

## Índice:

Esta tesis se presenta como una recopilación de 5 capítulos. Cada capítulo se introduce por separado y tiene su índice individual.

<u>Introducción</u> .....	1
<u>Capitulo 1: El Glutación</u> .....	3
<u>Capitulo 2: El glutación en las Plantas</u> .....	18
<u>Capitulo 3: El glutación en Mostos y Vinos</u> .....	83
<u>Capitulo 4: Experiencias practicas enológicas</u> .....	158
<u>Capitulo 5: El papel del glutación en el ser Humano</u> .....	229
<u>Conclusión</u> .....	236
<u>Bibliografías</u> .....	240
<u>Anexo: Productos Enológicos</u> .....	245

## **Introducción:**

El presente trabajo es una monografía resultante de la investigación de un antioxidante natural y poco conocido, como es el Glutati3n, presente en todos los organismos como plantas, en nuestro caso de inter3s la Vid, tambi3n presente en su producto final el mosto y vinos, inclusive presente en el ser humano.

La elecci3n del tema tiene varios fundamentos, entre ellos se encuentran la competencia entre los diferentes pa3ses productores de vino y tambi3n entre los diferentes productores de vino individuales que tienen la posibilidad de inserci3n en el mercado global, el cambio de preferencias de los consumidores fuera de vino b3sico de los vinos de calidad en funci3n a mayor duraci3n de sus caracter3sticas organol3pticas en botella y tambi3n en funci3n de la salud.

Adem3s de producir vinos de calidad, la capacidad de satisfacer las demandas del consumidor en t3rminos de un producto saludable se convertir3 en un motor econ3mico cada vez m3s importante de la rentabilidad, estrategias para mejorar y preservar la calidad del vino conferir3 una ventaja competitiva a los productores de vino.

El aumento de los niveles de glutati3n (GSH) en el vino, podr3a ayudar a obtener tal ventaja teniendo en cuenta la funci3n de preservar la calidad de este antioxidante natural juega en el vino. Adem3s de la limitaci3n de coloraci3n oxidativa en el zumo de uva y el vino, GSH ejerce un efecto protector sobre diversos compuestos de aroma, impacto durante el envejecimiento del vino, tales como tioles vol3tiles, 3steres y terpenos.

Los altos niveles de este antioxidante natural tambi3n pueden permitir el uso de di3xido de azufre (SO<sub>2</sub>) en baja dosis en el vino, abordando parcialmente las preocupaciones relacionadas con la salud en relaci3n con el uso de SO<sub>2</sub> en el vino.

La variabilidad en la concentraci3n seg3n la variedad vin3fera y la sensibilidad oxidativa que representa en cada caso, teniendo consecuencias perjudiciales sobre la calidad del vino, lo que resulta en una p3rdida de aroma caracter3stico, el desarrollo de un car3cter de sabor envejecimiento at3pico y pardeamiento visual.

La identificaci3n de las pr3cticas enol3gicas que pueden resultar en niveles de GSH vino elevados ser3a de gran valor para la industria enol3gica.

Otro de los fundamentos fue mi curiosidad sobre diferentes cepas de levaduras disponibles en el mercado, las diferencias en los requisitos de asimilación o de GSH entre cepas de levadura pueden por lo tanto resultar en vino contenido de GSH a variar cuando se utilizan diferentes cepas para la fermentación alcohólica y de una amplia gama de productos enriquecidos en glutatión que están actualmente disponible en el mercado que pretende mejorar la estabilidad sensorial de vinos y poder hacer uso de este espacio, sobre lo leído en bibliografías, documentos, reportes científicos, revistas enológicas, y a modo para brindar respuestas a esta misma inquietud de los lectores o como aporte para investigaciones mas profundizadas de alguno de los capítulos

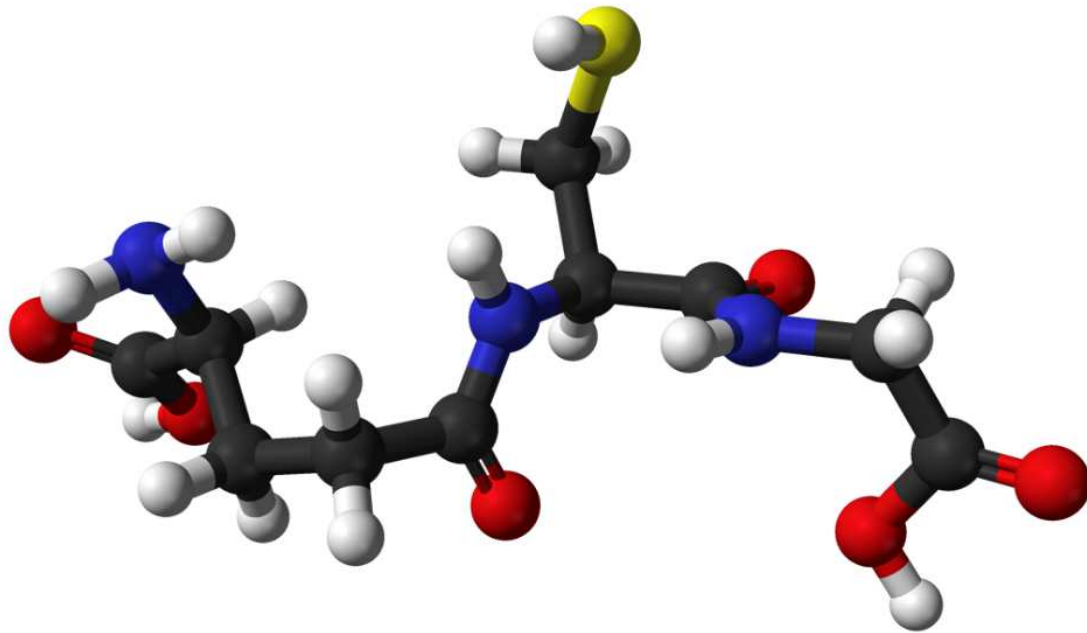
Para ello he ordenado y clasificado la información en esta monografía, espero que sea un proceso dinámico e interactivo.

*“Hay más filosofía y sabiduría en una botella de vino, que en todos los libros”.* Louis Pasteur

## **Capítulo 1: El Glutatión**

1.1 Definición .....	4
1.2 Potencial antioxidante .....	5
1.2.1 Estructuras moleculares.....	5
1.3 Enzimas .....	7
1.3.1 Glutatión peroxidasa .....	7
1.3.2 Glutatión S-transferasa .....	7
1.4 Biosíntesis.....	8
1.5 Estrés oxidativo.....	9
1.5.1 Radicales libres .....	11
1.5.2 Toxicidad del oxígeno .....	12
1.5.3 Especies reactivas del oxígeno (EROs).....	14
1.5.4 Sistema de defensa contra las EROs .....	15
1.5.4.1 Enzimas .....	15
1.5.4.2 Scavengers o eliminadores .....	15
1.6 El antioxidante cosmopolita- Funciones .....	16

## Capítulo 1: El glutatión:

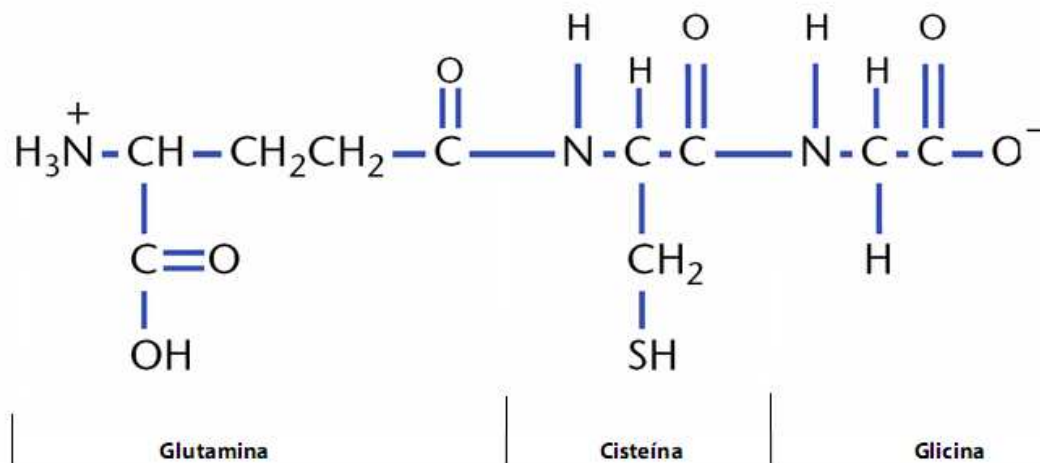


### 1.1 Definición:

El glutatión (GSH) es un tri-péptido no proteínico que se deriva de los aminoácidos.

Formado por los aminoácidos L-cisteína, ácido L-glutámico y glicina.

Contiene un enlace peptídico inusual entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato.



El glutatión, un antioxidante, ayuda a proteger las especies reactivas de oxígeno (EROs) como los radicales libres y los peróxidos. El glutatión es nucleofílico en azufre y ataca los aceptores conjugados electrofílicos.

### 1.2 Potencial antioxidante:

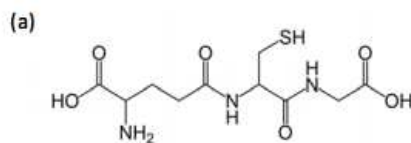
Pareja biológicas de óxido-reducción (forma oxidada → forma reducida)	$\Delta$ Potential Redox (mV a pH 3,5)
O <sub>2</sub> / H <sub>2</sub> O	+ 1022 mV
Q / QH <sub>2</sub>	+ 475 mV
G-SS-G / G-SH	- 240 mV

Siendo un compuesto tiolico no proteico intracelular (0,2-10 mM) presente en la mayoría de organismos procariotas y muchos mamíferos (tiol es un compuesto que contiene el grupo funcional formado por un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno).

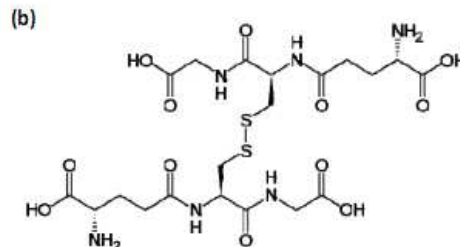
Los grupos tiol se mantienen en un estado reducido a una concentración de aproximadamente ~ 5 mM en células animales. En efecto, el glutatión reduce cualquier enlace disulfuro formado dentro de proteínas citoplasmáticas de cisteínas, al actuar como un donante de electrones. En el proceso, el glutatión se convierte en su forma oxidada disulfuro de glutatión (GSSG).

#### 1.2.1 Estructuras moleculares:

Estructuras moleculares: de (a) glutatión (GSH) y (b) disulfuro de glutatión (GSSG).



= **Forma reducida**  
**(Tiol)**

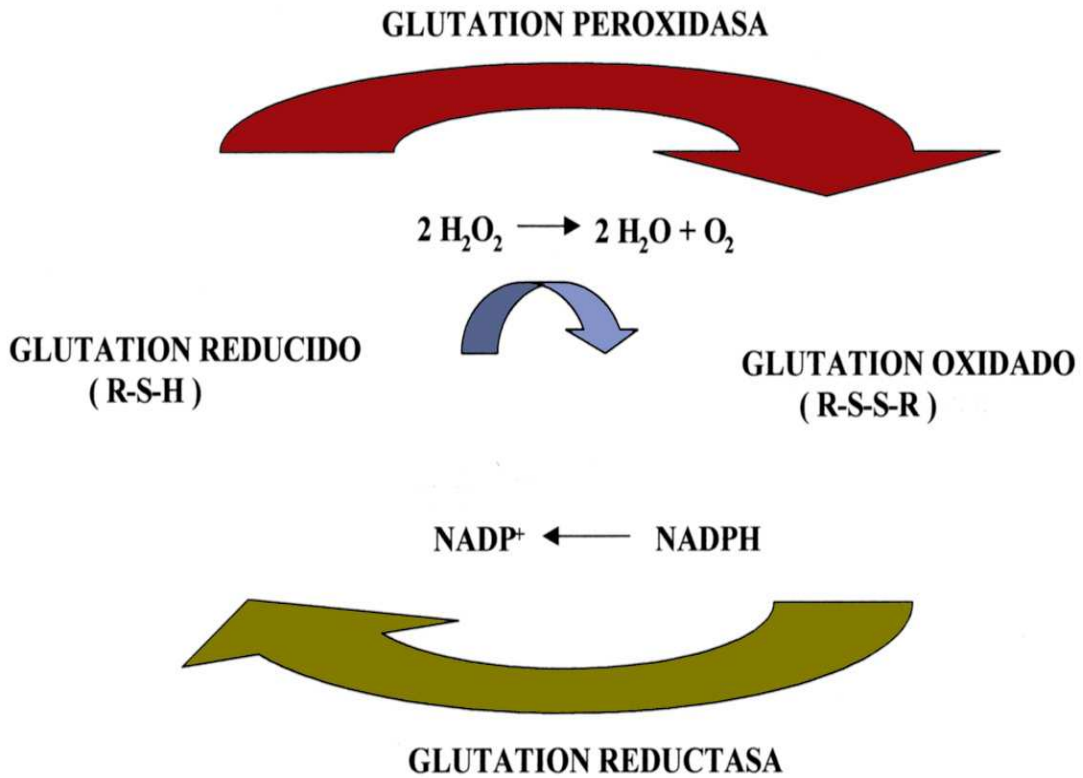


= **forma oxidada**  
**(Disulfuro)**

= ***pareja de oxido-reducción (redox)***

El glutatión se encuentra casi exclusivamente en su forma reducida, ya que la enzima que vuelve de su forma oxidada, la glutatión reductasa, es constitutivamente activa e inducible al estrés oxidativo. De hecho, la proporción de glutatión reducido a glutatión oxidado dentro de las células a menudo se utiliza científicamente como una medida de la toxicidad celular.

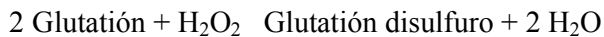
Una vez oxidado, glutatión se puede reducir de nuevo por la glutatión reductasa, usando NADPH como donante de electrones.



### 1.3 Enzimas

#### 1.3.1 Glutación peroxidasa:

La enzima Glutación peroxidasa (GPX) o Glutaciona peroxidasa, cataliza la reacción de oxidación de glutación a glutación disulfuro utilizando para ello peróxido de hidrógeno. Esta enzima usa como cofactor el selenio.



La glutación peroxidasa tiene como principal función proteger al organismo del efecto degradante de los hidroperóxidos formados de forma endógena.

#### 1.3.2 Glutación S-transferasa

El glutación S -transferasas (GSTs) , anteriormente conocido como ligandins , comprenden una familia de eucariotas y procariotas fase II metabólicos isoenzimas mejor conocidos por su capacidad para catalizar la conjugación de la forma reducida de glutación (GSH) a xenobióticos sustratos con el propósito de desintoxicación .Están clasificadas como enzimas multifuncional especializadas diméricas.

La familia GST consta de tres superfamilias: la citosólica, mitocondrial y microsomal - también conocidas como MAPEG - proteínas .Se encuentra en casi todas las formas de vida, incluyendo bacterias, hongos, levaduras, insectos, mamíferos y plantas superiores.

GSTs catalizan la conjugación de GSH - a través de un grupo sulfidrido - a los centros electrofílicos en una amplia variedad de sustratos con el fin de hacer que los compuestos sean más solubles en agua.



#### 1.4 Biosíntesis:

El glutatión no es un nutriente esencial, ya que puede ser sintetizado a partir de los aminoácidos L-cisteína, ácido L-glutámico y glicina. El sulfhídrico (tiol), grupo (SH) de la cisteína, sirve como donador de electrones y es responsable de la actividad biológica del glutatión. La prestación de este aminoácido es el factor limitante en la síntesis de glutatión en las células porque la cisteína es rara en los productos alimenticios. Por otra parte, si se libera, como el aminoácido libre, la cisteína es tóxica y de manera espontánea cataboliza en el tracto gastrointestinal y el plasma de la sangre.

El glutatión se sintetiza en dos pasos dependientes del trifosfato de adenosina:

- En primer lugar, la gamma-glutamilcisteína se sintetiza a partir del L-glutamato y la cisteína a través de la enzima gamma-glutamilcisteína sintetasa (también conocida como Ligasa glutamato-cisteína (GCL) ligasa). Esta reacción es el paso limitante en la síntesis de glutatión.
- En segundo lugar, la glicina se añade a la C-terminal de la gamma-glutamilcisteína a través de la enzima glutatión sintetasa.

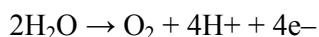
### 1.5 Estrés oxidativo

Para entender a las especies de oxígeno reactivo tenemos que conocer al protagonista químico de estos, siendo el oxígeno.

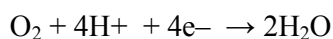
El oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) o dióxígeno es uno de los gases más importantes de la Tierra. Constituye el 21% de la atmósfera, 89% del peso del agua del mar y al menos el 47% de la corteza terrestre. La atmósfera terrestre está constituida por los siguientes componentes:

- Nitrógeno: 78.08%
- Oxígeno: 20.95%
- Argón: 0.93%
- Dióxido de carbono: 0.03%
- Neón: 0.0018%
- Helio: 0.0005%
- Criptón: 0.0001%
- Hidrógeno: 0.00006%
- Ozono: 0.00004 %
- Xenón: 0.000008 %

El oxígeno atmosférico es producido por la oxidación del agua por el complejo de ruptura del agua del fotosistema I de las células fotosintéticas durante la fase luminosa de la fotosíntesis:



En los organismos aerobios el oxígeno es el último aceptor de los electrones en la cadena respiratoria en donde se forma agua. La enzima citocromo c oxidasa, el complejo IV de transporte de electrones, reduce completamente el oxígeno a agua por la adición de cuatro protones y 4 electrones.



A esta reacción también se le conoce como reducción tetravalente del oxígeno, indicando que este complejo reduce completamente al oxígeno y no libera especies parcialmente reducidas. Las reacciones 1 y 2 establecen un ciclo entre los organismos productores y consumidores de oxígeno.

**Tabla 1.** Diferencias entre el proceso de oxidación y el proceso de reducción (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Término	Definición	Ejemplo
Oxidación	Proceso químico que implica: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ganancia de oxígeno</li> <li>• Pérdida de electrones</li> </ul>	$C + O_2 \rightarrow CO_2$ (El átomo de C se oxida a dióxido de carbono). $Na \rightarrow Na^+ + e^-$ (El átomo de Na se oxida al catión Na con pérdida de un electrón).
Reducción	Proceso químico que implica: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pérdida de oxígeno</li> <li>• Ganancia de hidrógeno</li> <li>• Ganancia de electrones</li> </ul>	$CO_2 + C \rightarrow 2 CO$ (El $CO_2$ es reducido a CO mientras que el C es oxidado a CO). $C + 2H_2 \rightarrow CH_4$ (El átomo de C es reducido a metano). $Cl + e^- \rightarrow Cl^-$ (El átomo de Cl es reducido al ión Cl con ganancia de un electrón).
Agente oxidante	Es un compuesto químico que oxida a otro compuesto, ya sea tomándole electrones o hidrógeno o bien adicionándole oxígeno con su correspondiente reducción.	
Agente reductor	Es un compuesto químico que reduce a otro compuesto, ya sea donándole electrones o hidrógeno o bien removiéndole oxígeno con su correspondiente oxidación.	

Acoplado al proceso de respiración o consumo de oxígeno, las células sintetizan la mayor parte del adenosín trifosfato (ATP) que se requiere para los diversos procesos celulares. A estos dos procesos acoplados (la oxidación de los acarreadores de electrones reducidos NADH y FADH 2 y el transporte de los electrones hasta el  $O_2$  para formar  $H_2O$  y la síntesis de ATP a partir del ADP) se le conoce como fosforilación oxidativa.

El oxígeno no sólo se requiere en la respiración; hay muchas enzimas que también lo utilizan.

**Tabla 2.** Algunas enzimas que requieren oxígeno.

---

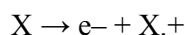
Sintasa de óxido nítrico
Hemo oxigenasa
Xantina oxidasa
NADPH oxidasa
Acil CoA desaturasa
Triptofano 2,3 dioxigenasa
Citocromo P450
Escualeno monooxigenasa
Desmolasa
Fenilalanina hidroxilasa

---

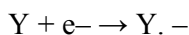
Además el oxígeno juega un papel esencial en la química de los radicales libres, razón por la cual resulta de importancia definir algunos conceptos básicos para entender la importancia del mismo no sólo en el proceso respiratorio sino también en el metabolismo celular.

#### 1.5.1 Radicales libres

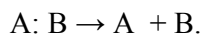
Un radical libre ( RL) se define como cualquier especie química, ya sea atómica o molecular, capaz de existir independientemente, que contenga uno o más electrones desapareados (que ocupan por sí mismos un orbital molecular o atómico), ya sea por ganancia o pérdida de un electrón de un no radical o por la ruptura homolítica de una molécula:



Radical formado por la pérdida de un electrón de un no radical.



Radical formado por la ganancia de un electrón de un no radical.



Radicales formados por la ruptura homolítica de una molécula.

La presencia de electrones desapareados modifica la reactividad química de un átomo o de una molécula, y suele ser más reactiva que su correspondiente no radical. Sin embargo, la reactividad química de los diferentes tipos de radicales libres es muy variable.

Es importante mencionar que los RL existen como derivados de muchos elementos o moléculas químicas, y los más importantes desde el punto de vista biológico son los derivados del oxígeno y del nitrógeno principalmente, aunque también destacan los derivados del hidrógeno y del carbono, así como los formados por los metales de transición como el hierro y el cobre, entre otros.

### 1.5.2 Toxicidad del oxígeno

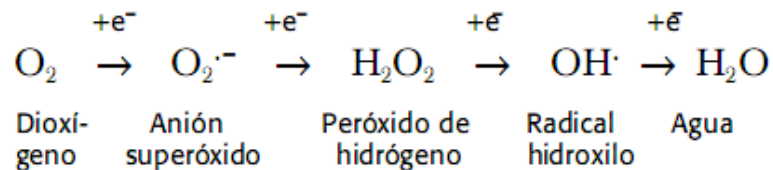
Aunque el oxígeno es indispensable para la vida de los organismos aerobios, a altas concentraciones o bajo ciertas condiciones a la concentración normal llega a ser tóxico. A este hecho contrastante se le conoce como la “paradoja del oxígeno”. La toxicidad del oxígeno se puede explicar por la formación de las especies reactivas de oxígeno (EROs). Estas especies, como posteriormente se explicará, son más reactivas que el oxígeno en su estado basal de triplete. Las principales especies son: (a) las que se producen por la ruptura o la excitación del oxígeno (oxígeno atómico, ozono y el oxígeno singulete) y (b) las parcialmente reducidas (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo).

Para entender la reactividad del oxígeno molecular o dióxígeno (porque son dos átomos de oxígeno atómico unidos por un enlace covalente,  $O_2$ ), debemos entender su estructura electrónica. Una de las características interesantes del oxígeno es el hecho de que tiene dos electrones desapareados (que no están unidos cada uno con otro electrón) ocupando cada uno de ellos dos diferentes orbitales moleculares externos (en el orbital  $\pi^*$  —pi antienlace— ver tabla 3). Este tipo de estructura es llamado estado basal o estado triplete y significa que el oxígeno es un birradical, pues los radicales son usualmente más reactivos tratando de encontrar otro electrón con quien establecer un par (recordando que un RL por definición tiene al menos un electrón desapareado). Sin embargo, como se observa en la tabla 3, el dióxígeno posee estos dos electrones en giro paralelo (el espín nuclear —representado por la punta de la flecha— se encuentra hacia arriba) y esto le dificulta tomar dos electrones libres con giro antiparalelo (donde el espín nuclear —representado por la punta de la flecha— se encuentra hacia abajo) a la vez, por ello sólo puede recibir estos electrones de uno en uno para cada orbital molecular externo. Esto explica por qué en su estado basal y a temperatura ambiente el oxígeno reacciona muy poco, a pesar del hecho de ser un birradical.

**Tabla 3.** Configuración electrónica de algunas moléculas de oxígeno diatómico en el orbital  $2\pi^*$

Especie de oxígeno	Configuración electrónica en el orbital $2\pi^*$
Dioxígeno ( $O_2$ )	$\uparrow \quad \uparrow$
Oxígeno singulete ( $^1O_2$ )	$\uparrow \quad \downarrow$
forma $^1\Sigma$	$\uparrow\downarrow \quad \text{—}$
forma $^1\Delta$	$\uparrow\downarrow \quad \text{—}$
Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )	$\uparrow\downarrow \quad \text{—}$

A la adición sucesiva de electrones a la molécula de oxígeno se le conoce como reducción univalente y esto produce especies parcialmente reducidas de oxígeno. Esto contrasta con la reducción tetravalente del oxígeno catalizada por la citocromo oxidasa en donde no se producen estas especies parcialmente reducidas.



Entonces, el desbalance en la producción de especies reactivas del oxígeno y la defensa antioxidante provoca un daño oxidativo conocido como estrés oxidativo, que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales provocan el deterioro y muerte celular. Se puede medir este tipo de daño mediante métodos directos e indirectos.

Entre los primeros tenemos la medición de la concentración de agentes oxidantes, que es muy difícil por su corta vida media y lo costoso que resultan los equipos, lo que hace imprescindible medirlos indirectamente mediante:

1) Determinación de productos terminales de la acción oxidante sobre biomoléculas: los métodos para medir peróxidos lipídicos son el patrón de oro, cuando se trata de probar el papel de los oxidantes en algún tipo de daño celular.

2) Medición de la concentración de antioxidantes: los resultados de diferentes estudios muestran que los niveles de antioxidantes pueden disminuir o aumentar en muchas

enfermedades, por lo que al monitorearlos pueden ser utilizados como marcadores de enfermedad o para el seguimiento terapéutico.

3) Medición del estado antioxidante total: este método refleja el balance dinámico entre el sistema antioxidante y los prooxidantes (EROs) y es beneficioso en un sinnúmero de enfermedades. Como instrumento para estimar el riesgo de daño oxidativo.

El "estrés oxidativo" puede provenir de:

- Una deficiencia del sistema de defensa antioxidante.
- Un incremento de la formación de EROs, cuya alta reactividad puede provocar: peroxidación lipídica, daño de la membrana celular, rotura del ADN, degradación proteica.

El aumento de varios de estos agentes oxidantes a la vez, provoca cambios biológicos de manera progresiva en el organismo, siguiendo más o menos un patrón común y la acumulación progresiva de esos cambios ocasiona la enfermedad.

### 1.5.3 Especies reactivas del oxígeno (EROs)

La mayor parte del oxígeno celular es reducido a través de reacciones enzimáticas, pero del 2-5 % escapa a esta reducción bivalente y elige la monovalente, y de ello resulta la formación de radicales libres de oxígeno (RLO), que no son más que átomos o moléculas que poseen un número impar de electrones en su órbita más externa, y que también se generan cuando ocurre una adición a un doble enlace. Son muy inestables y pueden reaccionar con otras moléculas, entregando o recibiendo un electrón.

Últimamente prefiere llamársele EROs, para agrupar a algunos compuestos que como el peróxido de hidrógeno, no constituyen un verdadero radical.

Estas EROs son moléculas altamente reactivas que atacan constantemente al cuerpo humano mediante reacciones bioquímicas de REDOX, que ocurren como parte normal del metabolismo celular o por la exposición a factores ambientales y se forman de la manera siguiente: La reducción univalente del  $O_2$  produce el radical superóxido ( $O_2^-$ ) cuya fuente más importante es la NADPH oxidasa durante el estallido respiratorio.

La reacción univalente subsecuente, genera el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) a través de la enzima superóxido dismutasa (SOD), que no es un RLO, pero tiene una alta capacidad

oxidante por vía de la reacción de Fenton, y forma el radical hidroxilo (OH) que es varios miles de veces más reactivo que el  $O_2^-$  y deriva fácilmente a la formación de nuevos radicales libres.

#### 1.5.4 Sistema de defensa contra las EROs

Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía, liberan EROs. Esta situación es incompatible con la vida, a menos que existan en las células mecanismos de defensa que las neutralicen.

A estas defensas se les denomina antioxidantes y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interaccionar con un radical libre.

Existe una primera línea de defensa antioxidante constituida por enzimas y scavengers o eliminadores de radicales.

##### 1.5.4.1 Enzimas:

- La citocromo oxidasa está encargada de evitar la reducción univalente del oxígeno.
- La superóxido dismutasa está especializada en captar el radical anión superóxido mediante una dismutación y así convertirlo en peróxido de hidrógeno.
- Catalasa y peroxidasas, glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) que neutralizan al  $H_2O_2$  y lo convierten en agua.

##### 1.5.4.2 Scavengers o eliminadores

- La vitamina E o  $\alpha$  tocoferol neutraliza al radical .OH por su ubicación en las membranas donde su protección es particularmente importante.
- La vitamina C, por su carácter reductor, reacciona rápidamente en el  $O_2$ . Y con el OH, también es captor del oxígeno singlete y del ion hipoclorito.
- El glutatión (GSH), además de captar el  $H_2O_2$  como substrato de la GPx, también capta al  $O_2$  y al OH.
- La transferrina y la ceruloplasmina son transportadoras de metales de transición, hierro y cobre respectivamente, que son generadores de RLO.



### 1.6 El antioxidante cosmopolita- Funciones:

Como ya hemos comentado anteriormente el glutatión (GSH) es uno de los principales compuestos antioxidantes no enzimáticos tanto en plantas como en animales.

El glutatión tiene múltiples funciones:

- Es el principal antioxidante endógeno producido por las células, participando directamente en la neutralización de los radicales libres y compuestos de oxígeno reactivos, así como el mantenimiento de los antioxidantes exógenos tales como las vitaminas C y E en sus formas reducidas.
- Regulación del ciclo óxido nítrico, que es fundamental para la vida, pero puede ser problemático si no se regula
- Se utiliza en las reacciones metabólicas y bioquímicas tales como la síntesis y reparación del ADN, la síntesis de proteínas, la síntesis de prostaglandinas, el transporte de aminoácidos, y la activación de la enzima. Por lo tanto, cada sistema en el cuerpo puede ser afectado por el estado del sistema de glutatión, especialmente el sistema inmunológico, el sistema nervioso, el sistema gastrointestinal y los pulmones.
- A través de la conjugación directa, participa en la desintoxicación compuestos extraños (xenobióticos) y agentes carcinógenos.

Por lo tanto, las funciones del glutatión son múltiples, pero sobre todo participa en la regulación del estado redox (reacciones óxido-reducción) celular.

El estado del glutatión es modulado por los oxidantes así como por factores nutricionales y otros factores tales como las respuestas de defensa frente a patógenos, etc. Por estas razones, el glutatión es considerado como una molécula señalizadora que integra la información ambiental en la red celular. Hoy en día, hay pruebas inequívocas de que el glutatión es un metabolito multifuncional en plantas y en animales, siendo fundamental en numerosos procesos celulares.



## **Capítulo 2: El glutatión en las Plantas**

2.1 Biosíntesis en las plantas .....	21
2.2 Función en plantas.....	21
2.3 Glutatión en las uvas.....	21
2.4 Nutrientes.....	22
2.4.1 Necesidades nutricionales.....	23
2.4.2 Factores de nutrición.....	24
2.4.2.1 Edad de la viña .....	24
2.4.2.2 Momento Fenológico.....	24
2.4.2.3 El suelo y su pH.....	25
2.4.3 Cómo Determinar las Necesidades de Fertilización de una Planta Adulta:.....	26
2.4.3.1 Nitrógeno.....	26
2.4.3.1.1 Síntomas de Deficiencia de Nitrógeno.....	26
2.4.3.1.2 Síntomas de Exceso de Nitrógeno .....	27
2.4.3.1.3 Movilidad del N en el Suelo.....	28
2.4.4 Vías de Incorporación de los Nutrientes.....	28
2.4.4.1 Fertilización Edáfica.....	28
2.4.4.1.1 Guanos y Enmiendas Orgánicas.....	28
2.4.4.2 Fertilización Foliar.....	29
2.4.4.3 Manejo del suelo.....	29
2.4.4.3.1 Cubierta vegetal.....	30
2.4.5 Nitrógeno fácilmente asimilable (NFA).....	33
2.5 Estrés.....	37
2.5.1 El Glutatión en plantas bajo estrés por cobre (Cu).....	37
2.5.1.1 La presencia de Glutatión en las funciones de desintoxicación de metales pesados.....	40
2.5.1.1.1 Mecanismos celulares para tolerancia y detoxificación de metales pesados en plantas.....	43

2.5.1.1.1.1 Micorrizas.....	44
2.5.1.1.1.2 Pared celular y exudados de raíz.....	44
2.5.1.1.1.3 Membrana plasmática .....	45
2.5.1.1.1.4 Quelación.....	45
2.5.1.1.1.4.1 Metalotioneinas (MTs).....	46
2.5.1.1.1.4.2 Fitoquelatinas (PCs).....	46
2.5.1.1.1.5 Compartimentalización vacuolar .....	47
2.5.1.1.1.6 Biotransformación.....	47
2.5.2 Homeostasis Estrés oxidativo en la vid ( <i>Vitis vinifera</i> L.) .....	48
2.5.2.1 Los metabolitos que participan en la homeostasis Antioxidante .....	50
2.5.2.1.1 EROs .....	52
2.5.2.1.2 AsA y GSH.....	52
2.5.2.1.2.1 Ciclo ascorbato –glutación.....	54
2.5.2.1.3 Carotenoides .....	55
2.5.2.1.4 Prolina .....	56
2.5.2.1.5 $\alpha$ -Tocoferol.....	56
2.5.2.2 Las enzimas antioxidantes clave para Homeostasis .....	56
2.5.2.2.1 Las enzimas de los Ciclos Agua-Agua .....	56
2.5.2.2.1.1 Catalasa .....	57
2.5.2.2.1.2 Peroxidasas.....	57
2.5.2.2.1.3 Glutación S-transferasas .....	57
2.5.2.2.1.4 Peroxirredoxinas .....	58
2.5.2.2.1.5 Superóxido dismutasa .....	58
2.5.2.3 El estrés oxidativo en sistemas in vitro.....	59
2.5.2.4 Estallido Oxidativo .....	61
2.5.3 Estrés Hídrico:.....	62

2.5.3.1 Las proteínas en la tolerancia al estrés hídrico en la planta: .....	62
2.5.3.1.1 Proteínas que protegen a proteínas .....	64
2.5.3.1.1.1 Hidrofilinas.....	64
2.5.3.1.2 Proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (Late Embriogénesis Abundant) (LEA).....	64
2.5.3.1.2.1 Dehidrinas.....	65
2.5.3.1.2.2 Heat-shock proteins (HSPs) .....	65
2.5.3.1.2.3 Acuaporinas.....	65
2.5.3.1.2.4 Enzimas eliminadoras de EROs.....	65
2.5.3.1.2.4.1 Glutación S- transferasas (GST).....	66
2.5.3.1.2.4.2 Glutación peroxidasa (GPX)-nombrada anteriormente-.....	66
2.5.3.1.3 Péptido antioxidante.....	67
2.5.3.1.3.1 Glutación.....	67
2.5.4 Estrés por radiación solar.....	68
2.5.4.1 Efectos de la radiación solar UV-B en viñedos cultivados a mayor altura y del ABA sobre la capacidad antioxidante de las bayas.....	68
2.5.4.1.1 Materiales y Métodos.....	69
2.5.4.1.1.1 Material vegetal y diseño experimental .....	69
2.5.4.1.2 Resultados representados como regresiones lineales para ORAC, polifenoles y azúcares .....	71
2.5.5 Estrés biótico por patógenos en vid.....	73
2.5.5.1 Virus fan leaf Grapevine .....	73
2.5.5.2 Antracnosis -Elsinoe ampelina.....	74
2.5.5.3 Agalla de corona-vitis Rhizobium.....	74
2.6 Efecto varietal sobre el contenido de glutación en mostos y vinos blancos.....	76

## Capítulo 2: El glutatión en las plantas:

### 2.1 Biosíntesis en las plantas:

GSH se sintetiza en el citosol y los cloroplastos de las células vegetales.

La glutamato cisteína ligasa de las plantas (GCL) es una enzima redox homodimérica sensible, conservada en el reino vegetal. En un ambiente oxidante se forman puentes disulfuro intermoleculares y la enzima cambia al estado dimérico activo.

Además del control redox está la enzima GCL inhibida por GSH. La GCL está exclusivamente situada en los plastidios y la glutatión sintetasa está en los plastidios y el citosol, por lo tanto son GSH y gamma-glutamylcisteína exportados de los plastidios. Las dos biosíntesis de las enzimas del glutatión son esenciales en las plantas.

### 2.2 Función en plantas

En las plantas, el glutatión es crucial para la gestión del estrés biótico y abiótico. Es un componente fundamental del ciclo de glutatión-ascorbato, un sistema que reduce el peróxido de hidrógeno venenoso.

Es el precursor de fitoquelatinas, oligómeros de glutatión que el quelato de metales pesados como el cadmio. El glutatión se requiere para la defensa eficaz contra patógenos de las plantas tales como *Pseudomonas syringae* y *Phytophthora brassicae*. APS reductasa, una enzima de la vía de asimilación de azufre utiliza glutatión como donante de electrones. Otras enzimas que utilizan como sustrato glutatión son glutaredoxina, estas pequeñas oxidoreductasas están involucradas en el desarrollo de flores, ácido salicílico y la señalización de defensa de la planta.

### 2.3 Glutatión en las uvas

GSH se cuantificó primero en las uvas en 1989, donde se realizó un estudio para analizar el contenido de GSH tanto de las bayas y los respectivos mostos de 28 variedades de uva *Vitis vinifera* diferentes. El contenido de GSH variaba 56-372 mol / kg (17-114 mg / kg) entre las variedades de uva.

Estas grandes variaciones entre las variedades, sin embargo, no eran estrictamente dependiente de la variedad sino también de la vendimia, ubicación y prácticas tecnológicas todos pueden influir en el contenido de GSH.

GSH se ha observado que aumenta en el inicio de la maduración de las bayas de *Vitis vinifera*. Este aumento se observó en el contenido de GSH en las variedades blancas, tintas, sin semillas y con semillas.

La fuerte correlación entre GSH acumulada y sólidos solubles persiste hasta que las bayas alcanzan los 16 ° Brix donde después el contenido de GSH se mantiene estable.

El aumento de GSH en el inicio de la maduración en las bayas puede ser atribuido a un aumento de la contribución de los componentes del floema a la baya de fuentes tales como hojas maduras.

El Contenido de GSH en la uva está muy relacionado con el estado nutricional y de nitrógeno de vid estimada.

#### 2.4 Nutrientes:

Para la producción de glutatión en vid, tenemos que tener una planta equilibrada y nutrida, en primer lugar el nitrógeno, que va a ser el que forme los péptidos y compuestos nitrogenados.

