Recerca del Departament d’Economia i Coneixement de la Generalitat de Catalunya y la Unión Europea.

OT09 - REVALORIZACIÓN DE LAS PEPITAS DE ORUJO DE MENCÍA MEDIANTE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS/GRAVEDAD

Matías Bas^{1,2}, Enma Conde³, Herminia Domínguez², Elena Falqué^{1*}

¹ Universidad de Vigo, Facultad de Ciencias, Depto. Química Analítica, As Lagoas s/n, 32004 Ourense, España

² Universidad de Vigo, Facultad de Ciencias, Depto. Ingeniería Química, As Lagoas s/n, 32004 Ourense, España

³ GLECEX S.L., Edificio CEI, Parque Tecnológico de Galicia s/n, 32900 San Cibrao das Viñas, Ourense, España
efalque@uvigo.es

RESUMEN:

En este trabajo, se ha aplicado la técnica extractiva de Microondas por Hidrodifusión y Gravedad (MHG) a pepitas obtenidas del orujo de la variedad Mencía tras la fermentación alcohólica. En el hidrolato obtenido, se analizaron, por triplicado, los compuestos fenólicos, la capacidad antioxidante y la composición volátil por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS); así como una evaluación olfativa. También se hizo una microscopía electrónica del extracto resultante tras la extracción. Los resultados obtenidos muestran que los hidrolatos poseen bajos valores de contenido fenólico y de capacidad antioxidante, aunque unos intensos y agradables aromas que pueden ser empleados para diversas aplicaciones.

Palabras clave: Pepitas, Mencía, fenoles, capacidad antioxidante, compuestos volátiles

1. Introducción

En la actualidad, una de las principales preocupaciones de la sociedad es la situación en la que se encuentra el Medio Ambiente. Cada vez estamos más concienciados de conseguir la meta del desarrollo sostenible; es decir, proteger y preservar el Medio Natural para que las futuras generaciones puedan disfrutarlo y aprovechar los recursos que este nos proporciona. Por eso, es cada vez más importante disminuir la cantidad de residuos que producimos.

La uva es uno de los principales cultivos de frutas a nivel mundial, y por ello, cada día aumenta la cantidad de desechos producto de diversas actividades agroindustriales, lo que hace necesario el desarrollo de nuevas estrategias de manejo adecuadas a fin de evitar problemas de contaminación ambiental [1]. Los biorresiduos resultantes de la elaboración del vino suponen una fuente de compuestos químicos que, puestos en valor, podrían ejercer un impacto económico y medioambiental positivo [2].

La industria vitivinícola forma parte de una de las principales actividades agroindustriales de la Comunidad Autónoma de Galicia, con varias Denominaciones de Origen (D.O.), con cultivo en, aproximadamente, 9.135 ha de terreno. Este sector no sólo aporta importantes beneficios económicos a la Comunidad gallega sino que, además, genera grandes cantidades de residuos que deberían ser procesados.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la posibilidad de aprovechamiento y revalorización de los residuos generados en el sector vitivinícola (concretamente orujo), con el fin de reducir la contaminación ambiental, empleando, además, una tecnología 'verde', limpia

y responsable con el Medio Ambiente, como es la técnica de extracción por Hidrodifusión asistida por Microondas/Gravedad.

2. Material y métodos

Muestras: El orujo de uva utilizado en este trabajo estaba constituido por hollejos, pulpas, pepitas y escobajos de la variedad Mencía, proporcionado por una bodega de la Denominación de Origen Ribeiro tras la fermentación alcohólica del vino. Se separaron las pepitas y se almacenaron congeladas hasta su utilización.

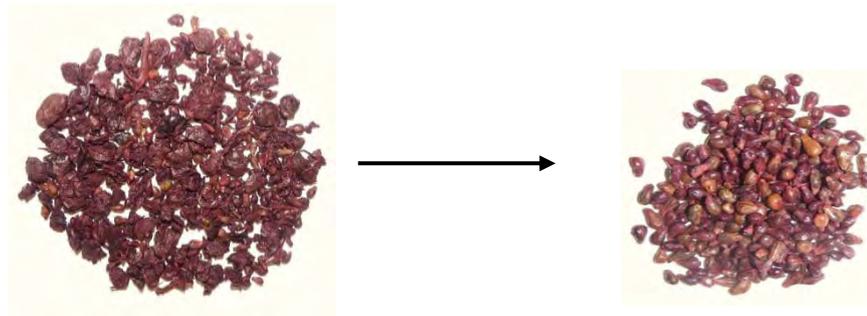


Imagen 1. Muestra de orujo inicial ("fresco"): pepitas (derecha).

Extracción asistida con Microondas por Hidrodifusión y Gravedad (MHG): Se ha utilizado un microondas que permite realizar la hidrodifusión del material vegetal que se pretende analizar sin añadir ningún tipo de disolvente, a presión atmosférica, mediante el empleo de radiación microondas y la fuerza de la gravedad [3].

Tras previa optimización de la potencia de irradiación, a 100 g de la muestra de pepitas se les aplicó la potencia de 25 W, durante 344 minutos, y se recogieron 35 mL de hidrolato, que se conservó a temperatura de refrigeración hasta su posterior análisis.

Compuestos fenólicos: La cantidad de fenoles totales se determinó con el reactivo de Folin-Ciocalteu mediante el método descrito por Singleton & Rossi [4] y lectura de la absorbancia a 765 nm.

Capacidad antioxidante: Para determinar la capacidad antioxidante se emplea el método de equivalentes en Trolox o TEAC, el cual permite cuantificar la actividad antirradicalaria de compuestos antioxidantes presentes en las sustancias analizadas mediante una reacción química y registrando los valores de absorbancia a una longitud de onda de 734 nm [5].

Compuestos volátiles: Los compuestos volátiles fueron obtenidos por extracción líquido-líquido con diclorometano, concentrados a 0,5 mL bajo nitrógeno e inyectados en un cromatógrafo Hewlett Packard equipado con una columna HP-Innowax (50 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Las distintas sustancias volátiles fueron identificadas a través de los espectros de la librería WILEY 7N y por comparación con las sustancias puras.

Análisis sensorial: La valoración aromática del hidrolato fue llevada a cabo, de manera cualitativa, por varios analistas experimentados, donde se expusieron el máximo número de

descriptores aromáticos generados por la muestra, poniendo en común todos aquellos que más caracterizaban a la extracción y ordenándolos en función de su intensidad.

3. Resultados

Compuestos fenólicos: El hidrolato procedente de la extracción de las pepitas de orujo mediante MHG presentó un contenido fenólico de 1,49 g GAE/100 g pepitas. Sin embargo, al referirlo al extracto, las pepitas permiten obtener hidrolatos con un 0,04 % en compuestos fenólicos, muy inferiores al 0,5 % cuantificado por Baydar *et al.* [6] en los extractos obtenidos mediante Soxhlet de diferentes partes de la uva de las variedades Cabernet Sauvignon, Kalecik Karası y Narince.

Capacidad antioxidante: El hidrolato obtenido a partir de las pepitas presentó un valor de 0,31 mM de Trolox/100 g pepitas. Baydar *et al.* [7] afirmaron que los extractos de uva son fuentes de antioxidantes naturales excelentes, encontrando que los mayores niveles de antioxidantes se encuentran en la piel y pepita, seguida del bagazo y la pulpa.

Compuestos volátiles: Los perfiles aromáticos de la muestra inicial y del hidrolato obtenido mediante MHG son similares (Figura 1), aunque ciertos compuestos sólo se detectaron en el hidrolato procedente del MHG, como por ejemplo, piruvato de etilo, lactato de metilo, malonato de dietilo, 2-hidroxivalerato de etilo y acetato de 4-feniletilo, dentro de la familia de los ésteres, o los ácidos 2-etil-hexanoico y heptanoico.

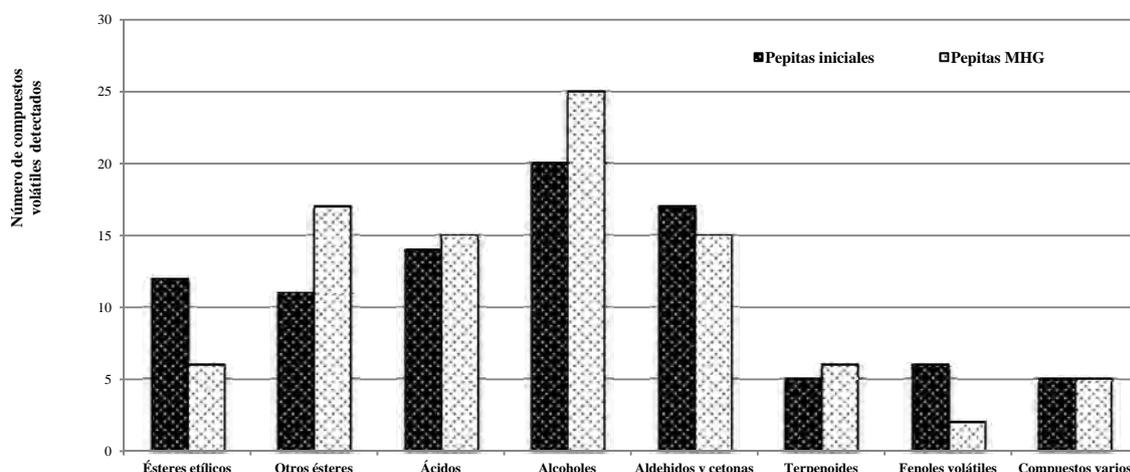


Figura 1. Número de compuestos volátiles, agrupados por familias, identificados en ambos tipos de muestras de pepitas.

En el caso de los alcoholes, los compuestos presentes exclusivamente en la muestra de MHG son 2-hexanol, 2-etil-1-hexanol, furfuro, 2-fenil-2-propanol, dodecanol, tetradecanol y 2-fenoxi-etanol, y algunos aldehídos o cetonas, como furfural y 2-fenil-2-butenal, o la 2,3-butanodiona. La mayoría de los terpenoides que se hallaron en la muestra obtenida mediante MHG tampoco fueron detectados en la muestra inicial de pepitas; entre ellos se encuentran citronelol, isopulegol, cumenol y dihidrojasmonato de metilo, que pudiera ser debido a que

con el tratamiento con MHG se alcanzaron temperaturas en torno a 50°C, y que se hubiese facilitado la extracción de los mismos.

Análisis sensorial: El perfil sensorial del hidrolato de las pepitas de orujo de Mencía fue descrito, por orden de intensidad, por aromas afrutados, relacionándose con olores que recuerdan a frutas maduras, como el melocotón o las uvas pasas. En segundo lugar, aparecen matices herbáceos o vegetales, que se vinculan con ligeros aromas a hierba seca. Finalmente, se manifiestan los aromas tostados y que se asocian con una amalgama de cacao, chocolate, caramelo y 'toffee'.

4. Conclusiones

El tratamiento de las pepitas procedentes de orujo de la variedad Mencía mediante esta técnica extractiva 'verde' ha permitido obtener un hidrolato que, si bien presenta menor contenido en sustancias volátiles que las pepitas iniciales, también han sido identificados otros compuestos no presentes, al menos a nivel detectable, en la muestra inicial, por lo que podría ser aplicado en diferentes industrias (alimentaria, cosmética, etc.) como aromatizante.

5. Bibliografía

1. Cegarra, J.; Alburquerque, J.A.; González, J.; Tortosa, G.; Chaw, D. 2006. Effects of the forces ventilation on composting on a solid olive-mill by-product ("alperujo") managed by mechanical turning. *Waste Manage.*, 26, 1377-1383.
2. Berradre, M.; Mejías, M.; Ferrer, J.; Chandler, C.; Páez, G.; Mármol, Z.; Ramones, E.; Fernández, V. 2009. Fermentación en estado sólido del desecho generado en la industria vinícola. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 26, 398-422.
3. Abert Vian, M.; Fernández, X.; Visinoni, F.; Chemat, F. 2008. Microwave hydrodiffusion and gravity: a new technique for extraction of essential oils. *J. Chromatogr. A*, 1190(1-2), 14-17.
4. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144-158.
5. Miller, N.J.; Rice-Evans, C.A. 1995. Antioxidant activity of resveratrol in red wine. *Clin. Chem.*, 41, 1778-1789.
6. Baydar, N.G.; Babalik, Z.; Türk, F.H.; Çetin, E.S. 2011. Phenolic composition and antioxidant activities of wines and extracts of some grape varieties grown in Turkey. *J. Agric. Sci.*, 17, 67-76.
7. Baydar, N.G.; Özkan, G.; Yasar, S. 2007. Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control*, 18, 1131-1136.

OT10 - LA EXPOSICIÓN DE LA CAVIDAD ORAL A VINOS DE DIFERENTE COMPOSICIÓN NO VOLÁTIL CAMBIA LA COMPOSICIÓN DE LA SALIVA Y AFECTA A LA LIBERACIÓN INTRAORAL DE AROMA EN CONDICIONES IN VIVO

Esteban-Fernández A., Martín-Alvarez P.J., Moreno-Arribas M. V., Pozo-Bayón M.A.
Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC-UAM, Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos, c/ Nicolás Cabrera 9, 28049, Madrid
m.delpozo@csic.es

RESUMEN:

Palabras clave: *liberación de aroma, cavidad oral, saliva, matriz del vino, persistencia*

La liberación intraoral del aroma puede estar relacionada con la persistencia del aroma de los vinos, una propiedad importante en su definición de calidad. Para comprobar si esta capacidad se ve afectada por los cambios que se producen en la composición de la saliva tras la exposición de la cavidad oral al vino, en este trabajo se han empleado condiciones *in vivo* para evaluar mediante la técnica de intra oral HS-SPME la cantidad de aroma liberado en la cavidad oral de tres individuos tras la administración de vinos aromatizados con seis compuestos odorantes y diferente composición no volátil (blanco, tinto joven y tinto crianza). A su vez, se ha comprobado su relación con los cambios que se producen en la composición de la saliva (flujo, pH, proteínas y polifenoles). Los resultados señalan diferencias interindividuales en la cantidad del aroma liberado que podrían estar relacionadas con las diferencias en el contenido de proteínas totales y la disminución en el pH de la saliva que son más importantes en el caso de la exposición a los vinos tinto joven y blanco. Estos resultados indican la importancia de considerar tanto los factores composicionales del vino como los fisiológicos (saliva) para explicar la persistencia y percepción prolongada del aroma tras el consumo.

1. Introducción

Se ha comprobado que la saliva puede influir la composición del aroma retronasal a través de distintos efectos: dilución, por interacciones entre los compuestos del aroma y constituyentes de la saliva (proteínas), por su actividad enzimática o por su capacidad amortiguadora del pH entre otras. En el caso del vino, sin embargo, hay escasos trabajos científicos encaminados a evaluar el efecto de la saliva en el aroma. Por otro lado, los pocos resultados que existen, muestran resultados contradictorios. Por ejemplo, Mitropoulou et al. [1] en vinos modelo suplementados con taninos observaron un aumento en la liberación de compuestos hidrofóbicos y una disminución de los más hidrofílicos en presencia de saliva. Por su parte, Genovese et al. [2] encontraron una disminución de la mayoría de compuestos volátiles en presencia de saliva en vinos blancos y tintos. Más recientemente, Muñoz-González et al. [3] en un estudio sistemático empleando condiciones de espacio de cabeza estático y dinámico, evaluaron el papel de la saliva y su composición en la liberación de más de cuarenta

compuestos representativos del perfil volátil del vino. En este estudio, se comprobó que en condiciones estáticas, los vinos suplementados con saliva humana a diferencia de los suplementados con saliva artificial, liberaban menor cantidad de compuestos de aroma, y este efecto era mayor en vinos tintos que en vinos blancos. A pesar del valor de este tipo de estudios, se desconoce si en condiciones *in vivo*, existe una relación entre los cambios de composición de la saliva tras el consumo de vino y la liberación del aroma en la cavidad oral y del efecto que la composición de la matriz no volátil podría ejercer en el aroma intraoral liberado.

Por tanto, el objetivo del presente trabajo ha sido comprobar si la exposición de vinos de diferente composición no volátil (blanco, tinto joven y tinto crianza) a la cavidad oral cambia la composición de la saliva y afecta a la liberación intraoral de aroma en condiciones *in vivo*

2. Material y métodos

Para este estudio, se emplearon tres tipos de vinos, un vino blanco, un vino tinto joven (2013) y un vino tinto de crianza (2007) Todos los vinos fueron aromatizados con una solución de compuestos de aroma (acetato de etilo, hexanoato de etilo, linalol, guayacol, β -feniletanol y β -ionona) a una concentración de 1mg/L.

La monitorización del aroma liberado en la cavidad oral se realizó mediante la técnica de HS-SPME intra-oral aroma release recientemente desarrollado en el laboratorio [4]. Brevemente, el procedimiento consiste en la administración de un volumen de vino en la cavidad oral del panelista (n= 3) con el que se enjuaga las superficies mucosas de la cavidad oral. Seguidamente el vino es expectorado y se introduce una fibra de SPME en la cavidad oral del panelista durante un tiempo definido de extracción. Finalmente, la fibra es desorbida en el inyector de un GC-MS. El procedimiento se realizó en triplicado empleando tres panelistas.

Además, se procedió a los análisis de la composición de la saliva. Para ello, la saliva de los tres panelistas se recogió en condiciones sin estimular (S-SE) y estimuladas (S-E), durante un tiempo específico. Se emplearon para ello tubos estériles que se pesaron para obtener el flujo de saliva. Además, tras el expectorado de las distintas muestras de vino se recogieron las salivas correspondientes a la exposición de la cavidad oral al vino blanco (S-B3), tinto joven (S-T1) y tinto crianza (S-T4). En todas las muestras se determinó el pH, el contenido de proteínas totales por el método de Bradford y el contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

3. Resultados

Con los datos obtenidos correspondientes a la liberación de los compuestos del aroma en la cavidad oral se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA). Como resultado, se obtuvieron dos PCs que explicaban más del 89% de la variabilidad observada en los datos. La PC1 estaba relacionada negativamente con los compuestos linalol (0.97), guayacol (0.94), β -phenylalcohol (-0.83) y β -ionona (-0.92). La segunda componente principal estaba relacionada con los dos ésteres, acetato de isoamilo (-0.95) y ethyl hexanoato (-0.76). La representación del aroma liberado de la cavidad oral tras la administración de los distintos vinos en cada panelista se muestra en la **figura 1**. En función de la PC1 se observan diferencias interindividuales en la liberación de aroma entre los individuos 2 y 3, respecto al individuo 1. Los dos primeros individuos, presentan valores positivos de PC1 y por tanto muestran en general, valores menores en la liberación de la mayoría de compuestos del aroma comparado con los mayores valores de liberación de estos compuestos que se observan en el individuo 1. Por otro lado, se observa que en función de la PC2, en el caso de los individuos 2 y 3, hay

diferencias en la liberación de aroma entre vinos tintos y blancos. De hecho, se observa que en el caso del vino tinto de crianza, los valores de PC2 son mayores, lo que está relacionado con una menor liberación de los dos ésteres isoamil acetato y acetato de isoamilo. La administración del vino tinto joven, induce sin embargo, una mayor liberación de estos compuestos. Estos resultados coinciden con trabajos recientes que indican una mayor retención de compuestos del aroma tras la administración de vinos con mayor contenido de polifenoles totales [3] y pone de manifiesto la importancia de este grupo de compuestos en la liberación del aroma tras el consumo de vino (persistencia del aroma).

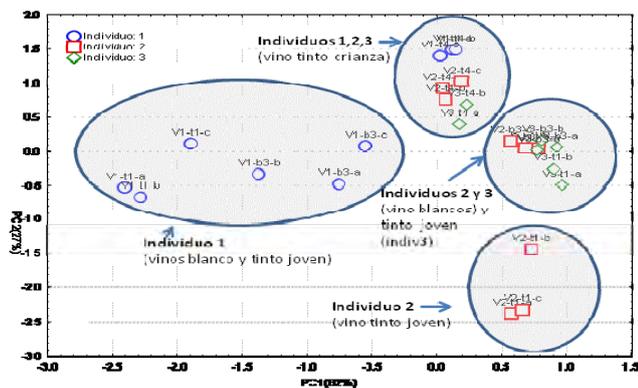


Figura 1. PCA obtenido con los datos de liberación intra oral de aroma tras la exposición de vinos de diferente composición a la cavidad oral de los individuos (n=3).