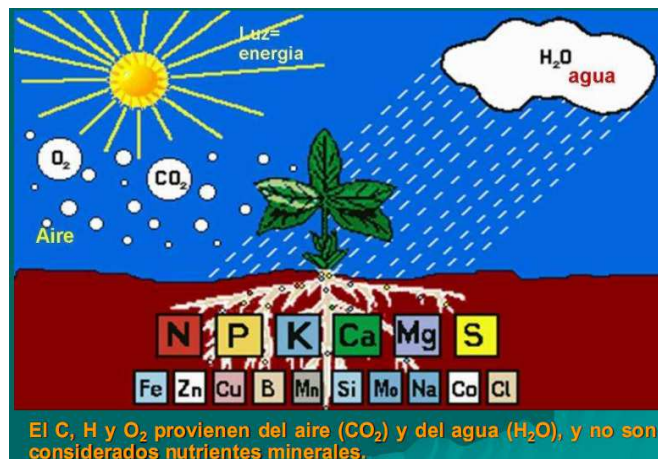
La planta de vid necesita para su desarrollo no solo de C, H y O, si no también de otros 13 elementos minerales. Unos en dosis mayores (Macronutrientes) y otros en menores concentraciones (Micronutrientes).

### 2.4.1 Necesidades nutricionales

Macronutrientes		Micronutrientes	
Nitrógeno	40 a 70 kg	NO <sub>3</sub> – NH <sub>4</sub>	Hierro 600 g
Potasio	40 a 70 kg		Zinc 100 a 200 g
Calcio	40 a 80 kg		Manganeso 80 a 160 g
Magnesio	6 a 15 kg		Boro 80 a 150 g
Fósforo	4 a 10 kg		Cobre 60 a 120 g
Azufre	6 kg		

Considerando la ley de Liebig, la ley del nutriente que se encuentra en mínima cantidad, aunque los demás se encuentren en concentraciones suficientes, este va a ser el que limite la productividad. Sabiendo eso, tenemos que mantener un viñedo equilibrado en todos los nutrientes que necesita.

Macro y micronutrientes son capaces de modificar el contenido de carbohidratos, proteínas, aminoácidos, aromas y vitaminas en el mosto, como así mismo los ácidos orgánicos (málico, tartárico, oxálico).





### 2.4.2 Factores de nutrición:

Existen ciertos factores que varían en las cepas, como por ejemplo la edad de la viña, una vid más joven tiene menor capacidad de extracción en Kg/ha que una más vieja, debido al sistema radicular más complejo;

#### 2.4.2.1 Edad de la viña

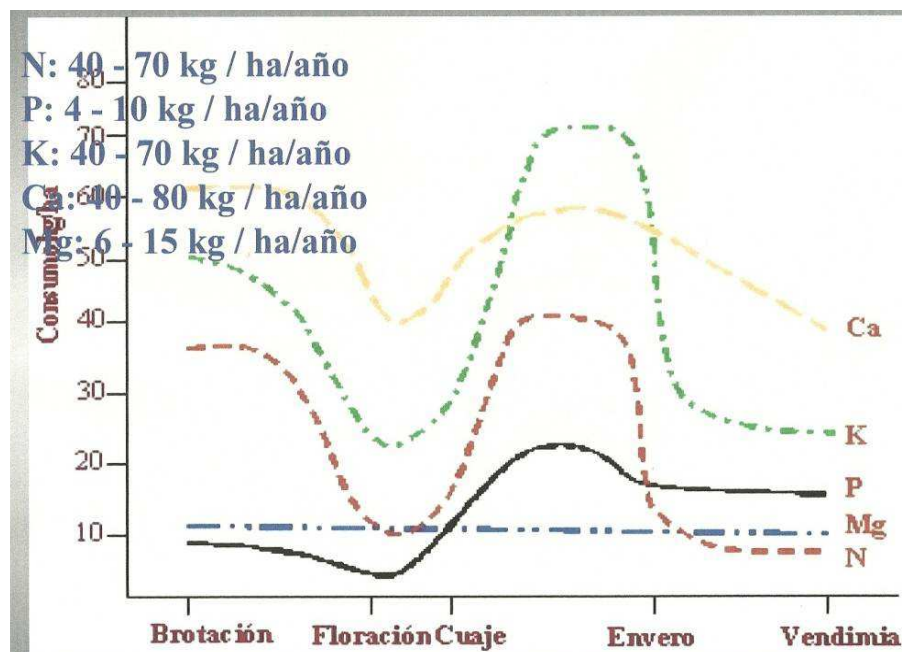
Extracciones de macronutrientes de un viñedo joven hasta el quinto año desde su plantación (kg/ha).

Nutriente	1er año	2º año	3er año	4º año	5º año
N	4,5	16,5	22,6	39,9	48,2
P	0,6	2,3	3,5	6,0	7,4
K	5,7	23,4	34,5	60,3	71,7
Ca	14,7	18,5	36,0	63,6	85,8
Mg	2,4	3,8	6,9	12,2	15,8
S	2,0	3,5	5,4	10,5	12,6

Fertilizaciones excesivas con N durante la etapa juvenil causan desequilibrio entre el crecimiento aéreo (mucho masa foliar) y subterráneo (pequeño sistema radical para abastecer tantas hojas) lo que puede derivar en colapso y muerte súbita de plantas jóvenes con sobreproducción en días calurosos y secos de verano.

#### 2.4.2.2 Momento Fenológico

El momento fenológico que se encuentre, ya sea brotación, floración, grano arveja, envero, postcosecha, estas etapas también varían el nutriente que se necesita en mayor cantidad.



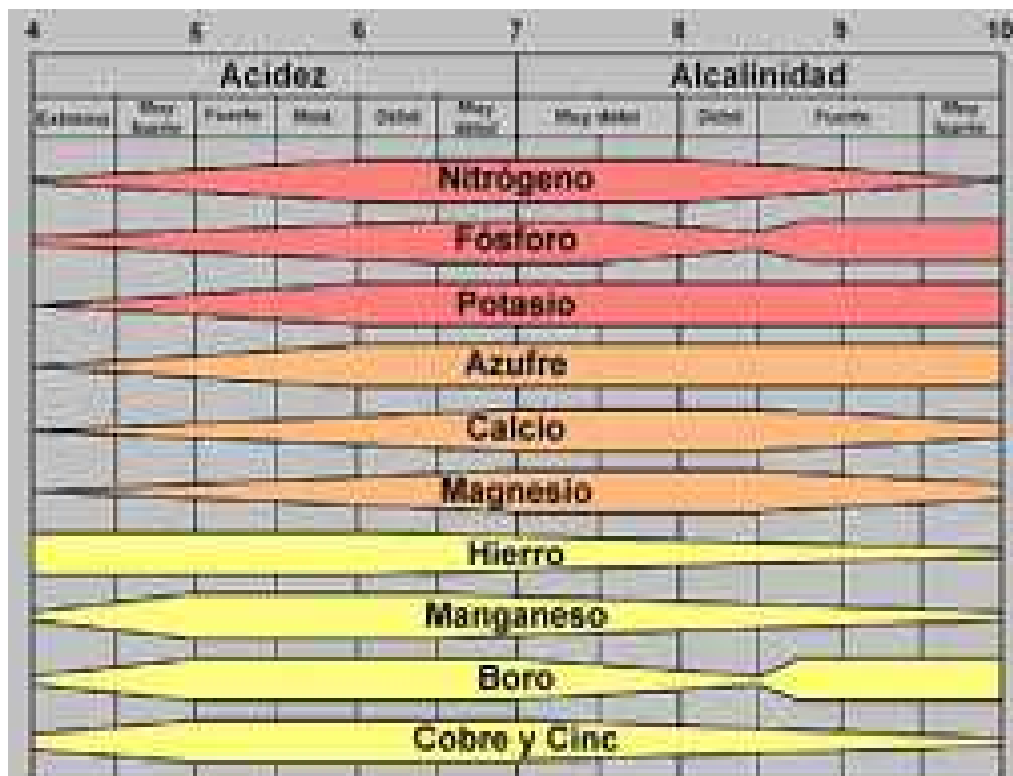
### 2.4.2.3 El suelo y su pH.

El pH del suelo es importante porque los vegetales sólo pueden absorber a los minerales disueltos, y la variación del pH modifica el grado de solubilidad de los minerales.

En un suelo con pH ácido, los iones  $H^+$  reemplazan a los de  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  y  $K^+$ , los cuales son posteriormente lavados del suelo, disminuyendo la riqueza de nutrientes disponibles.

En un suelo de pH neutro o básico los iones de Ca, Na y K reemplazan a los de H.

El rango óptimo del pH del suelo para el crecimiento de la mayor parte de los vegetales es de 6.0 a 7.0 porque la mayor parte de las sustancias nutritivas de las plantas está disponible en este intervalo.



La viña ha de extraer del suelo las sustancias minerales que son necesarias para su existencia. Sin embargo, la cantidad de algunos de los nutrientes disponibles, no siempre deriva en un incremento proporcional de la calidad. Así ocurre con el nitrógeno y la materia orgánica, cuyo nivel elevado proporciona cosechas abundantes pero de baja calidad. El fósforo y el potasio, por el contrario, son elementos que afectan positivamente a la calidad, proporcionalmente a su presencia.

El calcio en su forma de caliza activa ejerce una influencia notoria y compleja sobre la calidad. La mayor parte de los grandes vinos de crianza proceden de viñedos situados sobre suelos bien dotados de este elemento. Otro factor de clara incidencia en el desarrollo de la vid es el contenido en hierro de los suelos donde esté plantada. Un exceso de hierro puede originar vinos con tendencia a la oxidación, al actuar como catalizador y la escasa presencia de este mineral, o su eventual bloqueo en terrenos muy calizos, origina el problema de la "clorosis férrica", con pérdida de la función sintetizadora clorofílica de las hojas.

#### 2.4.3 Cómo Determinar las Necesidades de Fertilización de una Planta Adulta:

- De manera visual: Observación de síntomas.
- Análisis de suelo: Muy importante en preplantación.
- Análisis de pecíolos: Luego de la plantación nos da la mejor información sobre los requerimientos nutricionales y posibles deficiencias.

##### 2.4.3.1 Nitrógeno:

Es el elemento nutritivo que favorece el crecimiento y el vigor en la vid. Importante constituyente de los aminoácidos a partir de los cuales se sintetizan las proteínas y enzimas. Forma parte de la clorofila y los ácidos nucleicos (ADN y ARN).

##### 2.4.3.1.1 Síntomas de Deficiencia de Nitrógeno

- Reducción general del vigor, brotes pequeños que generalmente no llegan a alcanzar el último alambre.
- Rendimiento disminuye año tras año.
- Hojas maduras de la parte basal del brote con coloración verde pálido a amarillento. Pudiendo presentarse defoliación prematura.
- Los brotes crecen muy lentamente y los entrenudos son cortos.
- El crecimiento del brote se detiene en la mitad del verano.
- La calidad de la uva es pobre, racimos pequeños y algo ralos.
- La concentración de N del pecíolo en floración es menor al 1%.



#### 2.4.3.1.2 Síntomas de Exceso de Nitrógeno

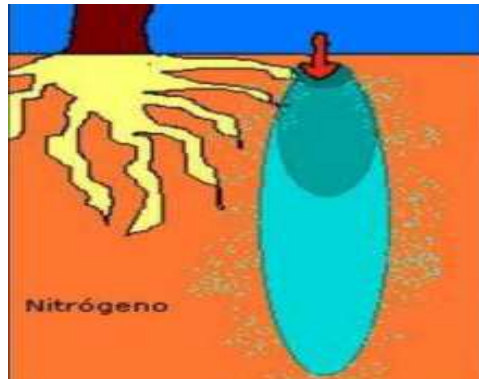
- Planta excesivamente vigorosa (muchas sombras en los racimos).
- Hojas grandes, color verde oscuro y coriáceas.
- Quemaduras en los bordes de las hojas.
- Excesivo crecimiento de los brotes, con entrenudos largos.
- Excesivo desarrollo de feminelas.
- Mal agostamiento de los sarmientos.
- Retardo en la senescencia de las hojas.
- Alteración en la fertilidad de las yemas.
- Problemas de madurez y calidad en los frutos (poco: color, azúcar y acidez, aromas herbáceos, podredumbres).



### 2.4.3.1.3 Movilidad del N en el Suelo

El nitrógeno es un elemento muy móvil, llevado por el agua de riego.

Se lava y lixivia a capas más profundas fácilmente. Entonces conviene dividir las aplicaciones en 2 o 3 veces. Se agrega en superficie enterrándose levemente para evitar pérdidas por volatilidad.



### 2.4.4 Vías de Incorporación de los Nutrientes

#### 2.4.4.1 Fertilización Edáfica:

Incorpora nutrientes para reponer los extraídos durante el ciclo o para mejorar el estado nutricional ante deficiencias de los mismos. Se aplican grandes dosis en una sola vez o fraccionadas dependiendo el tipo de nutriente, suelo, riego, etc. Respuesta del nutriente en mediano a largo plazo (químicos 15-30 días; guanos 3-18 meses).

#### 2.4.4.1.1 Guanos y Enmiendas Orgánicas:

<b>Material</b>	<b>N (%)</b>	<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (%)</b>	<b>K<sub>2</sub>O (%)</b>
Guano de gallina con cama	2,8	0,7	0,3
Guano de gallina sin cama	3,2	1,0	0,3
Guano de caballo	1,4	0,7	0,4
Guano de cabra	1,3	0,3	0,5
Guano de oveja	1,5	0,9	0,6
Guano de vaca	1,1	0,5	0,4
Orujo de uva agotado	1,5	0,1	0,2
Sarmientos	0,5	0,7	0,3

Los guanos de gallina son recomendados como fuente de nitrógeno

#### 2.4.4.2 Fertilización Foliar:

Incorporación de nutrientes en bajas dosis. Respuesta rápida. Generalmente para corregir deficiencias de micronutrientes. Solamente es complementaria de la fertilización edáfica. Una fertilización nitrogenada del suelo resultó en mosto con unas seis veces el contenido de nitrógeno asimilable por levadura, siendo superior en comparación con el control.

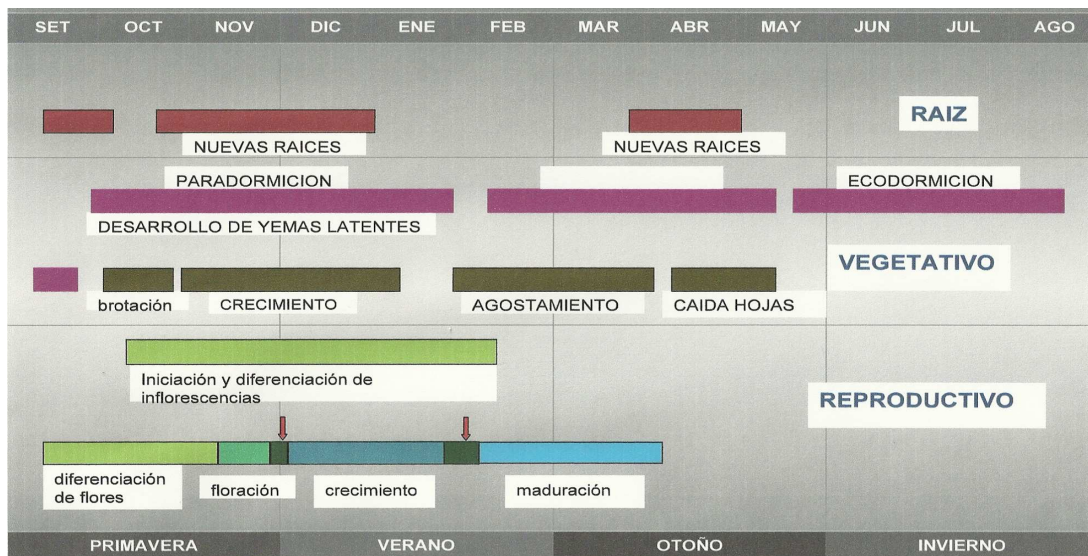
Este mosto también contenía precursores conjugadas superior de cisteína y los niveles de GSH. En este estudio, el contenido de GSH de mosto procedente de viñas de nitrógeno deficientes era significativamente inferior a mosto de vides que fueron fertilizados después de la floración.

Resultados anteriores fueron confirmados en otro estudio que evaluó el impacto de aplicaciones de nitrógeno foliar (LEAFN) y nitrógeno foliar y azufre (LEAFNS) midiendo GSH y tioles volátiles en vino. Ambos tratamientos resultaron en mosto con niveles más altos de nitrógeno asimilable de levadura en comparación con el control. El contenido de GSH del vino de ambos tratamientos fue también mayor.

Sin embargo, la adición de azufre a la pulverización foliar de N no aumentó significativamente el contenido de GSH del vino.

#### 2.4.4.3 Manejo del suelo:

El manejo del suelo es otro de los factores que pueden afectar la nutrición de la vid



Tiene influencias directas sobre las mejoras de las propiedades físicas, químicas, biológicas e hídricas del suelo; Controlar las malas hierbas y numerosos parásitos; Disminuir los riesgos de heladas primaverales.

El manejo de los suelos vitícolas ha cambiado profundamente en los últimos treinta años. Tradicionalmente, las viñas se labraban para controlar las malas hierbas y mantener un buen estado hídrico del suelo. Esta técnica fue reemplazada, en parte, por la aplicación de herbicidas a toda o a parte de la superficie del cultivo (escarda química). La continuidad de esta práctica afectó notablemente la estabilidad estructural del suelo, aumentando la compactación y determinando inconvenientes para el manejo del cultivo, especialmente luego de precipitaciones que afectan la tracción de la maquinaria y en general el tránsito de los operarios.

En el momento actual la producción agrícola está basada cada vez más en el respeto al medio ambiente (huella del CO<sub>2</sub>, del agua, producción integrada, ecológica, etc.). El interés de los consumidores por la calidad y la tipicidad del producto, nuevos materiales vegetales utilizados en plantaciones, maquinaria de trabajo más tecnológica, nos lleva a recapacitar sobre las técnicas de manejo del suelo vitícola.

El desequilibrio entre el vigor y el rendimiento es uno de los principales problemas de la viticultura actual. La limitación de la producción, en nuestra actual estructura vitivinícola, necesaria para el mantenimiento de una determinada calidad, nos lleva a menudo a limitar los rendimientos mediante el aclareo de racimos, antes de la vendimia. A largo plazo no parece lógico mantener un sistema de cultivo de gran producción para limitarlo posteriormente, antes de la recolección, con costosas operaciones manuales, que no cabe duda, puedan tener cabida en años o momentos puntuales para obtener un determinado producto.

#### 2.4.4.3.1 Cubierta vegetal:

La cubierta puede ser un medio para equilibrar el vigor de la viña y su rendimiento teniendo como resultado final un aumento en la calidad de la cosecha.

La cubierta vegetal viva en viña es una técnica de mantenimiento del suelo que consiste en mantener con hierba el suelo de cultivo, pudiendo ser cubierta natural, dejando crecer la flora espontánea, o cubierta implantada, sembrada para tal fin.

Las principales ventajas de la cubierta viva en viña son:

- Protección contra erosión.
- Control de rendimiento.
- Control del vigor en el cultivo.
- Mejora de la calidad de las uvas.
- Mayor sanidad de cosecha (disminución de ataques de Botrytis).
- Mejora de la estructura del suelo.
- Facilidad en el paso de maquinaria en cualquier época.
- Reducción del apelmazamiento del suelo por maquinaria.
- Enriquecimiento del suelo en materia orgánica.
- Activación de la vida microbiana del suelo.
- Control de ciertas malas hierbas.

Los principales inconvenientes son:

- Competencia excesiva por los nutrientes (fundamentalmente nitrógeno).
- Competencia excesiva por el agua.
- Riesgo de heladas primaverales.
- Fermentaciones más largas de los mostos.
- Posible problemática en los sabores en algunos vinos blancos.

La competencia por los nutrientes es uno de los detalles a tener en cuenta, ya que la falta de estos y como protagonista del glutatión el Nitrógeno, es muy importante mantenerlo en las cantidades óptimas de desarrollo.

Se ha realizado un estudio que se ha centrado en la comparación entre un suelo labrado y la cubierta vegetal permanente de las interlíneas. Las especies utilizadas para cubierta son gramíneas (*Lolium perenne* y *Festuca arundinacea*).

La experimentación se ha realizado sobre dos variedades, Tempranillo y Chardonnay.

El ensayo está ubicado en viñedos de la Bodega Señorío de Otazu, situado en la Cuenca de Pamplona con precipitaciones anuales en torno a los 800 mm.



Se estudiaron los parámetros agronómicos y los enológicos de los vinos producidos durante 9 años en el caso de tempranillo y en el caso del Chardonnay es el quinto año del ensayo.

Se establecieron tres niveles de ocupación del suelo:

1. Cubierta total (CT): todas las calles sembradas.
2. Cubierta parcial (CP): una calle sembrada y otra sin sembrar.
3. Testigo (T): sin cubierta con laboreo.

La cubierta está formada por la mezcla de dos especies de gramíneas: Festuca (60%) y ray-grass (40%). Los controles que se han realizado son los siguientes:

- Control del peso de madera de poda
- Análisis foliares (en cuajado y en envero)
- Controles agronómicos y enológicos en vendimia (peso/cepa, número de racimos, análisis de los mostos, etc.)
- Vinificaciones de las variantes
- Análisis de los vinos obtenidos y cata
- Estudio de fermentaciones, NFA (nitrógeno fácilmente asimilable), aminoácidos
- Control sanitario

### Resultados en tempranillo

Los parámetros productivos de la viña se han visto muy afectados por las cubiertas. La cubierta vegetal permanente de gramíneas ha limitado el rendimiento de las cepas, siendo más acusada esta limitación en la cubierta total (50% menos que el testigo) y menos en la cubierta parcial (15% menos que el testigo). En la cubierta total, este menor rendimiento se debe a una disminución de todos los parámetros productivos (número de racimos, peso del racimo, tamaño de la baya). En la cubierta parcial, esta menor producción se debe a un menor número de racimos, ya que el peso de racimos de la cubierta parcial y del testigo es el mismo y el peso de la baya es mayor en la cubierta parcial

Los parámetros enológicos del mosto presentan diferencias entre tratamientos. La cubierta total optimiza todos los parámetros enológicos con un mayor grado probable, menor acidez

total y menor ácido málico. La cubierta parcial presenta diferencias en la acidez total y en el ácido málico, respecto del testigo

Los parámetros de color, como la intensidad colorante, el Índice de Polifenoles Totales (IPT 280nm), los taninos y los antocianos de vinos procedentes de cepas con cubierta, presentan valores más altos que los del testigo sin cubierta, destacando la cubierta total con los valores más elevados.

Análisis foliares: Los niveles de nitrógeno, fósforo y potasio más bajos corresponden a la cubierta total. El elemento que mayores diferencias marca entre variantes es el sodio, que en el caso de la cubierta total y en envero adquiere valores muy elevados.

#### Resultados en Chardonnay

En los parámetros agronómicos obtenidos hasta ahora, no se aprecia un efecto tan marcado de las cubiertas como ocurre con la variedad tempranillo. No obstante, y de forma general, la tendencia es similar a la observada en la variedad tinta. Los parámetros más afectados han sido vigor (medido como peso de poda) y acidez del mosto, que en el caso de las cubiertas alcanza los valores más bajos.

Respecto a los parámetros enológicos, ya hemos observado en ensayos anteriores, cómo la cubierta vegetal en variedades tintas consigue mejorar la calidad de los vinos gracias al control del vigor de la viña, control de la producción, mejor exposición de racimos, mayor sanidad etc. Sin embargo estos efectos no son tan claros en el caso de los vinos blancos.

Otros investigadores, el nivel de extracción de nitrógeno es más alto en los vinos tintos ya que fermentan con los hollejos.

#### 2.4.5 Nitrógeno fácilmente asimilable (NFA)

Las sustancias nitrogenadas de la uva se encuentran en forma mineral (nitrógeno amoniacal,  $\text{NH}_4^+$ ) y en las diferentes formas orgánicas, entre las que destacan los aminoácidos, péptidos y proteínas. En la baya, el nitrógeno se localiza principalmente en el hollejo y las pepitas.

El nitrógeno mineral del mosto representa del 5 a 10% del nitrógeno total, es decir unas decenas de mg/l, si bien es la forma más directamente asimilable por las levaduras. Los

aminoácidos del mosto son alrededor de veinte y representan del 20 al 30% del nitrógeno total. La composición cuantitativa y cualitativa depende de la variedad, del suelo, de la conducción y de las condiciones climáticas del año, etc. La composición de los aminoácidos de un mosto es modificada por la fermentación, excepto en el caso de la prolina, no asimilada por las levaduras.

Estos aminoácidos presentes en el mosto, favorecen el crecimiento y desarrollo de las levaduras. Además el contenido en aminoácidos afecta a la cinética de fermentación. Así, mostos pobres en nitrógeno pueden provocar fermentaciones lentas o paradas de fermentación.

El nitrógeno asimilable, formado por el nitrógeno amoniacal y los aminoácidos contenidos en los mostos, es un elemento esencial en el crecimiento y en el metabolismo de las levaduras. Su concentración influye directamente en la cinética fermentativa. El umbral de carencia de NFA en los mostos comúnmente admitido se sitúa en 140-150 mg/l.

Pero el nitrógeno no es solo necesario para la buena marcha de la fermentación, está también implicado en los procesos de formación de diferentes compuestos aromáticos.

La utilización de cubiertas puede entrañar una disminución del contenido en nitrógeno de los mostos. Debido al modo de vinificación, las variedades blancas son más sensibles a este fenómeno. Conviene, por tanto, estar atentos a la intensidad de la competencia que la cubierta ejerce en variedades blancas, para poder limitar los riesgos fermentativos.

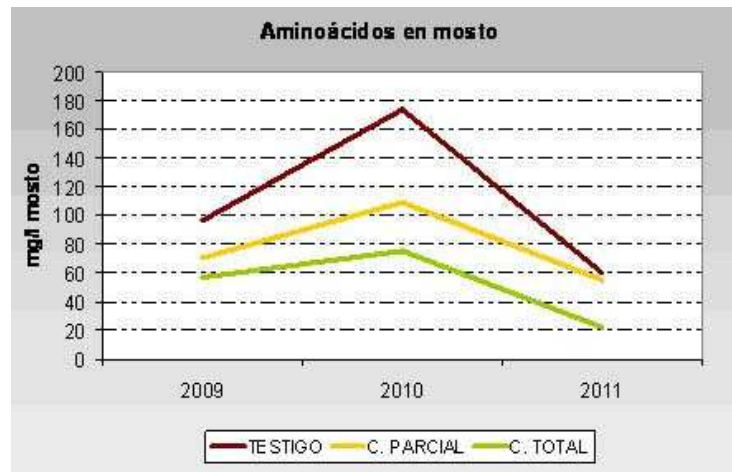
Por todas estas circunstancias, en este ensayo se midieron parámetros relacionados con la fermentación, como nitrógeno fácilmente asimilable., aminoácidos de los mostos (fig. 2) y vinos, así como compuestos aromáticos de los vinos (alcoholes superiores, ésteres, etc.). Se presentan los resultados más destacados de algunos parámetros.



**Figura 1.** Resultados correspondientes al nitrógeno fácilmente asimilable (NFA), cosecha 2011.

El NFA del mosto procedente de cubierta vegetal ha sido más bajo que en el laboreo, resultando a su vez menor en la cubierta total que en la parcial. En la figura 1 se puede observar cómo, en el año 2011, los valores obtenidos en cubierta total están por debajo de los umbrales de carencia anteriormente mencionados. Ese año se observó una ralentización muy importante de la fermentación.

El contenido en aminoácidos del mosto se ha comportado de la misma manera que el NFA: los valores más altos han correspondido al laboreo, seguido de la cubierta parcial, mientras que la cubierta total ha mostrado los valores más bajos

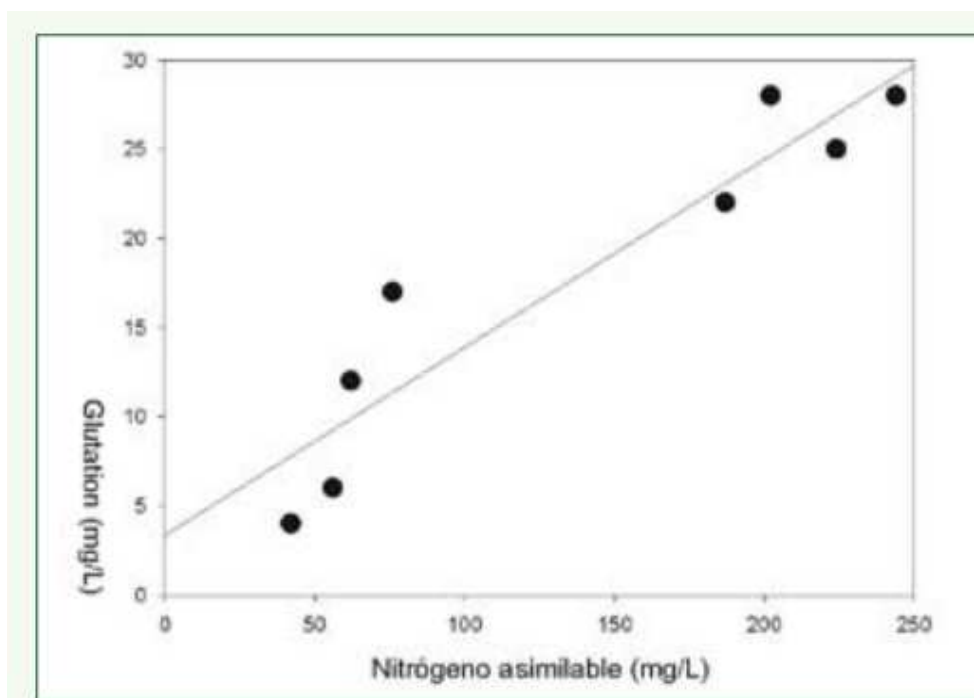


**Figura 2.** Comportamiento de aminoácidos en mosto.

La cosecha 2011 presenta los niveles más bajos de aminoácidos debido a las características climatológicas del año, marcado fundamentalmente por un gran estrés hídrico y altas temperaturas del verano.

Esto significa que la concentración de glutatión esta positivamente relacionada con los niveles de nitrógeno potencialmente asimilable (tan deficitarios y tan poco medidos en la mayoría de las bodegas argentinas).

Relación entre el contenido de nitrógeno asimilable y el contenido de glutatión de 8 mostos blancos diferentes:



## 2.5 Estrés

Genes GST pueden ser inducidas por diversos factores exógenos tales como ataque de patógenos, metales pesados, golpes de calor, etc. en forma de defensa de la planta.

### 2.5.1 El Glutati3n en plantas bajo estr3s por cobre (Cu)

El cobre como micro nutriente esencial juega un rol vital en el mantenimiento del metabolismo normal de las plantas, involucrando un amplio rango de procesos bioquímicos y fisiológicos como:

- Fotosíntesis, respiración, redistribución de carbohidratos, reducci3n y fijaci3n de Nitr3geno y metabolismo de proteínas de la pared celular.
- Ayuda a la permeabilidad del agua a los vasos del xilema y controla la relaci3n de agua.
- Controla la producci3n de ADN y ARN, su deficiencia inhibe la reproducci3n de las plantas.
- Est3 involucrado de manera indirecta en mecanismos de defensa de las plantas a ciertas enfermedades

El rango de Cu para un crecimiento normal es usualmente entre 5 a 20 ppm, mientras que por encima de 20 ppm se pueden observar sntomas de toxicidad. A niveles de concentraci3n altos, el cobre inhibe el crecimiento de las plantas e incluso causa su muerte. El exceso de cobre en la planta, induce la formaci3n de especies oxigenadas reactivas, como per3xido de hidr3geno y radicales hidroxilo

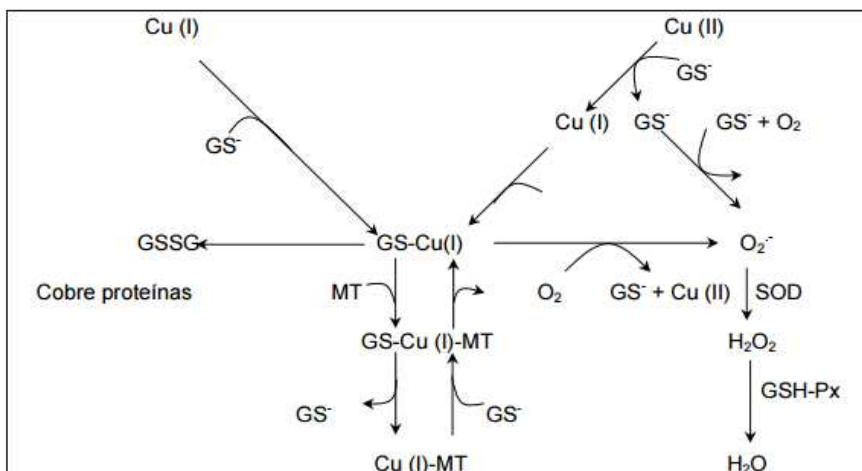


Figura 1: Diagrama del metabolismo celular del cobre. El diagrama representa un mecanismo para la transferencia de cobre desde GSH a MT (metalotioneína). También se presenta el mecanismo celular para remover las especies oxigenadas reactivas, generadas de la oxidación del complejo GS-Cu (I) o del glutatión radical (GS•).

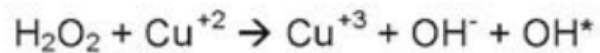
El efecto tóxico de los metales pesados en las plantas, depende del tiempo y concentración a la que están expuestas. Muchos de estos efectos, están relacionados a la interacción con grupos carboxílicos y tiólicos.

La fracción de contaminantes biodisponible no es constante en suelos cuyas características fisicoquímicas son distintas, como por ejemplo pH, contenido de materia orgánica, cantidad de carbono disuelto y conductividad del suelo, ya que muchas de estas variables determinan el grado de solubilización de los metales o la capacidad tamponante del suelo. La forma química del cobre que se encuentra en el suelo, la especie de la planta y el tejido estudiado, influyen en una mayor o menor absorción de éste por la planta, es así como el cobre como  $\text{CuSO}_4$  (especie de alta solubilidad) /al ser absorbido a altas concentraciones por especies sensibles, produce un notable deterioro en las hojas, no así cuando se utiliza  $\text{CuO}$  (especie de baja solubilidad).

El glutatión una de las especies tiólicas de bajo peso molecular más abundante en los tejidos, participa en múltiples procesos metabólicos, su monómero reducido (GSH), ayuda a desintoxicar de xenobióticos y metales pesados, reduce las proteínas tiólicas, mantiene la membrana celular y desactiva los radicales libres, así como también es asociado a la resistencia del estrés y está involucrado en la regulación redox del ciclo de la célula, pudiendo actuar como buffer. Su dímero oxidado (GSSG) controla el contenido de metal en las metaloproteínas.

El cobre (Cu), bajo cualquiera de sus estados, es el principal enemigo del glutatión, ya que se ha comprobado una relación inversa entre glutatión y Cu tanto en mostos como en vinos.

Un problema mayor asociado con pulverizaciones a base de Cu en momentos próximos a cosecha es que el Cu en el mosto, además de precipitar moléculas tioladas como el glutatión, es también un poderoso catalizador de la oxidación, a través de la activación de la reacción de Fenton



El radical hidroxil (OH\*) es una de las especies oxidativas más potentes, que en el mosto/vino, literalmente, oxida a la primer molécula que se encuentre a su paso. Esto último representa un problema desde el punto de vista de la concentración de glutatión y también en el caso de vinos blancos con bajas concentraciones de buffers antioxidantes como los fenoles.

La razón GSH/GSSG en las plantas puede ser perturbada por factores que inducen el estrés, como daño mecánico y contaminación ambiental.

El tratamiento prolongado de las plantas con cobre se manifiesta en síntomas de toxicidad con una drástica disminución de la biomasa de la parte aérea y raíz.

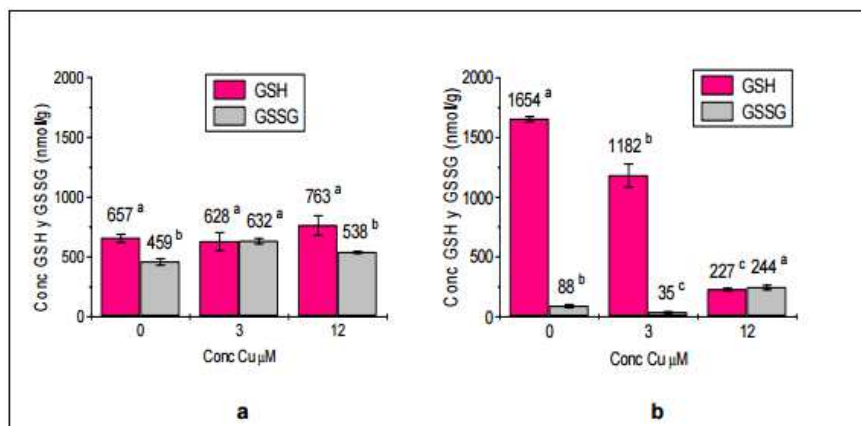


Figura 1: Grafico comparativo de concentración de GSH y GSSG (nmol/g), para tratamiento crónico en a) parte aérea y b) raíz. Con n=4



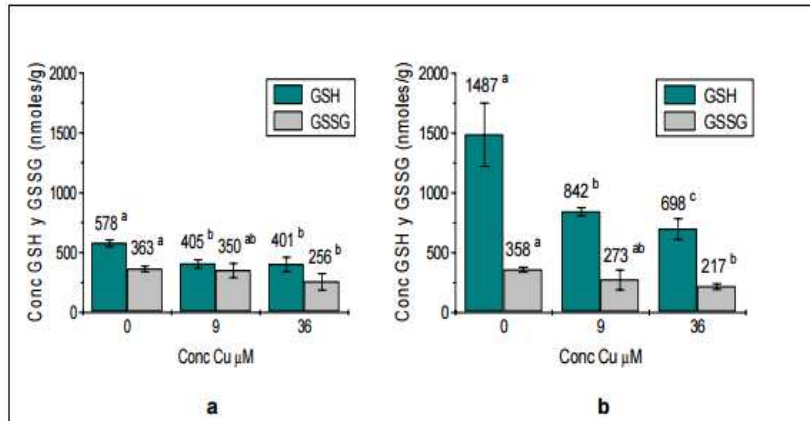


Figura 2: gráfico comparativo de concentración de GSH y GSSG (nmol/g), para tratamiento agudo a) parte aérea, b) raíz. Con n=4.

El cobre aplicado a la planta modifica los niveles de glutatión reducido y oxidado tanto en el tratamiento crónico como en el agudo. El efecto más notorio se manifestó sobre el glutatión reducido contenido en la raíz. Este péptido decrece su concentración a medida que incrementa la concentración de cobre, siendo este efecto independiente de los cambios morfológico que presenta la raíz y del lapso de tiempo en que se le aplicó cobre.

En plantas que ya han alcanzado un desarrollo, los cambios producidos en los niveles de glutatión reducido y oxidado cuando son expuestas a cobre por un periodo de tiempo corto (horas), constituyen un buen indicador de la respuesta temprana al estrés por metal.