Para comprobar si los cambios observados en el perfil de liberación de aroma estaban relacionados con los cambios experimentados en la composición de la saliva tras la exposición de la cavidad oral a los vinos, se llevó a cabo la determinación del contenido de proteínas totales, polifenoles totales, pH y flujos de saliva antes y después de la exposición de la cavidad oral a los vinos. La **tabla 1** muestra los resultados para cada panelista. Tras la exposición de la cavidad oral a los vinos se produce un aumento en la cantidad de proteína (x2), observada tanto con los vinos tintos como con los blancos. Es interesante señalar que la cantidad de proteína total fue siempre menor en las salivas del individuo 1 que en el resto. Por otro lado, y como era de esperar, tras el enjuague con los vinos se produce un aumento en el contenido de polifenoles totales que es mayor en el caso de la exposición a vinos tintos. Además, se produce una disminución en el pH de la saliva de en general dos unidades (desde un pH neutro de 7). Resulta destacable la importante bajada de pH que se produce en la saliva del individuo 1, que es más evidente tras el enjuague con los vinos tinto joven y blanco (el pH de la saliva pasa de valores de 7-7,7 a 4.8). Estos cambios de pH son mucho menos importantes en los otros dos individuos, lo que indica una mayor capacidad tamponante de la saliva. Algunos trabajos han descrito un efecto de “salting out” o mayor liberación de aroma en soluciones de proteínas con una disminución del pH [5] lo que estaría de acuerdo con la mayor liberación de aroma observada en el individuo 1 (**figura 1**). También la menor concentración de proteínas determinada en este individuo, implicaría una menor capacidad de interacción con moléculas del aroma y por tanto permitiría una mayor liberación de aromas. Más aun, se ha comprobado que la interacción entre proteínas y compuestos de aroma se ve desfavorecida a valores de pH menores [5], que está de acuerdo con los resultados de liberación de aroma observados para el individuo 1. Sin embargo, otros parámetros como el flujo de saliva (mayor para el individuo 3), o el contenido de polifenoles remanentes en la saliva, no parecen explicar las variaciones interindividuales en la liberación de aroma de la cavidad oral.

Tabla 1. Cambios en la composición de la saliva (valores medios) de los tres individuos antes y después de la exposición de la cavidad oral a los distintos tipos de vinos.

Antes de la exposición oral al vino			Después de la exposición oral al vino		
Proteínas totales (mg BSA/L)					
Individuo	S-SE	S-E	S-T1	S-T4	S-B3
1	760,03	496,53	1193,90	1370,67	983,37
2	842,23	725,03	1490,57	1981,77	1319,57
3	1024,27	837,17	1270,17	1406,57	1196,90
Polifenoles totales (mg gálico /L)					
Individuo	S-SE	S-E	S-T1	S-T4	S-B3
1	0,00	0,00	62,57	72,02	43,05
2	0,00	0,00	73,95	73,95	38,00
3	0,00	0,00	49,57	72,99	42,10
pH					
Individuo	S-SE-a	S-E-a	S-T1-a	S-T4-a	S-B3-a
1	7,016	7,74	4,864	5,243	4,806
2	7,143	7,53	4,759	5,466	7,005
3	7,262	7,622	6,388	7,193	6,711
Flujo de saliva (g/min)					
Individuo	S-SE-a	S-E-a	S-T1-a	S-T4-a	S-B3-a
1	0,49	1,33	1,06	0,94	1,00
2	0,37	0,55	1,08	1,16	0,94
3	0,83	2,44	1,62	2,00	2,32

S-SE: saliva sin estimular; S-E: saliva estimulada; S-T1: saliva obtenida tras la exposición de la cavidad oral a un vino tinto joven; S-T4: saliva obtenida tras la exposición de la cavidad oral al vino tinto crianza; S-B3: saliva obtenida tras la exposición oral al vino blanco.

4. Conclusiones

Se ha confirmado la existencia de diferencias interindividuales en la liberación del aroma tras la exposición de la cavidad oral a vinos de distinta composición, lo que produce además cambios en la composición de la saliva de los individuos. La menor cantidad de proteínas en la saliva y la disminución del pH observada después de la exposición de la cavidad oral a vinos tintos jóvenes y blancos podrían estar relacionadas con la mayor liberación de aroma observada en algunos individuos.

5. Bibliografía

1. Mitropoulou, A., Hatzidimitriou, E., Paraskevopoulou, A. (2011). Aroma release of a model wine solution as influenced by the presence of non-volatile components. Effect of commercial tannin extracts, polysaccharides and artificial saliva. *Food Res. Int.* 44(5), 1561-1570.
2. Genovese, A., Piombino, P., Gambuti, A., Moio, L. (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(1), 100-107.
3. Muñoz-González, C., Feron, G., Guichard, E., Rodríguez-Bencomo, J. J., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V., & Pozo-Bayón, M. A. (2014). Understanding the Role of Saliva in Aroma Release from Wine by Using Static and Dynamic Headspace Conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(33), 8274-8288.
4. Esteban-Fernández A., Rocha-Albadillo N., Muñoz-González C, Moreno-Arribas M.V., Pozo-Bayón M.A. (2014) En: *Jornadas de Análisis Instrumental 2014*, Barcelona, Spain
5. Guichard, E. (2006). Flavour retention and release from protein solutions. *Biotechnology advances*, 24(2), 226-229.

6. Agradecimientos

Los autores agradecen al MINECO la financiación del proyecto AGL2012-40172-C02-01

OT11 - ESTUDIO DEL METABOLOMA FECAL TRAS EL CONSUMO MODERADO Y CONTINUADO DE VINO TINTO POR INDIVIDUOS SANOS

Ana M. Jiménez-Girón, Clara Ibáñez, Alejandro Cifuentes, Carolina Simó, Irene Muñoz-González, Pedro J. Martín-Álvarez, Begoña Bartolomé, M. Victoria Moreno-Arribas

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC-UAM. c/ Nicolás Cabrera 9, 28049, Madrid, España. victoria.moreno@csic.es

RESUMEN:

En la edición del Gienol 2013, presentamos los primeros resultados de un estudio de intervención en humanos sobre los efectos del consumo moderado de vino en algunos aspectos relacionados con la función intestinal, comprobando que el consumo de vino tinto producía un aumento significativo del contenido, en heces, de metabolitos procedentes de la degradación microbiana de los polifenoles del vino, lo que sugería que estos metabolitos podrían ejercer su acción protectora también en el lumen intestinal. En esta ocasión, presentamos los resultados del análisis completo del metaboloma fecal, es decir, del total de metabolitos presentes en las muestras fecales, antes y después del consumo moderado y continuado de vino tinto. Para ello, se desarrolló un método metabolómico no dirigido basado en el uso de UHPLC-TOF MS (cromatografía líquida de ultra presión acoplada a espectrometría de masas) que determinaba la masa exacta de las señales m/z detectadas. Tras el procesamiento de los datos y el análisis estadístico, se encontraron 37 compuestos relacionados con la ingesta de vino, de los cuales 20 pudieron identificarse tentativa o completamente en las heces, incluyendo: I) compuestos presentes en el vino, II) metabolitos microbianos derivados de los polifenoles del vino, y III) metabolitos endógenos y/o derivados de otras vías metabólicas de nutrientes. Tras el consumo de vino, el metaboloma fecal resultaba fortificado en metabolitos derivados de flavan-3-oles procedentes del vino. Además, fue relevante la regulación a la baja de la xantina y metabolitos derivados de la bilirrubina tales como urobilinógeno y estercobilina tras el consumo moderado de vino. Estos cambios en el perfil metabolómico en heces reflejaban, entre otros, cambios en la composición y actividad metabólica de los microorganismos intestinales como consecuencia del consumo moderado de vino. En nuestro conocimiento, este es el primer estudio del metaboloma fecal derivado de la ingesta de vino

Palabras clave: Ingesta moderada y regular de vino, Polifenoles, Microbiota colónica, Función intestinal Metaboloma fecal

1. Introducción

En los últimos años, ha habido gran aumento de la investigación relacionada con la bioactividad de los componentes de vino y, especialmente, de su biodisponibilidad en el cuerpo humano. Los efectos beneficiosos del consumo moderado de vino se han evidenciado principalmente en relación con las enfermedades cardiovasculares [2-4], así como con la menor incidencia de hipertensión, diabetes, y ciertos tipos de cáncer [1,5]. Más recientemente, algunos estudios de intervención han demostrado que el consumo de vino tinto puede promover la salud intestinal mediante la modulación selectiva de la microbiota intestinal, a través de las propiedades antimicrobianas o eventualmente 'prebióticas' de sus componentes y/o de los metabolitos derivados de ellos [6]. La mayoría de estos efectos se han atribuido a los polifenoles del vino, y existen numerosas evidencias que indican que los efectos

beneficiosos asociados con la ingesta de vino parecen deberse más a metabolitos fenólicos formados en el tracto gastrointestinal, especialmente por la acción de la microbiota colónica, que a las formas originales que se encuentran en los alimentos [8, 9]. Hasta ahora, se han desarrollado pocos estudios de intervención para evaluar el impacto metabólico del consumo moderado de vino en la orina y en el plasma [10, 11]. Jacobs et al. [12] han estudiado el metaboloma fecal en voluntarios sanos que siguieron una dieta rica en polifenoles a partir de zumo de uva combinado con un extracto de vino en un período de 4 semanas. En un esfuerzo por mejorar nuestra comprensión sobre los efectos biológicos que los compuestos fenólicos (incluyendo polifenoles del vino tinto) ejercen a nivel intestinal, en este trabajo hemos llevado a cabo la caracterización del metaboloma de heces humanas antes y después del consumo moderado de vino tinto por sujetos sanos durante 4 semanas.

2. Material y métodos

2.1. Vino tinto

Para el estudio de intervención, se seleccionó un vino tinto joven (Pinot Noir, vendimia 2010) (Miguel Torres, S.A.) con un contenido de polifenoles totales de 1.758 mg de equivalentes de ácido gálico/L. Otros parámetros químicos fueron: grado alcohólico, 13.8% v/v; pH, 3.52; acidez total, 6.45 g de ácido tartárico/L; y acidez volátil, 0.56 g de ácido acético/L.

2.2. Diseño del estudio de intervención

Se diseñó y organizó un estudio de casos y controles con 41 voluntarios sanos (33 casos y 8 controles). Para ello, se seleccionó una población homogénea de edad, sin enfermedades de base, no fumadores, con una edad comprendida entre 20-65 años y de ambos sexos.

El estudio consistió en dos periodos, un período de lavado (2 semanas) en el que se restringió el consumo de alimentos ricos en polifenoles, y otro período de intervención (4 semanas) con vino (Figura 1) [13]. Los 8 sujetos controles siguieron las mismas pautas que los voluntarios, con la excepción de que no ingirieron el vino durante los 28 días de intervención.



Figura 1. Esquema del protocolo del estudio de intervención.

2.3. Preparación de las soluciones fecales

Para la preparación de las soluciones fecales, se pesó 1 g de heces en tubos falcón de 15 mL. Se añadieron 10 mL de solución salina estéril y se agitó con el vórtex hasta su homogeneización. La mezcla se centrifugó (10.000 rpm, 10 min, 4°C) hasta que el sobrenadante quedara visualmente limpio. Finalmente, se filtró (0,22 µm) y se diluyó con acetonitrilo (1:4, v/v, acetonitrilo/solución fecal) antes del análisis metabólico por UHPLC-TOF MS.

2.4. Análisis metabólico y procesado de datos

Las muestras fecales obtenidas al inicio del estudio (muestras basales) y después de la ingesta de vino (muestras finales) se analizaron mediante UHPLC-Q/TOF MS según el método desarrollado por Jiménez-Girón et al [14], que determina la masa exacta de las señales m/z detectadas. El procesamiento de los datos se realizó con el software MZmine (versión 2.7.2).

2.5. Análisis estadístico

Los métodos estadísticos utilizados para el análisis de los datos fueron el test de Shapiro Wilk para verificar la distribución normal de los datos; t-test para muestras dependientes y su correspondiente Wilcoxon no paramétrico para detectar metabolitos significativamente diferentes atribuibles al consumo de vino; y el análisis de componentes principales (PCA), a partir de la matriz de correlación, para estudiar la variabilidad entre las muestras y los metabolitos y las posibles tendencias de las variables debido al consumo de vino. Se fijó el valor de $p = 0,05$ para el nivel de significación de las pruebas. Se utilizó el programa STATISTICA para Windows, versión 7.1 (Statsoft Inc., 1984 2006, www.statsoft.com).

3. Resultados

El metaboloma fecal contiene información acerca de los metabolitos que se encuentran en el intestino, muchos ellos derivados del metabolismo de la microbiota intestinal. Los cambios en el perfil metabolómico en heces reflejan, entre otros, cambios en la composición y actividad metabólica de los microorganismos intestinales. Muchas de estas actividades metabólicas son aún desconocidas y están pobremente caracterizadas.

Se ha desarrollado un método metabolómico no dirigido basado en el uso de UHPLC-TOF MS para lograr la máxima información acerca del perfil de metabolitos en 82 muestras fecales humanas. Tras el procesamiento de los datos y el análisis estadístico, se encontraron 37 compuestos relacionados con la ingesta de vino, de los cuales 20 pudieron ser tentativa o completamente identificados, incluyendo: I) compuestos presentes en el vino, II) metabolitos microbianos derivados de los polifenoles del vino, y III) metabolitos endógenos y/o derivados de otras vías metabólicas de nutrientes. Entre los compuestos presentes en el vino, cabe destacar el ácido 2-metilbutírico, previamente reportado en heces. Tras el consumo de vino, el metaboloma fecal también se fortificó en metabolitos derivados de los polifenoles del vino, en concreto, de flavan-3-oles. Igualmente, el estudio metabolómico permitió la identificación de diversos metabolitos derivados de rutas metabólicas de nutrientes no fenólicos y metabolitos de origen endógeno. Así, se identificó el ácido glutárico, procedente del metabolismo de aminoácidos como lisina y triptófano, aunque también se ha descrito su producción por parte de bacterias anaerobias intestinales. Relacionado con el metabolismo de lípidos, se encontró que el consumo de vino condujo a una mayor respuesta del metil éster del ácido docosahexaenoico (DHA), que es un ácido graso poliinsaturado omega-3.

Entre los metabolitos identificados de origen endógeno, cabe destacar la xantina, base purínica que participa como metabolito intermediario en la degradación del adenosín monofosfato en ácido úrico por acción de la xantina oxidasa (XO), cuya respuesta disminuía tras el consumo de vino, lo que concuerda con el efecto potencialmente inhibitorio reportado para algunos polifenoles del vino, como flavonoides y resveratrol, frente a la enzima xantina oxidasa, reportado por otros autores [15]. Otros metabolitos endógenos significativos procedían de la degradación de la bilirrubina, en concreto, urobilinogeno y estercobilina (derivada del anterior). La disminución de la respuesta de estos metabolitos tras el consumo de vino se atribuyó a un posible efecto modulador de los polifenoles del vino (y/o sus metabolitos) inhibiendo el crecimiento de bacterias del género *Clostridium* spp., que parece que están implicadas en la degradación microbiana de bilirrubina en urobilinogeno. Es decir, de alguna forma, todos estos indicios sugieren que muchos de los cambios observados en el metaboloma fecal como consecuencia del consumo moderado de vino pueden derivarse a cambios en la composición y/o funcionalidad de la microbiota intestinal, quizás promovidos a su vez por el metabolismo de los polifenoles del vino.

4. Conclusiones

En nuestro conocimiento, este estudio ha sido el primero en la literatura que ha mostrado el perfil metabolómico en heces humanas derivado del consumo de vino tinto. Los resultados sugieren que algunos compuestos del vino llegan intactos a las heces mientras que otros son generados por la microbiota intestinal a partir de los precursores fenólicos del vino. Además, aporta información muy novedosa acerca del impacto del consumo de vino sobre otras rutas metabólicas de nutrientes no fenólicos relacionadas, en mayor o menor medida, con la actividad metabólica de bacterias intestinales.

5. Bibliografía

1. M. A. Pozo-Bayón, M. Monagas, B. Bartolomé, M. V. Moreno-Arribas, (2012) *Crit Rev Food Sci Nutr.* 52, 34-54
2. G. Avellone, V. Di Garbo, D. Campisi, R. De Simone, G. Raneli, R. Scaglione, G. Licata, *Eur. J. (2006) Clin. Nutr.* 60, 41-47
3. H. Li, U. Foerstermann, (2012) *Circ. Res.* 111, 959-961
4. G. Chiva-Blanch, S. Arranz, R. M. Lamuela-Raventos, R. Estruch, R. (2013) *Alcohol.* 48, 270-277
5. S. Arranz, G. Chiva-Blanch, P. Valderas-Martínez, A. Medina-Remón, R. M. Lamuela-Raventós, R. Estruch, R. (2012) *Nutrients.* 4, 759-781
6. M. I. Queipo-Ortuño, M. Boto-Ordóñez, M., Murri, J. M. Gómez-Zumaquero, M. Clemente-Postigo, R. Estruch, F. Cardona Díaz, C. Andrés-Lacueva, F. J. Tinahones, (2012) *Am. J. Clin. Nutr.* 95, 1323-1334
7. M. Monagas, M. Urpi-Sarda, F. Sánchez-Patán, R. Llorach, I. Garrido, C. Gómez-Cordovés, C. Andrés-Lacueva, B. Bartolome, (2010) *Food Funct.* 1, 233-253
8. A. Aura, (2008) *Phytochem. Rev.* 7, 407-429
9. M. V. Selma, J. C. Espín, F. A. Tomás-Barberán, (2009) *J. Agric. Food Chem.* 57, 6485-6501
10. R. Vázquez-Fresno, R. Llorach, F. Alcaro, M. A. Rodríguez, M. Vinaixa, M., G. Chiva-Blanch, R. Estruch, X. Correig, C. Andrés-Lacueva, *Electrophoresis*, 33, 2345-2354 (2012)
11. D. M. Jacobs, J. C. Fuhrmann, F. A. van Dorsten, D. Rein, S. Peters, E. J. J. van Velzen, B. Hollebrands, R. Draijer, J. van Duynhoven, U. Garczarek, U. *J Agric Food Chem.* 60, 3078-3085 (2012)
12. D. M. Jacobs, N. Deltimple, E. van Velzen, F. A. van Dorsten, M. Bingham, E. E. Vaughan, J. van Duynhoven, *NMR Biomed.* 21, 615-626 (20089)
13. I. Muñoz-González, A. Jiménez-Girón, P. J. Martín-Álvarez, B. Bartolomé, M. V. Moreno-Arribas, *J Agric Food Chem.* 61, 9470-9479 (2013)
14. A. Jiménez-Girón, Ibáñez, C., Cifuentes, A., Simó, C.; Muñoz-González, I.; Martín-Álvarez, P.J.; Bartolomé, B.; Moreno-Arribas, M.V. (2015) *J. Prot. Res.* 14, 897-905
15. S. L. Da Silva, A. Da Silva, K. M. Honório, S. Marangoni, M. H. Toyama, A. B. F. Da Silva, *J Mol Struc-Theochem.* 684, 1-7 (2004)

6. Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación recibida del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) a través del proyecto AGL2012-40172-C02-01, así como a la bodega Miguel Torres S.A. que ha proporcionado el vino del estudio. A. J.-G. e I. M.-G., agradecen las ayudas JAE-CSIC y Programa FPI, respectivamente.

OT12 - ACEPTABILIDAD DE VINOS CABERNET SAUVIGNON Y MERLOT CHILENOS: ESTUDIO DE CONSUMIDORES

Alejandro Cáceres-Mella¹, Jaime Narváez Bastías², Álvaro Peña-Neira²

¹Laboratorio de Fisiología del Estrés en Plantas, Departamento de Producción Agrícola, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile (Av. Santa Rosa 11315, La Pintana, casilla 1004, Santiago, Chile)

²Departamento de Agroindustria y Enología, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile (Av. Santa Rosa 11315, La Pintana, casilla 1004, Santiago, Chile)

alecaceres@uchile.cl

RESUMEN:

La aceptabilidad de un vino depende de diversos factores, entre estos sus características químicas, precio, premios y otros sujetos a la individualidad de cada persona y sus preferencias. En el último tiempo los compuestos fenólicos inciden mayormente en la calidad del vino, especialmente las proantocianidinas. Esto ya que modulan características como la astringencia, que se considera uno de los atributos sensoriales más importantes en vinos tintos. Es por esta razón, que el objetivo de este trabajo fue conocer la influencia de la composición fenólica de los vinos, en cuanto a la concentración y proporción de proantocianidinas, sobre la aceptabilidad de vinos comerciales chilenos de Cabernet Sauvignon (CS) y Merlot (ME). Se utilizaron 18 vinos comerciales para cada una de las variedades de diferentes denominaciones de origen chilenas, con un rango de precio entre 7 y 12 euros. Se utilizó un panel sensorial entrenado compuesto por 12 evaluadores para medir la astringencia y un panel de consumidores conformado por 68 personas para medir aceptabilidad. Los resultados mostraron que vinos con una mayor concentración de proantocianidinas y polímeros de flavanol, son percibidos como más astringentes con claras diferencias entre ambas variedades. Además, se observó una relación inversamente proporcional entre la astringencia y la aceptabilidad de los vinos (CS, $r^2 = 0,83$; ME, $r^2 = 0,91$), demostrando que el consumidor chileno, independiente del sexo, prefiere vinos menos astringentes.

Palabras clave: Aceptabilidad, astringencia, proantocianidinas, Cabernet Sauvignon, Merlot

1. Introducción

La aceptabilidad de un vino depende de diversos factores, ya sean propios de este, como su composición química, nivel de alcohol, acidez, composición aromática; externos al vino como el precio, conocimiento de la marca, premios o por factores sujetos a la individualidad de cada persona y sus preferencias (1). En el último tiempo, son los compuestos fenólicos los que inciden mayormente en la calidad del vino tinto y las proantocianidinas afectan principalmente a parámetros como la astringencia (2). Es por esta razón que el objetivo del presente trabajo fue conocer la influencia de la composición fenólica de los vinos, en cuanto a concentración y composición de flavanoles, sobre la aceptabilidad de vinos Comerciales chilenos del cv. Cabernet Sauvignon y Merlot.

2. Material y métodos

Se utilizaron 18 vinos comerciales de Cabernet Sauvignon y 18 vinos comerciales de Merlot de diferentes denominaciones de origen chilenas, con un rango de precio entre los 7 a 12 €.

Se realizaron los análisis químicos de acidez titulable (g ác. tartárico/L), pH, contenido de azúcares (g glucosa/L) y grado alcohólico (% v/v), además de los análisis fenólicos de fenoles totales mediante absorbancia a 280 nm usando ácido gálico como estándar (3); taninos totales mediante precipitación con metilcelulosa (4) y fraccionamiento de proantocianidinas por extracción en fase sólida mediante cartuchos Sep-Pak Plus tC₁₈ (5).

Se evaluó la aceptabilidad mediante un panel de consumidores conformado por 68 personas (39 hombres y 29 mujeres) con un rango de edad entre los 24 a 55 años. Se sirvieron 20 mL de vino en copas técnicas transparentes codificadas con números de tres dígitos a una temperatura de 18°C, presentados en forma aleatorizada. Además se realizó un análisis de astringencia mediante un panel de 12 jueces expertos, donde se sirvió la misma cantidad de vino en copas de color negro y se forzó a los panelistas a tener un descanso de 30 segundos y enjuagarse con una solución de pectina (1 g/L) entre muestras. Se utilizó en ambos parámetros una escala de 0-15 puntos. Los datos se recopilaron mediante el software FIZZ (Biosystemes, Francia).

3. Resultados

En la Tabla 1, se aprecian los resultados de los análisis químicos y fenólicos efectuados a los vinos de Cabernet Sauvignon y Merlot.

Tabla 1. Composición química en vinos comerciales de Cabernet Sauvignon y Merlot

	Cabernet Sauvignon	Merlot
Acidez titulable (g ác. tartárico/L)	5,8 ± 0,4	5,6 ± 0,8
pH	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1
Azúcar (g glucosa/L)	2,8 ± 0,7	2,7 ± 0,8
Alcohol (% v/v)	14,4 ± 0,4 a	14,1 ± 0,9 b
Fenoles Totales (mg EAG/L)	1684,0 ± 211,5	1571,6 ± 148,6
Taninos Totales (mg (+)-catequina/L)	1540,0 ± 340,1 a	1223,2 ± 311,9 b
Fracción monomérica (mg/L)	26,0 ± 8,8	25,0 ± 9,2
Fracción oligomérica (mg/L)	106,9 ± 33,8	129,3 ± 39,1
Fracción polimérica (mg/L)	2034,5 ± 591,0 a	1583,7 ± 426,9 b

Todos los datos expresados como promedio ± desviación estándar (n=18). Letras distintas en una misma fila indican diferencia estadísticamente significativa según *t*-Student ($p < 0,05$).

No se encontraron diferencias entre los parámetros básicos de los vinos, indicando que no afectarían la percepción de astringencia. El contenido de fenoles totales, no presenta diferencias entre los vinos, sin embargo el contenido de taninos totales es mayor en Cabernet Sauvignon. Debido a que la metodología utilizada para cuantificar los taninos usa su precipitación con metilcelulosa, similar a la precipitación de las proteínas de la saliva al unirse con las proantocianidinas del vino, se pudo observar una buena correlación entre el parámetro de astringencia y taninos totales (Cabernet Sauvignon: $r = -0,6999$, $r^2 = 0,4899$, valor $p = 0,0012$;

para Merlot: $r = -0,9292$, $r^2 = 0,8634$, valor $p = 0,0000$), lo que valida esta metodología como una forma analítica de medir la astringencia percibida en una muestra de vino.

El porcentaje relativo de las distintas fracciones de flavanoles en vinos de Cabernet Sauvignon fue el siguiente: monómeros, 1,20%; oligómeros, 4,93%, polímeros, 93,87%, mientras en los vinos de Merlot, los porcentajes fueron: monómeros, 1,44%; oligómeros, 7,44%, polímeros, 91,12%, siendo la fracción polimérica mayoritaria en ambos cultivares. Las fracciones de flavanoles cuantificadas pueden influir en las propiedades sensoriales de los vinos, especialmente astringencia. De acuerdo a lo anterior, el análisis de correlación entre las fracciones de flavanoles y la sensación percibida de astringencia se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Relaciones entre fracciones de flavanoles y astringencia en vinos Cabernet Sauvignon y Merlot.

Parámetros	Cabernet Sauvignon			Merlot		
	r	r ²	valor p	r	r ²	valor p
Fracción monomérica	0,2461	0,0605	0,3249	-0,0180	0,0003	0,9432
Fracción oligomérica	0,2526	0,0638	0,3118	0,0643	0,0441	0,7997
Fracción polimérica	0,6077	0,3693	0,0075	0,8006	0,6410	0,0001

No se encontraron relaciones entre los monómeros y oligómeros de flavanol con la astringencia de los vinos, en cambio al observar el contenido de polímeros, se produjo una relación positiva con la astringencia de estos, especialmente en Merlot.

En cuanto a la aceptabilidad, en Cabernet Sauvignon fue de $6,7 \pm 0,9$ pts y en Merlot = $6,9 \pm 1,0$ pts y en astringencia $9,4 \pm 1,1$ pts para Cabernet Sauvignon y $9,3 \pm 1,0$ pts para Merlot. De acuerdo a la escala utilizada, que consiste en una pauta de 15 puntos, se observó que la aceptabilidad de los vinos en ambos cultivares fue menor a la media de la escala, lo cual pudo deberse a la mayor astringencia percibida por el panel.

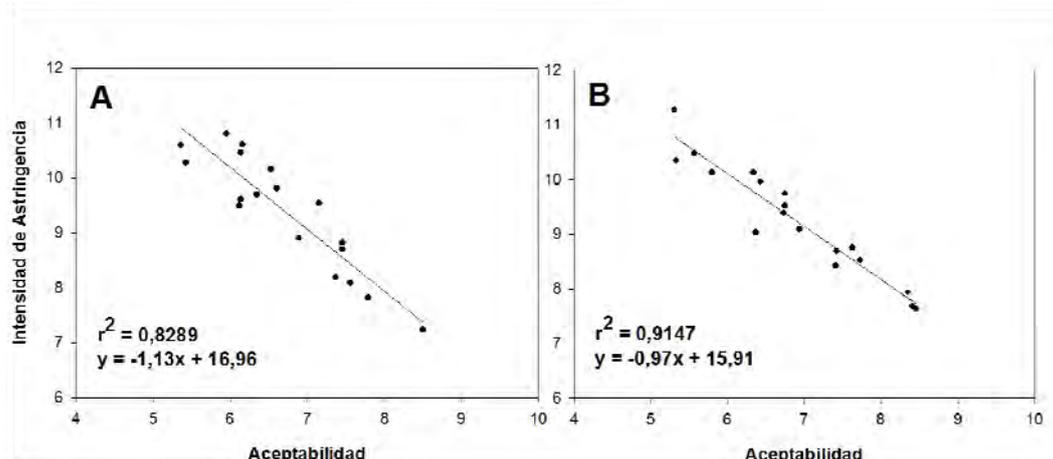


Figura 1. Relación entre aceptabilidad e intensidad de astringencia en vinos comerciales de Cabernet Sauvignon (A) y Merlot (B) (n=18).

En la Figura 1, se puede apreciar claramente la alta relación entre la astringencia percibida por el panel sensorial y la aceptabilidad por parte de los consumidores. En este caso, la mayor percepción de astringencia que presentaban los vinos influyó notablemente en su

aceptación, sugiriendo que aún cuando la astringencia es un punto importante para la sensación de cuerpo en el vino, si es excesiva influye negativamente sobre este parámetro.

4. Conclusiones

La astringencia del vino es un parámetro importante para la aceptación final del producto, existiendo un fuerte impacto en la concentración y composición de flavanoles sobre su percepción y por tanto en la aceptabilidad de los vinos. Los resultados de este estudio sugieren que el consumidor chileno prefiere vinos menos astringentes, independiente del sexo.

5. Bibliografía

1. Lattey, K., Bramley, B., Francis, I. 2010. Consumer acceptability, sensory properties and expert quality judgements of Australian Cabernet Sauvignon and Shiraz wines. *In: Australian journal of grape and wine research*. Wiley. 16, 189-202.
2. Llaudy, M., Canals, R., Canals, J., Rozés, N., Arola, L., Zamora, F. 2004. New method for evaluating astringency in red wine. *In: Journal of agricultural and food chemistry*. ACS Publications. 52, 742-746.
3. Glories, Y. 1984. La couleur des vins rouges. 2e partie. Mesure, origine et interpretation. *In: Connaissance de la vigne et du vin*. Vigne et vin publications. 18, 253-271.
4. Sarneckis, C., Damberg, R., Jones, P., Mercurio, M., Herderich, M., Smith, P. 2006. Quantification of condensed tannins by precipitation with methylcellulose: development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis. *In: Australian journal of grape and wine research*. Wiley. 12, 39-49.
5. Sun, B., Leandro, C., Ricardo da Silva, J., Spranger, I. 1998. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *In: Journal of agricultural and food chemistry*. ACS Publications. 46, 1390-1396.

6. Agradecimientos

A la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT) a través de los proyectos Fondecyt n° 1080559 y n° 1110832 por la financiación del presente trabajo.

OT14 - INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN Y EXPERIENCIA DEL PANEL DE CATA SOBRE LA VALORACIÓN DE VINOS DE ALBARIÑO

Cancela J.J.¹, Fandiño M.¹, Silvestre J.M.², Trigo-Córdoba E.^{1,3}, Martínez E.M.¹,
Caldeira I.², Rey B.J.¹, Climaco P.², Mirás-Avalos J.M.³

¹ GI1716. Univ. de Santiago de Comp./EPS, Dpto. Ing. Agroforestal (Campus Universitario s/n, 27002, Lugo, España)

² Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (Quinta da Almoinha, 2565-191, Dois Portos, Portugal)

³ Estación de Viticultura e Enología de Galicia (EVEGA-INGACAL) (Ponte San Clodio s/n, 32427, Leiro, España)

javierjose.cancela@usc.es

RESUMEN:

El objetivo del estudio ha sido determinar la variabilidad de resultados entre dos paneles de cata para la valoración sensorial de microvinificaciones. Los paneles de cata estuvieron compuestos por los miembros habituales de los paneles de la EVEGA (Leiro, España) y de la Ex-Estação Vitivinícola Nacional (EVN-Dois Portos, Portugal). Se valoraron vinos del cv. Albariño (2012) procedentes de dos ensayos en Galicia. Los resultados procesados con Big Sensory Soft 1.02, permitieron la elaboración de un Índice Hedónico (IH). El IH obtenido del panel de la EVN ha sido superior al del panel de EVEGA. Sin embargo, ambos paneles han ordenado las muestras de igual modo, según tratamientos. Los resultados han sido muy similares, lo que sugiere que la experiencia en describir vinos es equivalente.

Palabras clave: sensorial, microvinificaciones, Rías Baixas, Ribeiro, Índice Hedónico

1. Introducción

La valoración del resultado final de un ensayo vitícola o enológico, debería concluir con la evaluación del vino obtenido en cada tratamiento. Diversos investigadores han desarrollado trabajos que discuten sobre las valoraciones realizadas por parte de expertos, consumidores o catadores entrenados (Hopfer y Heymann, 2014), detectando correlaciones positivas entre consumidores y expertos y concluyendo que los expertos son capaces de valorar de un modo objetivo las cualidades de un vino, al contrario que los consumidores. Por otra parte, se han realizado estudios que persiguen conocer el efecto de ensayos de riego sobre las cualidades sensoriales de vinos obtenidos de variedades gallegas (Trigo-Córdoba et al. 2014), incluyendo el Albariño. Si bien, resultan muy escasos los trabajos que persigan determinar la variabilidad de resultados entre dos paneles de cata puesto que, generalmente, se considera que cada panel se encuentra perfectamente constituido y los resultados que obtiene son adecuados. Al igual que para la comparativa entre paneles, no se han encontrado trabajos que recojan la componente experiencia previa sobre la valoración sensorial de determinados vinos.

Las carencias de estudios detectadas nos llevaron a diseñar el presente trabajo, tal que fuese posible “validar” las valoraciones emitidas por un panel de cata, de cara a la evaluación sensorial de microvinificaciones. En el diseño del ensayo se ha tenido en cuenta que los vinos a estudiar proceden de la región de Galicia, lo que permite recoger el factor “experiencia previa” de los diferentes paneles de cata. El objetivo general ha sido determinar la variabilidad de

resultados entre dos paneles de cata para la valoración sensorial de microvinificaciones de vinos del cv. Albariño del año 2012.

2. Material y métodos

Los vinos estudiados en el presente trabajo se derivan de ensayos realizados al amparo del proyecto RTA2011-00041-C02-00. De las diferentes variedades estudiadas, se ha seleccionado la variedad Albariño en dos localizaciones geográficas en Galicia: DO Rías Baixas (O Rosal) y DO Ribeiro (Leiro), estudiándose las microvinificaciones elaboradas a partir de uva de la campaña 2012. Los diferentes vinos evaluados se corresponden con los obtenidos a partir de los tratamientos en campo de: secano (R), riego por goteo superficial (DI) y riego por goteo subsuperficial (SDI), para la DO Rías Baixas (A); y secano (R) y riego por goteo superficial (DI), para la DO Ribeiro (B). Una amplia descripción de los ensayos y mediciones realizadas en campo, se recoge en Mirás-Avalos et al., 2015. Por otra parte, el proceso de elaboración de las microvinificaciones se describe detalladamente en Trigo-Córdoba et al., 2014.

Se han seleccionado dos paneles de cata de vinos, formados por sus miembros habituales; el primero, situado en la sede de la Estación de Viticultura y Enología de Galicia - EVEGA (Leiro – España), donde participaron 8 miembros; y el segundo, en el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias y Veterinarias (Portugal, polo de Dois Portos, antigua Estação Vitivinícola Nacional – EVN) donde participaron un total de 11 catadores. En los dos casos, las salas de cata cumplen con todos los requerimientos de la norma ISO 8589 (ISO, 1988). Las muestras de vino se han servido en ambos casos en copa de vino standard y codificadas, de tal modo que los catadores desconocían la procedencia de cada muestra.

Las pruebas se han llevado a cabo durante el mes de diciembre de 2014, empleando en ambos casos la misma ficha. Se incluyen 14 descriptores cualitativos (4 para color y 10 para el aroma) y 7 cuantitativos para el sabor como ha sido propuesto por Odello et al. (2007). Los descriptores considerados fueron seleccionados específicamente para Galicia, a partir de trabajos previos (Vilanova et al. 2013) y valorados de 0 (ausencia) a 9 (muy intenso). Los descriptores incluidos han sido agrupados en tres grupos de atributos: color, aroma y sabor, además se ha incluido una valoración global sobre el vino. En total se han valorado tres vinos para la DO Rías Baixas y dos para la DO Ribeiro, siguiendo el esquema de tratamientos mencionado. Se ha incluido una muestra repetida para observar la eficiencia de los miembros del panel, en nuestro caso el DI de la DO Rías Baixas.

Los resultados han sido procesados con el software Big Sensory Soft 1.02 (Odello et al., 2007), que ha limitado el número de catadores “válidos” a 7, según la eficacia de los mismos. Además se ha determinado el Índice Hedónico (Odello et al., 2009), el cual representa un resumen de los valores de los descriptores y nos permita determinar una calidad general sobre las muestras degustadas por los evaluadores mediante un único número.

3. Resultados

Los dos paneles de cata evaluados han valorado de manera muy similar el color de los vinos presentados (Fig. 1), destacando la limpidez. Existen ligeras discrepancias en cuanto a la valoración de los reflejos verdoso y amarillo, ofreciendo valores más elevados el panel de la EVN. En cuanto a la fase olfativa (Fig. 2), las diferencias entre paneles han sido más claras, tendiendo a valores más elevados en el caso del grupo portugués, quienes ofrecen

puntuaciones más altas en cuando a intensidad aromática y persistencia; si bien, las notas a fruta fresca de los vinos recibieron mayor puntuación por parte del panel de cata gallego (Fig. 2). El caso contrario se apreció para el descriptor fruta tropical. El descriptor de aromas herbáceos apenas fue detectado en los vinos considerados por ambos paneles.