#### 2.5.1.1 La presencia de Glutatión en las funciones de desintoxicación de metales pesados:

Se definen como “metales pesados” aquellos elementos químicos que presentan una densidad igual o superior a 5 g cm<sup>-3</sup> cuando están en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalinotérreos).

El término “metales pesados” es impreciso. En verdad se pretende indicar con este término aquellos metales que, siendo elementos pesados, son “tóxicos” para la célula. Sin embargo en realidad cualquier elemento que a priori es beneficioso para la célula, en concentraciones excesivas puede llegar a ser tóxico. Por tanto se seguirá manteniendo el término “metales pesados” para definir dichos elementos.

Junto a ellos hay otros elementos que, aunque son metales ligeros o no metales, se suelen englobar con ellos por orígenes y comportamientos asociados; es este el caso de As, B, Ba y Se. Los metales pesados se clasifican en dos grupos:

- Oligoelementos o micronutrientes. Necesarios en pequeñas cantidades para los organismos, pero tóxicos una vez pasado cierto umbral. Incluyen As, B, Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Se y Zn.
- Sin función biológica conocida. Son altamente tóxicos, e incluyen Ba, Cd, Hg, Pb, Sb, Bi.

El problema de la entrada de metales pesados en la planta es la contaminación que pueden ser nocivos para la salud humana o la calidad del medio ambiente, causar daños a la propiedad material o perjudicar o entorpecer las actividades recreativas y otros usos legítimos de medio ambiente.

Las concentraciones anómalas de metales pesados en los suelos pueden deberse básicamente a dos tipos de factores: causas naturales y causas antropogénicas. Las causas antropogénicas que podemos reducir al tener conciencia sobre estas son, la minería, la combustión de carburantes fósiles, la industria a través de los vertidos, emisiones, residuos (incineración, depósito), como algunos pesticidas y fertilizantes, etc.

Los metales pesados siguen unas pautas de movilidad generales:

- Movilización a las aguas superficiales o subterráneas.
- Transferencia a la atmósfera por volatilización.
- Absorción por las plantas e incorporación a las cadenas tróficas.
- Retención de metales pesados en el suelo de distintas maneras: disueltos o fijados, retenidos por adsorción, complejación y precipitación.

La absorción por las plantas es la que nos interesa en este caso. Los iones inorgánicos y el agua (savia bruta) se transportan desde la raíz hasta las hojas mediante una serie de células tubulares que pertenecen a un tejido leñoso denominado xilema. La fuerza que mueve esta solución no radica en las células del tejido xilemático, sino en la fuerza propia del proceso de ósmosis y en otra fuerza, menos habitual, conocida como fuerza de succión.

La ósmosis se produce porque existe una gran diferencia de concentración entre la parte superior de la planta (hojas, inflorescencias) donde es mayor y la parte inferior, es decir existe un potencial hídrico favorable al impulso ascendente. La fuerza de succión se produce cuando en las hojas se pierde agua por transpiración, pues las moléculas perdidas producen una

succión de nuevas moléculas cercanas para reemplazar a las anteriores, de tal manera que se produce una fuerza que atrae agua desde las raíces hacia las hojas.

La toxicidad de los metales pesados depende, como ha quedado expuesto previamente, de la concentración, la forma química y la persistencia. Un elemento indispensable para un ser vivo en concentraciones traza puede llegar a ser tóxico en concentraciones elevadas.

Por otra parte, la mayoría de metales pesados se combina con otras formas químicas, antes de entrar en los organismos o cuando se encuentra en el interior de los mismos; por tanto, antes de determinar la toxicidad de un elemento es necesario determinar la forma química en la que se encuentra. La causa primaria del elevado nivel de toxicidad a nivel químico es que los metales pesados poseen una gran capacidad para unirse con moléculas orgánicas.

Estos efectos tóxicos en sistemas biológicos dependen de reacciones con ligandos que son esenciales para su asimilación, y estos ligandos están, a su vez, presentes en gran abundancia en la célula, ya sea formando parte de moléculas de mayores dimensiones, ya sea como moléculas aisladas.

En este sentido, cabe destacar la gran afinidad que muestran los metales pesados, como principales ligandos, por grupos sulfidrilo, radicales amino, fosfato, carboxilo e hidroxilo.

El resultado de estas uniones ligando-metal puede ser muy perjudicial para la célula, destacando en este aspecto sobre otros fenómenos.

(1) la acción genérica sobre proteínas por inhibición de la actividad o por disrupción en la estructura de las mismas,

(2) el desplazamiento de elementos esenciales de su metabolismo estándar, produciendo efectos de deficiencia, y

(3) la catálisis de reacciones de generación de moléculas EROs (Especies Reactivas al Oxígeno) o radicales libres que provocan fenómenos de estrés oxidativo.

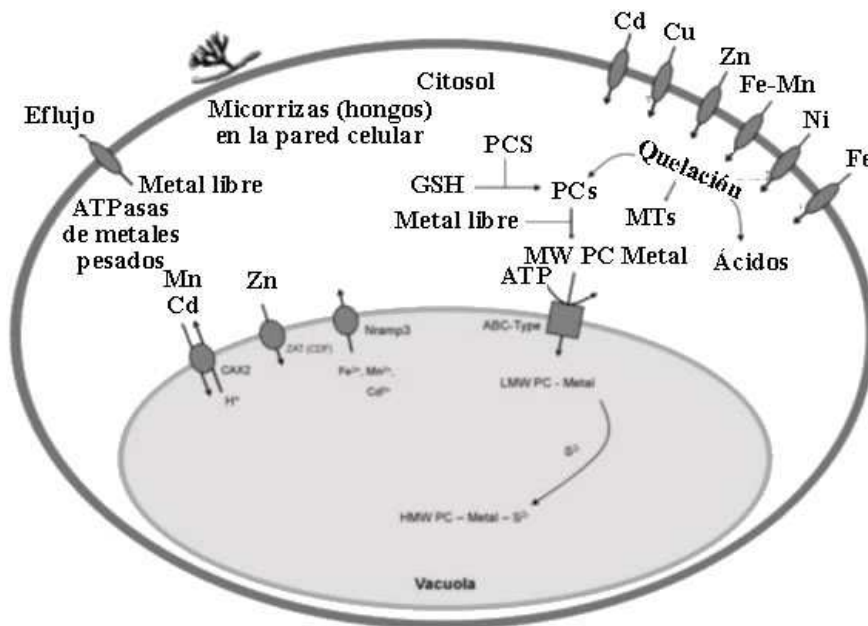
El estrés oxidativo es un fenómeno que merece ser estudiado aisladamente, dada su complejidad e importancia en el desarrollo de los mecanismos básicos de la célula. Como resumen de dicho fenómeno baste decir que provoca daño a distintos niveles, destacando los siguientes aspectos:

- Inactivación de proteínas y enzimas, fundamentalmente por la oxidación de los grupos sulfidrilo, dando lugar a puentes disulfuro que causan la interrupción del funcionamiento normal de la proteína o enzima.
- Peroxidación lipídica de membranas, causando rupturas y subproductos de las cadenas hidrocarbonadas.
- Efectos de daño sobre el ADN. Estos pueden ser desperfectos genotóxicos: mutaciones, aberraciones cromosómicas, alteraciones en la síntesis y reparación de ácidos nucleicos y transformaciones celulares. (Alteraciones producidas en oncogenes y factores de crecimiento/Alteraciones en los genes supresores de tumores/Alteraciones en los genes reguladores del crecimiento “hormonas”.)

#### 2.5.1.1.1 Mecanismos celulares para tolerancia y detoxificación de metales pesados en plantas

Para poder comprender la genética molecular de la acumulación de los metales pesados es necesario un conocimiento profundo de la interacción de los mismos con el entorno tanto en el interior de la planta como en el exterior de la misma.

Conseguir este conocimiento requiere el estudio de diferentes aspectos bien delimitados



Diferentes aspectos de interacción planta-metal relacionados con tolerancia y detoxificación son los siguientes:

#### 2.5.1.1.1.1 Micorrizas:

Las micorrizas son ciertos hongos del suelo que se encuentran en asociación simbiótica con las raíces de (la mayoría) de las plantas. La propia palabra define la simbiosis entre un hongo (mycos) y las raíces (rhizos) de una planta.

La asociación física se produce porque las raíces de las plantas se unen con las hifas de determinados hongos. La planta obtiene del hongo la parte que viene del suelo mientras el hongo obtiene la parte que viene del aire, así la simbiosis proporciona por parte del hongo nutrientes minerales y agua (suelo), y por parte de la planta, sustratos energéticos y carbohidratos (fotosíntesis).

Las plantas micorrizadas presentan una mayor tolerancia a los metales pesados gracias, en parte, a la capacidad para inmovilizar los metales en la raíz, impidiendo que éstos pasen a la parte aérea de la planta.

#### 2.5.1.1.1.2 Pared celular y exudados de raíz:

La raíz constituye el tejido de entrada principal de metales pesados en la planta. Hasta allí los metales pesados pueden llegar, fundamentalmente, por un proceso de difusión en el medio, mediante un flujo masivo y por intercambio catiónico.

La raíz posee cargas negativas en sus células, debido en gran medida a la presencia de grupos carboxilo del ácido péctico. Las cargas negativas de estas células de la rizodermis interaccionan con las positivas de los metales pesados presentes en el suelo, creando un equilibrio dinámico que facilita la entrada hacia el interior celular.

De esta forma, los cationes entran por la pared celular, que además es hidrofílica, lo que facilita el transporte iónico. Una vez unidas las cargas positivas a las negativas de la pared celular, los metales pesados se transportan, en parte por la vía apoplástica, y en parte por la simplástica.

Los exudados son compuestos orgánicos liberados por las raíces de la planta. Los exudados facilitan la disponibilidad de los metales. Por ejemplo, se ha observado que los exudados favorecen la absorción de Fe en suelos deficientes en el mismo.

#### 2.5.1.1.1.3 Membrana plasmática:

La célula necesita tener los siguientes caminos metabólicos en buen estado: la producción de ATP mitocondrial, el metabolismo de calcio, la síntesis de proteínas, la regulación del ADN, la glicólisis y el ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs.

La membrana plasmática es un sistema complejo y de un funcionamiento altamente sofisticado, siendo como es la puerta de entrada de cualquier elemento (señal, nutriente, tóxico, etc.) al lugar donde se realiza la química que mantiene la vida de la célula.

La membrana plasmática es utilizada por la célula para mantener los gradientes iónicos, que a su vez regulan el volumen celular.

Si se daña la membrana, entran iones  $\text{Ca}^{2+}$  y salen iones  $\text{K}^{+}$  (responsables de los fenómenos de polarización y despolarización de la membrana y, en definitiva, de la transmisión eléctrica). La salida de  $\text{K}^{+}$  favorece la entrada de agua. El aumento de agua incrementa el volumen celular. Hay varios mecanismos que pueden inducir estos cambios,

La membrana plasmática se ve rápidamente afectada por metales pesados. Sobre ella se producen efectos específicos según el metal, promoviendo daños mediante varios mecanismos. De manera resumida:

- Oxidación y entrecruzamiento de proteínas (conteniendo grupos tiol).
- Inhibición de proteínas de membrana que son esenciales (como por ejemplo la  $\text{H}^{+}$ -ATPasa).
- Cambios en composición y fluidez de los lípidos de membrana, y cambios en la permeabilidad.

#### 2.5.1.1.1.4 Quelación:

Uno de los aspectos más importantes de la acumulación de metales pesados es el que se refiere al proceso de complejación. Un complejo o compuesto de coordinación es el resultado de la interacción de un átomo central, esto es, un ion metálico con orbitales de valencia vacíos que puede actuar como ácido de Lewis (aceptor de electrones), y una o varias bases de Lewis (dador de electrones) con pares de electrones libres. Estas bases se conocen como agentes complejantes o ligandos. La planta utiliza este mecanismo de complejación en el interior de la

célula para detoxificar (amortiguar) los metales pesados, uniendo a ellos ligandos para formar complejos.

De esta manera, el metal queda inmerso en una interacción química que le mantiene en equilibrio electrónico (acomplejado), pero que no lo deja fuera del metabolismo, no se ha eliminado del citoplasma de la célula y, por ello, sigue siendo potencialmente tóxico. Los ligandos que utiliza son básicamente aminoácidos y ácidos orgánicos, y más específicamente, dos clases de péptidos: fitoquelatinas y metalotioneinas. Entre los aminoácidos y los ácidos orgánicos se encuentran los ácidos cítrico y málico, la histidina, la cisteína etc.

#### 2.5.1.1.1.4.1 Metalotioneinas (MTs)

Fueron las primeras proteínas identificadas (en mamíferos) como transportadoras de Cd. Son polipéptidos de unos 70-75 aminoácidos con un alto contenido en cisteína, aminoácido capaz de formar complejos con cationes mediante el grupo sulfidrilo que posee como radical. Son pues proteínas de transporte de metales, ricas en cisteína y de bajo peso molecular. Se cree que son las responsables esenciales de la quelación de metales pesados en el citoplasma de las células de mamíferos y bacterias, pero se piensa también que no son proteínas tan decisivas en el proceso de quelación de metales pesados en plantas.

#### 2.5.1.1.1.4.2 Fitoquelatinas (PCs)

Las fitoquelatinas son ligandos de alta afinidad que complejan metales pesados. Se piensa que las fitoquelatinas pueden desempeñar en plantas el papel equivalente al que las metalotioneínas desempeñan en mamíferos y bacterias. Las fitoquelatinas se inducen rápidamente en plantas por tratamiento con metales pesados.

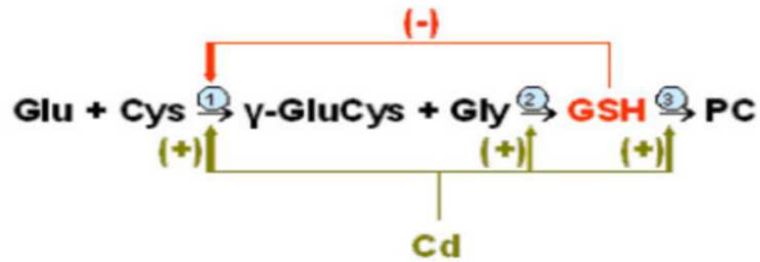
Las fitoquelatinas tienen como sustrato el glutatión. (GSH) está constituida por 3 aminoácidos: Glutámico (Glu), Cisteína (Cys) y Glicina (Gly), cuya estructura primaria es:  $\gamma$ -GluCysGly.

Numerosos estudios indican, como se ha mencionado previamente, que el GSH es el sustrato para la biosíntesis de las PCs.

Este proceso de síntesis se acomete a través de los enzimas que se indican en el esquema (Fig. 3). Se ha demostrado que estructuralmente la síntesis de PCs se produce por unión de GSH,

con residuos de Glu y Cys ligados a través de repeticiones de ( $\gamma$ -Glu-Cys)  $n$ -Gly donde  $n= 2-5\dots11$ . En cuanto al consumo energético, los dos primeros pasos (es decir la síntesis completa de glutatión) requiere consumo de ATP. No así la síntesis de PCs.

Esquema del proceso de síntesis de PCs.:



- 1:  $\gamma$ ECS (gamma-glutamylcisteína sintetasa)  
 2: GS (glutatión/GSH sintetasa)  
 3: PCS (fitoquelatina sintetasa)

Las PCs se sintetizan en el citosol, donde se unen a compuestos metálicos formando complejos. Sin embargo técnicas de HPLC y rayos X detectan mayores concentraciones de metal y PCs en el interior de la vacuola, por lo que se deduce que el transporte y acumulación en su interior están implicados en tolerancia y detoxificación. En consecuencia, parece ser que el paso final en el proceso de detoxificación, esto es, desde la movilización del metal del suelo a las raíces hasta llegar al interior de las células tanto de la raíz como de las hojas, es la compartimentalización vacuolar

#### 2.5.1.1.1.5 Compartimentalización vacuolar:

El eflujo de iones y el transporte al interior de la vacuola constituyen dos maneras diferentes de conseguir el mismo objetivo: reducir la concentración de metales tóxicos en el citoplasma

#### 2.5.1.1.1.6 Biotransformación:

Al conjunto de caminos metabólicos por medio de los cuales los tejidos incrementan la polaridad de un tóxico, o a la transformación química de un compuesto en el organismo, se le denomina biotransformación. Para reducir la respuesta tóxica de una sustancia en un organismo hay que disminuir la cantidad de sustancia en forma activa (tóxica) y el tiempo de permanencia de la misma en el sitio de acción. Esto se logra incrementando la polaridad ya que ello aumenta la difusibilidad del tóxico y por tanto puede incrementar la velocidad de excreción.



### 2.5.2 Homeostasis Estrés oxidativo en la vid (*Vitis vinifera* L.)

Las plantas pueden mantener el crecimiento y el éxito reproductivo mediante la detección de cambios en el entorno y reaccionar a través de mecanismos en los niveles moleculares, celulares, fisiológicos y de desarrollo.

Cada condición de estrés provoca una respuesta única a pesar de cierta superposición entre las reacciones al estrés abiótico (sequía, calor, frío, sal o alta la luz) y al estrés biótico (patógenos)

Se produce una característica común en la respuesta a todas las tensiones es la aparición de estrés oxidativo, a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs). Como peróxido de hidrógeno y superóxido están involucrados en la señalización de estrés, un control estricto en homeostasis EROs requiere un delicado equilibrio de los sistemas implicados en su generación y degradación.

A nivel mundial, grandes pérdidas agrícolas se atribuyen a la sequía, a menudo en combinación con calor. Los escenarios disponibles para el cambio climático sugieren incrementos en la aridez de las regiones de clima mediterráneo, donde la vid crece tradicionalmente. Esta especie es un cultivo muy importante en todo el mundo, en los planos económico y cultural. En el sur de Europa, las fases de post floración del ciclo de crecimiento por lo general se producen a altas temperaturas, exceso de luz y las condiciones de sequía en el suelo y / o nivel atmosférico.

Si la planta no tiene la capacidad de generar potencial de barrido, esta última instancia, puede conducir a la muerte. En la vid, la homeostasis antioxidante puede ser considerada a nivel de toda la planta y durante el ciclo de desarrollo. El ejemplo más notable se encuentra en bayas y sus derivados, como el vino, con propiedades nutraceuticas (hace referencia a todas aquellos alimentos que se proclaman como poseedores de un efecto beneficioso para la salud humana) asociados a su capacidad antioxidante.

El estrés oxidativo también surge en propagación *in vitro* general aplicada a las especies ornamentales, también se utiliza para propagar rápidamente vástagos de vid para injertar.

Homeostasis antioxidante está estrechamente regulada en hojas, asegurando un equilibrio positivo entre la fotosíntesis y la respiración, explicando la tolerancia de muchas variedades de vid a ambientes extremos.

El mejor "precio" a pagar por liberación fotosintética de O<sub>2</sub> y plantear el metabolismo aeróbico en la producción de EROs. La producción de EROs también se puede aumentar por condiciones de estrés. Cuando se inhibe la fotosíntesis, la absorción de energía de la luz puede estar en exceso a lo que puede ser utilizado por los procesos fotosintéticos, lo que resulta en la producción y la acumulación de EROs.

Lo mismo ocurre cuando el estrés produce una aceleración inducida de otros procesamiento EROs mecanismos metabólicos resultan en la acumulación de EROs. Las previsiones de cambio climático indican una alta probabilidad de episodios de temperaturas extremas, tanto altas como bajas, una disminución en la disponibilidad de agua, así como incrementos en óxido de carbono y el ozono en la atmósfera. Todos estos factores de crecimiento y desarrollo de plantas impactan, al afectar negativamente a la homeostasis antioxidante, lo que dificulta la adaptación a factores de estrés ambientales.

Una molécula se clasifica como "antioxidante" cuando es capaz de apagar EROs en sí sin someterse a la conversión en un radical destructivo, interrumpiendo así las cascadas de oxidación incontrolada. En esa categoría se incluyen, entre otros, el ácido ascórbico metabolitos (ASA, también denominado vitamina C), el glutatión (GSH), y pigmentos carotenoides.

La señal EROs o vías de degradación dependerá de enzimas tampón redox antioxidantes tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxirredoxinas (PRX), ascorbato peroxidasa (APX), y glutatión reductasa (GOR).

Sobre los genes de estrés abiótico se alteran los perfiles de expresión y por lo general los genes asignados a las categorías funcionales del metabolismo de las proteínas y la modificación, la señal y respuesta antioxidante sufren cambios significativos, mejorando así los atributos comunes de las vías de defensa abióticos de estrés.

Las propiedades nutraceuticas de la baya de la uva y sus derivados, es decir, el vino, son comúnmente asociados con las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos que contienen, desde simples como flavonoides antocianinas a proantocianidinas condensados (AP), taninos, que pueden solubilizarse en la vacuola o vinculado a los polisacáridos de la pared celular, por lo que, es de gran interés para comprender sus mecanismos antioxidantes en planta.

### 2.5.2.1 Los metabolitos que participan en la homeostasis Antioxidante: EROs, ASA, GSH, Pigmentos y Prolina

Los diferentes niveles de tolerancia al estrés presentado por las variedades de vid se relacionan directamente con la plasticidad genética de la homeostasis antioxidante.

Algunas variedades mantienen bajos niveles basales de metabolitos antioxidantes teniendo así a sintetizarlos en el inicio de estrés. Tales variedades tienen una respuesta más lenta que aquellos con mayores niveles basales de metabolitos antioxidantes. Esto se puso en evidencia por el patrón diferente de metabolitos antioxidantes en condiciones normales de crecimiento, como se muestra en la Tabla 1

*Las unidades se indican en cada fila, excepto los siguientes:*

*a nmol mg prot<sup>-1</sup>; b mUg<sup>-1</sup> FW; c Ug<sup>-1</sup> FW; d  $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mg<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>; e  $\mu$ g g<sup>-1</sup> FW, FW peso fresco; LA, área foliar; Peso seco DW.*

Concentración de los metabolitos y actividades de las enzimas antioxidantes cuantificadas en varias variedades de vid antioxidantes y en diferentes tejidos

Metabolito	Kalecik Karasi	Sultana	Trebbiano	Öküzgözü	Touriga Nacional	Trincadeira	Thompson Seedles	Tinto Cão	Tinta Roriz	Malbec
Tejido	Hojas	células / discos foliares de hojas	Hojas	Hojas	Hojas	Hojas	Brotos	Hojas	Hojas	Hojas
AsA [ $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ ]			11		0.8*	0.67				
DA sA [ $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ ]			3.3		0.23*	0.08				
GSH [ $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ ]			0.12		19*	25				
GSSG [ $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ ]			0.04		10*	7				
Clorofila [ $\text{mg cm}^{-2}\text{LA}$ ]					12*	4		208	409	26576
Carotenoides [ $\text{mg cm}^{-2}\text{LA}$ ]					5.6*	2.1		58	113	5297
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [ $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ ]	22.74	0.05 <sup>*.a</sup>	35	20	4.3*	2.9	0.023			
Prolina [ $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ ]	0.71	0.01*		0.01						
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> [ $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ ]		0.1 <sup>*.a</sup>	0.6							
MDA [ $\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$ ]				12						
Fenoles [ $\text{mmol g}^{-1}\text{FW}$ ]			30							
ABA [ $\text{pmol mg}^{-1}\text{DW}$ ]		50			6.1*	4.3				1 <sup>e</sup>
Actividad Enzimática										
Superóxido dismutasa [Unidades (mg prot min) <sup>-1</sup> ]	31.10		4	6.3	1.1					
Peroxidasa [ $\mu\text{mol GDHP (mg min)}^{-1}$ ]				250						664
Ascorbato Peroxidasa [ $\mu\text{mol AsA (mg min)}^{-1}$ ]	237		23 <sup>b</sup>	360	200					217.3
Monodehidroascorbato reductasa [ $\mu\text{mol NA DH (mg min)}^{-1}$ ]					1.5					
Dehidroascorbato reductasa [ $\mu\text{mol AsA (mg min)}^{-1}$ ]			4.5 <sup>c</sup>		0.4					
Glutación reductasa [ $\mu\text{mol NADHP (mg min)}^{-1}$ ]			0.08 <sup>c</sup>		0.16					
Catalasa [Unidades (mg prot min) <sup>-1</sup> ]	5.66			7 <sup>d</sup>	3					4.4
Total peroxirredoxinas [nmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ( $\mu\text{g prot min)}^{-1}$ ]					56.4 <sup>o</sup>					
LOX [ $\text{mmol g}^{-1}$ ]	2.42									

#### 2.5.2.1.1 EROs

Los primeros jugadores en la homeostasis antioxidante, que en condiciones normales inducen la necesidad de desintoxicación / barrido, son ellos mismos EROs. En los cloroplastos  $O_2^-$  producido en la reacción Mehler se produce en condiciones normales, comúnmente creciente sobre el estrés. Ahora se cree que la formación de  $O_2^-$  es el primer paso en una reacción en cadena que conduce a la de control y la regulación de varios procesos celulares, con EROs integrado en las vías de señalización, a menudo en la diafonía con la regulación hormonal

Cuando la energía del triplete excitados en las clorofilas se transfiere al oxígeno molecular, y se forma 1 molécula de  $O_2^-$ . Este EROs es un agente electrófilo fuerte que puede reaccionar con lípidos, proteínas y ADN.

Sin embargo, el  $O_2^-$  también reacciona con moléculas mediadoras del objetivo que desencadenan cascadas de señalización que conducen ya sea a la muerte celular programada o a la aclimatación.

En las hojas de vid,  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  se generan en oligoelementos por estrés, como la causada por boro en exceso.

Los peroxisomas son probablemente los principales sitios de producción intracelular de  $H_2O_2$  de, a pesar de  $O_2^-$  radicales de óxido y nítrico ( $NO \bullet$ ) también se producen en los peroxisomas.

La fotoinhibición que se verifica en hojas de vid sobre la sequía y estrés por salinidad es acompaña de un aumento en la transcripción de genes que codifican para la glicolato oxidasa de peroxisomas, catalasa y varias enzimas fotorespiratorias.

#### 2.5.2.1.2 AsA y GSH

Ácido L-ascórbico (AsA) es un metabolito abundante que juega papeles importantes en la fisiología de estrés de la planta, así como en el crecimiento y el desarrollo. AsA es un antioxidante clave, capaz de eliminar directamente varios diferentes tipos de EROs. Tanto el antioxidante lipofílico cloroplástico  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) y pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas) dependen de AsA para la regeneración de los radicales oxidados. AsA es también el más importante reductor de sustrato de la  $H_2O_2$ , actuando conjuntamente con el glutatión (GSH,  $\gamma$ -L-Glu-L-Cys-Gly) en el ciclo ascorbato-glutatión.

GSH es un metabolito multifuncional en las plantas, siendo un importante reservorio no proteico reducido de azufre, y un elemento crucial en la defensa celular y la protección, la

prevención de la desnaturalización de las proteínas causados por la oxidación de los grupos tiol durante el estrés, reacciona químicamente con una amplia gama de EROs. En vid, AsA y GSH en grupo y sus ajustes sobre el estrés parecen ser diferentes dependiente y bajo un estricto control.

Tiene un potencial redox de -340 mV que le permite reducir dehidroascorbato a ascorbato o reducir los puentes disulfuro de las proteínas. Se encuentra en la mayoría de los tejidos de plantas, en compuestos celulares y subcelulares; su nivel es mayor en luz que en oscuridad. Su mayor concentración se encuentra en los cloroplastos (70-90%) con un promedio de 1-4 mM, pero cantidades significativas pueden también acumularse en el citosol.

El glutatión reacciona químicamente con oxígeno singlete, superóxido y radicales hidroxilo, y por tanto, funciona directamente como un captador de radicales libres.

También estabiliza la estructura de membrana mediante reacciones de peroxidación de lípidos. Una respuesta inicial al estrés está relacionada con los cambios en el estado redox del glutatión, mientras que la aclimatación está marcada por un incremento de la concentración del glutatión, incremento relacionado con la actividad enzimática, y/o un estado redox más reducido de glutatión.

Sin embargo, cuando el nivel de estrés aumenta, la concentración de glutatión cae y el estado redox se vuelve oxidado, el cual marca la degradación del sistema. Cuando la producción celular de EROs excede la capacidad antioxidante de la propia célula, las macromoléculas como lípidos, proteínas y ADN cambian. Los EROs también juegan un papel en la regulación génica y en la señalización de la transducción de vías, las cuales pueden estar involucradas en mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo. Experimentalmente, si se inactiva la glutatión peroxidasa, se acumula peroxidasa la cual puede actuar como segundo mensajero y regular la expresión de genes antiapoptóticos y la glutatión peroxidasa misma para proteger contra daños a la célula. El glutatión elimina  $H_2O_2$  citotóxico, y reacciona no enzimáticamente con otros EROs: oxígeno singlete, radical superóxido y radical hidroxilo.

El papel central del glutatión en la defensa antioxidante se debe a su capacidad para regenerar otro potente antioxidante soluble en agua, el ácido ascórbico, vía ciclo ascorbato-glutatión.

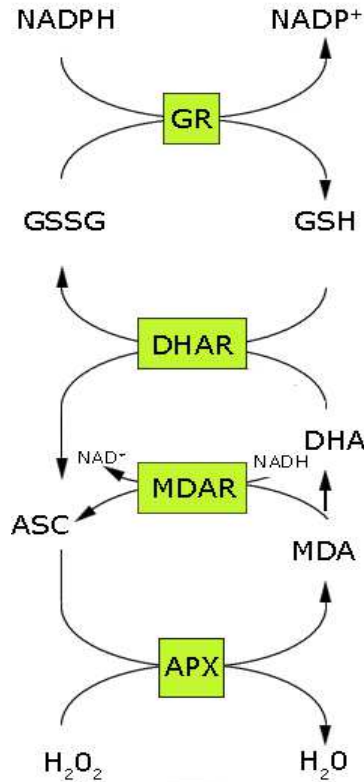
#### 2.5.2.1.2.1 Ciclo ascorbato –glutación:

El ciclo de glutación-ascorbato es una vía metabólica que desintoxica el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), una especie de oxígeno reactivo que un producto de desecho en el metabolismo. El ciclo implica los metabolitos antioxidantes: Ascorbato, glutación y NADPH y las enzimas que unen estos metabolitos.<sup>1</sup>

En el primer paso de esta vía,  $H_2O_2$  se reduce a agua por la peroxidasa de ascorbato (APX) usando ascorbato como el donador de electrones. El ascorbato oxidado (monodehidroascorbato) se regenera por la reductasa de monodehidroascorbato (MDAR).<sup>2</sup> Sin embargo, el monodehidroascorbato es un radical y si no se reduce rápidamente se desproporciona en ascorbato y deshidroascorbato.

El deshidroascorbato se reduce a ascorbato por la reductasa de deshidroascorbato por el GSH, dando glutación oxidado (GSSG). Finalmente GSSG se reduce por la reductasa de glutación (GR) usando NADPH como donador de electrones. Esto quiere decir que el ascorbato y el glutación no se consumen; el flujo de electrones desde va del NADPH al  $H_2O_2$ . La reducción del deshidroascorbato puede ser no enzimática o catalizada por las proteínas con actividad reductasa de deshidroascorbato (DHAR), como la S-transferasa omega 1 de glutación o glutaredoxinas.

En las plantas, el ciclo de glutatión - ascorbato opera en el citosol, mitocondrias, plástidos y peroxisomas.



- (GR) reductasa de glutatión
  - (GSSG) glutatión oxidado
  - (GSH) glutatión
  - (DHAR) deshidroascorbato reductasa
  - (ASC) ascorbato
  - (MDA) monodehidroascorbato
  - (MDAR) reductasa demonodehidroascorbato
  - (APX) peroxidasa de ascorbato
- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato:
- (NADP+ en su forma oxidada)
  - (NADPH+ en su forma reducida)

En la vid, la función del ciclo ascorbato-glutatión y su contribución al proceso de desintoxicación dependerá de varios factores, a saber, el tipo, intensidad y duración de la tensión y el genotipo en estudio.

#### 2.5.2.1.3 Carotenoides:

Los carotenoides son isoprenoides C40 y tetraterpenoides que están en plástidos de ambos tejidos de la planta, fotosintéticos y no fotosintéticos.

Protegen el aparato fotosintético contra el daño foto-oxidativa no sólo por enfriamiento rápido de los estados triplete de moléculas de clorofila, sino también por barrido de EROs, la protección de pigmentos y ácidos grasos insaturados del daño oxidativo. En la variedad de vid "Trincadeira" sometido al estrés por calor, los carotenoides juegan un papel importante en la hoja de EROs de barrido, en conjunto con el ascorbato y el glutatión, la primera línea habitual de defensa antioxidante en plantas.



#### 2.5.2.1.4 Prolina

El metabolismo de la prolina, incluyendo la oxidación de prolina, es extremadamente importante en la respuesta al estrés, ya que es uno de los más extendidos osmoprotectores, aumentando en condiciones de déficit de agua.

También en vid, los EROs generados por el estrés en señal de salinidad de la expresión de  $\alpha$ -GDH subunidad, GDH que actúa como una enzima anti-estrés no sólo por la desintoxicación de amoníaco, sino también mediante la producción de glutamato que se canaliza a la síntesis de prolina.

2.5.2.1.5  $\alpha$ -Tocoferol: tiene propiedades antioxidantes como resultado de su capacidad de amortiguación, tanto de oxígeno singlete y peróxidos.

#### 2.5.2.2 Las enzimas antioxidantes clave para Homeostasis

Homeostasis Redox comprende la interacción de EROs con moléculas antioxidantes formando una interfaz para señales metabólicas y ambientales, modulando así la inducción de procesos de aclimatación apropiados o programas de muerte celular.

Vías de señalización de EROs dependen de una estricta regulación homeostática logrado a través de un tampón redox antioxidante. Los antioxidantes determinan el curso de la vida y de la especificidad de las señales o transformación de productos de EROs.

En este proceso, las enzimas tales como SOD, CAT, Prx, APX, y GOR son los actores clave en la homeostasis antioxidante.

#### 2.5.2.2.1 Las enzimas de los Ciclos Agua-Agua

En condiciones normales, los electrones obtenidos a partir de la separación de las moléculas de agua en fotosistema II (PS II) se canalizan a través del aparato fotosintético y transferidos al oxígeno molecular por el fotosistema I (PS I). En condiciones de estrés que disminuyen  $\text{CO}_2$  disponibilidad debido al cierre de los estomas o aumentan la exposición a la luz excesiva continua allí es un exceso de transferencia de electrones hacia el oxígeno molecular, la generación de  $\text{O}_2^-$  iones en PS I, a través de la reacción de Mehler. En esta situación, la homeostasis redox se puede garantizar en dos pasos consecutivos, la membrana adjunta de cobre / zinc superóxido dismutasa (CZSOD) que convierte  $\text{O}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  que se dirige al ciclo ascorbato-glutatiión, donde se convierte a agua.

2.5.2.2.1.1 Catalasa: enzima que cataliza la dismutación de  $H_2O_2$  en agua y oxígeno. La catalasa es sensible a la luz, y su actividad puede verse reducida por salinidad, choque térmico o frío.

Los peroxisomas son orgánulos subcelulares con una sola membrana que existe en casi todas las células eucariotas, que contiene como componentes CAT enzimática básica y  $H_2O_2$  - producen flavina oxidasas.

A pesar de su simplicidad, que realizan funciones esenciales; a saber, en el metabolismo antioxidante. Tienen un tipo esencialmente oxidativa del metabolismo, y gran plasticidad metabólica, ya que su contenido enzimático varía con el organismo, célula / tipo tisular y las condiciones ambientales. Al estrés fotooxidativo el CAT peroxisomal es el más sensible de catalasas en la vid.

#### 2.5.2.2.1.2 Peroxidasas

Las peroxidasas son una gran familia de enzimas ubicuas que tienen numerosos roles en el metabolismo vegetal, incluyendo la de retirar el  $H_2O_2$  formado como consecuencia del estrés. En el genoma de la vid se encontraron 109 peroxidasas. Ellos usan diferentes donantes de electrones, tales como AsA, en el caso de APX en el ciclo ascorbato-glutatión; glutatión peroxidasa (GPX) utiliza GSH como reductor y los compuestos genéricamente denominados "peroxidasas" de uso fenólicos (capaces de utilizar guayacol como sustrato a veces se les llama "guayacol-peroxidasas").

#### 2.5.2.2.1.3 Glutatión S-transferasas

Glutatión S-transferasas (GSTs) son enzimas que desintoxican compuestos citotóxicos por conjugación de GSH a varios, sustratos electrófilos hidrófobos. GSTs de plantas han sido estudiadas intensivamente debido a su capacidad para desintoxicar herbicidas, y varios GSTs que confieren tolerancia a los herbicidas se han caracterizado en muchas especies de cultivos importantes. Otra subclase GST planta está implicada en las respuestas de estrés, incluidos los derivados de ataque de patógenos, estrés oxidativo, y la toxicidad de metales pesados.

En vid, la inducción de la GST en ataque de patógenos se produce en paralelo con la de fenilalanina amonio-liasa (PAL) y sintasa estilbeno (STS). GSTs también juegan un papel en la respuesta celular a las auxinas y durante el metabolismo normal de productos vegetales secundarios como antocianinas y ácido cinámico.

#### 2.5.2.2.1.4 Peroxirredoxinas

Prxs catalizan la reducción de  $H_2O_2$ , alquilhidroperóxidos y peroxinitrito al agua, alcoholes, o nitrito, respectivamente. Prxs son proteínas redox sensibles que pueden sufrir oxidación-reducción reversible y, como resultado, el interruptor de "on" y "off" en función del estado redox de la célula.

En *V. vinífera*, en condiciones de luz y el estrés por calor, la actividad Prx disminuyó como consecuencia de la disminución de  $H_2O_2$  niveles mientras que, bajo estrés hídrico, la actividad Prx aumentó, lo que refleja el aumento de  $H_2O_2$ .

#### 2.5.2.2.1.5 Superóxido dismutasa:

Es una enzima que cataliza la dismutación de superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno. Hay distintos tipos de SOD clasificados en base al cofactor metálico: los isómeros Cu/Zn-SOD, Mn-SOD y Fe-SOD.

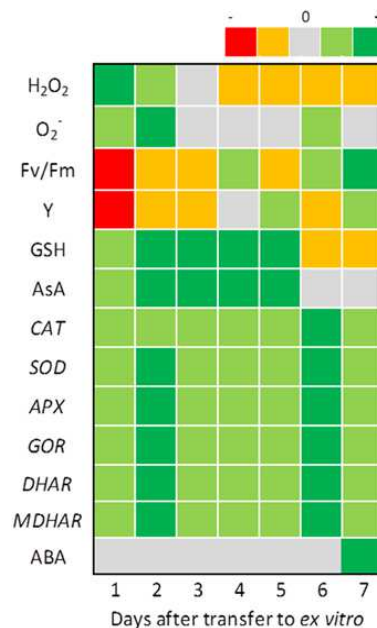
### 2.5.2.3 El estrés oxidativo en sistemas in vitro

Sistemas in vitro ofrecen un método práctico y fácil de manipular para el estudio del estrés oxidativo. Cultivos In vitro suelen ser cultivadas en ambientes contenidos con baja densidad de flujo de fotones y alta humedad relativa. Los medios de cultivo contienen altas cantidades de unos orgánicos reguladores de fuente de carbono y de crecimiento, que contribuyen al desarrollo de características tales como la anatomía anormal en hoja, escaso desarrollo de grana y las bajas tasas de fotosíntesis.