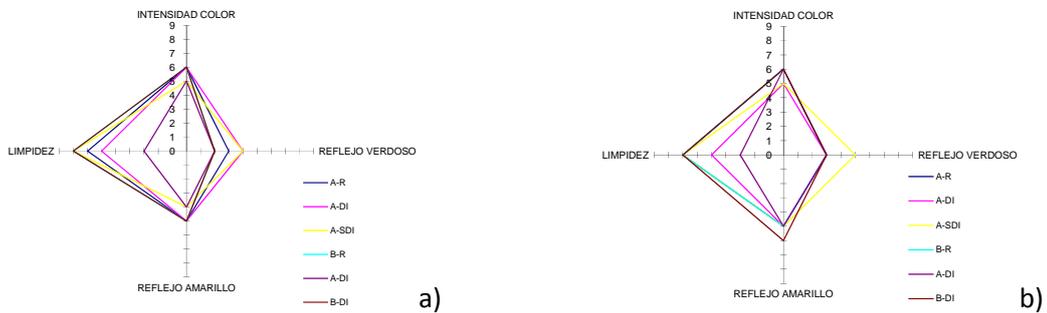


Figura 1. Medianas de las puntuaciones de ambos paneles, a) EVN y b) EVEGA, para la fase visual de la cata (nº catadores = 7)

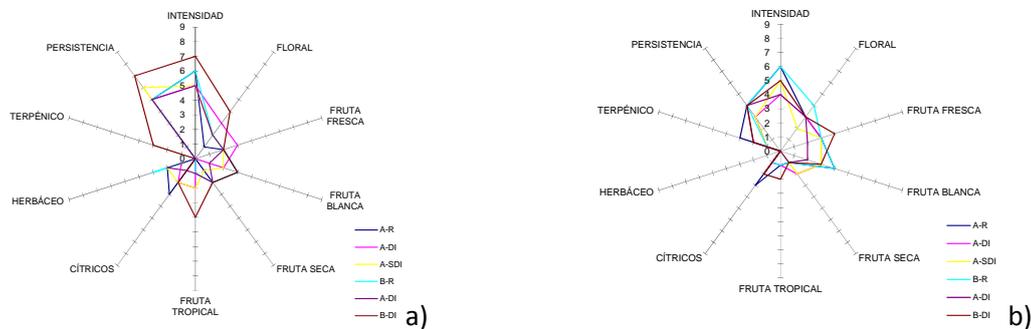


Figura 2. Medianas de las puntuaciones de ambos paneles, a) EVN y b) EVEGA, para la fase olfativa de la cata (nº catadores = 7)

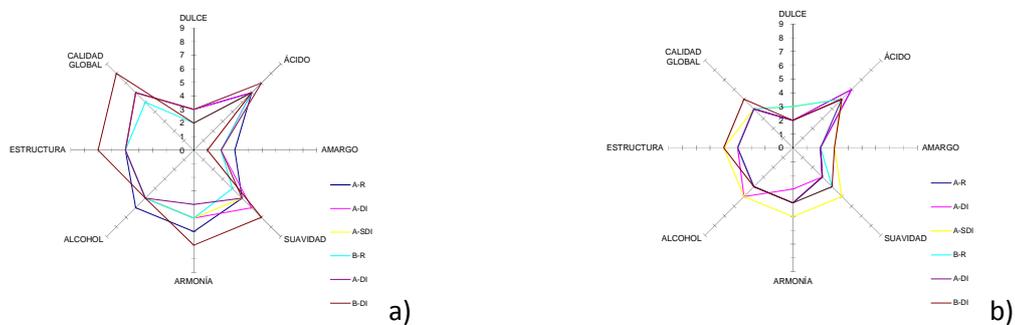


Figura 3. Medianas de las puntuaciones de ambos paneles, a) EVN y b) EVEGA, para la fase gustativa de la cata (nº catadores = 7)

Respecto a la fase gustativa (Fig. 3), ambos paneles respondieron de la misma manera, destacando el carácter ácido de los vinos así como su estructura y suavidad. Sin embargo, el panel de cata portugués ha tendido a valorar ligeramente más alto todos los descriptores gustativos así como la calidad global de los vinos presentados.

El índice hedónico presentó diferencias entre paneles de cata (Fig. 4), si bien el orden de preferencia de los vinos presentados fue el mismo para ambos paneles. El panel de cata

portugués ha tendido a ofrecer puntuaciones más elevadas (entre un 10 y un 20%) a los vinos presentados. Ambos paneles han ordenado las muestras de igual modo: seco, riego aéreo y riego enterrado, para la DO Rías Baixas; y riego aéreo y seco para los vinos de la DO Ribeiro.

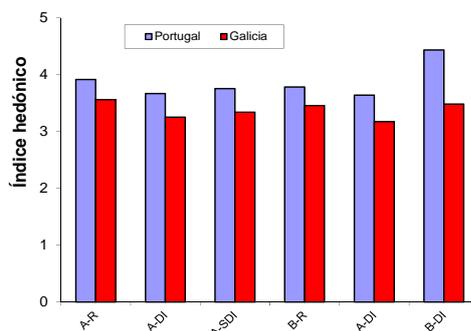


Figura 4. Índice hedónico para cada muestra, según la procedencia del panel

4. Conclusiones

El ensayo ha mostrado que el panel de la EVN ofreció valoraciones superiores para el Índice Hedónico, respecto a las ofrecidas por el panel de EVEGA. Ambos paneles han ordenado las muestras de igual modo: seco, riego aéreo y riego enterrado (DO Rías Baixas); y riego aéreo y seco (DO Ribeiro). A pesar de que los paneles poseen diferente experiencia a la hora de catar vinos gallegos, los resultados han sido muy similares lo que sugiere que esta experiencia puede ser equivalente.

5. Bibliografía

1. Hopfer, H., Heymann, H. 2014. Judging wine quality: Do we need experts, consumers or trained panelists?. *In: Food Qual. Pref.*, 32, 221- 233.
2. Trigo-Córdoba, E., Bouzas-Cid, Y., Orriols-Fernández, I., Mirás-Avalos, J.M. 2014. Irrigation effects on the sensory perception of wines from three white grapevine cultivars traditional from Galicia (Albariño, Godello and Treixadura). *In: Ciência Téc. Vitiv.* 29(2), 71-80.
3. Mirás-Avalos, J.M., Trigo, E., Bouzas, Y., Díaz E., Orriols, I., Fandiño, M., Martínez, E.M., Rey, B.J., Cancela J.J. 2013. Estado hídrico de viñedos del noroeste de España: valoración agronómica y económica. *In: Interempresas Horticultura*, 308, 30-38.
4. ISO., 1988. ISO norm 8589: Sensory analysis: general guidance for the design of test rooms. International Organization for Standardization, Genève.
5. Odello, L., Ugolini, A., Violini, M. 2007. *Analisi Sensoriale. I test descrittivi*. Centro Studi Assaggiatori, Brescia.
6. Vilanova, M., Zamuz, S., Tardáguila, J., Masa A. 2008. Descriptive analysis of wines from *Vitis vinifera* cv. Albariño. *In: J. Sci. Food Agric.*, 88, 819-823.
7. Odello, L., Braceschi, G.P., Seixas, F.R.F., da Silva, A.A., Galinaro, C.A., Franco, D.W. 2009. Avaliação sensorial de cachaça. *In: Quím. Nova*, 32, 1839-1844.

6. Agradecimientos

Al proyecto RTA2011-00041-C02-00 (80% FEDER). E. Trigo agradece al INIA su beca predoctoral. J.M. Mirás agradece a la Xunta de Galicia su contrato "Isidro Parga Pondal". J.J. Cancela agradece al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por la ayuda "José Castillejo" (CAS14/00249).

OT15 - ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DE LA ACLIMATACIÓN DE *Saccharomyces cerevisiae* AL ETANOL PARA LA PRODUCCIÓN DE VINOS ESPUMOSOS

A. Borrull, G. López-Martínez, M. Poblet, R. Cordero-Otero y N. Rozès

Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Enología, Universidad Rovira y Virgili, Campus Sescelades, 43007 Tarragona
nicolasrozes@urv.cat

RESUMEN:

Se ha realizado el seguimiento de la segunda fermentación de los vinos base según el método tradicional o *Champenois* a partir de una levadura tipo *Saccharomyces cerevisiae* aclimatada al etanol. Aunque existan protocolos industriales muy bien definidos para este proceso, se conoce poco de la idoneidad de la presencia de oxígeno y azúcares durante este proceso de aclimatación. Este trabajo muestra que, según la disponibilidad de estos dos factores, *S. cerevisiae* presenta diferentes respuestas en cuanto a la expresión diferenciada de sus genes (transcriptoma). En el análisis de los resultados, se puede observar inducción de genes relacionados con el metabolismo de los lípidos (ERG5, ERG10, ERG13, OLE1, YEH1, EEB1) en la cepa aclimatada en condición fermentativa. Contrariamente se observa también que se activan genes como GUT1 en la condición respiración, o el gen MDH1, en la condición fermentativo-respiratoria. También se ha podido observar que en las condiciones del estudio, las levaduras aclimatadas según el metabolismo fermentativo han podido alcanzar la presión de 6 bares en botella. En las otras condiciones no ha sido así.

Palabras clave: Oxígeno, Insaturación, Esteroles, respiración.

1. Introducción

El Cava necesita para su elaboración dos fermentaciones consecutivas. Una fermentación alcohólica para obtener el vino base y una segunda fermentación en botella según el método *Champenois* para conseguir la aparición de la espuma. Para asegurar que se realice esta segunda fermentación las levaduras tienen que ser previamente aclimatadas especialmente al etanol y pH del vino base.

Aunque la aclimatación de las levaduras es un proceso bien definido en la industria [1, 2], no existe ningún estudio que describa la diferencia en la expresión génica de células aclimatadas según diferentes criterios.

Nuestro estudio describe el proceso realizado con distintas condiciones de oxigenación y concentración de azúcar, para ello se ha seguido la cinética mediante la determinación del consumo de azúcares con su consiguiente producción de etanol. Además, se hizo un estudio transcriptómico a lo largo del proceso de aclimatación.

Después de realizar la segunda fermentación en botella para las diferentes condiciones de aclimatación testadas se determinó que un proceso en semi-anaerobiosis y con alta concentración de azúcar obtenía unas células con mejor diagnóstico.

2. Material y métodos

La cepa EC1118 *Saccharomyces cerevisiae* (Lallemand SA, Montreal, Canadá) fue utilizada en este estudio y rehidratada de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se activaron las levaduras en 30 ml de medio basal (150 g l⁻¹ de sacarosa, 4 g/l PO₄ (NH₄)₂, 20% (v/v) de vino sintético) bajo agitación (150 rpm) durante 24 horas, lo que corresponde a la fase 1 (P1). Entonces se completó este medio con 120 ml de medio basal (50 g/l de sacarosa y 84% (v/v) de vino sintético) para permitir que las células de levadura se aclimataran al etanol durante tres días, lo que corresponde a la fase 2 (P2).

Se modificaron variables en P2 dependiendo de la condición estudiado: condición OXI, crecimiento de la levadura en aerobiosis (1/3 del volumen total del recipiente con agitación) y condición NOXI, crecimiento en semi-anaerobiosis (4/5 del volumen total del recipiente sin agitación). La condición ETOXI representa un crecimiento de la levadura en aerobiosis sin adición de azúcares a partir de P1. La temperatura de aclimatación fue de 25°C.

La viabilidad de las células se determinó según [3] mediante la citometría de flujo utilizando el kit LIVE/DEAD Viabilidad (Molecular Probes Inc., EE.UU.). Se determinó la concentración en azúcares y etanol durante la aclimatación usando un análisis enzimático con kit comerciales de Roche (R-Biopharm, Darmstadt, Alemania).

La segunda fermentación en botella fue realizada a 25°C en un vino base definido inoculando con las tres condiciones de aclimatación por duplicado. Se siguió la evolución de la segunda fermentación midiendo la presión interior en las botellas mediante afrómetros.

Se realizaron dos preparaciones de ARN independientes; uno de cada réplica biológica, para cada uno de los tres puntos de muestreo al final del proceso de aclimatación, OXI, NOXI y ETOXI. El análisis de microarrays de expresión génica diferencial fue realizado mediante el *GeneChip Yeast Genome 2.0* en el *Institute for Research in Biomedecine* (IRB, Barcelona).

3. Resultados

La aclimatación de la cepa *S. cerevisiae* EC1118 fue realizada siguiendo el protocolo industrial descrito por [1, 2] con 2 fases sucesivas, la P1 (24h) y P2 (72h), (Fig. 1). Como se puede observar en la figura 1, las células de las condiciones OXI, NOXI y ETOXI tuvieron diferente comportamiento: ETOXI, presenta un metabolismo respiratorio consumiendo el etanol, OXI, presenta un metabolismo fermentativo-respiratorio, presencia de oxígeno con una concentración en azúcares por debajo del efecto Crabtree y NOXI, continua todavía con un metabolismo fermentativo.

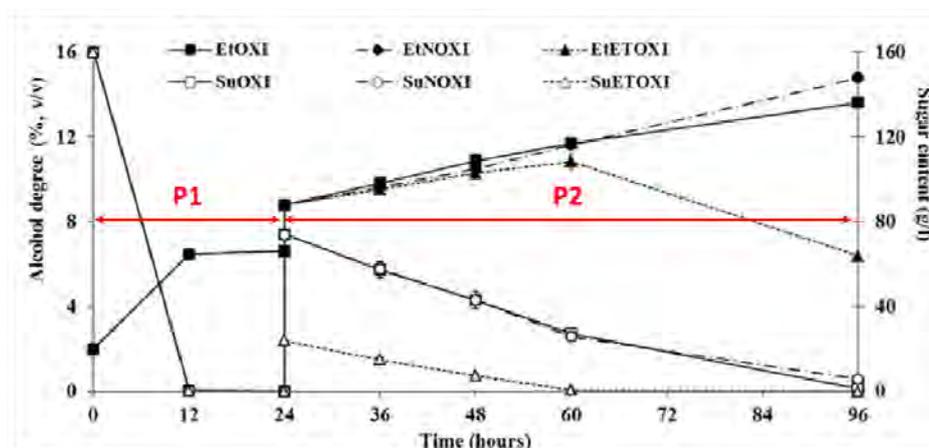


Figura 1. Evolución de las concentraciones en azúcares (símbolos abiertos) y etanol (símbolos cerrados) durante el proceso de aclimatación de *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 a 25 °C. Las condiciones utilizadas fueron: OXI, Aerobiosis + adición de azúcar (cuadrados); NOXI, Semi-anaerobiosis + adición de azúcar (círculos); ETOXI, Aerobiosis sin adición de azúcar (triángulos). Et, etanol; Su, Azúcar.

Los resultados de la tabla 1 muestran que las células aclimatadas según la modalidad NOXI fueron las únicas que permitieron finalizar la segunda fermentación (6 bares para una concentración inicial en sacarosa de 24 g/l) en 35 días. Se puede observar también que la viabilidad para las tres condiciones de aclimatación fue idéntica.

Tabla 1. Resultados finales de la segunda fermentación en botella a 25°C. Inoculación del vino base definido por tres procesos de aclimatación diferente OXI, Aerobiosis + adición de azúcar; NOXI, Semi-anaerobiosis + adición de azúcar; ETOXI, Aerobiosis sin adición de azúcar.

	OXI	NOXI	ETOXI
Concentración final en azúcares (g/l)	5.41	2.24	3.51
Grado alcohólico (% , v/v)	10.30	10.90	10.55
Días para alcanzar a 4 bares	16	10	13
Días para alcanzar 6 bares	ND	35	ND
Viabilidad celular 4 bares (cel/ml)	1.18 10 ⁶	1.34 10 ⁶	1.30 10 ⁶

ND: No Determinado porque hubo paradas de segunda fermentación.

El transcriptoma de la condición más favorable, NOXI, fue comparado con las otras condiciones OXI Y ETOXI, y se determinó qué genes estaban expresados dos veces-más (Fig. 2) o dos veces menos (Fig. 3). Aunque no se encontraron muchos genes con variaciones significativas, se vio que varias vías metabólicas se veían afectadas, de forma diferencial según la condición. Estas vías metabólicas incluían la sobreexpresión, para NOXI respecto a OXI y ETOXI, de genes relacionados con el metabolismo lipídico como son el caso de ERG5, ERG10, CYB5, OLE1 y YEH1. También de vio sobreexpresión de otros genes interesantes como TIR4, relacionado con las manoproteínas de la pared celular y que se expresa bajo condiciones anaeróbicas y necesarias para el crecimiento anaeróbico y el gen HLR1 relacionado con la preservación de la integridad de la membrana.

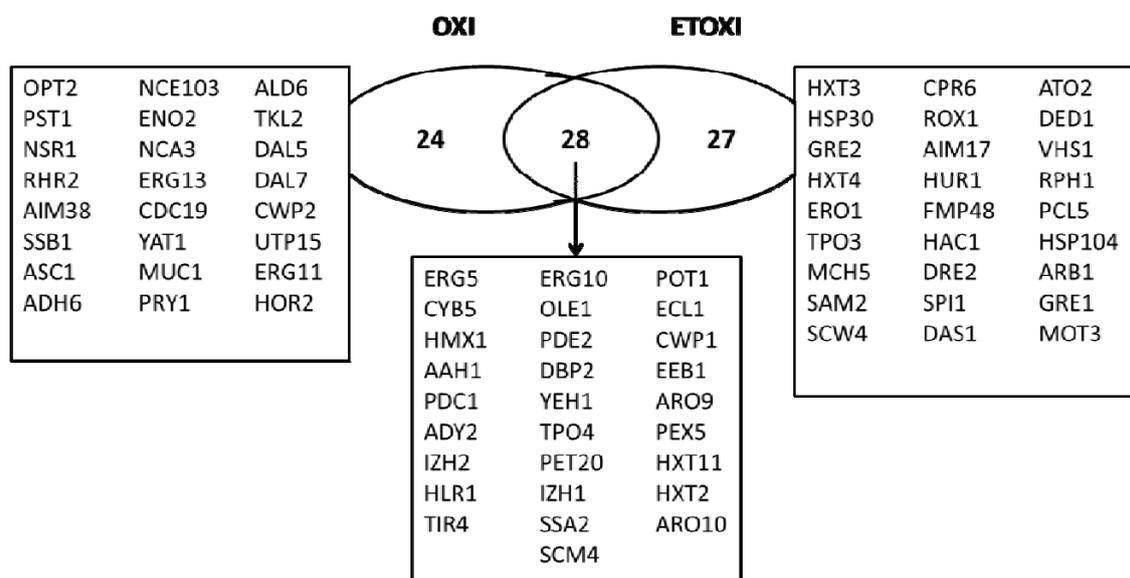


Figura 2. Representación de los genes *up-regulated* en NOXI respecto a OXI, ETOXI y ambos en *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 a 25 °C durante el proceso de aclimatación. OXI, Aerobiosis + adición de azúcar; NOXI, Semi-anaerobiosis + adición de azúcar; ETOXI, Aerobiosis sin adición de azúcar.

También se puede observar la inducción de la transcripción de dos genes, RHR2 (GPP1) y HOR2 (GPP2) como respuesta a las condiciones de hipoxia, y que están relacionados con la formación de glicerol, en NOXI respecto a OXI (Fig. 2).

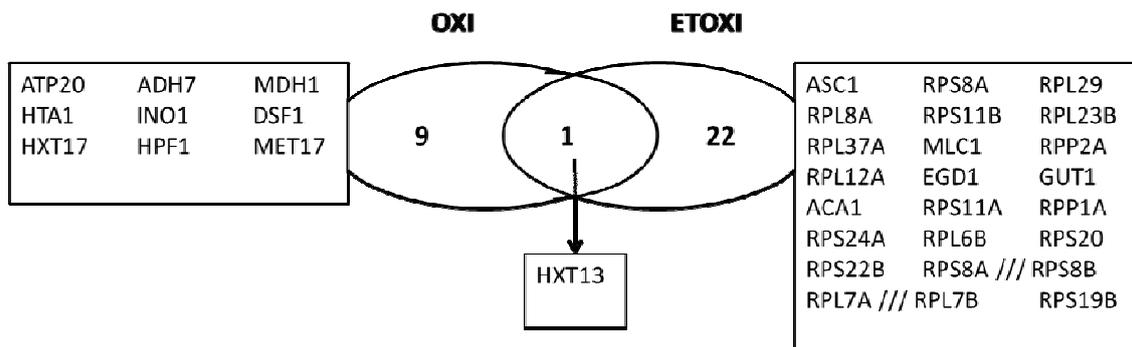


Figura 3. Representación de los genes *down-regulated* en NOXI respecto a OXI, ETOXI y ambos en *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 a 25 °C durante el proceso de aclimatación. OXI, Aerobiosis + adición de azúcar; NOXI, Semi-anaerobiosis + adición de azúcar; ETOXI, Aerobiosis sin adición de azúcar.

En la figura 3, es interesante notar que uno de los genes activado en OXI respecto a NOXI, el gen HPF1, está relacionado con la excreción de manoproteínas que pueden limitar la formación de agregados proteicos en los vinos blancos [4]. Por otro lado, en la condición ETOXI, se puede observar la inducción del gen GUT1 inducido por la presencia de una fuente de carbono no-fermentable.

4. Conclusiones

El análisis del transcriptoma de la condición más favorable NOXI fue comparado con las otras dos condiciones OXI Y ETOXI. Se determinó cuales genes estaban sobre-expresados o inhibidos y se vio que, aunque no hubo muchos genes con variaciones significativas, varias vías metabólicas se veían afectadas diferencialmente según la condición. Dichas vías incluían la sobreexpresión para NOXI de genes relacionados con el metabolismo lipídico por ejemplo ERG5, ERG10, CYB5 y OLE1, y otros con características interesantes como la inducción del gen HPF1 en la condición OXI. Trabajos futuros ayudaran a completar estos resultados.

5. Bibliografía

1. Laurent, M., Valade, M., 1998. La propagation des levains de tirage. *Vigneron Champenois*. 3, 29-52.
2. Laurent, M., Valade, M., 2007. La préparation du levain de tirage à partir de levures sèches actives. *Vigneron Champenois*. 3, 75-95.
3. Borrull, A. Poblet, M., Rozès, N., 2015. New insights into the capacity of commercial wine yeasts to grow on sparkling wine media. Factor screening for improving wine yeast selection. *Food Microbiol.*, 48, 41-48.
4. Brown, S.L., Stockdale, V.J., Pettolino, F., Pocock, K.F., de Barros Lopes, M., Williams, P.J., Bacic, A., Fincher, G.B., Høj, P.B., Waters, E.J., 2007. Reducing haziness in white wine by overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* genes YOL155c and YDR055w. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73:1363–1376.

6. Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Gobierno español, proyecto AGL2010-22001-C02-02, otorgado a NR. Además, AB quiere agradecer a la Universidad Rovira i Virgili para su beca de doctorado 2009BRDI / 12/13.

OT16 - ESTUDIO DEL CONTENIDO EN ALFA-HIDROXIÁCIDOS EN EXTRACTOS FENÓLICOS DE SUBPRODUCTOS DE VINIFICACIÓN Y SU POTENCIAL USO COSMÉTICO

Yolanda Carmona Jiménez, Valme García Moreno, Miguel Palma Lovillo, Carmelo García Barroso

Universidad de Cádiz/Centro Andaluz de Investigaciones Vitivinícolas (CAIV). Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CeIA3). Avda. República Saharaui, s/n, 11510, Puerto Real, Cádiz, España.

yolanda.carmona@uca.es

RESUMEN:

En los últimos años ha habido un creciente interés por la utilización de los residuos y subproductos vitivinícolas como fuente de compuestos naturales de interés, fundamentalmente de compuestos fenólicos. Durante el proceso de extracción de los compuestos fenólicos son extraídos, a su vez, otros compuestos de importancia biológica e industrial, ampliamente utilizados por la industria cosmética y farmacológica, los alfa-hidroxiácidos (AHAs). El objetivo de este estudio ha sido la caracterización de los AHAs presentes en extractos fenólicos obtenidos a partir de dos tipos de subproductos, uva de aclareo y orujo, de cinco variedades de uva tinta distinta. Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto importantes cantidades de AHAs en estos extractos.

Palabras clave: Subproductos, residuos, alfa-hidroxiácidos, extractos fenólicos

1. Introducción

El proceso de elaboración de vinos genera una gran cantidad de subproductos y residuos, cuya gestión implica problemas en términos tanto medioambientales como económicos. Sin embargo, a lo largo de los últimos años, ha aparecido un creciente interés por la utilización de estos subproductos para la obtención de compuestos naturales de interés. La mayor parte de los estudios publicados en relación a esta cuestión, han estado centrados fundamentalmente en el contenido fenólico de estos subproductos, debido a la actividad antioxidante que presenta esta familia de compuestos y a sus efectos beneficiosos para la salud. No obstante, durante el proceso de extracción de los compuestos fenólicos otros compuestos son extraídos. Éste es el caso de ciertos ácidos orgánicos conocidos como alfa-hidroxiácidos (AHAs). Los AHAs son ácidos orgánicos con un grupo hidroxilo unido a la posición alfa del grupo carboxílico. Ácidos como el tartárico, málico o láctico son AHAs. La uva, como consecuencia de su propio metabolismo, presenta en su composición AHAs, como el ácido tartárico, málico y cítrico mientras que otros AHAs, como el ácido láctico, pueden aparecer como consecuencia de la acción de microorganismos. Los AHA son ampliamente utilizados por la industria farmacológica y cosmética debido a su acción exfoliante y emoliente¹. Recientemente, el uso de AHAs en cosméticos se ha extendido ampliamente utilizándose para corregir desórdenes cutáneos, aumentar la hidratación, inducir la renovación celular y mejorar los efectos visibles del envejecimiento como líneas de expresión y arrugas². Algunos AHAs, como el ácido cítrico, tartárico y málico también presentan propiedades antioxidantes.

Dado la actividad biológica de estos compuestos, su importancia para industria cosmética y la ausencia de datos publicados al respecto, el objetivo de este estudio ha sido caracterizar el contenido en AHAs en extractos fenólicos de dos subproductos, orujo y uva de aclareo, de cinco variedades distintas de uva tinta.

2. Material y métodos

Las muestras de subproductos fueron suministradas por una bodega de la provincia de Cádiz. Los extractos analizados se obtuvieron a partir de uva de aclareo y orujo de cinco variedades de uva tinta, comunes en dicha zona geográfica: Tempranillo, Tintilla de Rota, Cabernet Sauvignon, Petit Verdot y Syrah. La uva de aclareo procede de una práctica, cada vez más habitual en climas cálidos, consistente en la supresión de un cierto número de racimos para corregir los excesos de producción, consiguiendo así una mayor calidad del producto final. Los racimos de aclareo fueron recolectados a finales de Julio, en un mismo día, cuando casi todas las variedades habían enverado, si bien, aunque próximo, no todas presentaban el mismo estado de maduración. El orujo, compuesto en este caso de hollejo y pepitas, procedió de la etapa de prensado de la uva previa maceración. A su vez, se obtuvieron extractos de la uva de esas mismas variedades recolectadas durante la vendimia, cuyos resultados se utilizaron como punto de referencia para realizar la comparativa varietal.

Se realizaron medidas de Baumé y de acidez total a la uva de aclareo y vendimia, a fin de conocer su estado de maduración. Las medidas de Baumé fueron realizadas con un densímetro automático, modelo DMA 4500M de Anton Paar. Las medidas de acidez se realizaron acorde al método oficial recomendado por la OIV³. El proceso de extracción se llevó a cabo siguiendo la metodología publicada por Carrera et al.⁴ con una modificación: para las extracciones se empleó una mezcla de etanol-agua (50:50) sin acidificar. Todas las extracciones fueron realizadas por duplicado. El contenido en polifenoles totales fue determinado mediante medida espectrofotométrica a 280 nm, utilizando un espectrofotómetro Uv/vis V-530 (Jasco, Madrid, Spain), expresándose los resultados como miligramos de ácido gálico equivalentes por gramo de subproducto extraído. La caracterización del contenido en AHAs fue realizado mediante cromatografía líquida acoplada a un detector conductimétrico, de acuerdo a la metodología descrita por Guillén y colaboradores⁵. Se prepararon curvas de calibrado con los estándares de: ácido cítrico, tartárico, málico y láctico, todos disueltos en EtOH-H₂O (50:50).

3. Resultados

Los resultados obtenidos del estudio del contenido polifenólico total pusieron de manifiesto importantes cantidades de compuestos polifenólicos en todos los extractos estudiados, si bien se encontraron mayores cantidades de compuestos fenólicos en los extractos de orujo que en los de uva de aclareo. Las concentraciones obtenidas para los extractos de orujo estuvieron entre 13,73 y 16,38 mg de ácido gálico equivalente/ g de subproducto extraído. El extracto de orujo de Tempranillo fue el que mayor cantidad presentó seguido del de Tintilla de Rota. El test ANOVA ($p < 0,05$) reveló diferencias significativas entre los resultados obtenidos para las distintas variedades de orujo. En cuanto a los extractos obtenidos a partir de uva de aclareo, se obtuvo un rango de concentración entre 9,65 – 12,74 mg ácido gálico equivalentes / g de subproducto extraído. En éste caso fueron los extractos de uva de aclareo Petit Verdot y Cabernet Sauvignon los que mejores resultados mostraron. El test ANOVA volvió a mostrar diferencias significativas entre los resultados de las distintas variedades de uva de aclareo. No obstante, cuando se analizó el contenido fenólico a los

extractos obtenidos a partir de la uva de vendimia, no se encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos para las distintas variedades. Este hecho induce a pensar que las diferencias encontradas, entre las distintas variedades de orujo y las distintas variedades de uva de aclareo, vienen dadas por otros factores que el meramente varietal, como pueden ser las diferencias durante el proceso de maduración de cada variedad para el caso de la uva de aclareo y la extractabilidad de cada variedad durante el proceso de maceración en el caso de los orujos.

Para la caracterización del perfil en AHAs, se partió del estudio de los extractos obtenidos a partir de la uva de vendimia, utilizando estos resultados como punto de referencia para la comparativa varietal. Los AHAs encontrados en estos extractos fueron, en orden decreciente de concentración: ácido tartárico, málico y cítrico. El extracto de uva Cabernet Sauvignon presentó el mayor contenido, seguidos por el de Syrah y Tempranillo. Los rangos de concentración hallados fueron de entre 5,90 – 7,40 mg de AHAs totales / g de subproducto extraído. El extracto de uva Syrah mostró la mayor cantidad en ácido málico, mientras que el de Tempranillo destacó por su contenido en tartárico y el de Tintilla de Rota por el de ácido cítrico.

En el caso de los extractos de uva de aclareo, los AHAs encontrados fueron, igualmente, ácido tartárico, málico y cítrico. En esta ocasión, el extracto con mayor contenido en todos los ácidos fue el de uva de aclareo de Tintilla de Rota seguido del de Petit Verdot. El rango de concentración estuvo entre 9,64 a 21,82 mg de AHAs totales / g de subproducto extraído. Acorde al test ANOVA, existen diferencias significativas en los resultados obtenidos para todos los ácidos determinados en estos extractos. Si comparamos los resultados con los obtenidos para los extractos de uva de vendimia, se ponen de manifiesto varias diferencias. En primer lugar, que el contenido en AHAs es mucho mayor en la uva de aclareo, como era de esperar, y en segundo lugar, que las variedades con mayor contenido en AHAs no son las mismas en el caso de la uva de aclareo y en el de la uva de vendimia. Como se mencionó anteriormente, aunque todas las variedades fueron recogidas próximas al estado de envero, no todas estaban justo en el mismo momento de maduración. Se realizó un estudio de correlación entre la madurez tecnológica de la uva de aclareo (Baumé/acidez total) y el contenido en AHAs, obteniéndose una elevada correlación, con un coeficiente de -0,8671. Estos resultados indican que el estado de maduración influye enormemente en el contenido en AHAs de la uva de aclareo, siendo éste un factor mucho más predominante para el contenido en AHAs que el varietal.

Los resultados obtenidos para los extractos de orujo muestran la presencia de ácido láctico además de ácido cítrico, tartárico y málico. Las concentraciones totales en AHAs halladas fueron desde 4,61 a 7,51 mg de AHAs / g de subproducto extraído. Los extractos de orujo de Tempranillo y Tintilla de Rota fueron los de mayor concentración, destacando el de orujo de Tempranillo por su concentración en ácido tartárico y málico, y el de Tintilla de Rota por la de ácido cítrico y láctico. Se encontraron diferencias significativas entre los resultados de todos los ácidos de los extractos de orujos. De nuevo, el orden obtenido en cuanto a cantidad de AHAs obtenidos por variedad no coincide con el obtenido para los extractos de uva de vendimia pero sí con el conseguido en el estudio de polifenoles totales. Por consiguiente, otros factores además del varietal están influyendo en las cantidades de AHAs presentes en los orujos. Factores como la extractabilidad de cada variedad de orujo durante el proceso de maceración para la elaboración de los vinos o la acción de microorganismos influyen en el contenido en AHAs de los orujos superando el factor meramente varietal de la uva.

AHAs Y PT

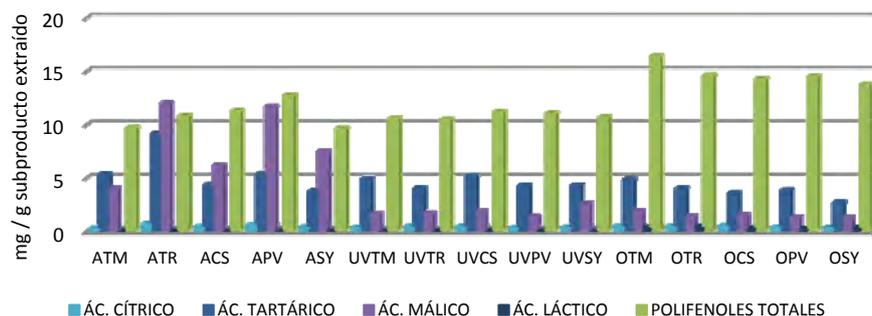


Fig.1: Representación del contenido en AHAs y polifenoles totales de los extractos estudiados (A: aclareo; UV: uva vendimia; o: orujo; TM: Tempranillo; TR: Tintilla de Rota; Cs: Cabernet Sauvignon; PV: Petit Verdot; SY: Syrah)

4. Conclusiones

Todos los extractos de subproductos estudiados han mostrado elevadas cantidades de polifenoles además de un importante contenido en AHAs. Los extractos de uva de aclareo presentaron las mayores cantidades en AHAs, cuyo contenido depende fundamentalmente del estado de maduración de la uva y no de la variedad. Los extractos de orujo mostraron las mayores cantidades en polifenoles totales, destacando los de Tempranillo y Tintilla de Rota en cuanto a su concentración en polifenoles y AHAs. Las cantidades de AHAs presentes en los orujos vienen dadas no sólo por la variedad sino también por la tendencia a la extractabilidad de cada variedad durante el proceso de maceración y la posible actividad microbiana. Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto importantes cantidades en AHAs en todos los extractos de subproductos estudiados proporcionando, a dichos extractos, propiedades adicionales para su potencial uso en preparados cosméticos.

5. Bibliografía

- Green, B.A.; Yu, R.J.; 2. Van Scott, E.J. 2009. Clinical and cosmeceutical uses of hydroxyacids. *In: Clin. Dermatol.*, 27, 495-501.
- Dutra, E.A., Santoro, M.I.R.M., Micke, G.A., Tavares, M.F.M., Kedor-Hackmann, E.R.M. 2006. Determination of α -hydroxy acids in cosmetic products by capillary electrophoresis. *In: J. Pharm. Biomed. Anal.*, 40, 242-248.
- Compendium of international methods of analysis. Method OIV-MA-AS313-01
- Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M.; Barroso, C.G. 2012. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *In: Anal. Chim. Acta*, 732, 100–104
- Guillén, D.A., Barroso, C.G., Zorro, L., Carrascal, V., Pérez-Bustamante, J.A. 1998. Organic acids analysis in 'Brandy de Jerez' by ion-exclusion chromatography, 'post-column' buffering and conductimetric detection. *In: Analisis* 26, 186-189.

6. Agradecimientos

Agradecemos a la empresa Barbadillo S.L. su colaboración suministrándonos las muestras estudiadas. Trabajo desarrollado dentro del proyecto AGR 6874, financiado a través de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía.

OT17 - MÉTODOS QUENCHER PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PRODUCTOS SÓLIDOS DERIVADOS DE LA UVA

M^a Luisa González SanJosé, Raquel Del Pino-García, Javier García-Lomillo,

M^a Dolores Rivero-Pérez, Miriam Ortega Heras, Pilar Muñoz-Rodríguez

Universidad de Burgos. Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Ciencias, Plaza Misael Bañuelos s/n, 09001 Burgos, España.

marglez@ubu.es

RESUMEN:

Son numerosos los estudios que se han publicado en las últimas décadas centrados en el estudio de la actividad antioxidante de los alimentos. Cuando se trata de alimentos sólidos, lo más frecuente es proceder a la evaluación tras una fase de extracción.

Este trabajo se centra en la puesta a punto de varios métodos QUENCHER, o de evaluación directa sin fase de extracción, de la actividad antioxidante de productos sólidos derivados de masas de vinificación.

La comparación de los datos obtenidos por estos métodos y los clásicos con fase de extracción ponen de manifiesto una sobrevaloración de la actividad antioxidante de los alimentos evaluados por los métodos de extracción, hecho que probablemente es debido a la extracción forzada de compuestos activos que, cuando están en la matriz alimentaria, realmente no están tan “disponibles” como en los extractos.

Palabras clave: Índice de Folin, ABTS, saborizantes, evaluación directa.

1. Introducción

La demanda de la industria alimentaria de aditivos naturales, incluidos los antioxidantes, viene creciendo desde la década de los 70 (siglo XX). Las demandas de los consumidores actuales y el desarrollo de los alimentos funcionales han contribuido a aumentar notablemente esta demanda. Adaptándose a esta situación, la comunidad científica ha trabajado intensamente en la puesta a punto de métodos que permitan evaluar el valor antioxidante de los alimentos, suplementos dietéticos y de la dieta en general (1). Así, se han desarrollado diversos métodos y protocolos, pero en general, cuando se trata de alimentos sólidos, lo más frecuente es proceder a la evaluación tras una etapa de extracción (2) siendo relativamente novedosa la tendencia a evaluar los productos directamente (métodos QUENCHER) eliminando la extracción (3). El interés de estas metodologías radica en que los resultados se acercan más a la situación real, a la actividad que realmente pueden ejercer los compuestos antioxidantes presentes en el alimento tal y como se encuentran en la matriz alimentaria que los contiene.

Es bien sabido que la uva y sus derivados constituyen una fuente importante de antioxidantes naturales, especialmente de compuestos fenólicos, y son numerosos los trabajos que han evaluado la capacidad antioxidante de uvas y productos derivados aplicando diversos métodos (4). Sin embargo, no se han encontrado trabajos que hayan aplicado métodos QUENCHER a productos sólidos o semisólidos derivados de la uva. Por eso, este trabajo se centró en la puesta a punto de varios métodos QUENCHER de evaluación de la actividad

antioxidante de productos sólidos y en su adaptación para aplicarlos sobre diversos productos sólidos derivados de masas de vinificación.

2. Material y métodos

Se partió de los orujos procedentes de la prensa de la vinificación en tinto, que se recogieron en varias bodegas de la provincia de Burgos. Se prepararon tres tipos de productos distintos. Uno derivado de los orujos completos (libres de raspones, en su caso) (M); otro derivado de los orujos libres de pepitas (H) y otro derivado de las pepitas separadas (P). Tras aplicar los procesos protegidos bajo patente se obtuvieron productos en polvo de granulometría variable.

Los métodos QUENCHER (Q-) Índice de Folin (Q-IF) (5) y Q-ABTS (3) se optimizaron. Además, se pusieron a punto los métodos QUENCHER de captación de radicales libres de interés biológico: superóxido (Q-SRSC), hidroxilo (Q-HRSC), y lipoperóxidos (Q-LPSC), y un método de evaluación *in vitro* de la protección del daño oxidativo al ADN.

Se aplicaron metodologías clásicas (4) (C-) con extracción previa. Los extractos se obtuvieron con metanol acidulado y agitación continua durante 24h.