El estrés oxidativo debido a la fotoinhibición es propenso a ocurrir en el trasplante de in vivo condiciones. El grado en el que la fotoinhibición afecta a la supervivencia de la planta depende de su estado fisiológico dictado por las condiciones ambientales imperantes, la eficiencia de los mecanismos de protección contra el exceso de los procesos de reparación de energía y para restaurar la fotosíntesis normal. Estrés abiótico-Nitro oxidativo también puede causar daños a cultivos in vitro y, en vid, se muestra procianidinas tener una acción protectora contra el daño causado por peroxinitrito peroxisoma así formado.

Inmediatamente después del trasplante a ex vitro, plantas de vid in vitro propagado mostró capacidad fotosintética severamente afectada, que se recuperó después de 1 semana como se ve claramente en el mapa de calor de la Figura 3:

*Figura 3. Cambios de vigilancia en la homeostasis antioxidante de vitro en plantas de vid propagadas durante los primeros 7 días de crecimiento en la ex vitro condiciones*



El mapa de calor representa las diferencias entre los valores medidos en el momento del traslado al ex vitro (control) y los monitoreado durante 7 días de crecimiento de ex vitro: aumento muy significativo de color verde oscuro del control; verde claro, aumento significativo del control; gris, no hay diferencias significativas en el control; naranja, disminución significativa del control; rojo, disminución muy significativa desde el control.

Concentración de EROs es máxima en los primeros 2 días después de la transferencia mientras que los indicadores de fluorescencia de clorofila muestran síntomas de la fotoinhibición y la maquinaria de barrido EROs se activa. Síntomas de Fotoinhibición son menos graves cuando las primeras etapas del crecimiento in vivo se realizan en concentraciones de CO<sub>2</sub>, duplicando los valores atmosféricos normales e intensidades de luz de seis veces mayores que in vitro.

En las primeras etapas del crecimiento ex vitro se observa una estabilización de Rubisco, lo que permite la fotosíntesis para recuperar los niveles normales. En paralelo, la activación del ciclo ascorbato-glutatión después de 24 h de ex vitro de crecimiento ayuda a mantener la homeostasis celular redox y regula la respuesta antioxidante.

Durante este corto periodo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está acumulando y se utiliza como un segundo mensajero para activar las vías que son esenciales para la supervivencia de las plantas en esta fase delicada del desarrollo, según lo confirmado por la activación de los genes relacionados en hacer hincapié en las vías de defensa, las hormonas y el metabolismo de proteínas en el mismo período de tiempo.

Después de superar la tensión inicial de la transferencia, las plantas se someten a un nuevo ciclo de regulación de la maquinaria antioxidante, que alcanza un máximo en el día 6, y no se acompaña de síntomas de estrés foto-oxidativo o aumento de ciclos GSH / AsA. Esto coincide con la proyección de nuevas raíces y la expansión de la primera ex vitro hoja y culmina con un pico de ABA y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el séptimo día después de la transferencia, ambos producidos en las raíces recién expandidas y funcionales (Figura 3). En este punto, la aclimatación al ex vitro aún no ha concluido, pero el estrés oxidativo foto ya no es un problema para las plantas de vid que crecen.

#### 2.5.2.4 Estallido Oxidativo

Las especies de plantas como la pera, tomate, fresa y piña muestran una respuesta de estrés oxidativo específico durante el desarrollo del fruto, denominado estallido oxidativo. Los respectivos frutos se denominan a sí mismos "climaterio." Mientras que la vid no es uno de ellos, se trató de algo como una sorpresa cuando Pilati reportó una explosión oxidativa en el cv. "Pinot Noir" que se inició en el envero y se caracteriza por la rápida acumulación de  $H_2O_2$  y por la modulación de muchas enzimas que limpian EROs. Este trabajo comprendió un análisis a fondo de la transcriptómica baya de la uva en las etapas cerca de envero y la cuantificación de  $H_2O_2$ . Este último aumentó en el momento del envero, alcanzando sus máximos 1-2 semanas después, y luego disminuyendo a un ritmo más lento hacia la maduración. A la par, las transcripciones de codificación APX, GPX, Prxs, TRX, glutaredoxinas, GST y metalotioneínas fueron reguladas en alza, de conformidad con el inicio de una respuesta antioxidante bien dirigida.

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que algunas variedades mantienen la homeostasis redox y sin un aparente aumento en su concentración antioxidante, simplemente ajustando las actividades de las enzimas antioxidantes y / o la acumulación de moléculas antioxidantes, mientras que otros necesitan para sintetizar esas moléculas antioxidantes de nuevo. El ex in vitro demuestra una extracción de EROs oportuno y eficiente y una amplia plasticidad para adaptarse a los cambios ambientales.

Procesos específicos de desarrollo pueden cambiar la homeostasis redox. Un ejemplo obvio es el estallido oxidativo en las bayas, una característica singular que ocurre en esta especie no climatérico durante el envero, sobre todo durante la noche. En concreto, este evento metabólico se acompaña de transporte de azúcar y la síntesis de resveratrol. Los informes de sistemas de in vitro en vid revelan el estrés y la señalización relacionada con el desarrollo mediada por EROs en el crecimiento de hojas y raíces.

Como un todo, la plasticidad fenotípica de diferentes variedades de vid que se comportan como más tolerante a las agresiones ambientales que causan estrés oxidativo puede mejorar el rendimiento del cultivo y la calidad, y por lo tanto el valor económico de las especies.

### 2.5.3 Estrés Hídrico:

#### 2.5.3.1 Las proteínas en la tolerancia al estrés hídrico en la planta:

A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado diferentes respuestas y adaptaciones que les permiten sobrevivir en condiciones de déficit hídrico. Estas estrategias de adaptación pueden ocurrir a nivel fisiológico, celular y molecular. En este último nivel, al modificarse la expresión génica, se producen diferentes proteínas cuya función puede ser:

- a) otorgar tolerancia ante una limitación hídrica, actuando como moléculas protectoras,
- b) señales regulatorias.

El conocimiento de estas proteínas y sus funciones, puede ser utilizado por la Biología Molecular y la Ingeniería Genética, en la generación de plantas tolerantes a las limitaciones hídricas, siendo un importante aporte a la producción agrícola en regiones con baja disponibilidad de agua.

Cuando el déficit hídrico se desarrolla lentamente, las plantas pueden presentar respuestas de aclimatación que tienen efectos sobre el crecimiento, como la disminución de la expansión foliar y el aumento del crecimiento radicular. Un mecanismo de resistencia, a nivel fisiológico, es el cierre de estomas, estructuras responsables de la mayor proporción de pérdida de agua en las plantas, respuesta mediada por el ácido Absísico (ABA)

La síntesis de ABA ocurre en los cloroplastos, siendo las hojas, tallos, y frutos verdes, importantes sitios de formación. Ciertas condiciones de estrés estimulan la síntesis de ABA en hojas, incluyendo la sequía, carencia de nutrientes minerales y condiciones de inundación. Existen evidencias de que el ABA aumenta la resistencia tales tipos de estrés.

Las plantas también responden al estrés por déficit hídrico a nivel celular y molecular, y una de las principales respuestas a esta limitación es la modificación de la expresión genética.

La expresión de los genes inducidos por estrés puede ser categorizada en tres grupos:

- 1) genes que codifican proteínas con funciones estructurales o enzimáticas conocidas;
- 2) proteínas con funciones aún desconocidas y
- 3) proteínas reguladoras

La respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés generalmente modifica el patrón proteico. Estos cambios están relacionados con modificaciones en la expresión de genes específicos dependiendo de la naturaleza, duración y severidad del estrés. Para adaptarse al ambiente, las plantas activan un gran set de genes, lo cual lleva a la acumulación de proteínas asociadas específicamente al estrés.

Diversas proteínas específicas han sido caracterizadas en plantas bajo condiciones de estrés y pueden ser clasificadas como LEA (Embriogénesis Tardía Abundante) proteínas, dehidrinas (proteínas inducidas por deshidratación), proteínas tolerantes a la desecación, proteínas que responden al ácido Absísico (ABA), proteínas reguladas por el frío, proteasas, enzimas requeridas para la biosíntesis de varios osmoprotectores tales como: azúcares, proteínas, glicinbetaína, enzimas para detoxificación y factores proteicos involucrados en la regulación de la traducción de señales y expresión génica, tales como quinasas y factores de transcripción. La sequía induce genes cuya función no sólo es proteger a las células vegetales de la deshidratación, sino que también actúan en la regulación de otros genes que se traducen en señales de respuesta al estrés hídrico

Ante condiciones de estrés hídrico, ciertas enzimas y proteínas son afectadas y pierden su actividad biológica. Por lo tanto, el mantenimiento de las proteínas en su forma funcional y el prevenir el agregado de proteínas es particularmente importante, para la vida de la célula bajo condiciones de estrés. Esa función es llevada a cabo, entre otras moléculas, por proteínas.

La tolerancia a la sequía puede ser considerada como la tolerancia a una deshidratación moderada, y la tolerancia a la desecación generalmente se refiere a la tolerancia a una mayor deshidratación. Asimismo, la tolerancia a la desecación incluye la posibilidad de las células de rehidratarse exitosamente. Los mecanismos que confieren tolerancia a la sequía están principalmente basados en la estabilización estructural por hidratación preferencial, mientras que los mecanismos que otorgan tolerancia a la desecación están basados en el reemplazo del agua por moléculas que forman puentes hidrógenos.

La disminución del volumen celular, aumenta la posibilidad de las interacciones moleculares que pueden causar la desnaturalización de las proteínas y membranas.

Dentro de los compuestos químicos que pueden prevenir estas interacciones adversas, podemos citar: prolina, glutamato, glicinbetaína, carnitina, manitol, sorbitol, fructanos, polialcoholes, trehalosa, sacarosa y oligosacáridos. Los mismos son químicamente diferentes



y generalmente son excluidos de la superficie de la proteína, posibilitando que la proteína permanezca hidratada. Ante condiciones de menor disponibilidad de agua, existen las proteínas LEA y Heat shock protein/ La proteína de choque térmico (HSP) que actúan “reemplazando el agua”, dado que forman puentes hidrógenos con las proteínas.

Un mecanismo adaptativo para la protección contra la sequía, es el mantenimiento de la turgencia celular, durante los períodos de sequía, regulando la presión osmótica de las células. Para ello, la célula puede:

- a) secuestrar iones en los compartimentos celulares y
- b) sintetizar osmolitos especializados tales como la prolina, glicinbetaína, manitol, trehalosa, ononitol y ectoína para reajustar el potencial osmótico celular

Los osmolitos son principalmente compuestos orgánicos de bajo peso molecular que permiten el ajuste osmótico y facilitan la absorción de agua por la planta.

Otra función de los osmolitos es participar en el mantenimiento de la estructura de las proteínas bajo condiciones de estrés.

#### 2.5.3.1.1 Proteínas que protegen a proteínas

##### 2.5.3.1.1.1 Hidrofilinas

Las proteínas LEA integran un amplio grupo de proteínas denominado hidrofilinas

Estas son proteínas no estructuradas o flexibles que participan en la respuesta a condiciones adversas. Si bien el rol funcional aún es especulativo, existen evidencias de que estas proteínas participan en la aclimatación y/o en la respuesta adaptativa al estrés hídrico y bajas temperaturas.

##### 2.5.3.1.2 Proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (Late Embriogénesis Abundant) (LEA) proteínas

Entre las proteínas más importantes por su efecto protector potencial están las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) y las que funcionan como antioxidantes.

Las proteínas LEA protegen a las proteínas y membranas del daño debido a la deshidratación. La progresiva sequía y salinidad induce la síntesis de estas proteínas en los órganos vegetativos, las cuales estabilizan las enzimas y la estructura de las membranas. Las

proteínas LEA participan en la reducción del daño celular durante la deshidratación, aunque el mecanismo preciso involucrado aún debe ser explorado.

#### 2.5.3.1.2.1 Dehidrinas

Las dehidrinas son proteínas inducidas por estrés hídrico, que presentan una secuencia consenso de 15 aminoácidos (EKKGIMDKI-KEKLPG), que está relacionada con las interacciones hidrofóbicas que estabilizan la macromolécula, y posibilitan la interacción sinérgica con los solutos compatibles.

#### 2.5.3.1.2.2 Heat-shock proteins (HSPs)

Las Heat-shock proteins (HSPs) comprenden un grupo reducido de moléculas de alto peso molecular y un grupo complejo de proteínas de bajo peso cuyo tamaño varía entre 15 y 30 KDa. Estas proteínas son parte de un grupo de proteínas inducidas para proteger las plantas del daño causado por estrés o para ayudar a reparar el daño causado por el estrés

#### 2.5.3.1.2.3 Acuaporinas

Las acuaporinas constituyen una familia de proteínas que regulan el movimiento del agua a través de las membranas celulares. Las acuaporinas se pueden dividir en dos subgrupos principales, por un lado las proteínas intrínsecas ubicadas en la membrana plasmática y por otro las ubicadas en el tonoplasto. Las primeras participan del transporte de agua a través de la membrana celular, en tanto que las segundas participan en el intercambio de agua entre el citoplasma y la vacuola y en la osmoregulación.

#### 2.5.3.1.2.4 Enzimas eliminadoras de EROs

Los procesos metabólicos aeróbicos tales como la respiración y la fotosíntesis inevitablemente llevan a la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas. En condiciones fisiológicas, el equilibrio entre la producción y la remoción de EROs puede ser perturbado por factores de estrés abióticos tales como alta luminosidad, sequía, bajas y altas temperaturas y estrés mecánico, dando como resultado el aumento en el nivel intracelular de EROs

Así el estrés oxidativo (EO), se refiere a una situación de desequilibrio, que puede ser el resultado de la disminución de los antioxidantes o del aumento en la producción de EROs. Cuando ocurre el EO la actividad celular conduce a la activación o silenciamiento de genes que codifican mecanismos de defensa, factores de transcripción y proteínas estructurales.

Las plantas han desarrollado varias estrategias antioxidantes para eliminar estos compuestos tóxicos.

Uno de los mecanismos de desintoxicación de EROs de forma enzimática es por la glutatión reductasa (GR) y otros como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), peroxidasa (POD) y monodehidroascorbato reductasa (MDAR).

Esta enzima se encuentra predominantemente en cloroplastos, aunque también se encuentra en mitocondria y citoplasma.

#### 2.5.3.1.2.4.1 Glutatión S- transferasas (GST)

Son un gran grupo de enzimas que catalizan la conjugación de un sustrato xenobiótico electrofílico con un tripéptido glutatión (GSH; glu-cys-gly). Son proteínas citoplasmáticas, aunque también se han encontrado en plástidos y núcleo. GSTs son muy abundantes y en algunos casos representan más del 1% de las proteínas solubles en células vegetales

#### 2.5.3.1.2.4.2 Glutatión peroxidasa (GPX)-nombrada anteriormente-

GPXs es una gran familia de diversas isoenzimas que usan GSH para reducir  $H_2O_2$  e hidroperóxidos orgánicos y lipídicos, protegiendo a la planta del estrés oxidativo. Se encuentran en citoplasma, cloroplasto, mitocondrias y retículo endoplásmico.

### 2.5.3.1.3 Péptido antioxidante

#### 2.5.3.1.3.1 Glutación

El glutación junto con el ácido ascórbico, la prolina, tocoferoles, carotenoides y flavonoides, constituyen los antioxidantes no enzimáticos. El glutación, es uno de los metabolitos cruciales en plantas, el cual es considerado como una importante defensa intracelular contra las EROs.

El glutación existe abundantemente en su forma reducida (GSH) en los tejidos vegetales y está localizado en citoplasma, retículo endoplásmico, vacuolas, mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas. Es de especial importancia en procesos fisiológicos incluyendo la regulación del transporte del sulfato, traducción de señales conjugación de metabolitos, detoxificación de xenobióticos y la expresión de genes en respuesta al estrés.

Ha sido establecido que GSH también juega un rol importante en eventos relacionados con el crecimiento, tales como: la diferenciación celular, muerte celular, senescencia, resistencia a patógenos y regulación enzimática

El glutación es la principal fuente de tioles no proteicos en la mayoría de las células. La naturaleza nucleofílica del grupo tiol es también importante en la formación de enlaces mercáptidos con metales. Esta reactividad junto con la estabilidad y la alta solubilidad en agua del GSH hace de él un buen protector vegetal bioquímico contra el estrés

El estado de conocimiento actual muestra la importancia de las proteínas en la tolerancia a la baja disponibilidad de agua, ya sea con una función estructural o con fines reguladores.

Sin embargo, dado el avance de la Biología Molecular y la Ingeniería Genética, este saber, podrá ser utilizado en la generación de plantas tolerantes a la baja disponibilidad de agua, lo cual será un importante aporte a la producción agrícola en regiones con limitaciones hídricas.

#### 2.5.4 Estrés por radiación solar.

##### 2.5.4.1 Efectos de la radiación solar UV-B en viñedos cultivados a mayor altura y del ABA sobre la capacidad antioxidante de las bayas

Se ha propuesto que la radiación solar ultravioleta-B (UV-B) activa los sistemas de defensa antioxidantes de las plantas, y que el ácido Absísico (ABA) participa en la disminución de las vías de señalización.

La luz solar es uno de los factores del medio ambiente, que impulsa la productividad primaria a través de la fotosíntesis, pero también suministra señales informativas vitales para el desarrollo de la planta. La radiación Solar ultravioleta-B (UV-B) (280-315 nm), la fracción más energética de la luz solar que llega a la biosfera, aumenta a medida que la altitud aumenta desde UV-B pasa a través de un ambiente más delgado (menos de filtrado por menos gases atmosféricos) para llegar a la tierra. Viñedos de altura en Mendoza, Argentina c.a 1500 m sobre el nivel del mar (msnm) reciben niveles de UV-B relativamente elevadas, con irradiaciones hasta 0,40 W m<sup>-2</sup> al mediodía en verano. UV-B causa efectos fotobiológicos directos e indirectos en las plantas superiores, algunos relacionados con el daño provocado y otros como la aclimatación inducida.

Muchos procesos fisiológicos y bioquímicos de aclimatación, algunos de los cuales son comunes para diferentes condiciones de estrés, están regulados por la fitohormona ácido Absísico (ABA), por lo tanto, es factible suponer que ABA puede regular respuestas de las plantas a los rayos UV-B. Pocos estudios trataron de abordar las relaciones entre la radiación UV-B y ABA en las plantas, sino un efecto promotora de UV-B en la biosíntesis de ABA se ha encontrado en tejidos de hojas de la vid .

Sin embargo, la radiación UV-B no era responsable de los niveles de ABA en pieles de uva de bayas, donde ABA fluctuó durante la morfogénesis de fruta, el aumento en el inicio de la maduración (envero) y disminuyendo posteriormente a la cosecha. Este último, además del hecho de que aplicaciones de ABA se apresuraron una maduración en baya de la uva , sugieren que el ABA juega un papel fundamental en la regulación de la maduración de la fruta. Se presenta los resultados de ensayos realizados durante tres temporadas de cultivo consecutivas, en cinco etapas de desarrollo, en un viñedo de *Vitis vinifera* L. Malbec de mayor altitud, donde se evaluaron los efectos de la radiación solar UV-B y de aplicaciones de ABA, sobre la calidad y el rendimiento.

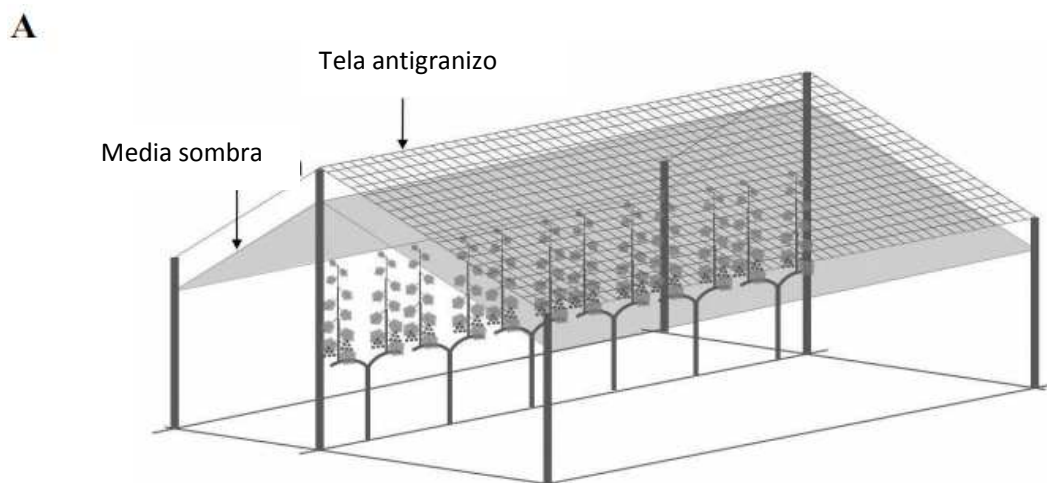
### 2.5.4.1.1 Materiales y Métodos

#### 2.5.4.1.1.1 Material vegetal y diseño experimental

Las tres temporadas de crecimiento fueron: 2009, 2010 y 2011, en una viña comercial de gran altitud (Viñedo Adrianna, Catena Zapata, 1450 m snm, 69°15'37 " W y 33°23'51 " S), Gualtallary, Mendoza, Argentina. Las vides eran un clon seleccionado de *Vitis vinifera* L. cv. Malbec, plantada en 1997 en sus propias raíces, formado en un sistema vertical enrejado, dispuestos en filas de norte-sur orientadas con espaciados de 2 m de distancia, con 1,20 m entre plantas sobre la fila y se mantuvieron sin restricción de agua en el suelo durante todo el experimento utilizando un sistema de riego por goteo. Las vides se podan y atan apretando a los 12 brotes por vid cuando estos brotes alcanzan 10 cm de largo, y se quedaron en la floración dos racimos por brote.

Un diseño de bloques completos al azar con un arreglo factorial 2 x 2 de tratamientos (UV-B y ABA) y cinco bloques fueron utilizados (n = 5). La unidad experimental consistió en 4 plantas seleccionadas en la base de su homogeneidad a partir de 6 plantas consecutivos en la fila. Dos brotes por unidad experimental fueron seleccionados, marcados y se utiliza para determinar el peso de racimos y el número de bayas por racimo en la cosecha (rendimiento de la fruta), mientras que el resto de los brotes se utilizaron para la baya muestreo en las diferentes etapas de desarrollo. Las medidas repetidas fueron tomadas en cada unidad experimental a los 52, 72 (envero), 96, 112 y 131 (cosecha) días después de la floración (DAF) durante cada temporada de crecimiento.

(**Figura 1 A** muestra una representación esquemática de una unidad experimental)



Las plantas recibieron UV-B solar elevada (+UV-B), o bien se les filtró este tipo de radiación (-UV-B) desde 15 días antes de la floración, y estos tratamientos se combinaron con aspersiones semanales de 1 mM de ABA (+ABA) o H<sub>2</sub>O (-ABA) desde 27 días antes del envero.

Los fenoles en los hollejos (antocianos y polifenoles totales) incrementaron por +UV-B y +ABA, marcadamente en valores de concentración (interacción significativa UV-B x ABA).

Los incrementos en capacidad antioxidante, determinada como capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC, por sus siglas en inglés) y en los fenoles de las bayas expuestas al tratamiento combinado +UV-B/+ABA fueron mayores que en el tratamiento -UV-B/-ABA, para el mismo incremento de azúcar.

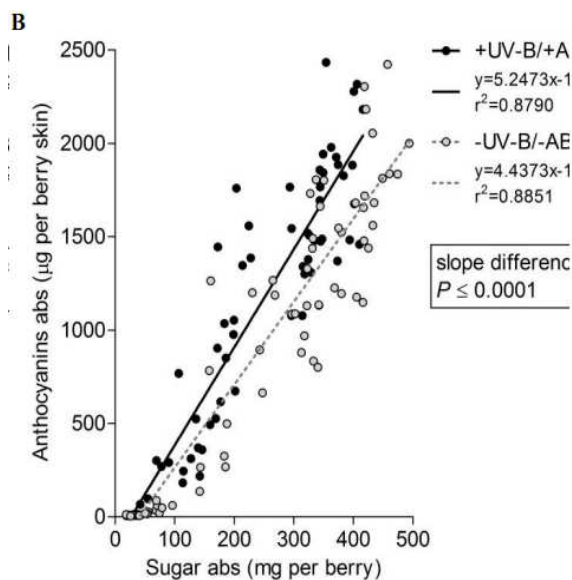
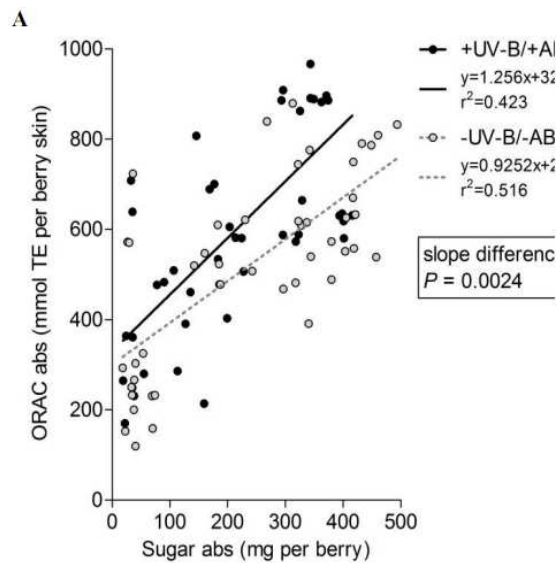
La capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC) se determinó con Soluciones de extracción de la piel de la baya se diluyeron 1: 750 v / v en 75 mM tampón de fosfato de potasio (pH 7,0). Alícuotas (50 l) de las muestras diluidas y normas Trolox se añadieron a una placa de color negro de 96 pocillos. Entonces, se añadieron 100 l de fluoresceína (20 nM solución), y la mezcla se incubó a 37° C durante 7 min antes de la adición de 50 l de la peroxilo generador de radicales AAPH [2,2'-azobis (2-amidinopropano) , solución 140 mM]. La fluorescencia se vigila por medio de excitación 485 nm y 538 emisiones nm a intervalos de 1 min para 90 minutos en un fluorómetro de microplacas . El área bajo la curva de el decaimiento de fluorescencia durante 90 min y se calculó la ORAC se expresó como mmol de Equivalentes Trolox (TE) por la piel de la baya y por cada 100 g FW bayas.

Asimismo, +UV-B y +ABA interactuaron reduciendo el número de bayas y el peso de los racimos (menor rendimiento), quizás debido a emisiones de etileno más elevadas, sin afectar las concentraciones de azúcar a cosecha (bayas mas chicas).

Se encontró que los compuestos antioxidantes (protectores para las plantas), incrementan en +UV-B/+ABA a expensas de la acumulación de azúcar y de la retención y el crecimiento de las bayas.

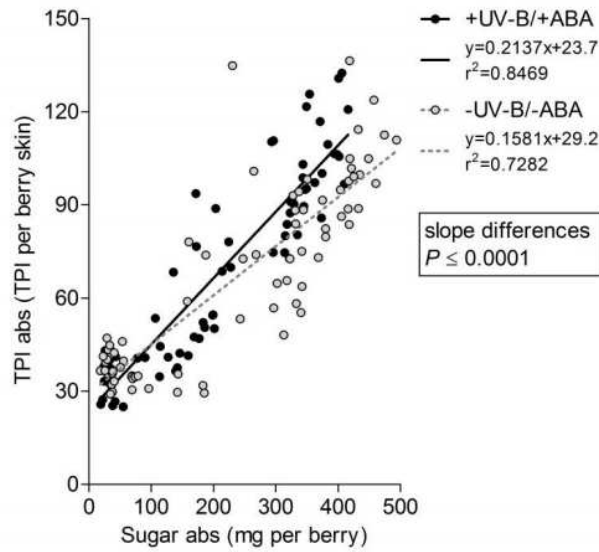
2.5.4.1.2 Resultados representados como regresiones lineales para ORAC, polifenoles y azúcares

La **Figura 5** presenta modelos de regresión lineal para el azúcar de la baya vs. ORAC (A), frente a las antocianinas (B) y frente a TPI (C), en + UV-B / + ABA y -UV-B / tratamientos - ABA, considerando todas las etapas en el desarrollo de bayas y estaciones de crecimiento. Más pistas prominentes fueron obtenidos para + UV B / + ABA que para -UV-B tratamiento / -ABA (aumento de 35,8%, 18,3% y 35,2% para el azúcar vs. ORAC, frente a las antocianinas y vs. TPI, respectivamente).





C



Un efecto positivo de la percepción de los viñedos de altitud altos niveles de UV-B y los sprays semanales de ABA (comenzando aproximadamente un mes antes del envero), se obtuvo en baya con pieles de capacidad de acumulación de antioxidantes, antocianinas y polifenoles totales.

Esto significa que a mayor estrés por radiación UV-B Y ABA aumenta la defensa natural de la planta desde compuestos fenolicos y otros metabolitos secundarios donde se puede incluir al glutatión como protección contra las ORA; terpenos, antocianidinas dihidroxilados como cianidina y flavonoles como quercetina y kaempferol, flavonoles, flavanoles, dihidroflavonoles y ácidos hidroxicinamicos, entre otros para proporcionar protección a las plantas.

### 2.5.5 Estrés biótico por patógenos en vid:

Otro de los factores de estrés en la vid , son aquellos que pueden ser producto del ataque de un patógeno, pudiendo ser hongos, virus, plaga o malezas. La información en relación a la respuesta de defensa con el uso de glutatión en planta es la siguiente:

La respuesta antioxidante en Vides infectadas por el virus de la vid fan leaf fue analizado a fondo. En las primeras etapas de la infección, los aumentos en  $H_2O_2$  se observaron y probablemente debido a una mayor dismutación de  $O_2$  por SOD, mientras que, hacia la fase tardía de la infección, los aumentos en ASA, glutatión( GSH), y la actividad APX pueden ser las razones para  $H_2O_2$  para recuperar los niveles de control.

En cuanto a la enzima glutatión peroxidasa (GPX) se ha implicado en las respuestas de estrés contra *Elsinoe ampelina* y *vitis Rhizobium* y GPX es hasta regulada en respuesta a estreses abióticos tales como la sequía y la salinidad.

Breve explicación de los patógenos protagonistas:

#### 2.5.5.1 Virus fan leaf Grapevine:

Causando la clorosis de las hojas y la reducción de la calidad de la fruta. Debido a su efecto sobre el rendimiento de uva, GFLV es un patógeno de importancia comercial. Se transmite a través de un vector nematodo, *Xiphinema index*.



#### 2.5.5.2 Antracnosis -Elsinoe ampelina:

Ampelina *Elsinoë* es un patógeno de la planta, que es el agente causal de la antracnosis en la uva . Este tipo de antracnosis afecta a diversas variedades de plantas, incluyendo algunas zarzas y las uvas de vino. Antracnosis uva puede ser identificado por las lesiones "ojo de pájaro" en las bayas y hundida lesiones negras o grises en las hojas y brotes.

A partir de estas lesiones, se producen conidios. Esta enfermedad puede ser letal para la planta, ya sea a través de la defoliación y la eliminación de la capacidad fotosintética, o por lesión a las regiones activas de la vid. Antracnosis uva es particularmente importante para la industria del vino, ya que puede disminuir la calidad y cantidad de bayas producidas, así como matar a la vid de plano, lo que lleva a grandes pérdidas económicas, en particular durante los meses de verano medio.



#### 2.5.5.3 Agalla de corona-vitis Rhizobium:

*Rhizobium* es un genero de bacterias Gram-negativas suelo bacterias que fijan el nitrógeno . *Rhizobium* forma un endo-simbiótica nitrógeno fijación asociación con las raíces de las leguminosas y *Parasponia* .

*Agrobacterium Tumefaciens* sinónimo de *Rhizobium radiobacter*

Las bacterias colonizan las células vegetales dentro de nódulos de las raíces; aquí las bacterias convierten el nitrógeno atmosférico a amoníaco y, a continuación proporcionan compuestos nitrogenados orgánicos tales como glutamina o ureidos a la planta. La planta proporciona las bacterias con compuestos orgánicos hechas por la fotosíntesis .

El síntoma principal es la producción de agallas carnosas como el resultado de la infección de las heridas por el patógeno. Estos son primero aparente como crecimientos carnosos blancos desarrollar adyacente a las lesiones. Galls se componen principalmente de tejido del floema desorganizado pero pueden incluir parénquima. Ellos se vuelven marrones y se secan y corky. Estos se encuentran más comúnmente en la parte inferior del tronco e inmediatamente por debajo de la superficie del suelo. Estas agallas tienen la capacidad de rodear tallos que conduce a retraso en el crecimiento y la reducción de los rendimientos. Agallas localizadas pequeñas que se extienden hasta el tronco también son comunes. Las agallas en las raíces laterales son poco comunes. *R. vitis* difiere de otras especies patógenas *Rhizobium* (*Agrobacterium*) en la causa única lesiones hundidas oscuras en las raíces de la uva, lo que lleva a la decadencia.



## 2.6 Efecto varietal sobre el contenido de glutatión en mostos y vinos blancos

El glutatión es un compuesto que desempeña un papel fundamental en la prevención de los procesos oxidativos de los mostos y vinos debido a su elevada actividad antioxidante

Los niveles de glutatión presentes en las bayas están influenciados por numerosos factores (variedad, localización, condiciones ambientales, añada, prácticas culturales...).

Se origina durante la maduración de la uva, incrementándose significativamente después del envero. Su acumulación en la baya es paralela a la de sólidos solubles hasta que se alcanzan los 16° Brix, y a partir de este momento se mantiene estable. Asimismo, el glutatión presente en la uva está estrechamente relacionado con el nivel de nutrición nitrogenada de la viña, habiéndose observado valores más bajos en el caso de viñedos con deficiencia en nitrógeno.

En el mosto, se combina con el ácido caftárico dando lugar a un compuesto incoloro denominado GRP, y por ello impide las posteriores reacciones de pardeamiento de éste ácido.

Durante el proceso de vinificación, su contenido es muy variable y puede estar influenciados por numerosos factores, como son la exposición al oxígeno, la actividad tirosinasa, el tiempo de maceración prefermentativa (más o menos tiempo de contacto), el prensado (diferentes presiones), etc.

Los resultados existentes acerca de su evolución durante la fermentación alcohólica son contradictorios. Algunos autores observaron un incremento, mientras que en otros casos este compuesto disminuye. El glutatión está implicado en algunos mecanismos de respuesta al estrés en *Saccharomyces cerevisiae*, pudiendo ser asimilado o excretado durante la fermentación alcohólica. El contenido de glutatión después de la fermentación puede depender de la cepa de levadura utilizada, aunque las diferencias observadas en algunos trabajos fueron insignificantes. Durante el proceso de conservación del vino, la concentración de glutatión generalmente disminuye, pudiendo verse afectada de forma notable por la exposición al oxígeno durante el embotellado.

En los mostos, el glutatión juega un papel crucial limitando los procesos oxidativos de tipo enzimático. Después del prensado, las polifenoloxidasas inician las reacciones de oxidación de los ácidos hidroxicinámicos y dan lugar a la formación de las correspondientes o-quinonas.

El glutatión reacciona con el ácido caftarico generando un compuesto incoloro denominado GRP (ácido 2-S-glutationil caftarico), que impide las posteriores reacciones de pardeamiento enzimático de dicho ácido, las cuales pueden conducir al deterioro de la calidad final del mosto y del vino. La ratio ácidos Hidroxicinámicos / glutatión puede considerarse un buen indicador de la susceptibilidad de los mostos a la oxidación el glutatión ejerce un efecto protector sobre el aroma del vino, preservando de la oxidación a algunos compuestos volátiles con gran impacto sensorial.

La adición de levaduras inactivas ricas en glutatión desde 10 a 40 g/Hl en diferentes formas de agregado (antes de la fermentación, realizado un tercio de la fermentación, o en los vinos durante el embotellado), puede prevenir el incremento del color amarillo y evitar la desaparición de aromas varietales (4-mercapto-4-metil-2-pentanona, 3-mecaptohexan-1-ol, linalol) y esterés procedentes de la fermentación (acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo). Este compuesto manifiesta también efectos beneficiosos sobre la salud humana, debido a su actividad antioxidante, inmunitaria y desintoxicante, por lo que es considerado una potente, versátil e importante molécula autogeneradora de defensas.

En los últimos años el glutatión ha sido objeto de numerosos estudios, aunque hasta el momento se desconocen muchos aspectos de su comportamiento y evolución en los mostos y vinos.

Se realizó un trabajo con el objetivo de la determinación del contenido en glutatión en mostos y vinos de diferentes variedades blancas cultivadas en la D.O.Ca. Rioja (España).

El estudio se ha llevado a cabo, durante las vendimias 2012 y 2013, en un viñedo experimental localizado en Logroño (La Rioja; España), que se implantó en 2002, conducido en espaldera, doble cordón Royat, con un diseño estadístico de tres repeticiones con 100 cepas por variedad. Las variedades estudiadas, todas ellas autorizadas en la Denominación de Origen Calificada (D.O.Ca.) Rioja, fueron las siguientes:

- Tempranillo blanco. Derivada de Tempranillo tinto como consecuencia de una mutación natural, que se detectó en un viñedo de La Rioja (España) en 1988.
- Maturana blanca. Cultivada en la zona en otros momentos y recientemente recuperada a partir del material vegetal existente en la colección ampelográfica del CIDA de La Rioja (España).

- Turrundes .Presente en la zona antiguamente y recuperada en la actualidad en viñedos viejos. Sinonimia confirmada, mediante microsatelites, de la variedad Albillo mayor.
- Garnacha blanca. Con difusión en diferentes regiones del noreste de España, pero con escasa presencia en el viñedo riojano, si bien de gran interés por su calidad en los últimos años.
- Malvasia riojana. Con referencias de su cultivo en la zona desde antiguo, pero escasa superficie en la actualidad. Sinonimia confirmada, mediante microsatelites, de la variedad Alarije, muy extendida por el centro de España.
- Viura. Variedad blanca más abundante en la zona, muy extendida por todo el Valle del Ebro. Sinonimia de Macabeo

La parcela experimental se localiza en la Finca La Grajera (Logroño), está conducida en espaldera, doble cordón Royat, y su diseño estadístico es de tres repeticiones con 100 cepas por variedad.

La vendimia se realizo de forma manual en el momento que se entendi6 adecuado de madurez, excepto en la Variedad Malvasia, que se recolecto antes de alcanzar un grado alcoh6lico adecuado debido a su elevada sensibilidad a Botrytis cinerea .