3. Resultados

Tras los oportunos estudios de adaptación de las condiciones de análisis incluyendo la relación sólido/ volumen de reactivos y tiempo de reacción, se consiguió establecer protocolos analíticos que cumplen con los requisitos de calidad exigibles a cualquier metodología analítica. Se obtuvieron métodos con buena linealidad, repetitividad y reproducibilidad, con la excepción de los métodos Q-HRSC y Q-LPSC, que presentaron una ligera desviación frente al criterio de aceptación de la repetitividad que se considera en 5% (tabla 1). Los métodos frente a radicales biológicos presentaron una reproducibilidad algo inferior a los métodos “químicos” (Q-IF y Q-ABTS), pero todos ellos aceptables ya que fueron inferiores al 7% siendo el 10% el criterio de aceptabilidad más frecuentemente considerado. Cabe indicar también que los rangos de linealidad y los límites de detección obtenidos fueron buenos y perfectamente válidos para ser aplicados en productos con alta capacidad antioxidante.

Tabla 1. Precisión de los métodos QUENCHER desarrollados

Método	Unidades ^{a)}	Repetitividad	Reproducibilidad
		CV (%)	CV (%)
Q-IF	μmol GAE/g product	2.06	2.37
Q-ABTS	μmol TE/g product	2.13	3.05
Q-SRSC	% Inhibición Oxidación	3.27	6.35
Q-HRSC	% Inhibición Oxidación	5.31	6.32
Q-LPSC	% Inhibición Oxidación	5.26	6.35

a) GAE: equivalentes de ácido gálico; TE: equivalentes de Trolox.

Los datos obtenidos al aplicar estos métodos en la evaluación de la capacidad antioxidante de diferentes productos sólidos derivados de la uva fueron satisfactorios con buena reproducibilidad en los tres productos considerados (tabla 2).

Tabla 2. Valores de la actividad antioxidante de tres productos sólidos derivados de orujo tinto completo (M), libre de pepitas (H) y de las pepitas (P), evaluados por métodos QUENCHER (Q-)

Método	Unidades ^a	H		M		P	
		Q-TAC	CV %	Q-TAC	CV %	Q-TAC	CV %
Q-IF	μmol GAE/g product	74 ± 1	1.4	78 ± 2	3.0	52 ± 2	4.8
Q-ABTS	μmol TE/g product	120 ± 5	4.3	150 ± 2	1.8	120 ± 1	0.6
Q-SRSC	% Inhibición Oxidación	31 ± 1	3.8	50 ± 1	3.7	30 ± 1	3.9
Q-HRSC	% Inhibición Oxidación	50 ± 2	5.2	59 ± 1	1.1	53 ± 1	2.0
Q-LPSC	% Inhibición Oxidación	52 ± 2	4.9	62 ± 3	5.4	33 ± 2	7.3

a) GAE: equivalentes de ácido gálico; TE: equivalentes de Trolox.

Estos resultados fueron inferiores a los que se habían obtenido en estudios previos trabajando con extractos. Por ello, y con el fin de evitar posibles diferencias entre partidas de productos, se hicieron extractos con los mismos productos evaluados por métodos QUENCHER y se evaluó la actividad por los métodos clásicos optimizados por el grupo (4). Finalmente se compararon los valores obtenidos en ambos casos.

Los datos obtenidos por cuantificación utilizando la metodología clásica (con extracción) mostraron tendencias similares a los obtenidos por los métodos QUENCHER en presencia de etanol, pero dispares a los obtenidos por los métodos QUENCHER en medio acuoso (figura 1).

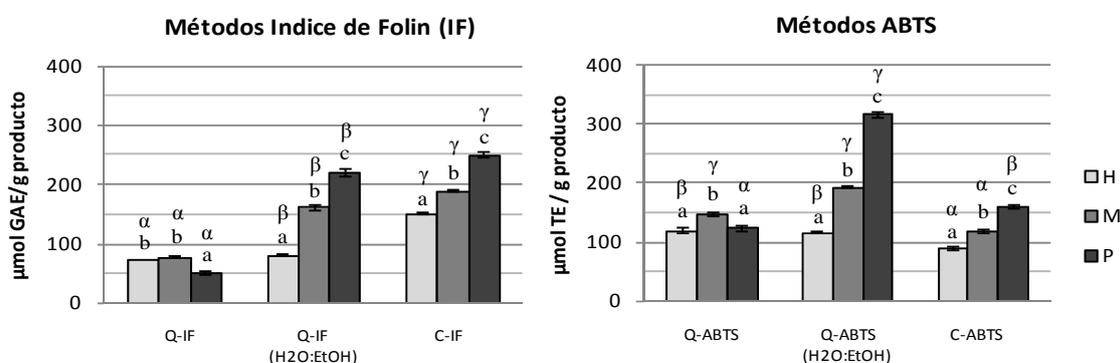


Figura 1. Actividad antioxidante de tres productos derivados de orujo de vinificación en tinto completo (M), libre de pepitas (H) y de las pepitas (P), evaluados por métodos QUENCHER (Q-) en medio acuoso y en presencia de etanol, y por métodos clásicos (C-).

Por otra parte, los resultados obtenidos parecen indicar que la actividad antioxidante puede sobrevalorarse cuando se usan extractos, aunque los resultados dependen del método y del producto. Así se observa una sobrevaloración importante, en todos los casos, cuando se evalúa la capacidad reductora total (C-IF), pero no ocurre así, salvo para el producto derivado de pepitas, al evaluar la capacidad antioxidante global por el método C-ABTS.

Las posibles desviaciones detectadas entre los valores de C-IF y Q-IF se pueden deber a varias razones, entre ellas las relacionadas con la movilidad y difusión de los componentes bioactivos, los cuales en el producto sólido están “atrapados” en la estructura del mismo mientras que en el extracto están “libres”. Además deben considerarse otros aspectos como la solubilidad de los compuestos antioxidantes en el medio de análisis

La importancia del factor solubilidad en el medio se muestra claramente al comparar los datos obtenidos en los métodos QUENCHER aplicados en ausencia y presencia de etanol. Cuando este “disolvente” está presente se obtienen valores notablemente superiores, con diferencias más marcadas cuanto menos solubles son en agua los productos antioxidantes presentes en los productos estudiados. Este fenómeno se observó en ambos casos (IF y ABTS).

4. Conclusiones

Los métodos QUENCHER son simples, rápidos, baratos y precisos y son válidos para aplicarse sobre productos sólidos de diversa naturaleza. La aplicación a productos con alta capacidad antioxidante pasa por buscar la adecuada relación muestra/ reactivos de tal manera que se gasten los menores volúmenes de los segundos sin comprometer la reproducibilidad de la pesada del producto en estudio. No se recomienda la dilución con productos sólidos neutros como se ha descrito en la bibliografía.

La valoración de la actividad antioxidante de un alimento a través de extractos obtenidos en condiciones forzadas puede conducir a estimaciones erróneas (sobrevaloradas) de la capacidad antioxidante real del producto. Sin embargo, esto depende del método de análisis y de la naturaleza de los antioxidantes presentes en el producto en estudio.

5. Bibliografía

- 1.- Becker E. M., Nissen L. R., Skibsted L. H. 2004. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *In: ur. Food Research and Technology.* 219, 561–571.
- 2.- Prior R. L., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *In: Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 53, 4290–4302.
- 3.- Serpen A., Capuano E., Fogliano V., Gökmen V. 2007. A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components. *In: Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 55, 7676–7681.
- 4.- Rivero-Pérez M. D., Muñoz P., Gonzalez-Sanjosé, M. L. 2007. Antioxidant Profile of Red Wines Evaluated by Total Antioxidant Capacity , Scavenger Activity , and Biomarkers of Oxidative Stress Methodologies. *In: Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 55, 5476–5483
- 5.- Kraujalis P., Venskutonis P. R., Kraujalienė V., Pukalskas, A. 2013. Antioxidant properties and preliminary evaluation of phytochemical composition of different anatomical parts of amaranth. *In: Plant Foods for Human Nutrition.* 68, 322–328.

6. Agradecimientos

Financiación de la Junta de Castilla y León a través del proyecto BU-282U13. J. García-Lomillo y R. Pino-García han sido financiados mediante ayudas FPU del MECD.

OT18 - CARACTERÍSTICAS DE SAZONADORES DERIVADOS DE RESIDUOS DE VINIFICACIÓN

M^a Luisa González SanJosé¹, Javier García-Lomillo¹, Raquel Del Pino-García¹, M^a Dolores Rivero-Pérez¹, Miriam Ortega Heras¹ y Pilar Muñiz-Rodríguez¹

¹Universidad de Burgos. Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos, Facultad Ciencias, Plaza Misael Bañuelos s/n, 09001 Burgos, España.

marglez@ubu.es

RESUMEN:

El elevado consumo de sal en los países occidentales y en particular en España y el riesgo de enfermedades asociadas con el excesivo consumo de sodio, han fomentado la puesta en marcha de varias estrategias para conseguir reducir paulatinamente el consumo de sodio. Son varias las alternativas para reducir el contenido de sal en los alimentos, sin embargo, son más limitadas las que pueden satisfacer al consumidor sensorialmente además de mantener niveles de seguridad aceptables y similares a los de los alimentos con sal.

Este trabajo se ha centrado en el estudio de la composición y propiedades tecnológicas de sazónadores obtenidos desde residuos de vinificación. Los productos en estudio, tienen bajos niveles de sodio y son ricos en potasio, permitiendo mejorar la relación sodio/potasio de los alimentos. Por otra parte, su contenido en componentes bioactivos, así como en fibra les aporta propiedades conservantes de interesantes para la industria alimentaria.

Los productos presentaron contenido en fenoles extractables totales (índice de Folin) entre 25 y 45 mg gálico/g, valores de capacidad antioxidante global evaluada (ABTS) entre 20 y 60 mg Trolox/g producto. El valor medio en fibra varió del 49 al 59%. Los contenidos de potasio fueron próximos a 45 mg/g, mientras que los de sodio fueron inferiores a 4 mg/g. Además, son productos libres de sulfuroso y de microorganismos alterantes.

Palabras clave: subproductos vinificación, reducción de sal, polifenoles, fibra, potasio,

1. Introducción

Las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre el consumo de sodio indican que los adultos deberían consumir un máximo de 5 g de sal por persona y día. Estas recomendaciones son notablemente inferiores a las del consumo medio de sodio de la población española. A principio de esta década el consumo medio estimado de sodio rondaba los 12 g/día y actualmente las estimaciones lo sitúan entre 10 y los 8 g/día (1).

La asociación directa entre el consumo excesivo de sodio y ciertas enfermedades como la hipertensión han impulsado campañas de concienciación, tanto entre consumidores como en la industria alimentaria, para reducir paulatinamente el consumo de sal. La implicación de la industria alimentaria es esencial ya que el 80% del consumo de sodio se debe al consumo de alimentos procesados (2).

La sal además de ser un potente saborizante es un conocido conservante, y en los alimentos ejerce ese doble papel. Por lo tanto, la reducción en sal conlleva reducción del sabor y reduce la estabilidad, aumentando los riesgos microbiológicos y, por tanto, reducción la vida útil. Por todo ello, se han desarrollado diferentes estrategias para afrontar la reducción de sal,

de los alimentos procesados, de forma exitosa. Algunas de las más tradicionales suponen la sustitución de la sal por otros productos que también combinan ambas propiedades, como son las especias. Más recientemente se han ensayado productos como derivados de algas.

Este trabajo presenta algunas características químicas, como los principales componentes y la actividad antioxidante, de tres sazónadores obtenidos con un proceso, en fase de ser patentado, desarrollado en el departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Burgos. Además, se comentan características tecnológicas de interés para la industria alimentaria, unidas a posibles aplicaciones.

2. Material y métodos

Se partió de los orujos procedentes de la prensa de la vinificación en tinto que se recogieron en varias bodegas de la provincia de Burgos. Se prepararon tres tipos de productos distintos. Uno derivado de los orujos completos (libres de raspones, en su caso); otro derivado de los orujos libres de pepitas y otro derivado de las pepitas separadas. Tras aplicar los procesos protegidos bajo patente se obtienen productos polvo de granulometría variable.

Los parámetros evaluados en los productos han sido:

a) Componentes mayoritarios (proteína, grasa y fibra) siguiendo los protocolos habituales. Es decir, las proteínas se evaluaron por valoración de nitrógeno total tras la digestión Kjeldahl ; las grasas por pesada tras extracción con éter de petróleo en extractor Soxhlet y posterior pesada del residuo obtenido, y el contenido en fibra total utilizando el método enzimático siguiendo las indicaciones del método AOAC 985.29.

b) Sodio y potasio: Las muestras fueron calcinadas en una mufla a 525°C hasta obtener cenizas blancas y el residuo obtenido fue pesado para calcular el contenido en cenizas totales. La muestra fue posteriormente diluida en una disolución de ácido nítrico. Los contenidos en sodio y potasio fueron medidos usando un detector de fotometría de llama (Flame Photometer 410, Corning, UK).

c) La presencia de SO₂ mediante el kit enzimático desarrollado por R-Biopharm (Darmstadt, Germany) y mediante el método Ripper doble, trabajando con cantidades de variables de producto llegando hasta 5 g.

d) Índice de Folin como indicativo de sustancias reductoras totales (3).

e) La actividad antioxidante se evaluó midiendo la capacidad para reaccionar con el radical del ácido 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS) (4).

f) Carga microbiana, analizándose la presencia de microorganismos aerobios mesófilos totales y mohos y levaduras mediante siembra en *plate count agar* (PCA) (Merck, Darmstadt, Alemania) y agar Sabouraud con cloranfenicol (Pronadisa, Madrid, España), respectivamente.

3. Resultados

Los productos obtenidos presentaron diferencias de composición y de capacidad antioxidante concordantes con su origen (Tabla 1).

La fibra alimentaria total fue el compuesto mayoritario de los tres productos. El producto más rico (59%) fue el obtenido desde las pepitas, concordando con que esta parte de la uva es especialmente rica en fibra. En los subproductos de vinificación predomina la fibra insoluble, especialmente la denominada lignina de Klason (5), que principalmente procede de

las pepitas. Además, éstas presentan elevados contenidos de taninos condensados de alto peso molecular.

Tabla 1. Composición de los tres sazonadores obtenidos a partir del subproducto completo de vinificación (M), del subproducto después de retirar la pepita (Pl) y la pepita (Pt).

Parámetro	Pl	M	Pt
Fibra Dietética Total (% DM)	48.6 ± 0.7 <i>a</i>	49.4 ± 0.9 <i>a</i>	58.9 ± 0.5 <i>b</i>
Proteínas (% DM)	14.35 ± 0.81 <i>b</i>	13.09 ± 1.51 <i>a,b</i>	12.04 ± 0.21 <i>a</i>
Lípidos (% DM)	3.69 ± 0.07 <i>a</i>	10.61 ± 0.18 <i>b</i>	16.99 ± 0.18 <i>c</i>
Cenizas (% DM)	14.37 ± 0.27 <i>c</i>	10.73 ± 0.13 <i>b</i>	2.94 ± 0.21 <i>a</i>
Potasio (mg/g)	43.34 ± 2.53 <i>c</i>	38.20 ± 1.26 <i>b</i>	4.39 ± 0.13 <i>a</i>
Sodio (mg/g)	1.31 ± 0.11 <i>c</i>	0.98 ± 0.07 <i>b</i>	0.12 ± 0.02 <i>a</i>

El contenido en proteínas (nitrógeno total) fue parecido en los tres productos, siendo sólo ligeramente superior en el producto derivado del orujo libre de pepitas. Estos datos se ajustan con la eliminación del efecto “dilución” que producen las pepitas, por ser la parte de la uva con menor contenido de compuestos nitrogenados. Debe considerarse que los productos, al venir de residuos de vinificación en tinto, también contienen el nitrógeno proveniente de los agentes biológicos de las fermentaciones (levaduras y bacterias).

El contenido en lípidos de los productos concuerda con su origen, ya que en los procesos de elaboración se procura conservar los componentes presentes en el material original y no hay fases de extracción en las que los componentes lipídicos se separen. La riqueza en lípidos de los productos derivados de pepitas y de las masas completas les confiere propiedades positivas, como el aporte de ácidos grasos insaturados valiosos desde el punto nutricional. Por otra parte, les hace más sensibles a la oxidación, limitando la estabilidad y la vida de anaquel, sobre todo por problemas de rancidez. La extensión de su vida útil puede conseguirse conservándolos en ausencia de oxígeno, luz y en refrigeración.

El contenido en cenizas, y por tanto en sodio y potasio, también se corresponden bien con las materias de procedencia. Es conocido que durante la maduración el potasio se acumula la uva, y que el hollejo es el gran almacén de este mineral. Por el contrario, el sodio es un mineral que apenas se acumula en las estructuras vegetales. Además, varios autores han descrito la reabsorción de potasio en los orujos en las fases finales de la fermentación, por lo que los orujos y en particular los hollejos son ricos en este mineral. La riqueza en potasio les confiere la posibilidad de considerarlos como posibles sazonadores en sustitución total o parcial de la sal. Además, en términos de contribuir a la hipertensión es importante la contribución positiva de estos productos a la relación potasio/sodio, contraponiendo de esta forma el efecto perjudicial del sodio frente al beneficioso del potasio. Los tres sazonadores tuvieron valores similares con ratios K/Na entre 33 y 37. Estos valores revelan la idoneidad para ser aplicados en productos enfocados a la población hipertensa o con mayor riesgo de padecer esta enfermedad y las asociadas.

Es importante señalar que aunque la incorporación de anhídrido sulfuroso es una práctica normal en bodegas, los productos pueden considerarse libres de sulfuroso, lo cual elimina los problemas relacionados con alergias en personas sensibles. Por otra parte, los sazonadores al final del proceso de elaboración no presentaron carga microbiana, por lo que

su aplicación como ingrediente incluso en productos de consumo en fresco, no comprometería la seguridad alimentaria de los alimentos en los cuales se apliquen.

Es bien sabido que las uvas son fuente de numerosos compuestos bioactivos, y que una gran parte de ellos permanecen aún en los residuos de vinificación, por lo que lo están también en los sazoadores. El contenido de sustancias reductoras extractables totales, evaluadas por el índice de Folin sobre extractos metánolicos, fue mayor en el producto obtenido de las semillas (42 mg ácido gálico/g) que en el obtenido del orujo entero (31 mg/g) o del derivado del orujo libre de pepitas (24 mg/g). Debe señalarse que la mayoría de las sustancias extraídas fueron de naturaleza fenólica, y por tanto de nuevo los resultados se corresponden bien con el origen cada producto. Coincidiendo con la capacidad reductora, la capacidad antioxidante de los extractos mediada por el método ABTS presentó resultados similares (142, 103 y 76 $\mu\text{mol Trolox/g}$, respectivamente).

La capacidad antioxidante de los sazoadores les hace interesantes para la industria alimentaria que puede usarlos para prevenir o bloquear la oxidación de grasas (6), pero también de proteínas y otros constituyentes (datos por publicar). Por otra parte, la capacidad antimicrobiana de algunos de los compuestos fenólicos presentes en ellos, les confieren potencialidad como conservantes. Se ha comprobado su capacidad para el bloquear el crecimiento de algunos de los microorganismos alterantes de los alimentos como las bacterias lácticas y enterobacterias (6).

5. Bibliografía

1. Ortega R. M., López-Sobaler A. M., Ballesteros J. M., Pérez-Farinós N., Rodríguez-Rodríguez E., Aparicio A., Perea J. M., Andrés P. 2011. Estimation of salt intake by 24 h urinary sodium excretion in a representative sample of Spanish adults. *In: British Journal of Nutrition. Cambridge Journals.* 105 (5), 787-794.
2. He F. J., MacGregor G. A. 2010. Reducing Population Salt Intake Worldwide: From Evidence to Implementation. *In: Progress in Cardiovascular Diseases. Elsevier.* 52 (5), 363–382.
3. Singleton V. L., Rossi J.A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *In: American Journal of Enology and Viticulture. American Society for Enology and Viticulture.* 16 (3), 144-158.
4. Rivero-Pérez M. D., Muñoz P., González-SanJosé M.L. 2007. Antioxidant Profile of Red Wines Evaluated by Total Antioxidant Capacity, Scavenger Activity, and Biomarkers of Oxidative Stress Methodologies. *In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. ACS Publications.* 55(14), 5476–5483.
5. Saura-Calixto F. 1998. Antioxidant Dietary Fiber Product: A New Concept and a Potential Food Ingredient. *In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. ACS Publications.* 46 (10), 4303–4306.
6. García-Lomillo J., González-SanJosé M.L., Del Pino-García R., Rivero-Pérez M.D., Muñoz-Rodríguez P. 2014. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Wine Byproducts and Their Potential Uses in the Food Industry. *In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. ACS Publications.* 62,012595-12602.