Variedad	Mostos 2012	Mostos 2013
<b>Tempranillo blanco</b>	12.3 ± 0.19	13.6 ± 0.64
<b>Maturana blanca</b>	12.6 ± 0.43	12.7 ± 0.05
<b>Turruntés</b>	12.1 ± 0.05	11.5 ± 0.00
<b>Garnacha blanca</b>	13.0 ± 0.20	12.2 ± 0.00
<b>Malvasía riojana</b>	11.2 ± 1.11	10.4 ± 0.57
<b>Viura</b>	12.2 ± 0.24	12.6 ± 0.43

Tabla1. Grado alcoh6lico probable (%v/v) en mostos de variedades blancas. Años 2012 y 2013. Media ± desviaci6n estandar (n = 2).

La vinificaci6n se llevo a cabo en la bodega Experimental del Servicio de Investigaci6n y Desarrollo Tecnol6gico Agroalimentario de La Rioja. El mosto obtenido mediante estrujado sin despallado y prensado suave, se desfango de forma estatica a baja temperatura (10 °C)

con adición de enzimas pectolíticas y sulfitado (60mg/L). La fermentación alcohólica se desarrolló en depósitos de 100L mediante la inoculación de levaduras comerciales (Zymaflore X16, de Laffort), a 20 °C de temperatura. Una vez concluida dicha fermentación, los vinos se sulfitaron con 40 mg/L de SO<sub>2</sub> y se conservaron a 5 °C durante un mes antes del embotellado.

En los mostos y vinos elaborados se analizaron parámetros básicos como: grado alcohólico (%v/v), pH, acidez total (g/l ácido tartárico), D.O.420 nm, D.O. 320nm e IPT 280nm.

La determinación analítica del contenido de glutatión reducido en los mostos desfangados y en los vinos, se realizó con un equipo de HPLC Agilent 1100, mediante derivatización automática en pre columna con OPA. La separación se llevó a cabo en una columna Hypersil ODS (250 × 4.0mm 5µm). Los eluyentes empleados fueron

- A. tampón acetato de sodio 75 mM, 0.018 % trietilamina (pH 6.9)+0.3 % tetrahidrofurano; y
- B. metanol /acetonitrilo /agua (45/45/10). La detección se efectuó por fluorescencia ( $\lambda$  excitación = 340nm  $\lambda$  emisión= 450nm).

Las concentraciones de glutatión obtenidas en los mostos desfangados de las diferentes variedades se muestran:

**Tabla 2.** Contenido en glutatión (ppm) en mostos de variedades blancas. Años 2012 y 2013. Media  $\pm$  desviación estándar (n = 2).

Variedad	Mostos 2012	Mostos 2013	g.s
Tempranillo blanco	5.33 $\pm$ 1.81	10.4 $\pm$ 1.98	n.s
Maturana blanca	2.65 $\pm$ 0.77	4.02 $\pm$ 0.91	n.s.
Turruntés	0.570 $\pm$ 0.28 b	5.11 $\pm$ 1.24 a	*
Garnacha blanca	1.22 $\pm$ 0.20	2.48 $\pm$ 0.49	n.s.
Malvasía riojana	1.23 $\pm$ 1.05	3.93 $\pm$ 2.23	n.s.
Viura	4.62 $\pm$ 5.73	8.67 $\pm$ 4.30	n.s
g.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Como puede observarse, no se encontraron diferencias significativas entre variedades en ninguna de las campañas consideradas. No obstante, los valores medios fueron más elevados en la variedad Tempranillo Blanco, oscilando entre 5.33mg/L en 2012 y 10.4 mg/L en 2013. Los mostos de la variedad Viura presentaron contenidos más próximos a Tempranillo blanco



que el resto, entre 4.62 mg/L y 8.67 mg/L. Los valores de glutatión obtenidos en los mostos se sitúan en el rango de los indicados por diferentes autores, entre cero y 100 mg/L, 1.1 y 71 mg/L y 1.1 y 42.3mg/L.

La influencia de la añada únicamente fue significativa en los mostos de la variedad Turruntés, aunque en todos los casos se obtuvieron concentraciones medias de glutatión más elevadas en 2013 que en 2012. Estas diferencias podrían estar relacionadas con las condiciones climatológicas de cada una de las campañas estudiadas.

La añada 2013 se caracterizo por una mayor cantidad de precipitaciones durante el período previo al envero, que alcanzaron los 85mm durante los meses de junio y julio.

Por el contrario, 2012 fue un año con menor abundancia de lluvias, únicamente se recogieron 30 mm entre los meses de junio y julio. Por ello, en la campaña 2012 el viñedo presentaba un cierto estrés hídrico, hecho que pudo afectar a las síntesis de glutatión.

En los mostos con mayor concentración de glutatión, correspondientes a las variedades Tempranillo blanco y Viura, el color amarillo estimado por la medida de la D.O.420nm, fue más bajo; Por el contrario, los mostos de Garnacha blanca y Malvasia, con bajo contenido de glutatión, presentaron un color mas oxidado.

**Tabla 3.** D.O. 420 nm en mostos de variedades blancas. Años 2012 y 2013. Media  $\pm$  desviación estándar (n = 2).

Variedad	Mostos 2012	Mostos 2013
Tempranillo blanco	0.070 $\pm$ 0.01	0.077 $\pm$ 0.00
Maturana blanca	0.145 $\pm$ 0.01	0.131 $\pm$ 0.00
Turruntés	0.100 $\pm$ 0.03	0.097 $\pm$ 0.01
Garnacha blanca	0.128 $\pm$ 0.02	0.101 $\pm$ 0.01
Malvasía riojana	0.253 $\pm$ 0.18	0.211 $\pm$ 0.15
Viura	0.086 $\pm$ 0.02	0.057 $\pm$ 0.01

En los vinos tampoco se obtuvieron diferencias entre las variedades estudiadas en la campaña 2012, mientras que en 2013 los elaborados a partir de la variedad Viura mostraron un contenido superior a los procedentes de Malvasia, siendo el resto intermedios:

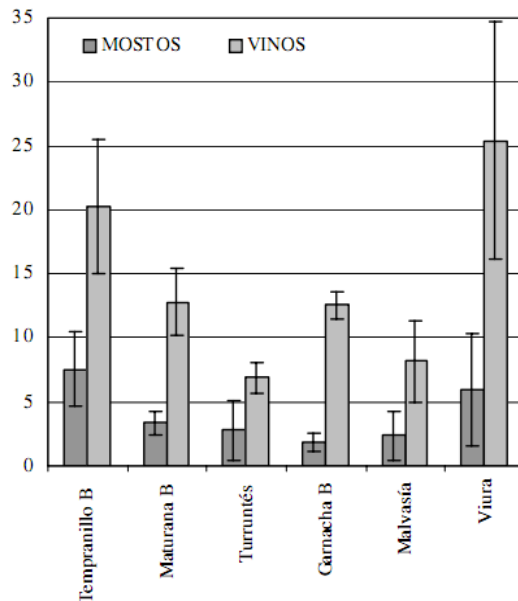
**Tabla 4.** Contenido en glutatión (ppm) en vinos de variedades blancas. Años 2012 y 2013. Media  $\pm$  desviación estándar (n = 2).

Variedad	Vinos 2012	Vinos 2013	g.s.
Tempranillo blanco	26.3 $\pm$ 1.44a	15.9 $\pm$ 0.85 b ab	*
Maturana blanca	11.8 $\pm$ 3.03	15.9 $\pm$ 0.02 ab	n.s.
Turruntés	7.29 $\pm$ 1.06	7.33 $\pm$ 2.21 ab	n.s.
Garnacha blanca	11.7 $\pm$ 1.77	11.5 $\pm$ 0.90 ab	n.s.
Malvasía riojana	6.68 $\pm$ 4.14	4.31 $\pm$ 3.39 b	n.s.
Viura	13.9 $\pm$ 12.4	21.8 $\pm$ 8.97 a a	n.s.
g.s.	n.s.	*	n.s.

Al igual que en los mostos, la variedad Tempranillo blanco presento los valores más elevados en 2012; sin embargo, en 2013 fueron superiores en Viura. En ambas campañas el contenido más bajo correspondió a los vinos de Malvasía riojana. Los contenidos de glutatión en un estudio efectuado sobre 28 vinos de Sauvignon blanc mostraron un rango de concentraciones entre 1.3 y 34.7 mg/L, con un valor medio de 12.5mg/L. En 43 vinos de Sudáfrica procedentes de diferentes variedades de uva (Chardonnay, Sauvignon blanc, Chenin blanc, Semillon y Petillant Blanc) el valor más elevado de glutatión encontrado fue de 27.4 mg/L, observándose un descenso de su contenido durante el envejecimiento.

En todos los vinos se produjo un incremento del contenido de glutatión con respecto a los mostos de partida. Los resultados existentes en la bibliografía sobre la evolución del glutatión durante la fermentación alcohólica son contradictorios, algunos autores observaron un incremento, mientras que en otros casos este compuesto disminuyó. El contenido de glutatión después de la fermentación puede depender de la cepa de levadura empleada. En un trabajo llevado a cabo con diferentes inoculos de levaduras comerciales en un vino sintético suplementado con glutatión, se apreció una disminución de este compuesto durante la fermentación alcohólica, observándose que los vinos fermentados con la cepa X16 mantenían un contenido superior al resto.

Las concentraciones medias de glutatión en los mostos y vinos varietales se muestran en la Figura 1.



**Figura 1.** Contenido en glutatión (ppm) en mostos y vinos de variedades blancas. Media  $\pm$  desviación estándar (n = 2).

El incremento de glutatión observado en los vinos fue muy significativo en todas las variedades excepto en Malvasia y en Viura, en esta última debido a la elevada desviación estándar de los resultados. El intervalo de incremento medio se situó entre el 53% (en Malvasia) y el 84% (en Garnacha blanca).

Entonces se puede decir que los niveles de glutatión obtenidos en mostos y vinos se encuentran dentro del intervalo descrito en otros trabajos sobre este compuesto. En los mostos se ha observado una reducción del color amarillo al aumentar la concentración de glutatión. La variedad Tempranillo blanco ha presentado concentraciones elevadas de este compuesto en mostos y vinos, que sugieren un buen potencial antioxidante. Esta variedad manifiesta características sensoriales de calidad y solamente se cultiva en la D.O.Ca.Rioja (España). La variedad Viura también ha mostrado un alto contenido de glutatión, especialmente en los vinos, que puede ser la causa de su color amarillo pálido. El incremento de glutatión ha sido muy notable en los vinos y podría estar relacionado con la cepa de Levadura inoculada.

### **Capítulo 3: El glutatión en Mostos y Vinos**

3.1 Glutatión: papel en la elaboración y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	86
3.1.1 Actividad antioxidante del glutatión en mosto y de vino: la inhibición del pardeamiento .....	86
3.1.1.1 Oxidación en el vino.....	88
3.1.1.1.1 Reacción de GSH con orto-quinonas. ....	90
3.1.1.1.2 Cuantificación de los ácidos hidroxicinámicos y GRP .....	92
3.1.1.1.3 Otros componentes del mosto que reaccionan con la quinona del ácido cafeoiltartárico .....	94
3.1.1.1.4 Impacto del glutatión sobre la formación de methylmethine- y carboxymethine con puentes de (+) - catequina dímeros en un sistema modelo de vino.....	95
3.1.1.1.5 GRP y Lacasa.....	96
3.1.1.2 Impacto del glutatión en aromas compuestos en mosto y vino .....	97
3.1.1.2.1 Esteres y terpenos.....	97
3.1.1.2.2 Tioles varietales .....	99
3.1.1.2.2.1 Protección de tioles varietales.....	101
3.1.1.2.2.2 El glutatión como precursor tiol volátil.....	103
3.1.1.2.2.2.1 Las vías de biogénesis en los vinos .....	103
3.1.1.2.3 Sulfuro de hidrogeno .....	107
3.1.1.2.3.1 Causas de la formación del aroma “reducido”.....	108
3.1.1.2.3.2 Metabolismo del azufre .....	108
3.1.1.2.4 Protección de los compuestos volátiles del aroma en un vino tinto con bajas dosis de dióxido de azufre por una mezcla de glutatión, ácido cafeico y ácido gálico. .	109
3.1.1.2.5 Reducción de carácter aromático envejecimiento atípico o UTA (untypical aging) .....	110
3.1.1.2.5.1 Sotolon y 2-aminoacetofenona.....	111
3.1.1.2.5.1.1 Concentración de sotolón y 2-aminoacetofenona para el control y GSH complementado en vinos a lo largo de un período de almacenamiento de botellas de tres años .....	112

3.1.1.3	Glutación y la Fermentacion Malolactica (FML).....	113
3.1.1.4	Métodos de análisis cuantitativos del glutatión.....	114
3.1.1.4.1	Métodos enzimáticos.....	114
3.1.1.4.1.1	Investigación del Contenido Total de sulfidrilos libres de Varios Vinos Blanco y Tintos.....	115
3.1.1.4.2	Métodos de cromatografía de líquidos.....	116
3.1.1.4.2.1	Preparación y caracterización de microparticulas de beta-coclidextrina/Glutatión y Quitosano/Glutatión obtenido mediante SPRAY-DRYING.	117
3.1.1.4.2.2	Determinación del glutatión en mostos y vinos mediante electroforesis capilar.....	118
3.1.1.4.2.3	Cuantificación de glutatión, catequina, y Ac. cafeico en el zumo de uva y el vino por un novedoso método de cromatografía líquida de ultra rendimiento.....	120
3.1.2	Glutación y <i>Saccharomyces cereviseae</i> .....	126
3.1.2.1	Síntesis de glutatión.....	126
3.1.2.2	Transporte de glutatión.....	127
3.1.2.3	Degradación de glutatión.....	128
3.1.2.4	Papel de <i>Saccharomyces cereviseae</i> durante el estrés nutricional y oxidativo...	130
3.1.2.4.1	Azufre y deficiencia de Nitrógeno.....	130
3.1.2.4.2	Estrés Oxidativo.....	131
3.1.2.5	Glutación Producción biotecnológica.....	132
3.1.2.5.1	Preparación de levadura seca inactiva enriquecidas con glutatión.....	133
3.1.2.5.1.1	Pruebas.....	135
3.1.2.5.1.1.1	Ensayo sobre vino rosado de la variedad Garnacha.....	135
3.1.2.5.1.1.2	Estudio sobre la Variedad Verdejo.....	136
3.1.2.5.1.1.3	Estudio y cata de productos resultados de preparados de levaduras enriquecidas en glutatión.....	137
3.1.3	Productos Enológicos.....	138

3.1.3.1 Ejemplos de algunos productos con glutatión disponible comercialmente preparados con levaduras secas inactivas enriquecidas utilizados en la elaboración del vino .....	138
3.1.3.2 Otros Productos enológicos comerciales.....	139
3.1.3.3 Estudio comparativo de 3 productos de levaduras secas inactivas enriquecidas con glutatión.....	139
3.1.3.3.1 Análisis de cisteína y GSH (HPLC) y método químico clásico de equivalente de GSH de varias ISL ricas en GSH.....	141
3.1.3.3.2 Contenido de glutatión reducido (GSH), oxidado (GSSG) y total (GSH reducido + oxidado) liberado por varias ISL ricas en GSH en una solución modelo de vino. ....	142
3.1.3.4 Ensayo del uso de manoproteínas (OptiWHITE) sobre las características enológicas y organolépticas de vinos cv, Chardonnay. Informe n° D88/230205 –INTA. ....	142
3.1.3.4.1 Procedimiento .....	143
3.1.3.4.2 Resultados y Discusión.....	144
3.1.3.4.3 Conclusiones .....	145
3.2 Glutatión y la legislación.....	146
3.2.1 Otros- Productos enológicos comerciales En la legislación del INV .....	148
3.3 Vinos Orgánicos .....	150
3.3.1 Vinificación .....	150
3.3.2 Clarificado-Estabilización de los fenoles.....	151
3.3.3 Gestión del SO <sub>2</sub> .....	151
3.3.3.1 Características Analíticas .....	151
3.3.3.2 Relevancia de la utilización de dióxido de azufre en los mostos y vinos.....	152
3.3.3.2.1 Beneficios del SO <sub>2</sub> .....	152
3.3.3.2.2 Perjuicios del SO <sub>2</sub> .....	153
3.3.3.2.2.1 Toxicidad de los sulfitos .....	153
3.3.3.3 Prácticas de vinificación importantes para reducir el nivel de azufre.....	154
3.3.3.4 Aditivos Alternativos .....	156

## Capítulo 3: El glutatión en Mostos y Vino:

### 3.1 Glutatión: papel en la elaboración y Saccharomyces cerevisiae

El deterioro oxidativo del vino blanco y rosado constituyen un problema bien conocido en la industria enológica. Estos vinos, puede ser sensibles a la exposición al oxígeno que puede conducir a una pérdida de aroma característico, el desarrollo de personajes atípicos de envejecimiento y cambios de color no deseados.

El glutatión (GSH), un tripéptido de origen natural en la uva, desempeña un papel integral en la oxidación de mostos blancos donde atrapa orto-quinonas, formado durante la oxidación, para limitar la cantidad de pigmentos pardos.

Además, GSH ejerce un efecto protector sobre diversos compuestos aromáticos en el vino.

GSH está presente en altas concentraciones de hasta 10 mM en la levadura, *Saccharomyces cerevisiae*. Esta especie también se emplea actualmente en la producción fermentativa industrial de GSH. La levadura puede influir en la concentración de GSH en el vino debido al metabolismo de los mismos durante la fermentación alcohólica.

Esta crítica tiene un doble enfoque. La primera sección se centra en GSH en cuanto a su papel en la elaboración del vino. Se hace especial hincapié a su aparición en la uva, mosto y de vino y su papel como antioxidante en el vino. El efecto de GSH en ambos compuestos aromáticos deseados y no deseados también se perfila. Por otra parte, el uso de GSH enriquece productos en la elaboración del vino y se discuten las diversas técnicas analíticas para la cuantificación de GSH en el mosto y el vino.

La segunda sección de esta revisión se centra en el papel de GSH en *S. cerevisiae*, con especial énfasis en su papel en la respuesta a las tensiones nutricionales y ambientales.

#### 3.1.1 Actividad antioxidante del glutatión en mosto y de vino: la inhibición del pardeamiento

El pardeamiento es un proceso oxidativo que ocurre durante la vinificación de vino, que resta valor a sus propiedades sensoriales.

Pérdida de calidad organoléptica:

- Deterioro del color: pardeamiento (Aumento de los colores amarillos y Pardos ;Pérdida del color rojo)

•Deterioro del aroma: (Pérdida del aroma varietal; Presencia de etanal libre; Sabor = gusto + aroma.)

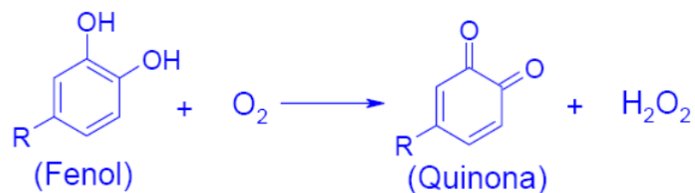
Los fenoles, en particular orto-difenoles son responsables de la pardeamiento oxidativo en el vino, siendo amenaza:

- Inhiben la expresión de la fruta.
- Proporcionan agresividad y amargor.
- Son motor y substrato de oxidación.

El pardeamiento puede ser el resultado de la oxidación enzimática (Oxígeno + sustrato + enzima) que tiene lugar casi en su totalidad en el mosto de uva, y la oxidación no enzimática (Oxígeno + sustrato), también llamado oxidación química, que se produce principalmente durante el envejecimiento del vino.

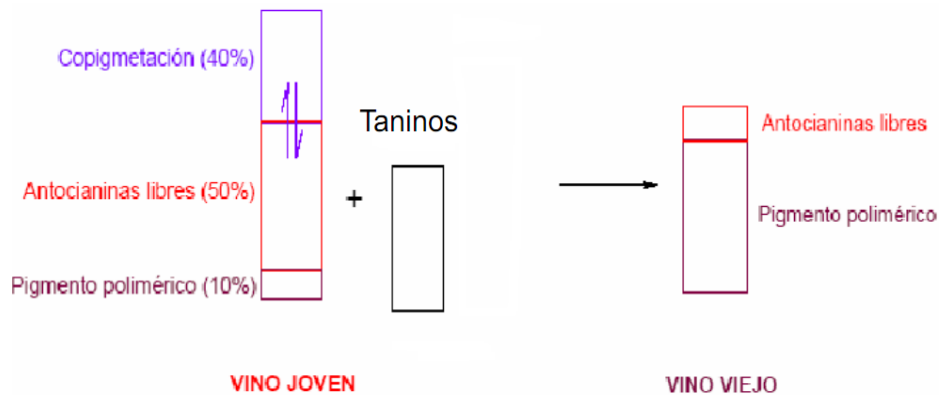
Las enzimas participantes de las oxidaciones enzimáticas son la tirosinasa (orto-difenol-óxido-reductasa) Cataliza la oxidación de monofenoles a orto -difenoles y quinonas (ácido cafeico, catequina, quercetina. Y Lacasa (para-difenol-óxido-reductasa) que cataliza la oxidación de ortodifenoles, paradifenoles y otros (M-3-G) a quinonas

El Pardeamiento enzimático consiste en la transformación de los compuestos fenólicos en polímeros coloreados.

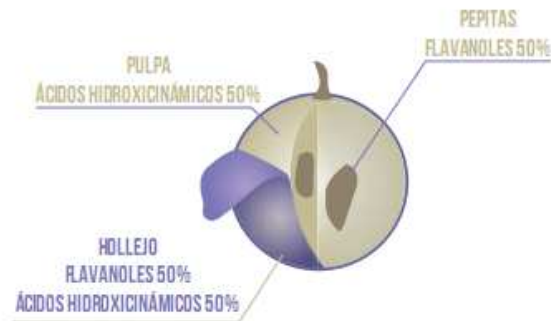




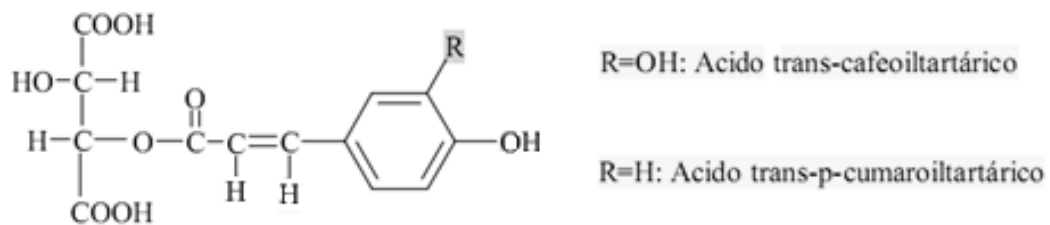
### 3.1.1.1 Oxidación en el vino:



En el mosto de uva está altamente correlacionado con el contenido de hidroxycinamato del mosto, presentando el principal grupo de compuestos fenólicos en los mostos blancos.



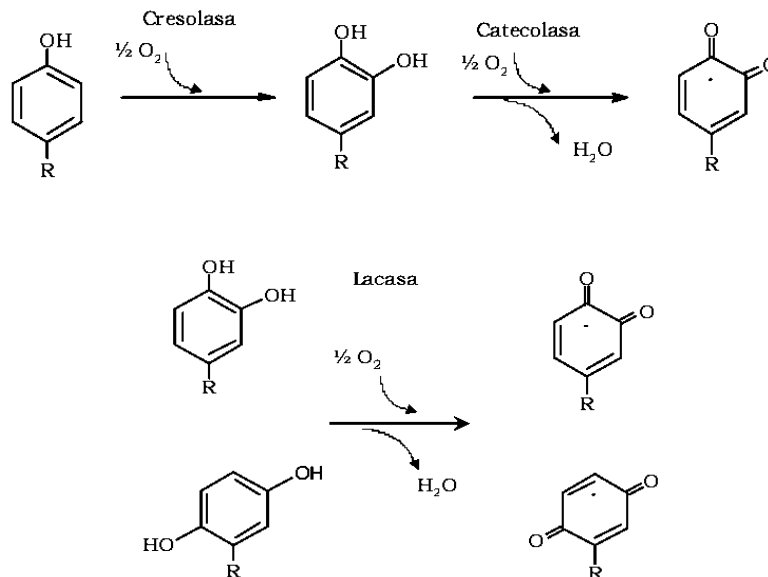
Acido Caftarico (cafeoiltartárico) y Acido Cumarico (cumároiltartárico) son los más abundantes hidroxycinamatos en el jugo de uva que tuvieron con un contacto mínimo con la piel.



La principal enzima responsable de los mecanismos de degradación oxidativa de los compuestos fenólicos en los mostos es la catecoloxidasas, conocida frecuentemente como

polifenoloxidasas (PPO), que cataliza la hidroxilación de los monofenoles a o-difenoles (actividad cresolasa) y oxidación de estos últimos a o-quinonas (actividad catecolasa).

Reacciones catalizadas por polifenoloxidasas (cresolasa y catecolasa) y por lacasa.



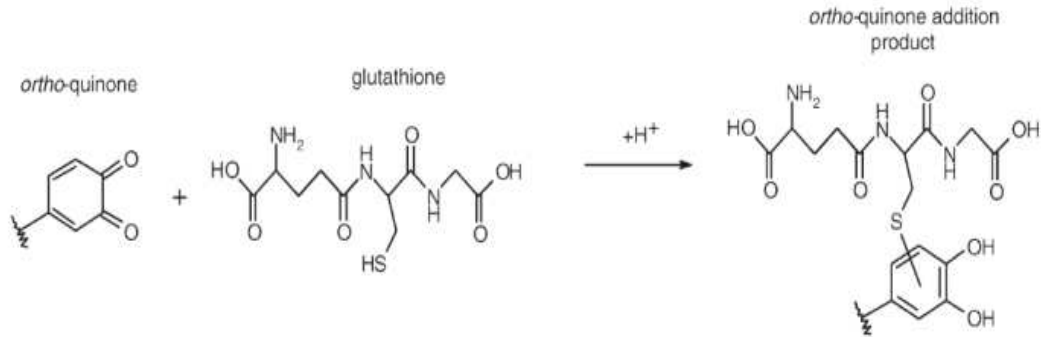
En la baya intacta, los hidroxicinamatos, predominantemente presentes en la vacuola, no están en contacto con la PPO, que se encuentra en el citoplasma, debido a los diferentes sistemas de membrana celular.

Sin embargo, cuando la baya se tritura en presencia de oxígeno, los sistemas de membrana se interrumpen y la oxidación enzimática (catalizada por PPO) convierte estos hidroxicinamatos a los correspondientes electrófilos orto-quinonas reactivas.

La actividad de la polifenoloxidasas cresolasa en uva convierte primero el ácido cutarico a ácido caftarico antes de ser oxidado adicionalmente a ácido caftarico quinona.

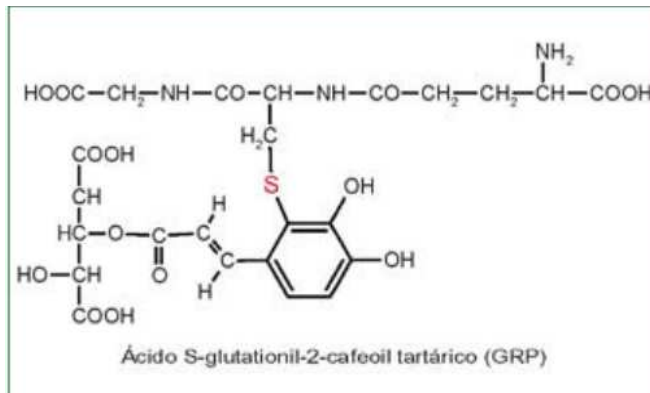
El GSH, con su grupo mercapto que sirve como un centro nucleofílico rico de electrones, sustituye en el anillo electrofílico del ácido caftarico quinona

### 3.1.1.1.1 Reacción de GSH con orto-quinonas.



El producto, un tioéter conocido como 2-S-glutationilo ácido caftarico o Producto de Reacción de la uva (GRP) no es un sustrato para la oxidación adicional por PPO a pesar de su estructura orto-dihidroxifenol. Esto supone un proceso de paralización de la quinona frente a las reacciones, anteriormente mencionadas, que dan lugar a la formación de pigmentos pardos. El ácido caftarico atrapado como GRP es inerte, o casi, para fomentar la oxidación por PPO, y la reacción llega a su fin con la desaparición del ácido caftarico

Pero además el GRP es un poderoso antioxidante *per se*: mientras que un mol de fenol simple puede consumir 3,4 átomos de O<sub>2</sub>, el mismo fenol combinado con el glutatión bajo la forma de GRP, puede consumir hasta 8,5 moles de O<sub>2</sub>.



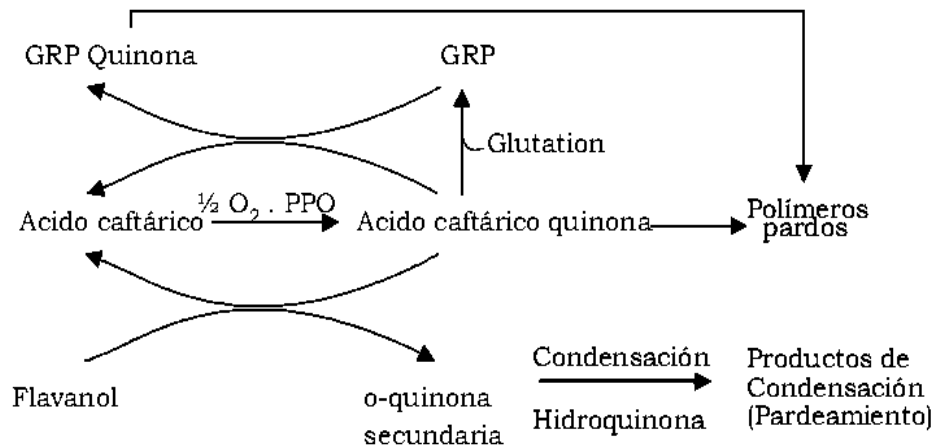
Formula desarrollada del ácido S-glutationil-2-cafeoil tartárico, conocido como producto reacción de la uva (GRP)

De esta manera, el glutatión atrapa los orto-quinonas en una forma incolora y la formación de polímeros de color marrón es limitado.

Si GSH se agota en el mosto, el ácido caftarico o-quinona, siendo un oxidante, puede oxidar GRP y otros flavanoles y reducirse de nuevo a ácido caftarico, con el resultado de un pardeamiento intenso. La adición de ácido caftarico a soluciones PPO-GRP inducen la degradación completa del derivado glutatiónil, debido a un fenómeno de cooxidación,

implicando la oxidación enzimática del ácido caftarico a la correspondiente o-quinona, seguida de la oxidación del GRP por dicha quinona. Además, el ácido caftarico o-quinona también puede polimerizar con ácido caftarico para formar un fenol re-oxidable. Estas reacciones de polimerización con orto-quinonas llevan al pardeamiento del mosto de uva.

Mecanismo de oxidación de ácido caftarico y un flavanol:



El ácido hidroxicinámico a la proporción de GSH de una necesidad, por tanto, debe presentar una buena indicación de su susceptibilidad de oxidación con relaciones más altas conducen a los mostos más oscuros.

Una proporción de 0,9 a 2,2 de GSH caracteriza una necesidad ligeramente coloreado.

Mostos de colores medios y oscuros se caracterizan por ácido hidroxicinámico a las relaciones de GSH de 01/01 a 03/06 y 03/08 a 05/09, respectivamente.

En tal caso, un alto nivel de hidroxicinamatos libres con alto potencial de pardeamiento se retiene en el mosto.

Considerando lo anteriormente expuesto, hay que decir que la susceptibilidad del mosto al pardeamiento no depende del contenido inicial de ácidos hidroxicinámicos sino de su riqueza relativa en glutatión y dichos ácidos.

### 3.1.1.1.2 Cuantificación de los ácidos hidroxicinámicos y GRP

La cuantificación de los ácidos cafeoiltartárico y p-cumároiltartárico (ambos hidroxicinámicos), del GRP y de sus o-quinonas respectivas durante la oxidación de una serie de mostos blancos obtenidos de diversos viñedos, junto con el análisis del color de los mostos oxidados, han permitido establecer tres clases de mostos, que se diferencian en su relación molar ácidos hidroxicinámicos/glutati6n (AH/GSH):

- A. mostos poco sensibles al pardeamiento ( $AH/GSH < 1$ )
- B. mostos sensibles al pardeamiento ( $1 < AH/GSH < 3$ )
- C. mostos muy sensibles al pardeamiento ( $AH/GSH > 3$ )

En la clase A, despu6s de una corta fase de retardo, la oxidaci6n de los ácidos hidroxicinámicos es muy rápida y las o-quinonas del ácido caftárico formadas son rápidamente atrapadas como GRP, siendo pequeño el consumo de oxígeno (menos de 7 mL/L) y la variaci6n de color muy pequeña; siguiendo a esta fase de oxidaci6n rápida, la oxidaci6n acoplada de GRP a su o-quinona, la cual es instantáneamente convertida a GRP2 (ácido 2,5-di-S-glutationil caftárico, formado por reacci6n de la o-quinona de GRP con una segunda molécula de glutati6n), compite con la formaci6n de GRP.

En la clase B, la concentraci6n de GRP alcanza un máximum despu6s de algunos minutos y entonces disminuye continuamente. Siguiendo al agotamiento del glutati6n, las o-quinonas del ácido caftárico y GRP dan lugar a productos de condensaci6n; se forma una pequeña cantidad de GRP2 que desaparece rápidamente, presumiblemente por oxidaci6n acoplada.

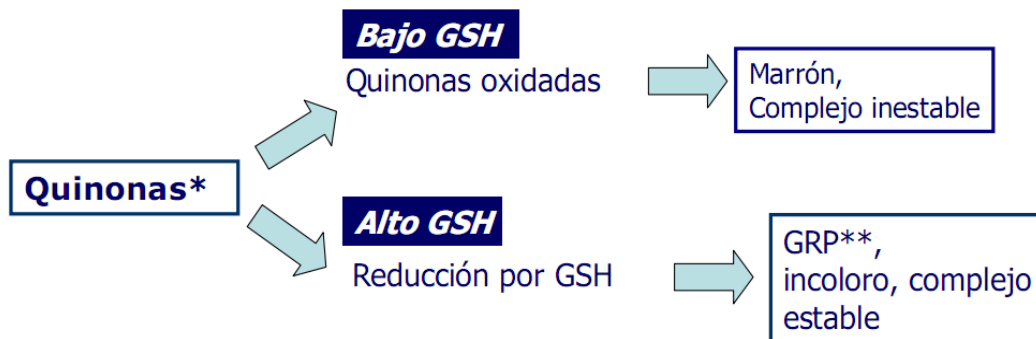
En la clase C, los niveles máximos de GRP y o-quinona de GRP son mucho más bajos y el de la o-quinona del ácido caftárico más alto; ningún GRP2 es detectado, lo cual quiere decir que el glutati6n es agotado antes de que comience la oxidaci6n del GRP.

En las clases B y C, la regeneraci6n del substrato inicial (ácidos hidroxicinámicos) a partir de su quinona en la reacci6n de oxidaci6n acoplada, bien con o-difenoles o el GRP, es seguida inmediatamente de una nueva oxidaci6n; esto se traduce en un gran consumo de oxígeno. Efectivamente, sólo la primera etapa de la oxidaci6n enzimática consume oxígeno, de modo que este consumo depende a la vez del contenido de substratos de la PPO en el mosto y del número de sus reciclados, es decir, de la cantidad de moléculas oxidadas por oxidaci6n acoplada. Además, la adici6n de glutati6n en exceso a un mosto de la clase C limita el

pardeamiento, lo cual confirma el papel del mecanismo que lleva al GRP a la prevención de este fenómeno, ya que todas las quinonas del sustrato inicial son atrapadas por el glutatión para formar el GRP, con lo cual no hay posibilidad de que tenga lugar la oxidación acoplada que conduce al pardeamiento.

Así pues, el enriquecimiento de los mostos en compuestos fenólicos y, sobre todo, en flavonoides, resultado de una maceración con partes sólidas o de un prensado muy fuerte, favorece el pardeamiento. Por el contrario, la presencia de un exceso de glutatión (mostos de clase A) o la adición de este compuesto a los mostos de las clases B y C, limita las alteraciones de color y protege a los flavonoides, lo cual confirma la función de la quinona del ácido cafeoiltartárico en sus mecanismos de degradación.

Sin embargo, el mantenimiento del color observado en mostos ricos en glutatión es un fenómeno temporal. Efectivamente, la sensibilidad de los vinos blancos al pardeamiento está relacionada con su contenido en flavanoles (catequinas y procianidinas) ya que estos compuestos, incluso en ausencia de aire, presumiblemente se polimerizan durante el almacenamiento, contribuyendo al desarrollo de color adicional en los vinos. Así, el mantenimiento de cantidades elevadas de flavonoides en mostos ricos en glutatión o protegidos contra la oxidación puede dar lugar a un pardeamiento más intenso en los vinos. Además, el GRP acumulado en los mostos podría constituir una reserva de compuestos oxidables a largo plazo durante la conservación de los vinos. Este fenómeno está particularmente comprobado en los vinos procedentes de vendimias Botrytizados a causa de la actividad de la lacasa sobre estos sustratos.



**\*Quinonas : compuestos oxidables presentes en el mosto**

**\*\*Grape Reduction Product**

### 3.1.1.1.3 Otros componentes del mosto que reaccionan con la quinona del ácido cafeoiltartárico

Las cinéticas de oxidación en mostos y soluciones modelo indican que hay compuestos que compiten con el glutatión por la quinona del ácido cafeoiltartárico; están los reductores fuertes como el ácido ascórbico a los cuales se les atribuye en los mostos un periodo de latencia anterior a la acumulación del GRP debido a que regeneran el ácido cafeoiltartárico a partir de su quinona. En efecto, la adición de ácido ascórbico a los mostos retarda la degradación del ácido caftárico y la formación del GRP. Por otra parte, están algunos compuestos fenólicos que pueden intervenir como reductores o nucleófilos en las reacciones con la o-quinona del ácido cafeoiltartárico y a los cuales se les atribuye que las concentraciones de quinonas y GRP encontradas en los mostos sean sistemáticamente inferiores a las de las soluciones modelo correspondientes.

Por otra parte, el pardeamiento es debido, como anteriormente se ha indicado, a las reacciones de polimerización que siguen a la formación de las o-quinonas de diversos flavanoles, ya que estas quinonas resultan muy inestables, dando lugar rápidamente a productos de condensación por reacción, bien con sus formas reducidas o bien con el ácido cafeoiltartárico

GSH añadido a 10 mg / L para vino blanco (ej.: Sauvignon blanc) al embotellado significativamente se nota disminuido el tinte amarillo del vino durante un período de tres años de envejecimiento en comparación con el vino de control.

Esto despertó el interés en la capacidad de GSH para proteger el color del vino blanco durante el envejecimiento en botella cuando las reacciones de oxidación enzimáticos no prevalecen. La oxidación no enzimática surge de la oxidación de compuestos fenólicos y la posterior polimerización de productos oxidados. Las reacciones de polimerización entre fenoles y otros componentes del vino, incluyendo acetaldehído y ácido glioxílico también pueden dar lugar a pigmentos pardos.