6. Agradecimientos

Financiación de la Junta de Castilla y León a través del proyecto BU-282U13. J. García-Lomillo y R. Pino-García han sido financiados mediante ayudas FPU del MECD.

OT19 - EVALUACIÓN DEL METABOLISMO COLÓNICO DE UN VINO TINTO MEDIANTE EL EMPLEO DE UN NUEVO MODELO DE SIMULACIÓN GASTROINTESTINAL DINÁMICO (SIMGI)

Carolina Cueva, Adelaida Esteban-Fernández, Irene Gil-Sánchez, Montserrat Dueñas, Pedro J. Martín-Álvarez, M^a Ángeles Pozo-Bayón, Begoña Bartolomé, M^a Victoria Moreno-Arribas

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC-UAM, Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos, c/ Nicolás Cabrera 9, 28049, Madrid, España
carolina.cueva@csic.es

RESUMEN:

Los polifenoles del vino pueden influir positivamente en la salud del hombre modificando la actividad metabólica y/o composición de la microbiota intestinal. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el metabolismo colónico de un vino tinto mediante el empleo de un nuevo modelo de simulación dinámica del tracto gastrointestinal (denominado SIMGI), utilizando heces humanas de donantes sanos (n=2). Para los tres compartimentos del colon -ascendente, transversal y descendente- se llevó a cabo la monitorización de diferentes parámetros metabólicos (compuestos fenólicos del vino y sus metabolitos, ion amonio y ácidos grasos de cadena corta (SCFA)) y microbiológicos (recuentos, qPCR), incluyendo la comparativa tras la alimentación del sistema con vino sintético (sin polifenoles). Los resultados mostraron que la ingesta moderada de vino activaba el metabolismo de la microbiota colónica. Se encontraron aumentos significativos para los ácidos gálico, protocatéquico, 3-O-metilgálico, 4-hidroxibenzoico, 3,4-dihidroxifenilpropiónico, vainillínico, siríngico, y salicílico después de la alimentación con vino. Simultáneamente, se observó una disminución en la formación del ion amonio y un incremento en la proporción del ácido butanoico. A nivel microbiológico, los principales cambios tuvieron lugar en el colon ascendente. En conclusión, estos resultados ponen de manifiesto que el vino modula la actividad metabólica de la microbiota intestinal *in vitro*, y demuestran la utilidad del SIMGI como modelo de simulación gastrointestinal dinámica.

Palabras clave: SIMGI, vino, microbiota intestinal, metabolismo, polifenoles.

1. Introducción

El intestino grueso humano alberga un complejo ecosistema de comunidades microbianas, que alcanzan sus concentraciones más altas a nivel del colon (hasta 10^{12} células por gramo de heces) [1]. La composición de la microbiota intestinal en la vida adulta es bastante estable, si bien existen factores como la edad, las diferencias inter-individuales, la dieta y determinadas enfermedades que pueden afectar a la composición y actividad metabólica de la microbiota [2]. Entre los compuestos de la dieta que pueden modificar el ambiente intestinal e influir positivamente en la salud del hombre se encuentran los polifenoles, abundantes en el vino [3].

Para abordar el estudio del efecto de los ingredientes dietéticos o alimentos en la microbiota intestinal, se pueden emplear tanto estudios *in vitro* como *in vivo*. Los estudios *in vivo* constituyen los mejores modelos para evaluar las interacciones de los componentes de los alimentos con la microbiota intestinal, sin embargo, resultan costosos, de larga duración y tienen limitaciones éticas. Es por ello, que las simulaciones *in vitro*, que permiten una monitorización a lo largo de todo el proceso experimental, se perfilan como una alternativa apropiada para este tipo de estudios.

El vino tinto presenta un alto contenido de polifenoles, principalmente de flavan-3-oles, antocianinas, flavonoles, y ácidos fenólicos. Aunque el metabolismo de estos compuestos comienza en la boca, la mayoría llegan intactos al colon, donde por acción de la microbiota intestinal dan lugar a ácidos fenólicos, que pueden tener mayor actividad a nivel fisiológico que sus compuestos precursores [4]. Hasta el momento, son pocos los estudios *in vitro* e *in vivo* que han evaluado la interacción entre los polifenoles del vino y la microbiota intestinal, sin embargo, todos ellos parecen evidenciar que los polifenoles son capaces de modificar selectivamente el crecimiento de algunos grupos microbianos intestinales, así como de promover cambios en su actividad metabólica [5].

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el metabolismo colónico de un vino tinto mediante el empleo de un nuevo modelo de simulación dinámico del tracto gastrointestinal (SIMGI) recientemente desarrollado en el CIAL [6,7].

2. Material y métodos

Para llevar a cabo la simulación gastrointestinal en el SIMGI se utilizó un vino tinto joven (var. Pinot Noir, vendimia 2010), proporcionado por Bodegas Miguel Torres S.A. (Cataluña, España) y con un contenido en polifenoles totales de 1.758 mg de ácido gálico/L. También se empleó un vino sintético (ácido tartárico 4 g/L, 12% etanol, pH 3.6,) con el fin de evaluar el efecto del etanol sobre la actividad metabólica de la microbiota.

El SIMGI permite simular en continuo y de manera conjunta los procesos de digestión gastrointestinal y fermentación colónica que tienen lugar en el sistema digestivo del hombre. Está formado por 5 compartimentos, estómago, intestino delgado, colon ascendente (CA), transversal (CT) y descendente (CD), gobernados por un autómata [6]. En particular para este estudio, donde el interés reside en evaluar el metabolismo colónico de los polifenoles, el sistema funcionó con los módulos correspondientes al intestino delgado y el colon. En primer lugar, los compartimentos del colon se llenaron con 250 ml (CA), 400 ml (CT) y 300 ml (CD) de medio nutritivo, siendo posteriormente inoculados con 20 ml de suspensión fecal al 20% (w/v). El modo de operación del SIMGI a lo largo del estudio fue el siguiente: el intestino delgado se alimentó con una mezcla de 75 ml del medio nutritivo y 40 ml del jugo pancreático tres veces al día (8 h x 3). Tras 2 h de digestión intestinal a 37°C, la mezcla se transfirió automáticamente al CA, y de forma simultánea se activó el tránsito de fluidos entre los compartimentos del colon. El pH del colon ascendente, transversal y descendente se mantuvo de forma automática en 5.6, 6.3 y 6.8, respectivamente. Además, todos los compartimentos se mantuvieron a 37°C, y en condiciones anaerobias mediante un flujo constante de nitrógeno.

Para este estudio, se realizaron dos experimentos independientes en el SIMGI, utilizando muestras fecales de dos voluntarios sanos. Para cada experimento, tras la inoculación de la microbiota fecal, se aplicó un periodo de estabilización inicial de dos semanas para permitir que las bacterias intestinales se adaptasen y formaran una comunidad microbiana estable. Durante este periodo, el sistema se alimentó con medio nutritivo. Después de la estabilización, para simular la ingesta de un vaso de vino, la alimentación con el medio nutritivo fue reemplazada por vino tinto (225 ml) repartida en tres dosis en el mismo día (75 ml cada 8 h). Posteriormente, el sistema se alimentó con medio nutritivo durante seis días para volver a las condiciones iniciales de estabilización. Esta secuencia experimental se repitió dos veces para cada experimento (voluntarios 1 y 2). Además, en el caso de voluntario 2, se llevó a cabo una alimentación extra con vino sintético a fin de evaluar el efecto del etanol sobre la composición y la actividad metabólica de la microbiota SIMGI.

Durante todo el estudio, se recogieron muestras de los tres compartimentos de colon a distintos tiempos con el fin de monitorizar los cambios en la microbiota y su actividad metabólica. El análisis metabólico incluyó la determinación de los compuestos fenólicos del vino y sus metabolitos por UPLC-ESI-TQ MS/MS, de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) por SPME-GCMS, y del ion amonio a través de un medidor de pH/ion acoplado a un electrodo selectivo de iones de amonio. Por otro lado, a nivel microbiológico se llevaron a cabo recuentos bacterianos en medios selectivos y generales, así como la cuantificación de las poblaciones microbianas mediante qPCR. Los métodos estadísticos utilizados para el análisis de los datos fueron el análisis de varianza (ANOVA) y es test de Fisher (LSD).

3. Resultados

En primer lugar, y dada la novedad de este sistema de simulación, se comprobó que los protocolos de funcionamiento y de administración de vino empleados permitían monitorizar adecuadamente los diferentes parámetros metabólicos.

A nivel metabólico, los resultados mostraron que, en general, la formación de metabolitos fenólicos tras la alimentación con vino tinto ocurre de forma secuencial conforme avanza el proceso de digestión, esto es, primero en el colon ascendente, y posteriormente en el colon transversal y descendente, siendo estos dos últimos donde se alcanzaban los niveles más altos de metabolitos. En particular, se encontraron aumentos significativos para los ácidos gálico, protocatéuico, 3-O-metilgálico, 4-hidroxibenzoico, 3,4-dihidroxifenilpropiónico, vainillínico, siríngico, y salicílico, lo que está de acuerdo con un estudio previo de intervención en humanos llevado a cabo con el mismo vino [8]. Comparativamente, la alimentación con el vino sintético, empleada para determinar el efecto del etanol, no generó metabolitos fenólicos. Por otro lado, la alimentación con vino tinto produjo una disminución gradual en la concentración de amonio en todos los compartimentos, siendo más pronunciada en el colon ascendente, y que podría deberse, al menos en parte, a la capacidad de los polifenoles del vino para reducir la fermentación colónica de proteínas [9]. De igual forma, el vino sintético dio lugar a una disminución de la concentración de amonio en el colon ascendente, sin embargo aumentó de forma considerable en el colon transversal y descendente. En cuanto a la concentración de ácidos grasos, los resultados mostraron que la alimentación con vino tinto o sintético era compartimento-dependiente, siendo mayor en el colon transversal y descendente. Cabe destacar que la alimentación con vino tinto produjo un aumento en el porcentaje de ácido butanoico, conocido por sus efectos beneficiosos en la mucosa intestinal [10].

A nivel microbiológico, y con el fin de comparar la influencia del vino tinto frente al vino sintético en algunos grupos representativos de la microbiota intestinal, se realizaron recuentos microbianos antes y después de las alimentaciones para todos los compartimentos. En general, tanto la alimentación con vino tinto como con vino sintético dio lugar a una disminución en los recuentos bacterianos en el CA, llegando a ser significativa en el caso de las bacterias lácticas. Por el contrario, este grupo bacteriano experimentó un aumento significativo en el CT y CD sólo tras la alimentación con vino tinto, lo cual sugiere la capacidad de las bacterias lácticas para crecer en presencia de polifenoles del vino. En cuanto a los resultados obtenidos por qPCR, también se observó una disminución de los grupos bacterianos analizados en el CA tras la alimentación del vino tinto y el vino sintético.

4. Conclusiones

En conclusión, estos resultados ponen de manifiesto que la alimentación con vino tinto del SIMGI activa el metabolismo de la microbiota colónica, produciendo una gran cantidad de metabolitos fenólicos, así como una disminución en la formación del ion amonio y un aumento en la proporción de ácido butanoico. A su vez, se ha comprobado que la actividad metabólica de la microbiota es dependiente del compartimento. Simultáneamente, la alimentación con vino tinto genera cambios a nivel microbiológico, principalmente en el colon ascendente. En conjunto, los resultados de este estudio han demostrado la utilidad de la SIMGI como modelo dinámico de simulación del tracto gastrointestinal humano.

5. Bibliografía

1. Doré, J., Corthier, G. 2010. The human intestinal microbiota. *In: Gastroenterologie Clinique et Biologique.* 34, S7-S15.
2. Salonen, A., De Vos, W.M. 2014. Impact of diet on human intestinal microbiota and health. *In: Annual Review of Food Science and Technology.* 5, 239-262.
3. Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F.J., Queipo-Ortuño, M.I. 2013. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *In: Journal of Nutritional Biochemistry.* 24, 1415-1422.
4. Monagas, M., Urpi-Sarda, M., Sánchez-Patán, F., Llorach, R., Garrido, I., Gómez-Cordovés, C., y col. 2010. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *In: Food and Function.* 1, 233-253.
5. Cueva, C., Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Walton, G. E., Gibson, G.R., Martín-Álvarez, P.J., y col. 2013. *In vitro* fermentation of grape seed flavan-3-ol fractions by human faecal microbiota: Changes in microbial groups and phenolic metabolites. *In: FEMS Microbiology Ecology,* 83, 792-805.
6. Barroso, E., Cueva, C., Peláez, C., Martínez-Cuesta, M.C., Requena, T. 2015. Development of human colonic microbiota in the computer-controlled dynamic SIMulator of the GastroIntestinal tract SIMGI. *In: LWT- Food Science and Technology.* 61, 283-289.
7. Cueva, C., Jiménez-Girón, A., Muñoz-González, I., Esteban-Fernández, A., Gil-Sánchez, I., Dueñas, M., y col. 2015. Application of a new *in vitro* Gastrointestinal Simulator (SIMGI) to study the impact of wine in colonic metabolism. *In : Food Research International,* 72, 149-159.
8. Muñoz-González, I., Jiménez-Girón, A., Martín-Álvarez, P. J., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M. V. 2013. Profiling of microbial-derived phenolic metabolites in human feces after moderate red wine intake. *In: Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 61, 9470-9479.
9. Jacobs, D.M., Fuhrmann, J.C., Van Dorsten, F. A., Rein, D., Peters, S., Van Velzen, E.J.J., y col. 2012. Impact of short-term intake of red wine and grape polyphenol extract on the human metabolome. *In: Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 60, 3078-3085.
10. Van Immerseel, F., Ducatelle, R., De Vos, M., Boon, N., Van De Wiele, T., Verbeke, K., y col. 2010. Butyric acid-producing anaerobic bacteria as a novel probiotic treatment approach for inflammatory bowel disease. *In: Journal of Medical Microbiology.* 59, 141-143.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el MINECO a través del proyecto AGL2012-40172-C02-01, el Programa de la Comunidad Madrid ALIBIRD-CM S2013/ABI -2728 y el Proyecto Intramural CSIC 201270E065.

OT21 - ESTUDIO DEL PERFIL SENSORIAL DE LOS TAPONES DE CORCHO NATURAL PARA VINOS TRANQUILOS

Jordi Roselló¹, Miquel Puxeu¹, Juan-José R. Coque²

¹ Parc Tecnològic del Vi, Carretera de Porrera, Km.1, 43730 Falset.

² Instituto de Investigación de la Viña y el Vino, Universidad de León, Avda de Portugal 41, 24071 León.
e-mail: jordi.rosello@vitec.cat

RESUMEN:

El corcho contiene compuestos que pueden migrar al vino y afectar de forma positiva o negativa a la calidad. El objetivo de este trabajo fue determinar los compuestos positivos presentes en el corcho y que pueden contribuir a la calidad sensorial de los vinos. Se analizaron tapones de corcho natural terminados, provenientes de nueve regiones corcheras distintas de Portugal, Marruecos, España, Francia e Italia. Se detectaron un total de veintinueve compuestos capaces de impactar positivamente en el vino agrupados en las siguientes familias: fenoles volátiles, aldehídos, cetonas, cetonas aromáticas, alcoholes, terpenoles, furanos, ácidos aromáticos, esterés etílicos y ácidos grasos.

Se observó una gran diversidad en la composición aromática de los tapones de corcho de las distintas procedencias. Los corchos analizados mostraron una relación entre el perfil sensorial de los tapones y la zona de procedencia del corcho.

Palabras clave: Corcho, compuestos positivos, perfil aromático, vainillina.

1. Introducción

El envejecimiento en botella es un proceso muy importante en la elaboración de los vinos. Durante este tiempo el vino sufre complejos cambios químicos que pueden afectar la composición aromática, las sensaciones en boca, el color y en conjunto la percepción de calidad del producto. La difusión del oxígeno a través del tapón de corcho es el principal causante de los cambios químicos que ocurren en este proceso de crianza. Dependiendo de la cantidad de oxígeno que entra en la botella a través del tapón de corcho el vino puede mejorar sus características o desarrollar aromas defectuosos.

El tapón de corcho también puede afectar positivamente la calidad del vino mediante la aportación de compuestos positivos que pueden migrar del corcho al vino. Compuestos presentes en el corcho, como pueden ser alcoholes, ácidos, aldehídos y acetonas pueden contribuir positivamente a la calidad sensorial (1).

La estructura física y la composición química del corcho le confieren particulares características: impermeabilidad, compresibilidad, recalcitrancia a la degradación y una gran tendencia a comportarse como un material químicamente inerte. El corcho está constituido esencialmente por suberina, celulosa, lignina y una pequeña proporción de compuestos extraíbles (2). Entre estos últimos se encuentran determinados compuestos que pueden ser extraídos por una solución hidroalcohólica como es el vino.

La composición química del corcho y su perfil sensorial se ven afectados por el proceso de fabricación del tapón (3). El origen geográfico del corcho también puede incidir en su composición química (4).

El análisis de las poblaciones de alcornocal mediante marcadores del DNA de los cloroplastos (microsatélites), identifica 5 diferentes halotipos, cada uno de ellos distribuido en las poblaciones de una determinada área geográfica (5). Esta variabilidad genética puede ser origen también de variabilidad en la composición química.

El objetivo de este trabajo fue determinar los compuestos positivos presentes en el corcho y que pueden contribuir a la calidad sensorial de los vinos. Para ello, se ha determinado el perfil aromático de tapones de corcho natural de nueve localizaciones distintas.

2. Material y métodos

Se analizaron tapones comerciales producidos a partir de corcho de nueve procedencias distintas:

Portugal: Vale do Tejo, Alentejo, Algarbe.

España: Extremadura, Cataluña, Valencia.

Italia: Toscana, Cerdeña.

Marruecos: Maâmora.

En todos los casos se analizaron tapones de dimensiones 44x24 mm, clase visual extra y tratamiento de superficie con silicona

Los tapones de corcho fueron triturados (0,5 – 1 mm de diámetro de partícula) y 25 g del triturado fueron macerados en un litro de solución hidroalcohólica durante 10 días a temperatura ambiente. Se utilizó la extracción en fase sólida (SPE) mediante resina LiChrolut EN empacada en cartuchos de 200 mg (Merk, Darmstadt, Alemania).

Cien ml de la solución, a los que se añadió 10 µl de solución de 2-octanol como patrón interno, se pasaron a través de un cartucho SPE con un flujo de 2 ml/min. Posteriormente el solvente fue secado y los analitos fueron recuperados con 5 ml de diclorometano. Las muestras fueron concentradas al rotavapor hasta 300 µl.

Se analizaron por GC-MS soluciones de concentración conocida de los patrones en diclorometano para elaborar las rectas de calibración y cuantificar los distintos compuestos.

El análisis por GC-MS se realizó mediante un cromatógrafo de gases GC 7890 (Agilent Tecnologías, Wilmington, USA) acoplado a un detector de espectrometría de masas MSD 5975C (Agilent Tecnologías, Wilmington, USA). La columna utilizada fue una HP5-MS (Agilent Tecnologías, Wilmington, USA). El programa de temperaturas fue de 40°C (durante 1min), 5°C/min hasta 225°C, 20°C/min hasta 290°C con un post run a 300°C durante 2 min. Los compuestos volátiles se identificaron mediante comparación de los espectros de masas con la librería NIST (Agilent Tecnologías, Wilmington, USA) y mediante sus tiempos de retención.

3. Resultados

Se han detectado 29 compuestos aromáticos en las muestras de corcho analizadas, que han sido agrupados en las siguientes familias: vainillina y derivados, fenoles volátiles, aldehídos, cetonas, cetonas aromáticas, alcoholes, terpenoles, furanos, ácidos aromáticos, ésteres etílicos y ácidos grasos.

La vainillina es el compuesto, con un impacto positivo sobre el vino, que se ha detectado en el corcho a mayor concentración (gráfico 1). Este compuesto está

frecuentemente presente en el aroma de los vinos criados en barrica. Otros compuestos detectados y que aportan aromas relacionados son la acetovanillona y la vainillil metil cetona.

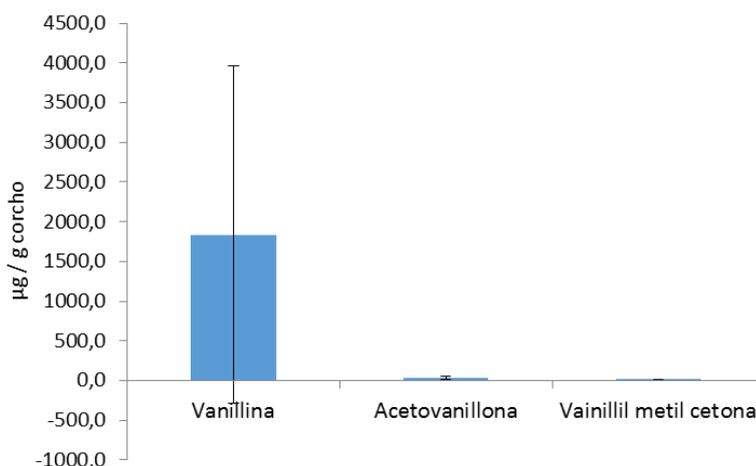


Figura 1.- Media y desviación estándar de la concentración de vainillina y derivados en las muestras de corcho analizadas.

Otros compuestos detectados han sido:

- ✓ Fenoles volátiles: eugenol, isoeugenol, guaiacol y dihidroeugenol.
- ✓ Alcoholes: alcohol fenilético y alcohol bencílico.
- ✓ Aldehídos: benzaldehído, bencenacetaldehído y nonanal.
- ✓ Cetonas: 2-octanona y acetofenona.
- ✓ Terpenoles: β -terpineol, 4-terpineol, α -terppineol, alcanfor, veratrol y borneol.
- ✓ Esteres etílicos: octanoato de etilo, γ -nonalacton.
- ✓ Ácidos grasos: ácido nonanoico y ácido dodecanoico.
- ✓ Furanos: furfural y 2-pentilfurano.
- ✓ Cetonas aromáticas: benzofenona.
- ✓ Ácidos aromáticos: Ácido bencenacético.

La mayoría de estos compuestos se detectan frecuentemente en el vino y contribuyen a su aroma. Algunos pueden aparecer en alimentos como la miel, el queso, o en aceites esenciales, o son productos de degradación de la madera.

Con los datos de concentraciones en los tapones de distintas procedencias, se ha llevado a cabo un análisis de componentes principales (Figura 2). El primer componente principal, que recoge el 40% de la variabilidad, ordena los corchos según su origen. Los corchos atlánticos y de España continental se agrupan a la izquierda del gráfico, mientras que los corchos mediterráneos lo hacen a la derecha. Los corchos atlánticos presentan una mayor contribución de aldehídos y vainillina mientras que los corchos mediterráneos presentan mayor contribución de cetonas, cetonas aromáticas y alcoholes.

Teniendo en cuenta los dos primeros componentes principales se establecen cuatro grupos. Un primer grupo de corchos de Alentejo y Valle del Tajo con una importante contribución de aldehídos y vainilla. Un grupo formado por los corchos del Algarve, Extremadura y levante español, cuya contribución principal son los fenoles volátiles. El corcho de Marruecos se diferencia del resto por su mayor contribución de furanos, ácidos aromáticos y ésteres etílicos. Finalmente, los corchos italianos (Cerdeña y Toscana) destacan por su mayor contribución de cetonas, alcoholes y ácidos grasos.

OT22 - EL CONSUMO MODERADO DE VINO TINTO SE ASOCIA CON UNA BAJA PREVALENCIA DE SÍNDROME METABÓLICO EN UNA POBLACIÓN DE ALTO RIESGO CARDIVASCULAR. ESTUDIO PREDIMED

Alexander Medina-Remón^{1,2}, Anna Tresserra-Rimbau^{2,3}, Rosa M. Lamuela-Raventós^{2,3}, Monica Bulló^{2,4}, Jordi Salas-Salvadó^{2,4}, Dolores Corella^{2,5}, Montserrat Fitó^{2,6}, Alfredo Gea², Enrique Gómez-Gracia², José Lapetra², Fernando Arós², Miquel Fiol², Emili Ros², Lluís Serra-Majem², Xavier Pintó², Miguel A. Muñoz², Ramón Estruch^{1,2}, en nombre de los investigadores del estudio PREDIMED.

¹ Universidad de Barcelona, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Departamento de Medicina Interna, C/Casanova, 143, 08036, Barcelona, España.

² Centro de Investigación Biomédica en Red de la Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN). Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

³ Universidad de Barcelona, Facultad de Farmacia, Departamento de Nutrición y Bromatología, XaRTA, INSA, Av Joan XXIII s/n, 08028, Barcelona, España.

⁴ Universidad de Rovira i Virgili, Facultad de Medicina, Unidad de Nutrición Humana, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, IISPV, C/Sant Llorenç, 21, 43201, Reus, España.

⁵ Universidad de Valencia, Facultad de Medicina, Unidad de Genética y Epidemiología Molecular, Avda. Blasco Ibañez, 15, 46010, Valencia, España.

⁶ Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Grupo de Investigación Riesgo Cardiovascular y Nutrición, Dr. Aiguader, 88, 08003, Barcelona, España.
amedina@ub.edu

RESUMEN:

El síndrome metabólico (SM) es un grupo de alteraciones metabólicas que incluye la obesidad abdominal, hipertrigliceridemia, niveles bajos de colesterol HDL, hipertensión e hiperglucemia. El objetivo de este estudio fue investigar la relación entre la ingesta de vino tinto (VT) y la prevalencia del SM y sus componentes individuales en una población mediterránea con alto riesgo cardiovascular. Comparado con los no consumidores, los consumidores moderados de VT (≥ 1 bebida/d) mostraron una reducción de la prevalencia del SM (OR=0.56; $P<0.001$), un menor riesgo de tener la circunferencia de la cintura elevada (OR=0.59; $P<0.001$), bajo colesterol HDL (OR=0.42; $P<0.001$), alta presión arterial (OR=0.28; $P<0.001$) y elevada glucosa plasmática en ayunas (OR=0.67; $P<0.001$). En una población adulta con alto riesgo cardiovascular, el consumo moderado de VT reduce la prevalencia del SM, así como cuatro de los cinco criterios metabólicos individuales incluidos en el SM.

Palabras clave: síndrome metabólico, vino tinto, alcohol, PREDIMED.

1. Introducción

El síndrome metabólico (SM) es un grupo de alteraciones metabólicas que incluye obesidad abdominal, hipertrigliceridemia, niveles bajos de colesterol HDL, hipertensión e hiperglucemia. El SM es el resultado de la interacción de múltiples elementos, en el que los factores genéticos y ambientales, junto con los hábitos alimentarios, juegan un papel crucial en su desarrollo¹.

Estudios previos han demostrado distintos efectos, negativos y positivos, del consumo de alcohol sobre el síndrome metabólico². Sin embargo, en un meta-análisis de estudios

observacionales Alkerwi y cols.³ observaron que un efecto metabólico favorable parece estar restringido a un consumo moderado de alcohol, es decir, menos de 20 g/día en mujeres y menos de 40 g/día en hombres. Mientras que algunos autores no han encontrado diferencias en la incidencia de SM entre los consumidores de diversas bebidas alcohólicas, otros han reportado tasas más bajas en los bebedores de vino^{2,4}. Sin embargo, en el estudio SUN, Barrio-López y cols. encontraron que los consumidores de al menos 7 bebidas alcohólicas por semana aumentaban la probabilidad de desarrollar un SM, sin observar una asociación significativa con el consumo de vino o licor⁴. El vino tinto (VT) además de su contenido en alcohol, es rico en compuestos fenólicos, que pueden tener efectos positivos sobre el metabolismo de los hidratos de carbono⁵ y la presión arterial⁶. Diferentes estudios de intervención en humanos han mostrado que otros alimentos ricos en polifenoles aumentan la concentración del colesterol HDL⁷, sin embargo los pocos estudios relacionados con la adiposidad abdominal han arrojado resultados contradictorios.

El objetivo de este estudio fue investigar la relación entre el consumo de VT y la prevalencia del SM y sus componentes individuales en una población mediterránea con alto riesgo cardiovascular.

2. Material y métodos

Se realizó un estudio transversal con datos basales de 5801 participantes de cohorte PREDIMED (*PREvención con Dieta MEDiterránea*) (www.predimed.org; ISRCTN35739639). La descripción detallada del estudio ha sido publicada anteriormente⁸. Este estudio se llevó a cabo de acuerdo con las directrices establecidas en la Declaración de Helsinki y todos los procedimientos fueron aprobados por los Comités de Ética e Investigación de todos los centros participantes. Asimismo, todos los participantes firmaron un consentimiento informado aceptando su inclusión en el estudio.

Los hábitos dietéticos fueron evaluados mediante un cuestionario de frecuencia de consumo de 137 puntos, el consumo diario de alimentos y nutrientes fue estimado según este cuestionario. También se utilizó un cuestionario validado de 14 puntos para valorar el grado de adherencia a la dieta mediterránea tradicional. Además se rellenó un cuestionario general sobre hábitos de vida, enfermedades y tratamientos seguidos, así como un cuestionario validado de actividad física (Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire).

El peso corporal y altura se midieron con el mínimo de ropa y sin zapatos, con una balanza calibrada y un estadiómetro, respectivamente. La circunferencia de la cintura se midió en el punto medio entre la última costilla y la cresta ilíaca utilizando una cinta antropométrica. La presión arterial se midió por triplicado en posición sentada, utilizando un esfigmomanómetro semiautomático (Omron HEM-705CP, Hoofddorp, The Netherlands), con un intervalo de 5 minutos entre cada medición, y se registró la media de estos valores, siguiendo los procedimientos recomendados por la Sociedad Europea de Hipertensión. La glucosa plasmática y los perfiles de lípidos se midieron usando un analizador automático. Para los pacientes con niveles de triglicéridos menos de 400 mg/dL, las concentraciones de colesterol LDL fueron estimadas utilizando la fórmula de Friedewald.

El cuestionario de frecuencia de consumo incluía preguntas relativas a la ingesta de vino (VT, vino rosado, vino blanco y vino espumoso), cerveza, licores y bebidas destiladas. Se utilizó la Unidad Básica de bebida 10 g de alcohol puro, para categorizar la ingesta de alcohol, es decir: 100 mL de vino, 250 mL de cerveza, 65 mL de licores y 32 mL de licores. La ingesta de VT se clasificó en tres grupos: no bebedores, 0.1-1 bebida/día y ≥ 1 bebida/día.

El SM se definió de acuerdo a los criterios actualizados de la Federación Internacional de Diabetes (IDF) y la Asociación Americana de Cardiología/Instituto Nacional de Cardiología, Neumología y Hematología (AHA/NHLBI). Los participantes se diagnosticaron de SM si cumplían al menos tres de los

siguientes criterios: a) perímetro de cintura elevado (≥ 88 cm en mujeres y ≥ 102 cm hombres), b) triglicéridos elevados [≥ 150 mg/dL (1.7 mmol/L)] o tratamiento hipotrigliceridemiante, c) Concentración baja de colesterol HDL [≤ 40 mg/dL (1.0 mmol/L) en los hombres; ≤ 50 mg/dL (1.3 mmol/L) en mujeres] o tratamiento hipolipemiante, d) presión arterial elevada (sistólica ≥ 130 y/o diastólica ≥ 85 mmHg) o tratamiento antihipertensivo, e) Concentración elevada de glucosa plasmática en ayunas [≥ 100 mg/dL (5.5 mmol/L)] o tratamiento hipoglucemiante.

Para comparar las medias de variables continuas entre los diferentes grupos de VT se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) con la prueba post-hoc de Bonferroni. Las odds ratio (OR) para el SM y cada uno de sus componentes individuales en las diferentes categorías de consumo de VT se calcularon con análisis de regresión logística multivariante, con el SM y sus componentes individuales como variables dependientes y los grupos de consumo de VT como variables independientes. En los modelos multivariantes, se ajustó por sexo, edad, índice de masa corporal (IMC), condición de fumador (nunca, fumadores y ex-fumadores), actividad física durante el tiempo libre (sí/no), energía total ingerida, nivel educativo y adhesión al patrón de dieta Mediterránea excluyendo el consumo de vino. Se realizaron análisis adicionales estratificados por sexo, grupos de edad (< 70 y ≥ 70 años) y la condición de fumador (nunca/siempre). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software de IBM SPSS v19.0 (Chicago, USA). Los valores $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

3. Resultados

En el estudio se analizaron los resultados de 5801 participantes, 2433 hombres y 3368 mujeres con alto riesgo cardiovascular, dentro del estudio PREDIMED. El 52.4% (3037) de los participantes no consumían vino, el 36% (2086) consumían menos de 1 bebida/día y el resto (12%) ≥ 1 bebida/día. Los participantes con la mayor ingesta de VT (≥ 1 bebida/día) eran hombres, fumadores o ex-fumadores, más activos físicamente y tenía una educación superior. Además, consumían más calorías totales, hidratos de carbono, proteínas, colesterol total y ácidos grasos saturados, mono insaturados y poli insaturados. El consumo de frutas, verduras, hortalizas y productos lácteos fue menos frecuente en el grupo de bebedores intermedio (0.1-1 bebida/día), aunque no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos en cuanto a la adherencia a la dieta Mediterránea tradicional.

De los 5801 participantes incluidos en el estudio el 67% cumplían criterios de SM. Los participantes con la mayor ingesta de VT (n=678) tenían el IMC y el ritmo cardíaco más bajo, pero mayor presión arterial. No se observaron diferencias significativas entre los grupos en el colesterol total o el HDL. Sin embargo, cuando se tradujeron estos valores a los componentes de SM teniendo en cuenta la medicación para tratar la trigliceridemia, la hipertensión o la diabetes se observó un menor número de casos de SM (53.4% del total del grupo) entre los mayores consumidores de VT, así como una menor prevalencia de la circunferencia de cintura elevada, concentraciones altas de triglicéridos, concentraciones bajas de colesterol HDL, presión arterial elevada y cifras altas de glucemia en ayunas. En el grupo de no consumidores (n=3037), se observó un 74.7 % de casos de SM, mientras que en el grupo intermedio (0.1-1 bebida/día; n=2086) se observó un 60.7 % de casos.

Se calculó el riesgo relativo del SM y sus componentes utilizando regresión logística, tomando el grupo de no consumidores como categoría de referencia y ajustando por los diferentes factores de confusión descritos anteriormente. El consumo de ≥ 1 bebida/día de VT se asoció con una reducción estadísticamente significativa del riesgo de SM en el análisis antes y después del ajuste (OR=0.56, 95%IC 0.45, 0.68; $P < 0.001$). Teniendo en cuenta los componentes individuales del SM, los participantes en el grupo de mayor consumo de VT (más de 1 copa al día) mostraron un riesgo 41% menor de tener la circunferencia de la cintura elevada (OR=0.59, 95%IC 0.46, 0.77; $P < 0.001$), un riesgo 58% menor de tener bajo colesterol

HDL (OR=0.42, 95%IC 0.32, 0.53; $P<0.001$), un riesgo 72% menor de tener la presión arterial elevada (OR=0.28, 95%IC 0.17, 0.45; $P<0.001$) y un riesgo 33% menor de tener una cifra elevada de glucemia en ayunas (OR=0.67, 95%IC 0.54, 0.82; $P<0.001$).

El análisis estratificado por sexos reveló un menor riesgo de SM en las mujeres que consumían ≥ 1 bebida/día (OR=0.47; $P<0.001$) que en los hombres (OR=0.68; $P=0.004$) tras el ajuste multivariante. En el análisis estratificado por edad (< 70 y ≥ 70 años), el efecto del VT se mantenía significativo sólo en el grupo de participantes < 70 años (OR=0.49; $P<0.001$). Al estratificar por condición de fumador, nos encontramos con una reducción del 43% en el riesgo de SM en los fumadores y ex-fumadores (OR=0.57; $P<0.001$) y una reducción del 40 % entre los que nunca habían fumado.

4. Conclusiones

En una población adulta con alto riesgo cardiovascular, los consumidores moderado de VT (≥ 1 bebida/día), comparado con los no consumidores, tuvieron una menor prevalencia de SM, de circunferencia de la cintura elevada, niveles bajos de colesterol HDL, la presión arterial elevada e hiperglucemia, cuatro de los cinco criterios metabólicos individuales incluidos en el SM.

5. Bibliografía

1. Babio N., Bulló M., Basora J.; *et al.* 2009. Adherence to the Mediterranean diet and risk of metabolic syndrome and its components. *In: Nutr.Metab Cardiovasc.Dis.* 19 (8): 563-570
2. Freiberg M.S., Cabral H.J., Heeren T.C.; *et al.* 2004. Alcohol consumption and the prevalence of the Metabolic Syndrome in the US.: a cross-sectional analysis of data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *In: Diabetes Care.* 27 (12): 2954-2959
3. Alkerwi A., Boutsen M., Vaillant M.; *et al.* 2009. Alcohol consumption and the prevalence of metabolic syndrome: a meta-analysis of observational studies. *In: Atherosclerosis.* 204 (2): 624-635
4. Barrio-Lopez M.T., Bes-Rastrollo M., Sayon-Orea C.; *et al.* 2013. Different types of alcoholic beverages and incidence of metabolic syndrome and its components in a Mediterranean cohort. *In: Clin.Nutr.* 32 (5): 797-804
5. Chiva-Blanch G., Urpí-Sarda M., Ros E.; *et al.* 2013. Effects of red wine polyphenols and alcohol on glucose metabolism and the lipid profile: a randomized clinical trial. *In: Clin.Nutr.* 32 (2): 200-206
6. Chiva-Blanch G., Urpí-Sarda M., Ros E.; *et al.* 2012. Dealcoholized red wine decreases systolic and diastolic blood pressure and increases plasma nitric oxide: short communication. *In: Circ.Res.* 111 (8): 1065-1068
7. Baba S., Osakabe N., Kato Y.; *et al.* 2007. Continuous intake of polyphenolic compounds containing cocoa powder reduces LDL oxidative susceptibility and has beneficial effects on plasma HDL-cholesterol concentrations in humans. *In: Am.J.Clin.Nutr.* 85 (3): 709-717
8. Martínez-González M.A., Corella D., Salas-Salvadó J.; *et al.* 2012. Cohort profile: design and methods of the PREDIMED study. *In: Int.J.Epidemiol.* 41 (2): 377-385

6. Agradecimientos

Quisiéramos agradecer a todos los voluntarios que participaron en el estudio PREDIMED su valiosa colaboración. Este estudio ha sido financiado en parte por la CICYT (AGL2010-22319-C03) del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN); y el Instituto de Salud Carlos III, ISCIII (CIBEROBN CB06/03, PI1002658, and PI1001407). El CIBEROBN es una iniciativa del ISCIII, España. A.T.-R. recibió el apoyo del ISCIII (FI10/00265) y finalmente A. M.-R. agradece al programa post-doctoral "Juan de la Cierva" (JCI-2012-13463) del Ministerio de Economía y Competitividad.

PATROCINADOR SINGULAR



PATROCINADORES PREMIUM



PATROCINADORES



COLABORADORES