Los compuestos fenólicos más susceptibles a la oxidación química en el vino incluyen el ácido cafeico y sus ésteres, catequina, epicatequina y ácido gálico.

#### 3.1.1.1.4 Impacto del glutatión sobre la formación de methylmethine- y carboxymethine con puentes de (+) - catequina dímeros en un sistema modelo de vino.

Se ha demostrado que cantidades suficientes de GSH podrían inhibir la coloración oxidativa retrasando la formación de carbonilo con puentes de (+) - catequina dímeros formados en el sistema de vino modelo.

El estudio consistió en evaluar el impacto de glutatión en la reacción entre (+) - catequina y compuestos carbonílicos en condiciones relacionadas con el vino.

(+) - Catequina (0,50 mM) y, o bien ácido glioxílico (0,25 mM) o acetaldehído (0,25 mM) se añadieron a un sistema de vino modelo con 0,0, 0,25, y 2,5 mM de glutatión añadido.

UPLC-DAD y el análisis LC-MS mostró que la formación de carbonilo con puentes de (+) - catequina dímeros se inhibió en las muestras con una relación de glutatión a carbonilo de 10: 1 en comparación con las muestras sin glutatión. A una relación de 1: 1, glutatión inhibido los dímeros de acetaldehído con puentes, pero sólo tenía un impacto menor en los dímeros de ácido glioxílico con puentes.

Investigaciones adicionales mostraron que esta tendencia de la inhibición por el glutatión en el dímero de ácido derivado de glioxílico era independiente de las temperaturas, 20°C vs 45° C, o la presencia de iones metálicos, 0,2 mg / l de cobre (II) y 5 mg / L de hierro (II).

(1) análisis H NMR y el análisis LC-MS proporcionan evidencia de que el glutatión inhibió la formación de dímero a través de diferentes mecanismos, dependiendo del compuesto de carbonilo.

Para dímeros de acetaldehído derivado, el modo principal de inhibición fue la capacidad del glutatión para formar una (metil-glutationil-metino) - (+) - catequina complejo. Alternativamente, la formación de un producto de adición de ácido glioxílico-glutatión impidió la reacción entre el ácido glioxílico con (+) - catequina. Estos resultados demuestran que el glutatión, en concentración suficiente, puede tener un impacto sustancial en las reacciones de polimerización carbonilo derivados en condiciones de vino similares, tales como el ácido glioxílico .



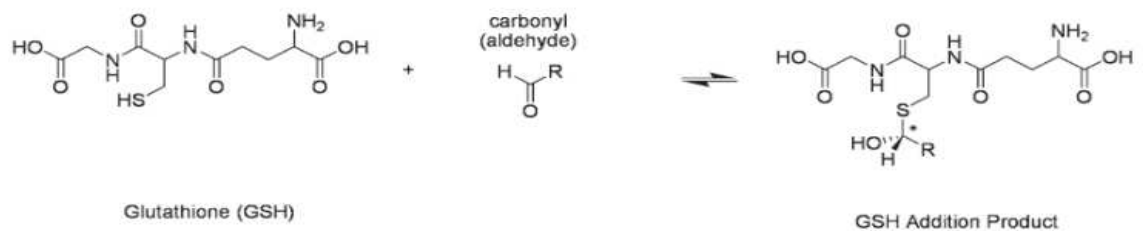


Figura: Reacción de adición de glutatión con compuestos de carbonilo. ( $R = CH_3$ : acetaldehído,  $R = COOH$  u  $COO^-$ : ácido glioxílico)

Esta inhibición de reacciones carbonilo de polimerización derivadas dificulta la formación de pigmentos no deseados, tales como el catión xanthylum amarillo que puede inducir cambios de color que se correlacionan negativamente con la calidad del vino.

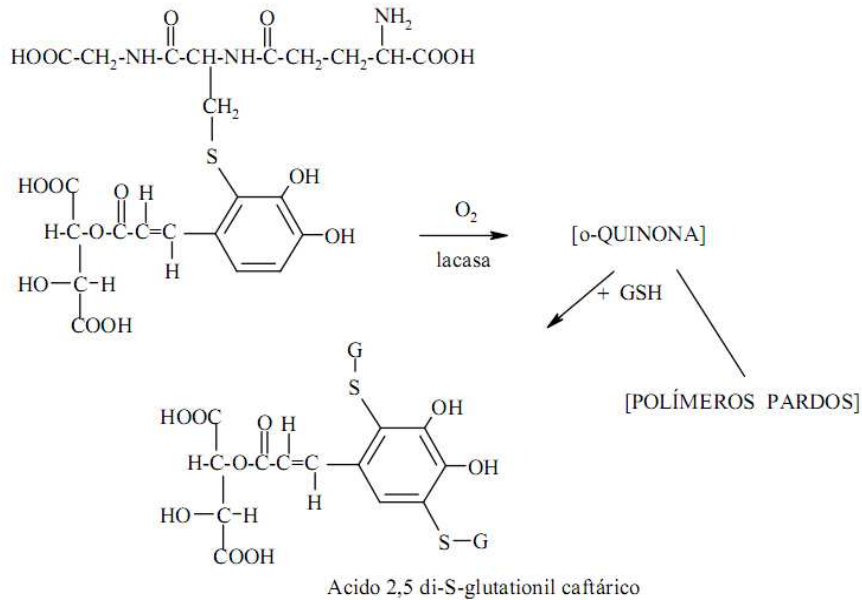
Por tanto, parece como si GSH podría ejercer un efecto protector en el color del vino durante el envejecimiento.

#### 3.1.1.1.5 GRP y Lacasa

Aunque resistente a PPO, GRP es, sin embargo, un sustrato para la lacasa producida por el hongo, *Botrytis cinerea* y posterior oxidación a su correspondiente o-quinona que, en ausencia de glutatión, se polimeriza aumentando el pardeamiento; sin embargo, este aumento no se produce si hay glutatión en exceso, puesto que entonces, la o-quinona del GRP es atrapada por el glutatión formándose el ácido 2,5-di-S-glutationil caftárico (GRP2).

No parece como si GRP2 puede oxidarse adicionalmente por lacasa en condiciones de vinificación

Secuencia de reacciones propuestas para la oxidación del ácido 2-S-glutationil caftárico por lacasa y la formación del ácido 2,5-di-S-glutationil caftárico. GSH=glutati6n



La reacci6n es muy sensible a la presencia de oxígeno y di6xido de azufre (SO<sub>2</sub>). SO<sub>2</sub> inhibe PPO que por lo tanto previene la formaci6n de GRP.

3.1.1.2 Impacto del glutati6n en aromas compuestos en mosto y vino

3.1.1.2.1 Esteres y terpenos

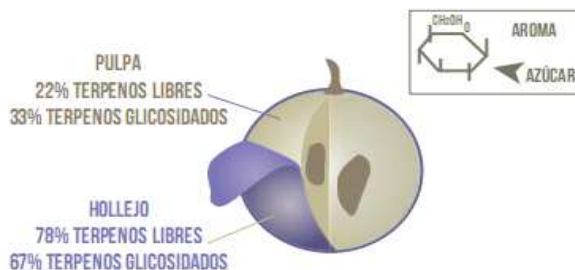
Los 6steres de alcoholes superiores y 6steres et6licos contribuyen positivamente a la calidad del vino impartiendo aromas frutales. Los terpenos Son derivados del isopreno, un hidrocarburo de 5 6tomos de carbono, y se acumulan en la uva con m6ximos al final del proceso de maduraci6n. Se encuentran y constituyen un grupo arom6tico importante en varias variedades de uva y sus correspondientes vinos como los vinos Muscat, Gewürztraminer, Riesling, Moscatel, Torrontes, Carmenere y Weisser Bukettraube.

En viñedo su producci6n est6 ligada a una buena insolaci6n de los racimos y un estr6s h6drico moderado. Se degradan r6pidamente en presencia de Botrytis.

En la uva est6n presentes en el hollejo y en la pulpa tanto en forma libre como en forma de precursor glicosilado. Estos precursores son inodoros por ir ligados a az6cares como glucosa,

arabinosa, apiosa, ramnosa y xilosa. Durante la fermentación las actividades enzimáticas glucosidasas de la levadura liberan el terpeno del azúcar, transformándolo en la forma libre, la responsable del aroma del vino.

#### LOCALIZACIÓN DE LOS TERPENOS Y SUS PRECURSORES EN LA UVA



PRINCIPALES TERPENOS EN LA UVA	DESCRIPTORES
LINALOL	ROSA, CORIANDRO, FLOR DE NARANJO
CITRONEROL	CITRONELA, ROSA
NEROL	ROSA, FRAMBUESA, MAGNOLIA
GERANIOL	ROSA, CERA
$\beta$ -TERPINEOL	LILA, PINO
HO-TRIEENOL	TILO, JACINTO

Papadopoulou y Roussis evaluaron el efecto de GSH y N-acetilcisteína en la disminución de ésteres volátiles y terpenos en tanto el vino blanco Debina y una solución vino modelo durante el envejecimiento.

GSH inhibe la disminución de varias sustancias volátiles tales como el acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, acetato de etilo octanoato, decanoato y linalol en el vino Debina durante el almacenamiento. También se ha informado que GSH añadido a 20 mg / L para vino seco Muscat inhibió la desaparición de linalool y  $\alpha$ -terpineol durante el almacenamiento del vino.

En la solución vino modelo, GSH inhibe la disminución de acetato de isoamilo, hexanoato de etilo y linalool en una forma dependiente de la dosis. Un vino con bajo dióxido de azufre libre de (35 mg / L) suplementado con 20 mg / L GSH fue más eficaz en la protección de varios ésteres y linalol en comparación con un vino con 50 mg / L de SO<sub>2</sub> libre.

La pérdida de compuestos volátiles puede ser atribuida a la oxidación y otras reacciones químicas que tienen lugar. La concentración de éster en el vino puede cambiar debido a esterificación y reacciones de hidrólisis que tienen lugar.

Además, la mayoría de los alcoholes terpénicos son reemplazadas por óxidos de terpeno mientras que linalol pueden convertir a  $\alpha$ -terpineol que tiene un umbral sensorial mucho mayor .

El efecto protector de GSH en algunos ésteres y terpenos durante el almacenamiento del vino se atribuye a su fracción de sulfidrilo libre (SH) que confiere redox única y propiedades nucleófilos.

### 3.1.1.2.2 Tioles varietales

Los tioles son compuestos azufrados ligados a una molécula de Cisteína. Tienen elevado poder odorante pero son muy sensibles a la oxidación por lo que sus enemigos principales son el oxígeno disuelto y los polifenoles.

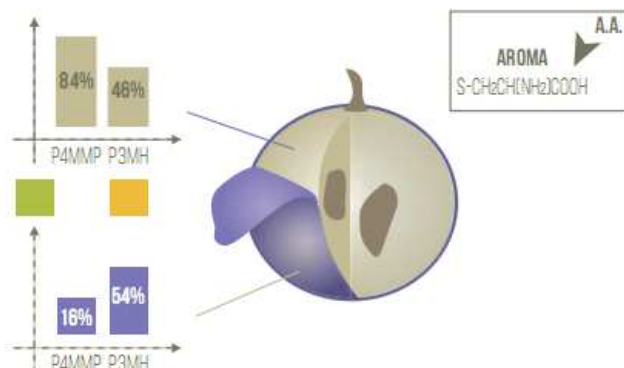
Son la principal fracción aromática en Verdejo, Sauvignon blanc, Gros manseng, Petit manseng; y en menor concentración y según fecha de vendimia pueden estar también en Muscat, Chardonnay o Viura. También los encontramos en variedades tintas como Syrah, merlot, Pinot Noir, Tempranillo y otros en vendimia temprana.

En viñedo su producción va ligada a la alimentación nitrogenada, vigor, insolación controlada y régimen hídrico generoso. Su enemigo principal en el viñedo es el cobre.

Hoy día se han identificado 6 tioles como principales responsables de los aromas reductores que caracterizan algunos vinos.

	MOLECULA	DESCRIPTORES
4MMP	4-MERCAPTO-4-METHYLPENTAN-2-ONA	BOJ, RETAMA
A3MH	ACETATO DE 3-MERCAPTOHEXANOL	BOJ, MARACUYÁ, CORTEZA DE CÍTRICOS
3MH	MERCAPTOHEXAN-1-OL	POMELO, MARACUYÁ
4MMPDH	4-MERCAPTO-4-METHYLPENTAN-2-OL	CORTEZAS DE CÍTRICOS
3MMB	3-MERCAPTO-3-METHYLBUTAN-1-OL	PUERRO COCIDO
A3SH	3-SULFANYLHEXAN-1-OL	HOJA DE TOMATERA

## LOCALIZACIÓN DE LOS PRECURSORES TIPO TIOL EN LA UVA



Compuestos tiólicos varietales particularmente la 4-mercapto-4-metilpen-tan-2-ona (4MMP, 1), el acetato de 3-mercaptohexilo (3MHA, 2) y el 3-mercaptohexan-1-ol (3MH, 3) han sido identificados como compuesto claves en el aroma de los vinos jóvenes procedentes de diversas variedades como Sauvignon blanc, Colombard, Riesling, Semillón, Merlot, Cabernet Sauvignon y Garnacha

Compound	Structure
3-mercaptohexan-1-ol (3MH)	<chem>CCCCC(S)CO</chem>
3-mercaptohexyl acetate (3MHA)	<chem>CCCCC(S)COCC(=O)C</chem>
4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one (4MMP)	<chem>CC(=O)CC(C)(C)S</chem>

4MMP es una reminiscencia de boj y grosella negra con un umbral de percepción correspondiente a 0,8 ng / L en solución vino de modelo (3 ng / L en el vino blanco y tinto).

Los enantiómeros R y S de 3MH es una reminiscencia de pomelo y fruta de la pasión, respectivamente, con umbrales de percepción de 50 y 60 ng / L, respectivamente.

3MHA también ocurre en dos formas enantioméricas: los aromas frutales forma R exposición pasión con un umbral de percepción de 4,2 ng / L mientras que la forma S tiene un olor herbácea de boj con un umbral de percepción mucho más baja que corresponde a 2,5 ng / L .

Los cambios en los precursores de tioles en el viñedo han sido poco estudiados, debido a la dificultad de análisis. Los pocos resultados disponibles conciernen a los efectos de la madurez, la ubicación del viñedo (terroir), el nivel de estrés hídrico y la fertilización nitrogenada.

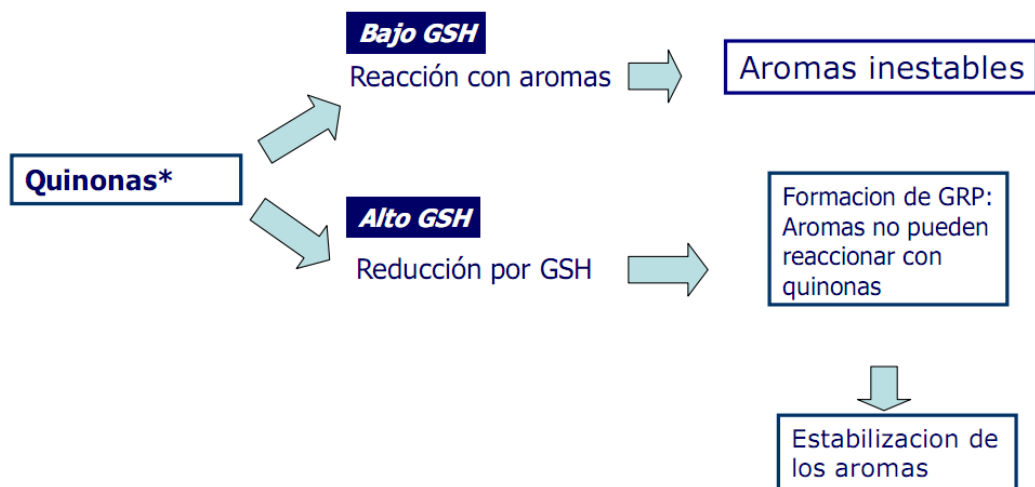
Los parámetros clave para la obtención de tioles en la fermentación son:

- Uva sana vendimiada en la fecha adecuada: piel de coloración verdosa y elevado contenido en NFA.
- Maceración con pieles o borras según el perfil buscado.
- Gestión correcta de los polifenoles, IPT < 6.
- Inertización y protección máxima contra el oxígeno disuelto.
- Parámetros de fermentación adecuados: turbidez, levadura, temperatura, NFA.

Estos tioles volátiles son particularmente susceptibles a la oxidación durante el almacenamiento, y se ha propuesto que GSH desempeña un papel importante en la protección de estos compuestos durante el envejecimiento botella.

#### 3.1.1.2.2.1 Protección de tioles varietales

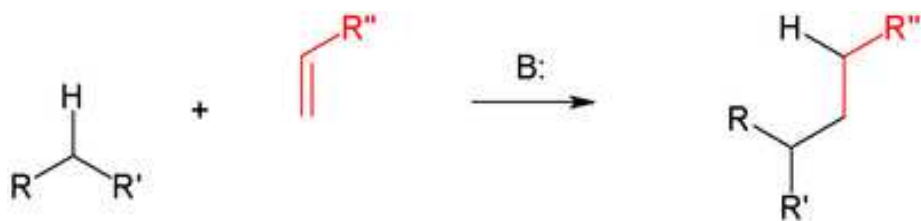
La adición de 10 mg / L de GSH a sauvignon blanc vino antes del embotellado resultó en niveles 3MH significativamente mayores en comparación con el control después de tres años de crianza en botella. Esto está de acuerdo con los hallazgos recientes, informaron que la adición de 20 mg / L de GSH antes del embotellado en general dio lugar a vinos con más altos niveles 3MH después de seis meses de envejecimiento en botella.



En otro ensayo en Vinos Sauvignon blanc enriquecido en glutatión durante la Fermentación Alcohólica, se obtuvieron los siguientes resultados:

	3 MH (ng/L)	3 MHA (ng/L)
Sin GSH	403	221
Con GSH	945	379

Como se mencionó anteriormente, los ácidos hidroxicinámicos en el vino pueden ser oxidados a orto-quinonas en presencia de oxígeno. Estas orto-quinonas pueden reaccionar fácilmente con tioles mediante una reacción de adición de Michael. La reacción de Michael o adición de Michael consiste en una adición nucleófila de un carbanión a un compuesto carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado. Pertenece a la clase más grande de las adiciones conjugadas. Es uno de los métodos más útiles de formación de enlaces C-C en condiciones suaves.



En este esquema los sustituyentes R y R' en el nucleófilo son grupos electroaceptores tales como el acilo y el ciano convirtiendo al hidrógeno metilénico en ácido, que al reaccionar con

la base B: da lugar al carbanión. El sustituyente en el alqueno activado es normalmente una cetona, lo que la convierte en una enona, pero puede ser también un grupo nitro.

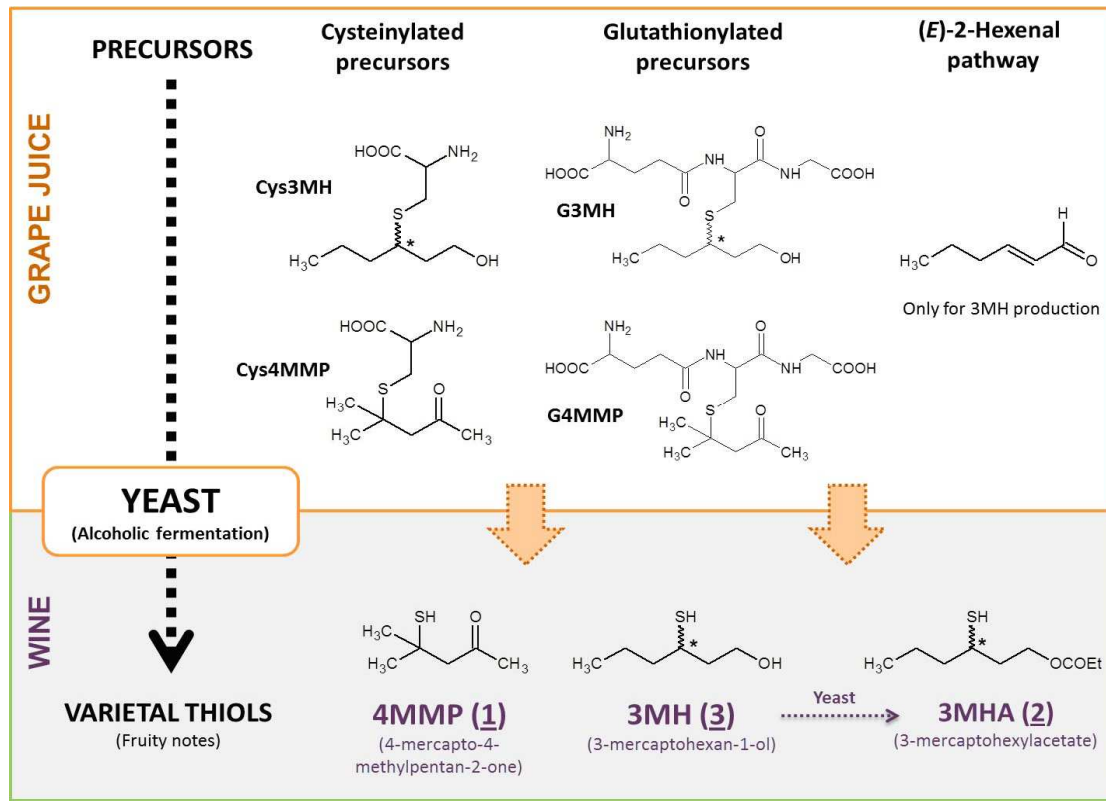
Además, orto-quinonas también pueden generar peróxidos mediante una serie de reacciones acopladas que son conocidos por sus propiedades oxidativas contra tioles.

El GSH también por ser un tiol, posiblemente, puede competir con los tioles aromáticos para unirse a los orto-quinonas y en consecuencia limitar la pérdida de aroma varietal .

### 3.1.1.2.2.2 El glutatión como precursor tiol volátil

#### 3.1.1.2.2.2.1 Las vías de biogénesis en los vinos

La 4mmp, el 3mH y el 3mHa son aromas varietales liberados durante la fermentación, a partir de precursores inodoros presentes en las uvas y los mostos. Tres rutas biogénicas de formación de la 4mmp y del 3mH han sido identificadas en los vinos . La formación del 3mHa es especial y se hace por acetilación del 3mH por la levadura.





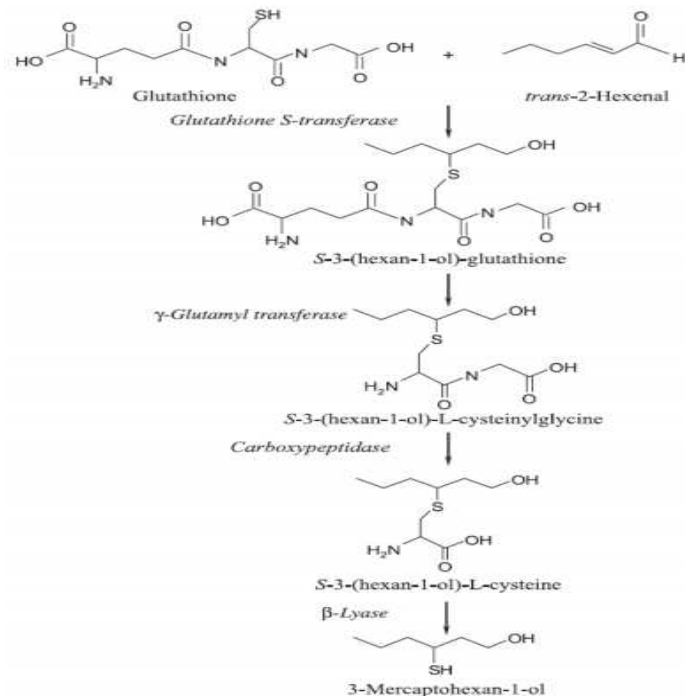
La primera vía implicando precursores cisteneilados fue identificada por primera vez en la uva sauvignon Blanc, merlot y Cabernet sauvignon, Semillon, Petit y Gros manseng , riesling, melón B. y Gewürztraminer y, finalmente, Koshu. Estos conjugados de la s-cisteína son escindidos por la levadura con la actividad  $\beta$ -liasa durante los primeros días de fermentación. La s-3-(hexan-1-ol)-cisteína (Cys3mH) es más ubicua y abundante que la s-3-(4-mercapto-4-metil-2-ona)-cisteína (Cys4mmP), lo que es consistente con las proporciones relativas de los tioles correspondientes.

La segunda vía implica precursores glutathionilados: el s-3-(hexano-1-ol)-glutathión (G3mH) identificado de manera tentativa en la uva de sauvignon Blanc (, y formalmente en la de melón B., riesling y Gewürztraminer, y luego Chardonnay, Pinot Gris y Koshu (y el s-3-(4-mercapto-4-metil-2-ona)-glutathión (G4mmP) presente en la uva de sauvignon Blanc, riesling y Gewürztraminer.

Por último, una última vía de biogénesis ha sido identificada en el pasado. Esta ruta implica compuestos insaturados en C6 tal como el (E)-2-hexenal que reciben un grupo sulfhídrico durante la fermentación alcohólica .Sin embargo, el donador de azufre aún no ha sido identificado: podrían ser compuestos tales como el H<sub>2</sub>S, la cisteína, el glutathión u otros compuestos que poseen un tiol libre en los mostos.

Glutathión S-conjugados están involucrados en los sistemas de desintoxicación de los organismos vivos. La enzima glutathión S-transferasa cataliza la conjugación de GSH con compuestos tóxicos . A partir de entonces,  $\gamma$ -glutamyl y carboxipeptidasa elimina los restos de ácido glutámico y glicina, respectivamente, para producir la cisteína S-conjugado.

La figura siguiente representa una vía propuesta para la biosíntesis de la glutathionilacion precursor 3MH y el precursor cisteneilados 3MH en vid con el último paso que tiene lugar durante la fermentación alcohólica, como resultado de la acción de la levadura  $\beta$ -liasa.



Sin embargo,  $\gamma$ -glutamyl nunca ha sido identificado en uvas. Las vías de desintoxicación en plantas son activados por varias tensiones incluyendo la senescencia así como abiótico (oxidación, lesión) y factores bióticos (patógenos). De hecho, reportaron que la síntesis de GLUT-3MH y el posterior metabolismo para Cys-3MH se mejoran por diversas condiciones de estrés ambiental a través de la activación de la glutatión S-transferasa.

Además, se demostró que Sauvignon blanc y Semillon deben tenían concentraciones precursoras tiol volátiles considerablemente mayor cuando las uvas fueron infectadas con el hongo, *B. cinérea*. Un trabajo reciente realizado demostraron que metabolitos de *B. cinérea* que estimularon la producción de Cys-3MH secretada. La hipótesis establece que estos metabolitos estimulan la formación de (E) -2-hexenal que está conjugado con GSH y luego desglosan a Cys-3MH.

Otros autores sugirieron que los precursores 3MH son transportados en la levadura a través del sistema regulado OPT1 de transporte de GSH-P1 GSH que se discute en una etapa posterior. Se propone que una enzima de levadura liasa carbono-azufre libera el tiol volátil a partir del precursor de cisteína.

También se ha demostrado que un extracto de enzima libre de células de *Eubacterium limosín* que muestra cisteína-S-conjugado actividad  $\beta$ -liasa, podría liberar 4MMP partir de su

precursor Cys-4MMP. Cuando los genes que codifican supuestas liasas carbono-azufre fueron suprimidos, una disminución en la cantidad de 4MMP puesto en libertad.

Además que las cepas de levadura del vino modificado con un exceso de genes expresados en liasa azufre carbono liberaba 25 veces más 4MMP y 3MH en el modelo de fermentos que las cepas de control. Esta enzima  $\beta$ -liasa no tenía ninguna actividad hacia el precursor de GSH, apoyando la degradación de la vía hipotética de GLUT-3MH a Cys-3MH para formar 3MH.

Se ha encontrado que ni (E) -2-hexenal ni Cys-3MH representa a la mayoría de la libre 3MH y 3MHA detectado en Sauvignon blanc vino. Los autores sugirieron que GLUT-3MH es el principal precursor de 3MH ya que la delección del gen OPT1, que codifica para el principal GSH transportador, dio lugar a la formación de menor 3MH en comparación con la cepa de tipo salvaje.

Del mismo modo, se reporto que la adición de GSH y (E) -2-hexenal de Sauvignon blanc y mostos Melón de Bourgogne (Melón B), dio lugar a una mayor producción y 3MH 3MHA.

Esto es contrario a los datos de Patel , quien observó que las adiciones de GSH en prefermentación de Sauvignon Blanc es traducido en bajos niveles 3MH y 3MHA en vinos tratados en comparación con el control de los vinos. Los autores explican este efecto represivo como la competencia por el GSH para su absorción por la levadura de los precursores tiol. Sin embargo, tanto de la concentración de GSH precursor y conjugados de cisteína aumentan durante la maduración de las uvas.

Se ha reportado un aumento de 10 veces en la cisteína y GSH conjugados entre precosecha y cosecha comercial en un período de 14 días para Sauvignon blanc. Esto se atribuyó a una pérdida de integridad de la membrana en la madurez con la posterior descompartmentalización y mezcla de enzimas y precursores. Del mismo modo, el aumento tanto de GSH y (E) -2-hexenal niveles se han reportado durante la maduración y estos componentes son inevitables para la formación de conjugado de GSH.

Los estudios realizados sobre la localización de los precursores cisteneilados y glutathionilados en Sauvignon blanc de varias regiones revelaron que la mayor cantidad de Cys-3MH residía en la piel que está de acuerdo con otros estudios ,mientras que el exceso -3MH fue bastante uniformemente distribuido entre la pulpa y las pieles. Por otra parte, el 81% de la GLUT-4MMP residía en las pieles. Los mismos autores informaron que las variaciones

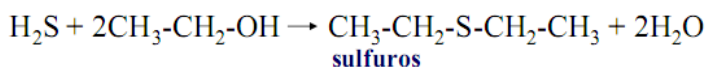
entre la distribución y la abundancia precursor se producen para las muestras de diferentes regiones y que estas diferencias podrían estar vinculados a diferentes concentraciones de GSH en los diversos lugares de viñedos que podría participar en la biosíntesis de GLUT-3MH.

El daño estructural de las bayas de uva parece aumentar los niveles de precursores. Procesamiento de uvas con un mezclador de palo que resulta en daño de la baya, dado los niveles de GLUT-3MH significativamente mayores en comparación con el mosto flor obtenido por medio de una prensa neumática. Algunas oxidaciones son esencial para la formación de (E) -2-hexenal. Parece, pues, que las técnicas destinadas a limitar la oxidación en mosto en efecto conduce a reducir las concentraciones de GLUT-3MH.

Se estudio el efecto de la oxidación de jugo de uva en cisteína y GSH conjugados en Sauvignon blanc y mostos Melón B. Ni los precursores cisteinilado ni los niveles de GLUT-4MMP se vieron afectados por la adición de oxígeno. Curiosamente, se observó un aumento de 2,5 veces para GLUT-3MH en el mosto Sauvignon blanc después de la adición de oxígeno en comparación con el vino de control sin adición de oxígeno. En consecuencia, GLUT-3MH que ocurre naturalmente en las uvas, también se formó durante las operaciones prefermentativa.

#### 3.1.1.2.3 Sulfuro de hidrogeno

El sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) contribuye a la "reducción", dando un mal sabor en los vinos con un olor que a menudo se describe como "huevo podrido" o putrefacción. Su umbral de detección corresponde a 1,6 g / L en vino blanco.



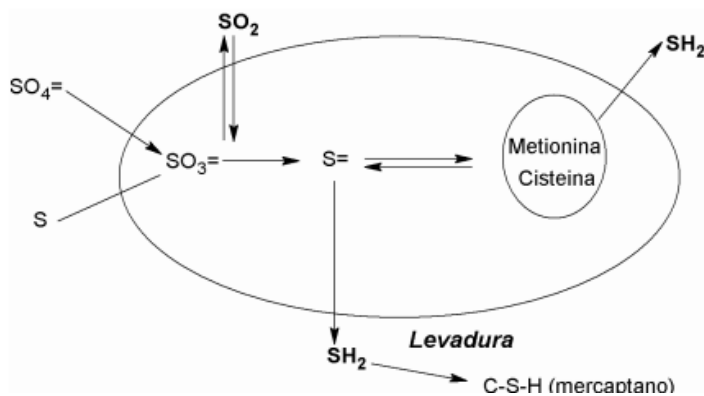
Varios factores influyen en la concentración de H<sub>2</sub>S producidos durante la fermentación alcohólica, tales como la presencia de compuestos de azufre, cepa de levadura, las condiciones de fermentación y el estado nutricional del mosto de uva .

### 3.1.1.2.3.1 Causas de la formación del aroma “reducido”



Se postula que GSH también puede ser una fuente potencial de  $H_2S$  ya que la cisteína, un aminoácido constituyente, puede ser degradada por desulfidrasa cisteína para formar  $H_2S$ .

### 3.1.1.2.3.2 Metabolismo del azufre:



Los resultados preliminares sugieren que el GSH puede contribuir hasta un 40% del  $H_2S$  liberados por levadura con deficiencia de nitrógeno que se incubaron en presencia de sulfato. Cuando las células de *S. cerevisiae* se preincubaron en un medio que contiene buthionine-(S, R)-sulphoximine (BSO), un inhibidor específico de la síntesis de GSH, la liberación  $H_2S$  fue suprimida por 75% y 45% durante la primera y segunda hora, respectivamente, después de ser transferido a un medio deficiente en nitrógeno.

Recientemente, también se ha demostrado que los vinos tratados con GSH antes del embotellado acumula más altos niveles de H<sub>2</sub>S durante el envejecimiento en botella de Sauvignon blanc vino en comparación con los vinos no tratados. Este efecto se amplificó bajo condiciones de oxígeno bajas y la presencia de concentraciones de cobre elevada (II). Los autores atribuyen la mayor acumulación de H<sub>2</sub>S a la capacidad antioxidante de GSH causando condiciones reductoras que promueven la producción de H<sub>2</sub>S .

#### 3.1.1.2.4 Protección de los compuestos volátiles del aroma en un vino tinto con bajas dosis de dióxido de azufre por una mezcla de glutatión, ácido cafeico y ácido gálico.

El deterioro oxidativo de los dos vinos blancos y tintos es un problema bien conocido en la elaboración del vino. El dióxido de azufre es el conservante más utilizado en la elaboración del vino, exhibiendo ambas propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Sin embargo, cuando los niveles de dióxido de azufre libre son entre 15 y 40 mg / L, la mayoría de los individuos comienzan a detectar un olor distintivo a fósforo quemado.

Se ha observado que la adición de una mezcla de glutatión y ácido cafeico a un vino blanco que contiene dióxido de azufre libre bajo tiene un efecto protector sobre ésteres volátiles y terpenos.

Los niveles de varios ésteres y otros volátiles en Merlot-Cabernet Sauvignon se mezclan vinos tintos con dióxido de azufre típico (35 mg / L), con dióxido de azufre baja (25 mg / L), y con dióxido de azufre baja (25 mg / L), además de una mezcla de antioxidantes (glutatión 20 mg / L, ácido cafeico 60 mg / L y ácido gálico 20 mg / L).

Después clarificación y estabilización, el vino fue embotellado en botellas de 750 ml, con tapones de corcho natural para el envejecimiento moderado. En los vinos de control, se añadió dióxido de azufre en el embotellado y los niveles de dióxido de azufre eran típicas, es decir, 35 mg / L de dióxido de azufre libre y 75 mg / L dióxido de azufre total.

En el vino tinto con el dióxido de azufre bajo, sin adición de dióxido de azufre se hizo en el embotellado. Niveles de dióxido de azufre fueron 25 mg /L libre dióxido de azufre y 58 mg /L de dióxido de azufre total.

El tercer vino experimental fue el vino con el dióxido de azufre bajo al que se añadió la mezcla de glutatión, ácido cafeico y ácido gálico al embotellado

Las botellas se almacenan en un cuarto oscuro a 18 ° C, se evaluaron en el embotellado, y después de 18 y 36 meses de envejecimiento. La mayoría de los volátiles disminuyeron durante el almacenamiento del vino.

En el embotellado y después de 18 meses de almacenamiento, los tres vinos exhibieron niveles similares de compuestos volátiles. Después de 36 meses de almacenamiento, los vinos con dióxido de azufre bajo mostraron niveles más bajos de muchos compuestos volátiles, tales como acetato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo y 2-feniletanol. Por otro lado, los vinos con dióxido de azufre bajo, más la mezcla de antioxidantes exhibieron niveles similares de la mayoría de los compuestos volátiles en comparación con los vinos con dióxido de azufre típico. Los presentes resultados indican que una mezcla de glutatión, ácido cafeico y ácido gálico puede proteger ésteres y otros compuestos volátiles en el vino tinto joven con el dióxido de azufre bajo, y puede sustituir parte del dióxido de azufre que suele utilizar.



### 3.1.1.2.5 Reducción de carácter aromático envejecimiento atípico o UTA (untypical aging)

Esta desviación organoléptica se presenta fundamentalmente en vinos blancos de añejamiento prolongado, pero también y especialmente en los últimos años, se ha visto su incidencia en vinos de consumo anual. El vino afectado, si bien puede no mostrar síntomas visuales de oxidación, pierde rápidamente su frutalidad y aparecen notas que han sido descritas como "suavizante de ropa", "barniz", ó "naftalina"; tales descriptores han

sido atribuidos a la 2-aminoacetofenona, un compuesto derivado del ácido indol-acético o AIA (una hormona vegetal normalmente presente en la uva).

Pero el glutatión interviene en esta maraña de rutas metabólicas que comienzan en la planta y repercuten luego en el vino. Al parecer, a partir del año 1994 en Francia hubo un vuelco tecnológico desde la llamada viticultura con labranza cero o labranza mínima y uso de herbicidas a la llamada viticultura biodinámica y lucha razonada.

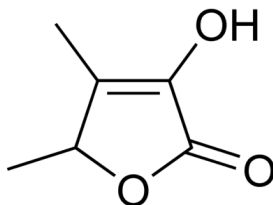
Los interfiliarios, antes limpios de toda vegetación, se cubrieron rápidamente con distintas especies vegetales, algunas nativas y mantenidas ex profeso, otras cultivadas en forma de coberturas vegetales. Añosas vides otrora acostumbradas a competir por agua y nitrógeno, entre otros metabolitos, sólo con sus pares, se vieron ahora sometidas a un déficit de éstos debido al consumo extra ejercido por estas coberturas "extranjeras".

Resultado 1: estrés hídrico y desbalances hormonales respecto del AIA, que al parecer gatillan la formación de 2-aminoacetofenona en el vino (solo uno de los compuestos implicados, aunque pueden haber más).

Resultado 2: menos nitrógeno general y una disminución marcada de los niveles de glutatión, lo que resultó en vinos "más oxidables", que perdían rápidamente sus aromas frutales más delicados. Posteriormente se comprobó que altos niveles de glutatión previenen la formación de 2-aminoacetofenona y de sotolón, dos poderosos marcadores de oxidación.

#### 3.1.1.2.5.1 Sotolon y 2-aminoacetofenona

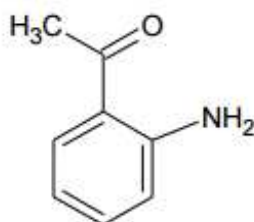
Sotolon (4,5-dimetil-3-hidroxi-2(5H)-furanona) es un compuesto volátil con un intenso olor de curry y su umbral de percepción corresponde a 8 g / L en el vino, producido por la degradación oxidativa de la treonina.



Esta furanona contribuye a los aromas de "vins jaunes" (vinos amarillos) del Jura y jerez. Higos secos y matices rancios en vinos generosos franceses. Se ha establecido la contribución de sotolon para el carácter atípico envejecimiento de los vinos blancos secos.



2-aminoacetofenona (2-AAP) es un envejecimiento atípico mal sabor en el vino que confiere lana mojada, el alcohol fusel, naftaleno y muebles de aromas pulidos si están presentes en concentraciones que exceden su umbral sensorial de 0,5 a 1,5 mg / L en el vino y aumenta por la oxidación de su precursor en crianza en barricas. Este compuesto se ha detectado en los vinos blancos alemanes desde finales de 1980.



2 - aminoacetofenona (2-AAP)

Se añadió GSH 10 mg / L a Sauvignon blanc vino en el embotellado para demostrar que puede limitar la formación de éstos, tanto el envejecimiento atípico y malos olores durante tres años de almacenamiento.

3.1.1.2.5.1.1 Concentración de sotolón y 2-aminoacetofenona para el control y GSH complementado en vinos a lo largo de un período de almacenamiento de botellas de tres años

Ageing off-flavour	Wine	Wine + 10 mg/L GSH
Sotolon (µg/L)	9	3
2-Aminoacetophenone (ng/L)	215	125

La concentración sotolon en el vino de control supera su umbral de percepción de 8 mg / L en el vino, mientras que la adición de GSH inhibe su desarrollo a niveles por debajo de su umbral. Aunque los niveles de 2-aminoacetofenona eran todavía menor que el umbral de percepción, es evidente que el GSH suprime la formación de este compuesto en casi la mitad. Ningún mecanismo fue propuesto por los autores.

### 3.1.1.3 Glutación y la Fermentación Maloláctica (FML).

Informes sobre GSH en relación con la fermentación maloláctica (FML) son escasos.

Uno de los estudios es sobre el efecto de GSH en la fermentación maloláctica (FML) y otro sobre la influencia de la FML en los niveles de GSH en el vino.

En otro estudio observaron que la adición de GSH a los vinos de pH bajos promovió el crecimiento de *Oenococcus oeni* y aceleró la velocidad de la FML.

Evaluaron el contenido de glutación reducido oxidado y total de cinco vinos Merlot antes y después de la FML. Sus resultados mostraron que ninguna tendencia podría ser deducido del GSH individuo o cuantificaciones GSSG aunque el contenido de GSH reducido en general parecía bien permanecer constante o disminuir durante la FML.

Sin embargo, el contenido total de GSH disminuyó significativamente durante la FML (entre 21% y 36% para las cinco muestras).

En otro estudio sobre influencia del glutación en la fermentación maloláctica (es un proceso metabólico que contempla la reducción de la acidez de los vinos) en vinos de la variedad Niágara.

La variedad Niágara, procedente de la región de Santa Maria, RS, tuvo su vinificación durante la cosecha de 2002 e inoculación con un cultivo comercial de *Leuconostoc venas*, *Viniflora oenos*, para inducir la fermentación maloláctica. Este tratamiento, fue comparado con la aparición espontánea de la fermentación maloláctica (control) y con vinificaciones sin y con adición de 50 ug/ml de glutación.

Las determinaciones de los ácidos orgánicos se hicieron mediante cromatografía líquida de alta eficiencia. Se hicieron análisis de °Brix, pH, acidez total, dióxido de azufre total, azúcares reductores y alcohol en los mostos y vinos correspondientes. Las muestras para determinación de ácidos orgánicos fueron colectadas en intervalos de 3°Brix durante la fermentación, al final de la fermentación alcohólica, durante la fermentación maloláctica, antes del primer trasiego y antes del embotellado.

El valor medio de ácido málico hallado en los mostos de Niágara fue de 2, 202 g/l. Al final de la fermentación alcohólica estos valores pasaron a 0, 406 g/l.

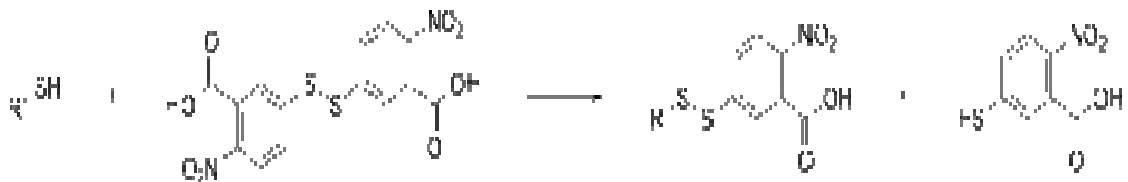
Después de la fermentación maloláctica, en tres de los cuatro tratamientos, no fue observado ácido málico alguno. La fermentación maloláctica ocurre normalmente con adición de glutatión, la cual ejerce un probable efecto benéfico, por lo que puede ser utilizada cuando esta fermentación secundaria sea deseable.

### 3.1.1.4 Métodos de análisis cuantitativos del glutatión

Como resultado del creciente interés en GSH, diferentes métodos de análisis han sido desarrollados para la determinación de la reducción, oxidado y el total de glutatión en las uvas, mosto, vino y preparaciones de levadura seca inactiva.

#### 3.1.1.4.1 Métodos enzimáticos:

Basados en la reacción de GSH con 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) , también llamada Prueba de Ellman´s para dar ácido 2-nitro-5-tiobenzoico



Los tioles reaccionan con este compuesto, la escisión del enlace disulfuro para dar 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB<sup>2-</sup>), que ioniza el TNB 2- dianión en agua a pH neutro y alcalino. Este TNB 2- ion tiene un color amarillo. Esta reacción es rápida y estequiométrica, con la adición de un mol de tiol liberación de un mol de TNB.

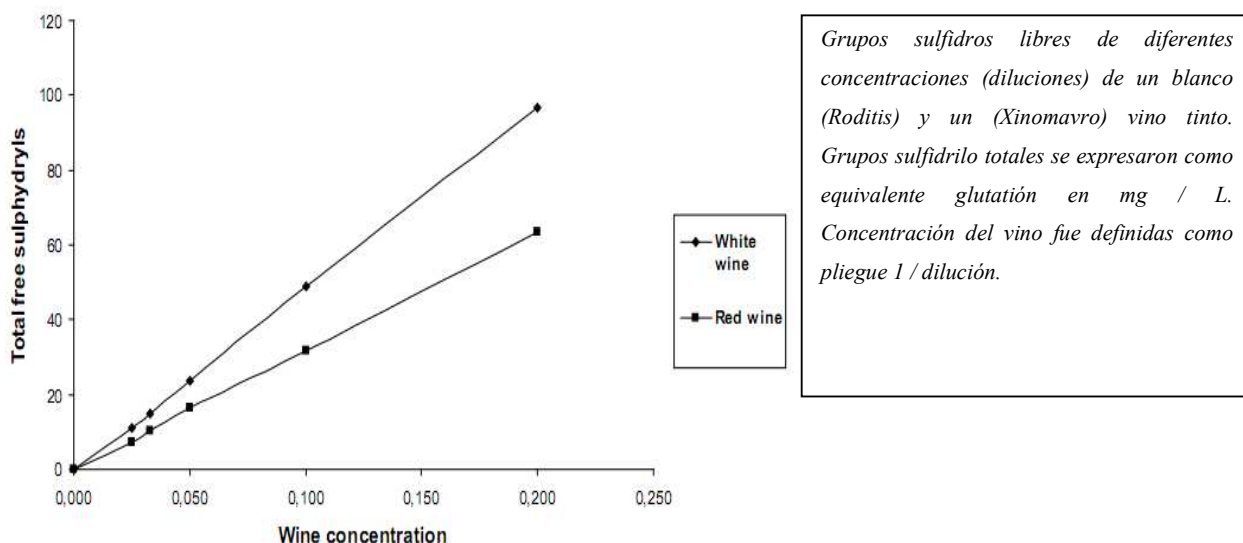
El TNB 2- se cuantificación la absorción espectrofotométrica a 412 nm se han utilizado para la determinación del total de GSH en las bayas, raquis y hojas de vid. Reactivo de Ellman se puede utilizar para la medición de los tioles en masa de bajo peso molecular tales como glutatión en ambas soluciones puras y muestras biológicas.

### 3.1.1.4.1.1 Investigación del Contenido Total de sulfidrilo libres de Varios Vinos Blanco y Tintos

El contenido total de Grupos sulfidrilo libres fueron evaluados en varios vinos blancos y tintos. El Método de Ellman fue adaptado para muestras de vino para la determinación de grupos -SH totales.

Se examinaron Veintidós (22) vinos secos de los viñedos griegos. Vinos Moschoflero, Assyrtiko, Moschato Alexandrias, Robola, Debina, Roditis, Agiorgitiko y Xinomavro fueron clasificados como "Denominación de Origen", mientras Vilana, Athiri, Savatiano, Malagousia, Trebbiano, Chardonnay, Traminer, Riesling, Sauvignon blanc, cabernet sauvignon, mezcla Kotsifali-Mandilaria, Limnio, Merlot y Syrah fueron vinos de la región. La mayoría de los vinos blancos tenían un año de edad, mientras que Traminer y Riesling dos años. La mayoría de los vinos tintos fueron dos años de edad, mientras que Xinomavro tenía tres años.

En la Fig. 1, se presentan concentraciones totales de sulfidrilo libre de diferentes diluciones de un blanco y un tinto. En ambos casos una ecuación lineal fue tomada por el trazado de los valores -SH y dilución vino, indicando la idoneidad del procedimiento.



La Tabla 1 muestra el total de los grupos sulfidrilo libres de varios vinos blancos y tintos, expresados como equivalentes glutación en mg / L. En la mayoría de los casos, los vinos blancos mostraron mayores sulfidrilo libres totales que los vinos tintos.

TABLE 1  
Total sulphhydryl groups of several white and red wines.

White wines	Total -SH	Red wines	Total -SH
Moschofilero	425 ± 4	Agiorgitiko	239 ± 2
Assyrtiko	472 ± 4	Cabernet Sauvignon	163 ± 3
Vilana	435 ± 3	Kotsifali-Mandilaria blend	467 ± 1
Muscat of Alexandria	427 ± 1	Limnio	352 ± 3
Athiri	734 ± 4	Xinomavro	333 ± 7
Robola	573 ± 3	Merlot	185 ± 4
Debina	603 ± 2	Syrah	174 ± 1
Savatiano	502 ± 4	Mean/range	273/163-467
Malagousia	431 ± 2		
Trebbiano	622 ± 4		
Roditis	514 ± 2		
Chardonnay	645 ± 5		
Traminer	567 ± 4		
Riesling	315 ± 2		
Sauvignon blanc	436 ± 5		
Mean/range	513/315-734		

En los vinos blancos, como el glutatión, estaban en el rango de 315 a 734 y de los vinos tintos en el rango de 163 a 467 mg / L. En la mayoría de los casos, los vinos blancos mostraron valores más altos que los vinos tintos. Los altos valores de sulfidrilos totales de vinos blancos y tintos indican su potencial contribución a la capacidad antioxidante del vino.

El método utilizado determina el total de sulfidrilos libres, es decir, la suma del total de grupos sulfidrilo libres de amino- ácidos pequeños, péptidos y los polipéptidos de las proteínas.

Por lo tanto, los valores más altos de los vinos blancos se pueden atribuir a la eliminación de los polipéptidos proteínas a partir de los vinos tintos, después de su reacción con taninos. Entre amino tiol péptidos ácido pequeño de vino, se sabe que el glutatión juega un papel significativo en la oxidación de los mostos y protección de aroma del vino, y existe en concentraciones más altas que las otras.

#### 3.1.1.4.2 Métodos de cromatografía de líquidos:

Como un método de electroforesis capilar se han desarrollado para la cuantificación de GSH y/o GSSG en el mosto de uva y el vino que se resumen en la siguiente tabla.

Method	Detector <sup>a</sup>	Label <sup>b</sup>	Matrix	Compounds	LOD <sup>c</sup>	References
HPLC	DAD	DTNB	Grape juice	Total GSH		Cheyrier <i>et al.</i> , 1989
HPLC	FD	OPA	Grape juice Wine	GSH	1 µg/L	Park <i>et al.</i> , 2000
HPLC	ESI-MS/MS		Grape juice Wine	GSH, GSSG	0.2 mg/L (GSSG) 0.4 mg/L (GSH)	du Toit <i>et al.</i> , 2007
CE	LIF	MBB	Grape juice Wine	GSH	0.02 mg/L	Lavigne <i>et al.</i> , 2007
HPLC	FD	NDA	White wine <sup>a</sup> Red wine <sup>a</sup>	GSH, GSSG	0.03 mg/L (GSH) <sup>**</sup> 2.45 mg/L (GSSG) 3.06 mg/L (GSSG)	Marchand & de Revel, 2010
HPLC	FD	OPA	Grape juice Wine	GSH	0.06 mg/L	Janes <i>et al.</i> , 2010
UPLC	PAD	pBQ	Grape juice Wine	GSH	0.017 mg/L	Fracassetti <i>et al.</i> , 2011

A )DAD: detector de diodos; FD: Detector fluorescente; ESI-MS / MS: ionización por electrospray conjuntamente espectrometría de masas; PAD: foto detector de red

b) DNTB: 5,5 ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) reactivo Ellman' s; OPA: o-phthaldehyde; MBB: monobromobimano ;NDA: 2,3-naphthalenedialdehyde ; pBQ: parabenzoquinona

c) LD: límite de detección

#### 3.1.1.4.2.1 Preparación y caracterización de micropartículas de beta-coclidextrina/Glutatión y Quitosano/Glutatión obtenido mediante SPRAY-DRYING.

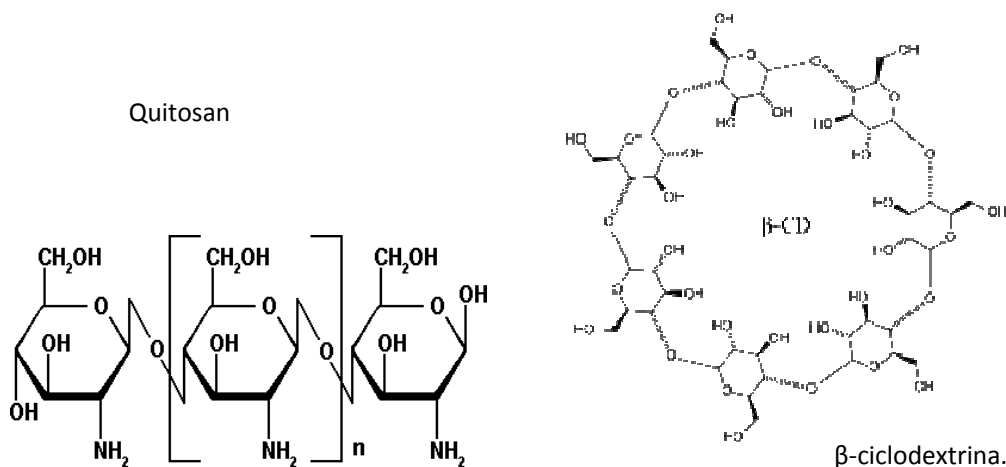
El glutatión está presente de forma natural en pequeñas cantidades en las uvas, jugos y vinos, y tiene el importante papel de la inhibición de la oxidación. Sin embargo, la adición de GSH en los alimentos es limitada debido a su inestabilidad y pobre biodisponibilidad.

En vista de esto, la encapsulación de GSH en un sistema polimérico capaz de proteger el péptido contra condiciones de oxidación, y que actúa como un mecanismo de liberación controlada, mejora su funcionalidad y su biodisponibilidad parece ser una alternativa interesante. El objetivo de este trabajo fue preparar y caracterizar micropartículas secadas por pulverización obtenidas utilizando glutatión (GSH) como un compuesto activo hidrófilo y β-ciclodextrina o quitosano, como polímeros.

Las micropartículas obtenidas se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopia de infrarrojos (FT-IR) y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las micrografías mostraron que las microesferas eran esféricas, con superficies lisas para micropartículas de quitosano/GSH y superficies rugosas para β-cyclodextrin/GSH.

Se observó una amplia distribución de tamaño de partícula.

FT-IR demostró que GSH había interactuado con quitosano(Chitosan) y β-ciclodextrina.



La DSC mostró que el proceso de encapsulación produce una marcada disminución en la cristalinidad de GSH conferido a la droga un estado casi amorfo.

Los resultados sugieren que el quitosano y  $\beta$ -ciclodextrina son prometedores medios de soporte para el uso de GSH en vinos como un antioxidante y/o un ingrediente funcional.

#### 3.1.1.4.2.2 Determinación del glutatión en mostos y vinos mediante electroforesis capilar

El presente método permite determinar la concentración de glutatión en mostos y vinos en un rango de concentración de 0 a 40 mg/l. Para ello se utiliza la electroforesis capilar (EC) junto con una detección fluorimétrica (LIF).

El método de determinación utilizado se basa en la modificación de los grupos funcionales -SH producida por el monobromobimano (MBB). Antes de proceder al análisis, las muestras de mostos o de vinos en bruto se clarifican por centrifugación. El análisis de vinos embotellados no requiere clarificación previa.

El método desarrollado basado en la electroforesis capilar, es una adaptación para la determinación de tioles no volátiles en las hojas de álamo mediante CLAR con detección fluorimétrica.

La separación de los solutos de una mezcla por electroforesis capilar resulta de la migración diferencial de dichos solutos en un electrolito. El capilar está lleno de electrolito. La muestra se inyecta por uno de los extremos del capilar. La acción del campo eléctrico creado por los electrodos que se encuentran sumergidos en el electrolito provoca la separación de los solutos debido a las diferentes velocidades de migración. La detección se produce cerca del extremo

opuesto del capilar y se registra en forma de picos. En condiciones experimentales concretas, los tiempos de migración constituyen un criterio de identificación de las sustancias químicas y el área de un pico es proporcional a la cantidad inyectada.

Se han definido algunos elementos de validación interna, pero no se ha adoptado un sistema de validación que se ajuste al protocolo para la planificación, la realización y la interpretación de los estudios de rendimiento de los métodos de análisis.

El vino se utiliza como patrón para realizar las curvas de calibrado y las pruebas de repetibilidad de cada compuesto. Cada concentración se calcula a partir del promedio de tres determinaciones obtenidas utilizando la recta de regresión de la curva de calibrado.

Los resultados se expresan en mg/l. Las regresiones lineales y los coeficientes de correlación se calculan según el método de los mínimos cuadrados. Las disoluciones madres de los tioles se elaboran a partir de una solución de HCl/EDTA, por lo que pueden conservarse durante varios días a 6 °C sin que se den pérdidas.

El límite de detección se estima mediante la dilución sucesiva de las disoluciones madres, con una relación señal/ruido mayor o igual que 3.

Cada tiol tiene un intervalo de linealidad distinto

	Intervalo de linealidad	Regresión lineal	Coefficiente de correlación
Homocisteína	0 - 15 mg/l	$y = 0,459x - 0,231$	0,9987
Cisteína	0 - 15 mg/l	$y = 0,374x - 0,131$	0,9979
Glutatión	0 - 40 mg/l	$y = 0,583x - 0,948$	0,9966
N-acetilcisteína	0 - 10 mg/l	$y = 0,256x - 0,085$	0,9982

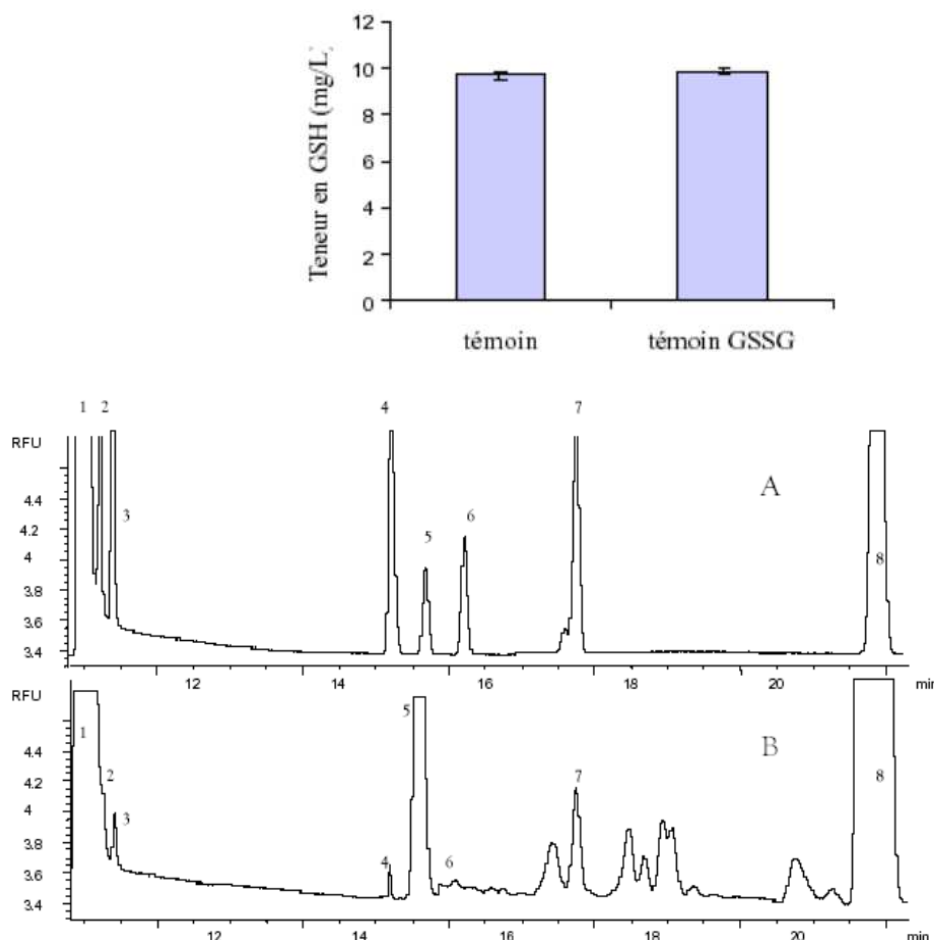
Para determinar la repetibilidad se comparan diez análisis de una misma muestra de vino. Si la concentración de tioles es de 10 mg/l, el coeficiente de variación para el glutatión, la homocisteína, la cisteína y la N-acetilcisteína es, respectivamente, 6,0 %, 3,2 %, 4,8 % y 6,4 %.

El límite de detección del glutatión es de 20 µg/l y el límite de cuantificación está en 60 µg/l.

A la concentración en que se utiliza en la muestra, el DTT permite que se estabilicen los grupos sulfidrilo, que son inestables en medio básico y que se oxidan muy fácilmente con las quinonas (que proceden de la oxidación de los compuestos fenólicos), pero sin romper los puentes disulfuro. De hecho, en las condiciones experimentales del método, la concentración



de la forma reducida del glutatión (GSH) de un vino es equivalente se haya añadido o no glutatión en su forma oxidada (GSSG) a razón de 10 mg/l. El método permite, por lo tanto, determinar el glutatión en forma reducida.



Ejemplo de separación de los tioles no volátiles conocidos en una solución HCl/EDTA (A) y en un mosto de uva (B).

1. DTT, 2. homocisteína, 3. cisteína, 4. Cys-Gly, 5. GSH, 6. g Glu-Cys, 7. N-acetilcisteína, 8. SO<sub>2</sub>

### 3.1.1.4.2.3 Cuantificación de glutatión, catequina, y Ac. cafeico en el zumo de uva y el vino por un novedoso método de cromatografía líquida de ultra rendimiento.

Esta investigación tuvo como objetivo el desarrollo y validación de un Método de cromatografía ultra-líquida (UPLC) para la cuantificación de glutatión (GSH) en el jugo de uva y en el vino blanco después de derivatización con p-benzoquinona), para introducir cromóforos haciendo la detección por UV posible.

Los compuestos fenólicos, catequina y ácido cafeico que se producen en vino blanco y tienen efectos antioxidantes, también son cuantificables en el mismo análisis. Catequina es la unidad

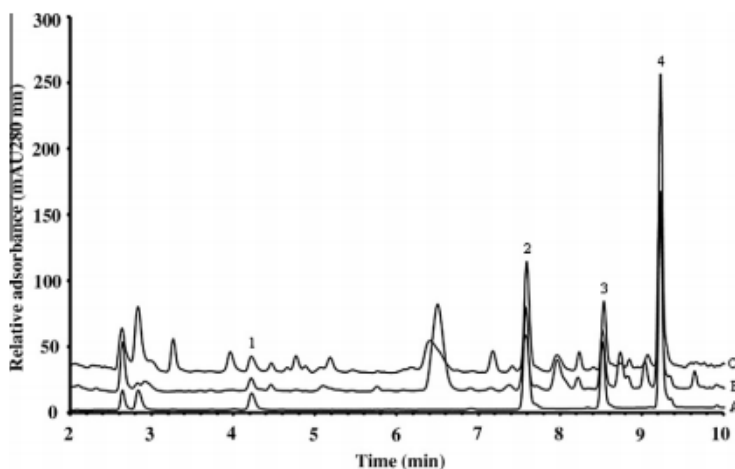
monomérica básica de la uva y el vino taninos y ácido cafeico, cuando esta esterificado con ácido tartárico, desempeña un papel relevante en la uva siendo la formación Reacción del producto en uva (GRP).

El método analítico propuesto mostró una buena linealidad, repetibilidad y repetibilidad intermedia, así como de alta recuperación (> 85%). Se aplicó para la cuantificación de GSH, catequina y ácido cafeico en los mostos del Sur de África (12) y los vinos blancos (43). Este nuevo método tendrá largo impacto en el tiempo y los costos de los análisis para la industria del vino a través de permitir una rápida rutina de cuantificación de GSH, catequina y ácido cafeico.

Los tiempos de elución fueron 4.2, 7.5 y 9,2 min para derivatizado de GSH, catequina y ácido cafeico, respectivamente, con la elución MPA derivatizada en 8,2 min. La derivatización de GSH con PBQ es rápido, preciso y sencillo; ningún paso de purificación, que no sea la centrifugación, ya sea mosto o muestras de vino blanco era necesario antes de la reacción de derivación.

El tiempo de análisis cortos y la preparación rápida de muestras, que incluyó una centrifugación rápida para el período corto de tiempo, permitiendo que los compuestos sean cuantificados en menos de 20 min.

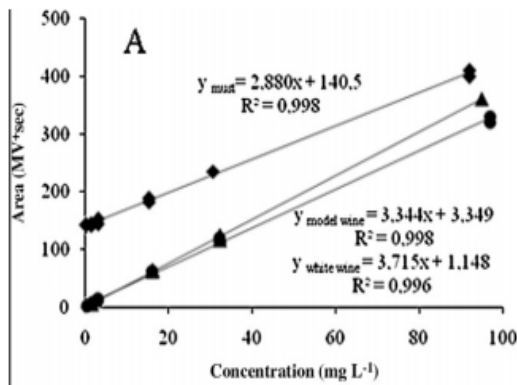
Todos los compuestos investigados fueron representados por picos separados de la línea de base



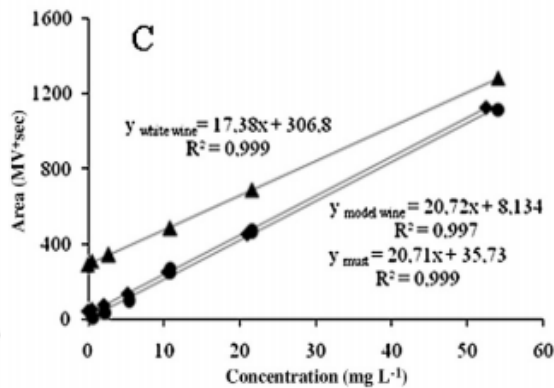
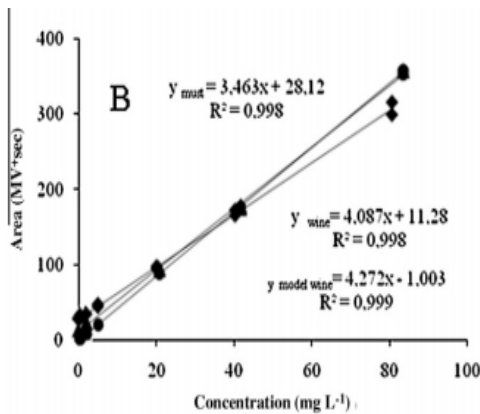
*La separación cromatográfica y detección a 280 nm de los tres compuestos en cumbres de : la solución (A), vino modelo (B) el vino blanco (C): 1: GSH-HQ, 2: catequina, 3: MPA-HQ, 4 : ácido cafeico.*

El nivel de concentración enseñaron mostrar una respuesta de rango lineal para la concentración añadida de GSH que van desde 0,057 hasta 100 mg/L, Catequina que van desde 0,048 a 80 mg/L y ácido cafeico que van desde 0.0088 a 50 mg/L; rangos de estas concentraciones se ajustan a las que se encuentran previamente en el jugo y el vino .

Los gráficos de calibración para el jugo, el vino sintético y vino blanco, respectivamente se muestran:



Gráficos de calibración en la solución de vino sintético (circulo), jugo blanco (rombo) Y vino blanco (triangulo) .A: GSH (detectado a 303 nm), B: catequina (detectado a 280 nm), C: ácido cafeico (detectado a 320 nm).



Con el fin de evaluar si el método es adecuado para su uso como una herramienta de rutina analítica, 12 muestras de jugo de uva y 43 muestras de vino blanco.

Descripción de zumo de uva y vinos blancos analizó y su cuantificación de GSH, catequina y cafeico.

Tabla 4: Descripción de zumo de uva y vinos blancos analizados y su cuantificación de GSH catequina y cafeico

Matriz	Cultivar	Vendimia	Descripción	GSH mg/l	Catequina mg/l	Cafeico mg/l
Mosto	Sauvignon Blanc	2010	muestra de tanque	40.0	59	0,78
Mosto	Sauvignon Blanc	2010	muestra de tanque	39.6	63	0.83
Mosto	Sauvignon Blanc	2010	muestra de tanque	10.6	66	0.51
Mosto	Sauvignon Blanc	2010	muestra de tanque	41.4	45	0.41
Mosto	Sauvignon Blanc	2010	muestra de tanque	41.8	87	0.59
Mosto	Sauvignon Blanc	2010	muestra de tanque	372	7.7	3.7
Mosto	Sauvignon Blanc	2010	muestra de tanque	316	7.0	1.0
Mosto	Sauvignon Blanc	2010	muestra de tanque	423	7.0	1.0
Mosto	Sauvignon Blanc	2010	muestra de tanque	365	6.6	1.0
Mosto	Semillon	2010	muestra de tanque	10.1	44	0.82
Mosto	Semillon	2010	muestra de tanque	20.7	34	0.50
Mosto	Chenin Blanc	2010	muestra de tanque	1.1	0.73	0.51
Vino	Sauvignon Blanc	2010	muestra de tanque	9.8	230	0.54
Vino	Sauvignon Blanc	2010	muestra de tanque	7.0	15	0.16
Vino	Sauvignon Blanc	2010	muestra de tanque	83	2.5	6.2
Vino	Sauvignon Blanc	2010	muestra de tanque	68	8.0	19.4
Vino	Sauvignon Blanc	2010	muestra de tanque	18	9.0	6.6
Vino	Sauvignon Blanc	2010	muestra de tanque	9.1	128	0.87
Vino	Sauvignon Blanc	2010	muestra de tanque	6.6	31	0.89
Vino	Sauvignon Blanc	2010	muestra de tanque	126	2.3	1.2
Vino	Sauvignon Blanc	2010	muestra de tanque	4.2	27	0.66
Vino	Sauvignon Blanc	2010	muestra de tanque	274	2.7	1.2
Vino	Sauvignon Blanc	2010	muestra de tanque	5.9	97	0.29
Vino	Sauvignon Blanc	2010	muestra de tanque	118	2.0	1.0
Vino	Sauvignon Blanc	2010	muestra de tanque	115	1.2	1.0
Vino	Chenin Blanc	2010	muestra de tanque	104	9.7	18.5
Vino	Chenin Blanc	2010	muestra de tanque	4.3	32	0.51
Vino	Chenin Blanc	2010	muestra de tanque	8.3	17	0.28
Vino	Chenin Blanc	2010	muestra de tanque	5.8	18	0.84
Vino	Chenin Blanc	2010	muestra de tanque	4.4	14	0.87

Vino	Chenin Blanc	2010	muestra de tanque	35	2.9	1.2
Vino	Chenin Blanc	2010	muestra de tanque	130	2.5	11.7
Vino	Chenin Blanc	2010	muestra de tanque	108	1.8	7.1
Vino	Chenin Blanc	2010	muestra de tanque	77	3.2	6.1
Vino	Chenin Blanc	2010	muestra de tanque	0.39	20	0.89
Vino	Chenin Blanc	2010	muestra de tanque	0.27	3.9	7.2
Vino	Chenin Blanc	2010	muestra de tanque	0.34	1.4	3.7
Vino	Chenin Blanc	2010	muestra de tanque	5.9	20	0.65
Vino	Chenin Blanc	2010	muestra de tanque	n.d	2.1	3.1
Vino	Chenin Blanc	2010	muestra de tanque	n.d	2.1	2.9
Vino	Chenin Blanc	2010	muestra de tanque	0.19	1.9	2.8
Vino	Chenin Blanc	2010	muestra de tanque	0.23	4.8	7.1
Vino	Chenin Blanc	2010	muestra de tanque	72	4.0	1.0
Vino	Chenin Blanc	2010	muestra de tanque	4.9	36	0.72
Vino	Sauvignon Blanc	2009	vino en botella	n.d	5.3	5.5
Vino	Sauvignon Blanc	2009	vino en botella	n.d	4.6	2.7
Vino	Petillant Blanc	2009	vino en botella	0.50	11.7	5.0
Vino	Semillon	2009	vino en botella	0.27	5.9	2.8
Vino	Sauvignon Blanc	2008	vino en botella	n.d	5.0	8.0
Vino	Sauvignon Blanc	2008	vino en botella	0.27	5.9	2.8
Vino	Sauvignon Blanc	2008	vino en botella	0.13	1.6	6.4
Vino	Sauvignon Blanc	2008	vino en botella	n.d	4.4	2.9
Vino	Sauvignon Blanc	2008	vino en botella	n.d	2.5	3.9
Vino	Chardonnay	2007	vino en botella	n.d	3.9	5.3
Vino	Sauvignon Blanc	2004	vino en botella	n.d	2.2	5.3

Como puede verse en la Tabla, la concentración más alta detectada GSH fue 27.4 mg/L, Que fue, en general, mayor en los vinos blancos de la añada 2010.

Durante el envejecimiento del vino, las concentraciones de GSH son conocidos por disminuir, dando lugar a concentraciones más bajas de este compuesto en vinos de más edad, que podrían explicar los niveles más altos que observamos en el vino 2010 en general.

Las cantidades que detectamos fueron también de acuerdo con hallazgos anteriores. Los niveles promedio de GSH de 2010 muestras de Sauvignon, Petillanc blanc (10mg/L).

Fue mayor en muestras de la variedad Chenin 2010 de muestras, Petillanc blanc (5 mg/L ) Mosto blanc .Sauvignon se trata a menudo más por reducción en Sudáfrica, con la adición de N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y mayores niveles de SO<sub>2</sub> al jugo, que conduce a una elevada conservación de los niveles de GSH en el jugo resultante y vinos.

Muchos de estos métodos requieren mucho tiempo, lo que requiere extensa preparación de la muestra y sólo permitir la cuantificación de GSH con la excepción de la cuantificación de catequina y caftarico.

Es evidente que un método preciso y rápido que no requiere una amplia preparación de la muestra para GSH y GSSG determinación en el jugo de uva y el vino sería de gran valor para la investigación adicional.

### 3.1.2 Glutación y Saccharomyces cereviseae

GSH es el compuesto orgánico que contiene azufre más abundante en *S. cereviseae*. Dependiendo de las condiciones de crecimiento, GSH puede dar cuenta de 0,5 a 1% del peso seco celular y representa más de 95% de los tioles no proteicos en *S. cereviseae*.

La alta concentración de GSH en células de levadura (hasta 10 mM), su bajo potencial redox de  $E'o = -240$  mV para el intercambio de disulfuro de tior, así como el hecho de que el GSH se mantiene en su estado reducido por el glutati6n NADPH-dependiente disulfuro reductasa, render este trip6ptido un tamp6n redox celular.

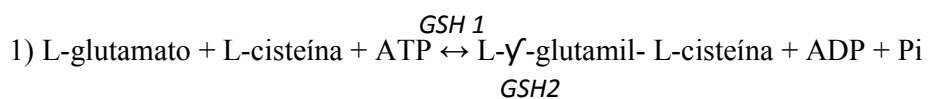
GSH est6 implicado en muchos mecanismos de respuesta al estr6s en *S. cereviseae* tales como azufre e inanici6n de nitr6geno, el estr6s oxidativo y la detoxificaci6n de metales pesados y xenobi6ticos. Tambi6n puede jugar un papel en el mantenimiento de las funciones b6sicas de la c6lula tales como la estructura celular de integridad.

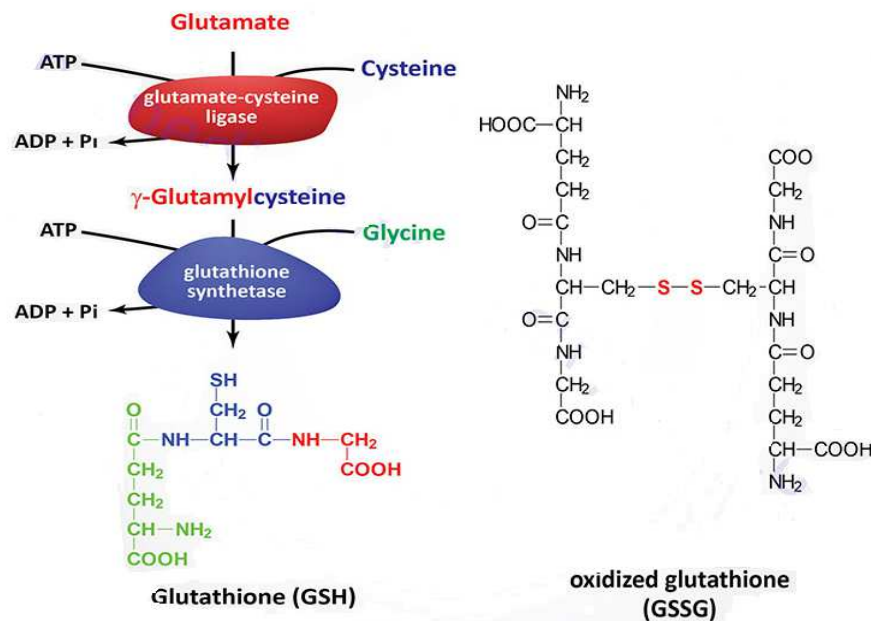
#### 3.1.2.1 S6ntesis de glutati6n

GSH se sintetiza intracelularmente en el citosol por las acciones consecutivas de sintetasa  $\gamma$ -glutamilciste6na:  $\gamma$ -GCS (Reacci6n 1)

y L- $\gamma$ -glutamylcysteine-glicina  $\gamma$ -ligasa: GSH sintetasa (Reacci6n 2).

Estas enzimas son, respectivamente, codificados por los genes GSH1 y GSH2.





La actividad de  $\gamma$ -GCS es inhibida por retroalimentación de GSH (pero no GSSG) para evitar el exceso de acumulación de GSH en la célula, que es de importancia fisiológica. La cisteína es usualmente el sustrato limitante en la síntesis de GSH. GSH sintetasa, a diferencia de  $\gamma$ -GCS, parece ser una enzima no regulada.

### 3.1.2.2 Transporte de glutatión

Además de la biosíntesis intracelular, GSH también puede ser tomado desde el entorno extracelular, tal como el medio mosto. Transportador Hgt1p tiene una alta afinidad GSH, ha sido identificado, clonado y caracterizado en *S. cerevisiae*. El transportador, un polipéptido ácido 799-amino, está codificada por el gen TGH1.

Miyake identifico dos sistemas de transporte de GSH distintas, cinéticamente distinguibles en *S. cerevisiae*, a saber GSH-P1 y GSH-P2.

GSH-P1 es una alta afinidad ( $K_m = 45 \text{ M}$ ), sistema impulsado y regulado ATP, mientras que GSH-P2 tiene una menor afinidad ( $K_m > 2 \text{ mM}$ ) y no está regulado.

También se identificaron GSH11 como el gen que codifica GSH-P1 estructural. El gen GSH11 ya ha sido designado como OPT1 y TGH1 y en la actualidad se acepta que la Hgt1p y GSH-P1 son homólogos y el principal transportador de GSH en la membrana plasmática de *S. cerevisiae*.



El transportador de alta afinidad es capaz de transportar tanto GSH y GSH conjugada en el citoplasma de la célula. La actividad de Hgt1p / GSH-P1 no sólo está regulada por cisteína, sino también por la metionina y GSH.

Ycf1p, el ortólogo de la levadura de la proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos de mamíferos (MRP1), actúa como una bomba de vacuola mediada por el transporte dependiente de ATP de GSH y glutatión S-conjugados en la vacuola de *S. cerevisiae*. Esta bomba vacuolar, sin embargo, tiene una afinidad muy baja para GSH ( $K_m = \pm 15 \text{ mM}$ ) y su función principal es el transporte de glutatión S-conjugados.

Un intercambiador novedoso GSH, Gex1, fue identificado recientemente en *S. cerevisiae* y se encuentra tanto en la membrana vacuolar y plasma. Las células superproductoras Gex1, muestran un bajo contenido de GSH intracelulares y extracelulares alto contenido de GSH. Además, la sobreproducción de Gex1 induce la acidificación del citosol de levadura, probatorias de la posibilidad de que Gex1 es un antiporter GSH / protón. Se requiere más investigación para entender el transporte de GSH en el medio extracelular.

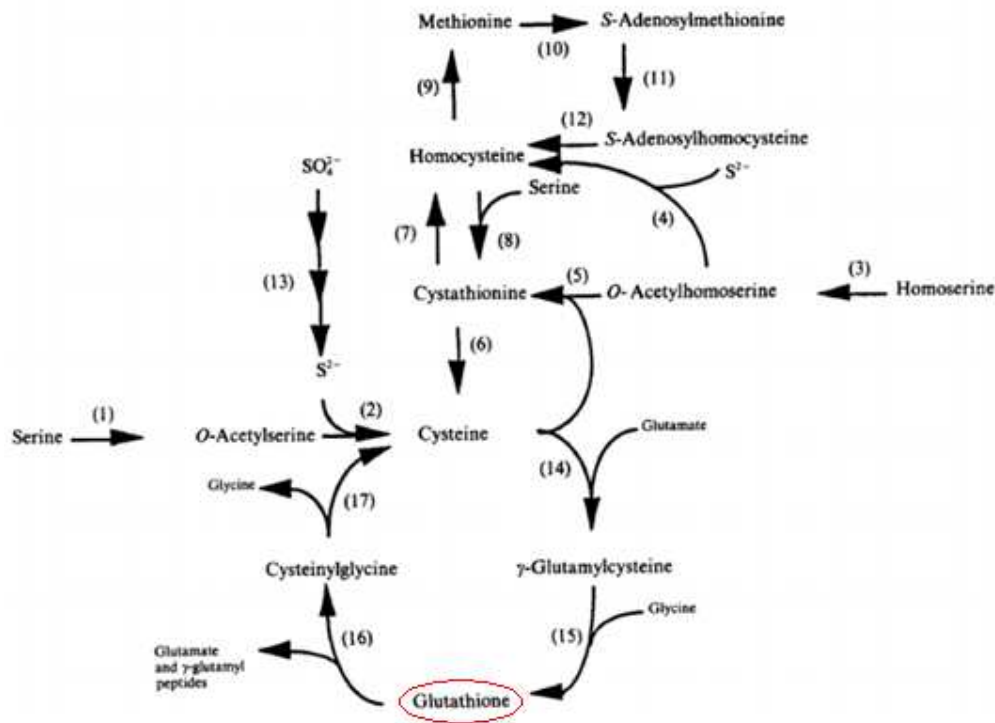
### 3.1.2.3 Degradación de glutatión

Una vez GSH se transporta en la vacuola de la célula, que se degrada por las proteínas unidas a la membrana vacuolar  $\gamma$ -glutamil ( $\gamma$ -GT) y dipeptidasa L-cisteinil glicina.

$\gamma$ -glutamil ( $\gamma$ -GT) codificada por el CIS2 (ECM38) gen cataliza el primer paso en la degradación de GSH que implica la escisión de la fracción de  $\gamma$ -glutamil y la liberación de cisteinilglicina.

El resto  $\gamma$ -glutamil se transfiere a péptidos  $\gamma$ -glutamil adecuados y aminoácidos mientras que cisteinilglicina es más degradada en sus aminoácidos constitutivos, cisteína y glicina. La enzima L-cisteinil glicina dipeptidasa (CGase: L-cisteinil glicina + H<sub>2</sub>O → L-cisteína + glicina) que cataliza esta acción, se asocia con la membrana vacuolar de *S. cerevisiae*, aunque el gen que codifica para esta enzima, permanece no identificado en la levadura

Un modelo para los principales flujos de azufre en *Saccharomyces cerevisiae*



(1) acetiltransferasa serina; (2) la sintasa de cisteína; (3) homoserina acetiltransferasa; (4) la sintasa de homocisteína; (5) sintasa  $\gamma$ -cistationina; (6)  $\gamma$ -cistationina; (7) L-cistationina; (8) L-cistationina sintasa; (9) homocisteína metiltransferasa; Sintetasa (10) S-adenosilmetionina; Demetilasa (11) S-adenosilmetionina; (12) adenosylhomocysteinase; (13) el sulfato de reducción de la vía; La ligasa (14)  $\gamma$ -glutamato-cisteína; (15) sintetasa GSH; (16)  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa; Dipeptidasa (17) L-cisteinilglicina.

Se encontró que la biosíntesis de  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasa ser regulada por dos vías diferentes. La enzima fue reprimida por iones de amonio como fuente de nitrógeno mientras que se encontraron niveles más altos de enzimas celulares en presencia de una variedad de otras fuentes de nitrógeno, incluyendo aminoácidos o urea.

En el caso de la inanición de nitrógeno, se observó una fuerte desrepresión de la producción  $\gamma$ -glutamyl. Se han propuesto la posibilidad de una vía alternativa degradación de GSH en *S. cerevisiae* independiente de  $\gamma$ -GT. Esto se demostró a través de la interrupción en el gen que codifica la enzima EMC38  $\gamma$ -GT en cepas *met15Δ*, que requieren fuentes de azufre orgánicos para el crecimiento. Estas células fueron capaces de utilizar GSH como única fuente de azufre, que apoya la existencia de la vía  $\gamma$ -GT-independiente de la degradación de GSH.

Esta vía está mediada por un nuevo complejo de proteína que participa en tres nuevos genes, DUG1, DUG2 y DUG3, que se han caracterizado recientemente en *S. cerevisiae*.

#### 3.1.2.4 Papel de *Saccharomyces cerevisiae* durante el estrés nutricional y oxidativo

##### 3.1.2.4.1 Azufre y deficiencia de Nitrógeno

*S. cerevisiae* puede utilizar metionina, homocisteína, cisteína o GSH como única fuente de azufre como resultado de una red metabólica en la que los átomos de azufre se intercambian fácilmente entre estos compuestos .

GSH se sintetiza usando cisteína y se degrada para dar lugar a cisteína. Por lo tanto, sirve como un depósito de cisteína y azufre en la célula. Cuando las células de *S. cerevisiae* fueron privados de sulfato externo, GSH era capaz de servir como una fuente de azufre interno hasta que se alcanza una concentración residual de aproximadamente 10% de su valor normal. Se observó Derepression de la síntesis  $\gamma$ -GT que resultó en un aumento en la tasa de rotación de GSH.

Cuando suficiente sulfato estaba presente como un nutriente, la mayoría del exceso de azufre se incorporó en GSH. Esto fue acompañado por una actividad  $\gamma$ -GT baja y una tasa de rotación excepcionalmente lento de GSH.

Cuando las células de *S. cerevisiae* se crecieron en medio mínimo con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fuente de nitrógeno y luego se transfirieron a un medio desprovisto de fuente de nitrógeno, la fuente total de GSH aumentó gradualmente en las primeras dos horas 7-17 nmol / mg de peso seco. El grupo GSH disminuyó en las próximas dos horas para alcanzar un valor estable de 2,6 nmol / mg de peso seco. Durante el crecimiento en el medio que contiene nitrógeno, el GSH citoplasmática constituía 50% con el 50% restante se produce en la vacuola.

La deficiencia de nitrógeno, más de 90% del GSH celular se desplazó hacia la vacuola central donde el 90% se consumió. Esto está de acuerdo con Elskens quien también informó de que sólo 90% de la fuente de GSH podría servir como una fuente de azufre endógeno cuando las células de *S. cerevisiae* fueron privados de sulfato.

Por tanto, parece que *S. cerevisiae* tiene un mecanismo inherente que impide el agotamiento de GSH celular completa .Se formuló la hipótesis de que el GSH cumple el papel de un compuesto de almacenamiento que se moviliza a la vacuola durante la inanición. Las enzimas

vacuolares  $\gamma$ -GT y L-cisteinil glicina dipeptidasa (CGase), entonces catalizan la hidrólisis de la vacuolar de GSH almacenado para liberar los aminoácidos constituyentes, L-glutamina, L-cisteína y glicina que satisfacen parcialmente los requisitos de crecimiento de la levadura en términos de nitrógeno.

#### 3.1.2.4.2 Estrés Oxidativo

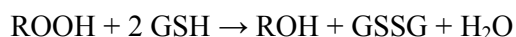
Todos los organismos cultivados aeróbicamente sufren estrés oxidativo causado por formas parcialmente reducidas de oxígeno molecular, conocidos como especies reactivas de oxígeno (EROs). EROs incluyen radicales anión superóxido ( $O_2 \cdot^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), hidroperóxidos de alquilo (ROOH) y el radical hidroxilo ( $HO \cdot$ )

Estos EROs son casi todos los constituyentes celulares altamente reactivos y de ataque, incluyendo el ADN, las proteínas y lípidos. GSH es considerado como una molécula de defensa importante contra el daño oxidativo en *S. cerevisiae*.

GSH puede reaccionar con EROs no enzimáticamente. En este caso, GSH se oxida a GSSG por interacción directa con los radicales libres, eliminando de este modo los oxidantes reactivos de la solución.

GSH también puede actuar indirectamente como un cofactor para las enzimas antioxidantes, tales como GSH peroxidasa, glutatión reductasa, glutaredoxinas y glutatión S-transferasas.

Glutatión peroxidasa (GPx) cataliza la reducción de hidroperóxidos por GSH como reductor:



Y fue demostrado ser inducidos por las condiciones oxidativas en *S. cerevisiae*.

Además de ser un eliminador de radicales, GSH también puede conjugarse con electrófilos tóxicos tales como xenobióticos y metales pesados, una reacción catalizada por citosólica glutatión S-transferasa ( $\text{GSH} + \text{RX} \rightarrow \text{GS-X} + \text{RH}$ ).

Las glutatión S-conjugados se excretan a continuación, en la vacuola central de la célula por la bomba GS-X ATP-dependiente.

Como se mencionó anteriormente, Ycf1p ha sido identificado como una bomba vacuolar la mediación del transporte de glutatión S-conjugados en *S. cerevisiae*. YCF1, el gen que

codifica este transportador, se aisló por su capacidad para conferir resistencia al cadmio en *S. cerevisiae*.

Curiosamente, el factor de transcripción YAP-1 activa transcripcionalmente tanto el gen YCF1 y el gen GSH1. Este último codifica y-glutamilcisteína sintetasa, la primera enzima implicada en la biosíntesis de GSH. La expresión del gen YCF1 y la síntesis de uno de los precursores para el transporte por la bomba vacuolar Ycf1p son por lo tanto reguladas coordinadamente.

Además, GSH se puede unir de forma reversible a los grupos sulfidriilo de proteínas que hacen que estas proteínas protegidas contra el daño oxidativo irreversible .

#### 3.1.2.5 Glutati3n Producci3n biotecnol3gica

Levaduras de la cepa *S. cerevisiae* se utiliza actualmente a escala industrial para la producci3n fermentativa de GSH. El GSH se acumula intracelularmente y la extracci3n de los mismos a partir de c3lulas de levadura constituye una parte importante del proceso de producci3n.

Por esta raz3n, los estudios anteriores se centraron principalmente en la optimizaci3n de las condiciones de fermentaci3n para la producci3n intracelular GSH. La acumulaci3n extracelular de GSH por *S. cerevisiae* no se ha estudiado en detalle. Wei hizo la suposici3n de que GSH, en general, no puede ser excretado al medio extracelular por las c3lulas vivas.

Sin embargo, el trabajo realizado en el intercambiador de GSH recientemente descubierto en *S. cerevisiae*, Gex1, demostr3 lo contrario.

Wei usaron tensioactivos [Dodecilsulfato de sodio (SDS) Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)] para mejorar la penetraci3n de la membrana celular y la posterior acumulaci3n de GSH en forma extracelular. La adici3n de bajas concentraciones de SDS y CTAB (por debajo de 0,5 y 0,25 g / L, respectivamente), produjo un aumento de la acumulaci3n extracelular GSH. El crecimiento celular se inhibi3 dr3sticamente a concentraciones m3s altas.

M3s recientemente, Rollini estudiaron el efecto de diversos qu3micos fermentativa de correos y tratamientos f3sicos sobre la acumulaci3n de GSH extracelular en *S. cerevisiae*. Los productos qu3micos Triton y Lauroil sarcosina mostraron resultados prometedores mientras que la liofilizaci3n tambi3n dio lugar a una mayor acumulaci3n extracelular.

Aunque esta aplicación plantea una estrategia atractiva para aumentar el vino contenido de GSH, la adición de tensioactivos no está permitido por la regulación vino actual.

#### 3.1.2.5.1 Preparación de levadura seca inactiva enriquecidas con glutatión

Para prevenir la oxidación de los vinos se emplea extensamente el SO<sub>2</sub> debido a su acción antioxidante. A pesar de su amplio uso y de su eficacia, a los sulfitos se les atribuyen serias reacciones alérgicas.

En este sentido, el glutatión (GSH) puede ayudar al SO<sub>2</sub> en su papel como antioxidante, favoreciendo el uso de menores niveles de SO<sub>2</sub>.

Debido a que la OIV no permite una suplementación directa de GSH al mosto durante la vinificación, las empresas biotecnológicas del sector están desarrollando preparados comerciales de levaduras secas inactivas ricas en GSH (LSI-GSH) o levadura seca inactivas (IDY-GSH).

El uso de preparaciones de levadura seca inactivas (IDY) en la elaboración del vino está ganando interés debido a su amplia gama de aplicaciones reivindicadas. Preparaciones de levaduras inactivas comerciales se fabrican a partir de la inactivación térmica de la levadura, *S. cerevisiae* cultivada en un medio de azúcar altamente concentrada bajo condiciones aeróbicas.

Clasifican preparaciones IDY en cuatro categorías: levadura inactiva (obtenido por la inactivación térmica antes del secado), autolizados de levadura (contenido intracelular está parcialmente degradada por una etapa de incubación la liberación de enzimas vacuolares antes de la inactivación térmica), cascos de levadura o paredes (los componentes insolubles de las paredes de levadura excluyendo el contenido citoplasmática) y extractos de levadura (extracto soluble después de la degradación total del contenido citoplasmática).

Se han hecho los estudios para determinar el contenido de tiol natural en términos de GSH y la cisteína libre y proteína en levaduras secas activas enológicas.

Se informaron los niveles de GSH que van desde 39 mmol / 100 g hasta 0,92 mmol / 100g. También se analizaron los contenidos tiol de diferentes muestras comerciales de levadura manoproteínas, cascos, lisados y extractos.

A diferencia de lo que se esperaba, los extractos de levadura, siendo el extracto soluble del contenido citoplasmático, y GSH ser un componente citoplasmático, no contenían GSH. De hecho, fueron los productos de lisado que muestran el contenido de GSH más alta (hasta 4,6 mmol / 100 g).

Tradicionalmente, los preparativos IDY se han utilizado principalmente para mejorar la fermentación alcohólica y maloláctica, pero su uso para mejorar las características sensoriales del vino ha recibido recientemente mucha atención.

El efecto protector de estos productos se atribuye al alto contenido de GSH con propiedades reductoras. Preparaciones de levaduras secas Inactivas enriquecidas con glutatión (GSH-IDYs) todos pretenden impulsar GSH contenido en el vino, ya sea por la liberación de GSH en el vino, o permitiendo que la levadura para asimilar los precursores de GSH durante la fermentación alcohólica para aumentar la producción de GSH.

Sin embargo, la dosis óptima requerida, tiempo de adición óptima durante la fermentación y los efectos de otras vinificaciones dan parámetros tales como la temperatura, SO<sub>2</sub> y pH. Autores probaron la cantidad del total y GSH reducido liberado en vinos sintéticos de GSH-IDYs comerciales.

### 3.1.2.5.1.1. Pruebas:

#### 3.1.2.5.1.1.1 Ensayo sobre vino rosado de la variedad Garnacha.

Andujar-Ortíz realizó el primer ensayo sobre la evolución de estos compuestos y fueron monitoreados también durante un período de nueve meses en el vino rosado complementado con una preparación GSH-IDY.

Resultados para el vino sintético mostraron que cantidades muy similares de total y la reducción de GSH fueron liberados en el vino sintético para los diferentes productos. Cuando se añadieron las preparaciones a una dosis de 0,3 g / L, entre 1 y 2 mg / L redujo GSH fueron liberados en el vino sintético 30 minutos después de la suplementación. Nueve días después de la suplementación, sólo se observó una ligera reducción en la concentración de GSH reducido para todo el GSH-IDYs.

En el caso del ensayo de elaboración del vino, el contenido total de GSH fue a un nivel máximo directamente después de la fermentación alcohólica, tanto para el control de vino y el vino suplementado con el GSH-IDY, que corresponde a 8 y 16 mg / L, respectivamente. Por otra parte, la diferencia en el contenido total de GSH para el vino de control y el vino GSH-IDY fue mayor de lo esperado, tener en cuenta la cantidad de GSH publicado por la preparación específica GSH-IDY que se determinó en el vino sintético experimento.

Análisis de la composición de nitrógeno de los vinos reveló un contenido de aminoácidos y el péptido mucho más alto para el vino GSH-IDY en comparación con el control. Esto condujo a la hipótesis de que el contenido de nitrógeno más alto en el vino GSH-IDY estimuló la producción de GSH reducida por *S. cerevisiae* durante la fermentación alcohólica. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la reducción de contenido de GSH entre el control y el vino GSH-IDY después de la fermentación alcohólica.

Los autores explican este fenómeno por una rápida oxidación de GSH reducido liberado de la GSH-IDY durante la fermentación alcohólica. Sin embargo, el contenido de GSH reducido del vino de control aumentó de 0,7 mg / L en el mosto a 6 mg / L después de la fermentación alcohólica, lo que sugiere que *S. cerevisiae* es una fuente potencial de GSH. Una disminución drástica en la concentración de GSH durante la fermentación alcohólica debido a la oxidación es probablemente poco probable, debido al ambiente reductor durante este proceso.



#### 3.1.2.5.1.1.2 Estudio sobre la Variedad Verdejo

La Universidad de Valladolid, España en el año 2011 llevó a cabo un estudio con uva de la variedad Verdejo de la cosecha 2011 procedente de la D.O. Rioja. Los ensayos con las distintas preparaciones de LSI-GSH se realizaron, por duplicado, en depósitos de 20 L en la bodega experimental de la ETSIIAA de Palencia (Universidad de Valladolid) siguiendo un esquema clásico de elaboración de vinos blancos.

Para dar más robustez a nuestros resultados, se seleccionaron cinco preparaciones comerciales de LSI-GSH que se aplicaron a la dosis de 300 mg/L en un mosto con una baja dosis de SO<sub>2</sub> total (15 mg/L).

Paralelamente, se incluyeron dos vinificaciones control con mostos con 30 y 15 mg/L de SO<sub>2</sub> total y sin la adición de LSI-GSH. Se realizó un seguimiento de la fermentación alcohólica (densidad y T<sup>a</sup>) y un control analítico de los vinos después del embotellado (pH, acidez total y volátil, grado alcohólico, azúcares reductores, parámetros de color, pardeamiento y compuestos fenólicos).

En términos generales la adición de LSI-GSH promovió una mayor velocidad en el inicio de la fermentación alcohólica, si bien no acortó la duración de la misma. Por otro lado, la presencia de LSI-GSH no modificó los valores de pH, acidez total y volátil y azúcares reductores, sin embargo, se obtuvieron vinos con mayor graduación alcohólica.

Además, algunas preparaciones de LSI-GSH redujeron el contenido en polifenoles totales, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles, si bien, no se observó una notable modificación de los parámetros de color (L\*, a\* y b\*).

En algunos casos, las LSI-GSH provocaron un descenso en el nivel de pardeamiento de los vinos.

#### 3.1.2.5.1.1.3 Estudio y cata de productos resultados de preparados de levaduras enriquecidas en glutatión:

Investigadores de la UPM, en colaboración con el CSIC, en el año 2014, demostraron que el empleo de preparados de levaduras inactivas ricas en glutatión puede preservar el aroma de los vinos jóvenes.

Los científicos del CIAL y de la UPM han llevado a cabo el trabajo en colaboración con una bodega de la denominación de origen Navarra, en el que han estudiado el efecto de un preparado de levadura inactiva enriquecido en glutatión en el aroma de un vino rosado de la variedad garnacha y en el mismo vino elaborado de la manera convencional (sin preparado).

Para este estudio se contó con un panel de la UPM de 12 jueces entrenados por las propias investigadoras que realizaron el estudio en el reconocimiento de olores y sabores y en el uso de escalas de intensidades. Los jueces participantes fueron a su vez sometidos a una evaluación del entrenamiento.

Durante el año que duró el estudio, los jueces llevaron a cabo los ensayos sensoriales que consistieron en la realización de test triangulares para determinar diferencias sensoriales entre el vino tratado y el control durante la vida útil del vino (1, 2, 3 y 9 meses).

Los vinos fueron sensorialmente similares hasta los 9 meses de almacenamiento.

En este punto, y para evaluar cualitativa y cuantitativamente estas diferencias, se llevó a cabo un análisis sensorial descriptivo en el que los jueces entrenados evaluaron y puntuaron la intensidad de algunos de los descriptores del aroma más característicos de estos vinos (fresa, melocotón, plátano, floral, levadura) y del sabor (acidez). Como resultado de este estudio, se comprobó estadísticamente que los vinos con el aditivo a base de levaduras inactivas antioxidantes eran más intensos en aromas frutales (fresa y banana) y menos intensos en notas aromáticas más características de oxidación (levadura).

Estos resultados indican que los derivados de levadura inactiva con un elevado contenido en glutatión podrían ser unos interesantes aditivos para preservar el aroma de los vinos jóvenes durante el almacenamiento y una alternativa más sostenible para reducir el contenido de sulfitos de los vinos.

### 3.1.3 Productos Enológicos

Varios productos IDY o ISL-GSH comerciales usando el poder reductor del glutatión están disponibles actualmente en el mercado que pretenden preservar el aroma del vino, extender la vida útil de los vinos embotellados y retrasar el desarrollo de notas oxidadas y la coloración amarillenta de vino blanco. Los costos de estos varían desde 59USD + IVA /Kg a 350 USD/kg.

#### 3.1.3.1 Ejemplos de algunos productos con glutatión disponible comercialmente preparados con levaduras secas inactivas enriquecidas utilizados en la elaboración del vino

Producto (a)	Composicion del producto (b)	Acciones en mostos y vinos (c)
OptiWHITE®	Levadura inactiva con alto contenido de GSH	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protegen el color del vino</li> <li>• Preservan frescura y aroma del vino</li> <li>• Aumentan sensación en boca del vino</li> <li>• Retardan oxidativos en apariencia</li> <li>• Disminuyen la amargura</li> <li>• Aumentan la estabilidad de la proteína y tartrato</li> <li>• Mejoran la fermentación alcohólica</li> <li>• Eliminación de polifenoles astringentes</li> <li>• Previenen el envejecimiento prematuro</li> </ul>
OptiMUM-White®		
Springarom®		
BIOAROM®		
BoosterBlanc®		
ActimaxGSH®		
ElevageGlu®		

a) los productos distribuidos por sociedades: Lallemand, LAFFORT, Springer Oenologie y Enartis,A&B. b) Uno o más de estos componentes pueden incluirse en la composición) Las solicitudes están de acuerdo a las descripciones del fabricante incluidas en los productos.

### 3.1.3.2 Otros Productos enológicos comerciales

Productos enológicos comerciales como GENESIS FRESH, GENESIS PRIME, GENESIS LIFT, OPTI-RED, RED STYLE 1.0, WHITE STYLE, EXTRA FERM, SUPER BOUQUET, MANNOVIN, MANNOSTAB, BIOLEES, los principales efectos en los vinos son:

- Aumentan el sabor dulce y disminuye el amargo
- Favorece la eliminación de fenoles astringentes
- Ayudan a la Estabilización tartárica
- Tienen propiedades antioxidantes (glutación)
- Mantienen el frescor del aroma y el color en vinos blancos y rosados.
- Rápida liberación de manoproteínas y péptidos al vinos
- Evita la formación de *off-flavors*, acidez, etc.
- Promueve la fermentación y relanza fermentaciones paradas
- Aumenta la estructura y el cuerpo del vino
- Elimina compuestos tóxicos de mostos y vinos

### 3.1.3.3 Estudio comparativo de 3 productos de levaduras secas inactivas enriquecidas con glutación

El Dr. Wessel du Toit, del Departamento de Viticultura y Enología de la Universidad de Stellenbosch, está investigando sobre los antioxidantes y la oxidación en el vino.

Se han puesto de manifiesto diferencias en las cantidades de GSH liberadas por las distintas LIE. Estas diferencias parecen estar relacionadas con los distintos procesos de producción. Nuestros resultados ilustran la variedad que existe entre las GSH-IDY (LIE ricas en glutación) en términos de contenido de GSH. Además, muestran la importancia de distinguir entre el GSH y el contenido de GSH total, ya que su forma reducida es el antioxidante activo en el vino.

Estos datos permiten deducir que el proceso de producción de GSH-IDY-5. (OptiMUM White®, Lallemand) se ha optimizado hasta tal punto que contiene concentraciones mucho

más elevadas de GSH. Este producto podría ser más eficaz en la reducción de los fenómenos de oxidación de los vinos en comparación con otras GSH-IDY empleadas

Se realizó un estudio comparativo entre tres de los productos antes mencionados, siendo OptiMUM White®, OptiWHITE® y Booster Blanc®.

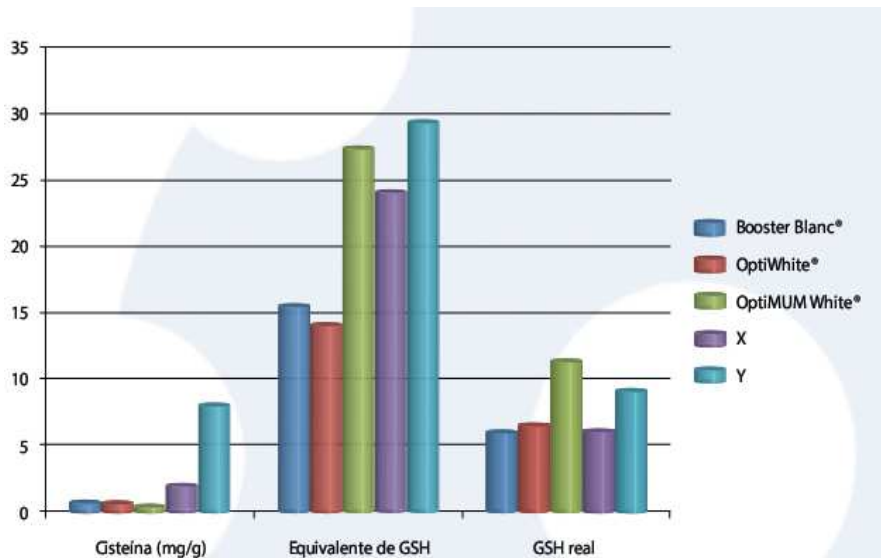
Es importante comprender que el valor asociado con las diferentes LIE ricas en GSH guarda relación con el modo en que se mide el contenido de GSH. Si la medida se realiza mediante la clásica reacción química, se cuantificarán todas las moléculas con un grupo –SH liberado por la LIE y no específicamente el GSH en su forma reducida. El resultado se expresa en términos de “equivalente de GSH” y no de “GSH real”.

La mejor manera de obtener una medida del glutatión real es aplicando un método específico HPLC/UPLC que revele el contenido de GSH reducido, el cual, como ya se mencionó anteriormente, es la forma activa de GSH para preservar el color y el aroma del mosto y el vino. Paralelamente se pueden medir con precisión el glutatión oxidado (GSSG) y otros compuestos como la cisteína y la glutamilsteína.

La siguiente 4 ilustra los resultados del análisis de varias LIE ricas en GSH y las variaciones entre los métodos de análisis. Por ejemplo, el uso del método químico clásico (que mide todas las moléculas –SH y no solo el GSH reducido activo) y del método HPLC (que mide únicamente el GSH reducido activo) da lugar a interpretaciones diferentes. OptiWHITE® y Booster Blanc® presentan el mismo perfil de contenido de GSH, mientras que OptiMUM White® tiene con mucho los niveles más altos de GSH real debido a la optimización del proceso, lo que significa que este producto será el más eficiente para proteger el color y el aroma del mosto y el vino.

Podemos apreciar que el producto Y posee el nivel más alto de “equivalente de GSH”, pero también es el que presenta mayor contenido de cisteína, por lo que podría no ser el compuesto más interesante y apropiado en lo que se refiere a su impacto en la calidad del vino.

### 3.1.3.3.1 Análisis de cisteína y GSH (HPLC) y método químico clásico de equivalente de GSH de varias ISL ricas en GSH



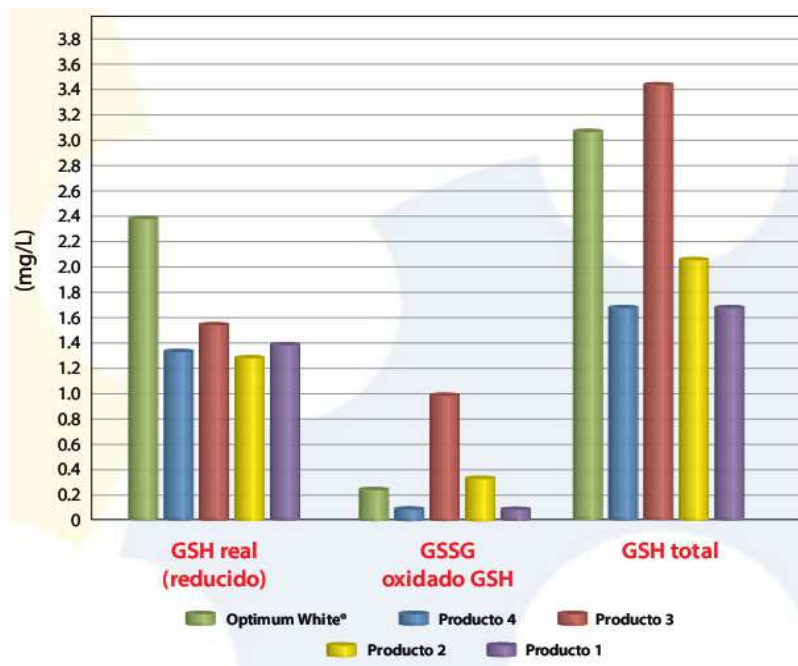
En un estudio realizado por el Departamento de Viticultura y Enología de la Universidad de Stellenbosch, el análisis UPLC reveló las concentraciones de GSH total, reducido y oxidado, liberadas por diferentes LIE ricas en GSH en una solución modelo de vino.

En la figura 2 observamos que OptiMUM White® liberó el nivel más alto de GSH reducido en la solución modelo de vino, mientras que los otros cuatro productos liberaron una cantidad similar de GSH reducido en la solución modelo.

Sin embargo, uno de los otros tres productos (producto 3) presenta un alto nivel de GSH total, si bien la mayor parte está en su forma oxidada (GSSG), la cual no es eficiente en el mosto y el vino.

Estos resultados muestran claramente que OptiMUM White® liberó la mayor cantidad de glutatión necesario para proteger la calidad del vino.

3.1.3.3.2 Contenido de glutatión reducido (GSH), oxidado (GSSG) y total (GSH reducido + oxidado) liberado por varias ISL ricas en GSH en una solución modelo de vino.



3.1.3.4 Ensayo del uso de manoproteinas (OptiWHITE) sobre las características enológicas y organolépticas de vinos cv. Chardonnay. Informe n° D88/230205 –INTA.

El objetivo fue evaluar el efecto de la utilización de manoproteinas (considerando las levaduras secas inactivas como manoproteinas) de uso enológico sobre las características organolépticas (aporte en boca, preservación de los aromas, prevención de la oxidación), de vinos elaborados a partir de uvas cv. Chardonnay

Se partió de uvas cv. Chardonnay, provenientes de la localidad de Mayor Drummond, Lujan de Cuyo, pertenecientes a la EEA- Mendoza.

Las mismas fueron cosechadas a mano e inmediatamente transportadas a la planta piloto del Centro de Estudios de Enología, de la EEA- Mendoza.

Los tratamientos ensayados correspondieron a un testigo (sin agregado de manoproteinas), y a un mosto con agregado de manoproteinas de uso enológico, en dosis de 20g/HL en dos momentos: 10 g/HL al inicio de la fermentación alcohólica y 10 g después del primer trasiego. Los tratamientos ensayados fueron los siguientes:

- Testigo (sin agregado de manoproteínas)
- Manoproteínas OptiWHITE 20 g/Hl

#### 3.1.3.4.1 Procedimiento:

Solo fueron sometidos a moliendo los racimos que presentaban ausencia de Botrytis cinérea, al menos visual. La unidad experimental fue de 100kg de uva para cada tratamiento. Previo a la molienda se les determino a las uvas de cada variante: contenido azucarino (°Bx), acidez total y pH por métodos oficiales argentinos. No se llevo a cabo la corrección de rutina de la acidez total del mosto, ya que la materia prima presentaba un contenido superior a 7,5g/l de acido tartárico.

Posteriormente las uvas fueron molidas, descobajadas , y sometidas a una maceración a 18°C por un lapso de dos horas, lo cual se dejo escurrir el mosto flor, el mismo fue sulfitado inmediatamente a dosis de 50 mg/l y adicionando 5g/l de bentonita. En estas condiciones se le efectuó un desborre previo sometiendo el mosto a una temperatura de 5° C durante 24 hs. Finalmente , el mosto límpido fue separado de las borras gruesas y sometido a fermentación de damajuanas de 25 L a una temperatura controlada de 18°C, previo al agregado de levaduras secas seleccionadas Lallemand EC- 1118 en dosis de 20g/HL En el agua de hidratación de las levaduras , se adiciono el producto Go-Ferm de la misma empresa , en dosis de 20g/HL En este momento se agrego también la primera dosis (10g/HL) de las manoproteínas OptiWHITE en el tratamiento correspondiente. Una vez terminada la fermentacion se ajusto el SO<sub>2</sub> a 45 mg/l de SO<sub>2</sub> libre y se realizo un battonage semanal, removiendo las borras durante aproximadamente 1 mes y medio. Acto seguido los vinos fueron trasladados a cámara de frio durante 1 semana a una temperatura de 3-4°C para la estabilización tartárica y posteriormente trasegados. En este momento se agrego la segunda dosis (10g/HL) de manoproteínas OptiWHITE. Luego de esta operación se dio por terminado el vino, procediendo al embotellado del mismo previo filtrado por membrana de celulosa y ajuste del SO<sub>2</sub> a 35mg/l de SO<sub>2</sub> libre.

Se realizo un análisis organoléptico con un panel de 12 jurados expertos, mediante análisis descriptivo y pruebas de preferencia , trabajando siempre sobre muestras anónimas.

Para el análisis descriptivo , en una degustación preliminar se seleccionaron los descriptores que sirvieron para diferenciar los vinos. En una segunda degustación se procedió a medir la



intensidad de cada uno de los descriptores seleccionados mediante una tabla estructurada de 1 a 5. Luego se obtuvo el promedio de todos los degustadores para cada vino y para cada descriptor

### 3.1.3.4.2 Resultados y Discusión:

#### Datos analíticos de los vinos terminados:

**Tabla N°2:** Análisis finales de vinos obtenidos a partir de uvas cv. *Chardonnay*, provenientes de Mayor Drummond, Luján de Cuyo, Mendoza. Efecto del uso de manoproteínas sobre las características organolépticas de los vinos. 2005.

Tratamiento	Alcohol % v/v	Acidez total (g.L <sup>-1</sup> de ácido tartárico)	pH	Azúcares reductores (g.L <sup>-1</sup> )	Acidez volátil (g.L <sup>-1</sup> de ácido acético)	SO <sub>2</sub> Total	SO <sub>2</sub> Libre	Abs. 420 nm
Testigo	14,30	5,55	3,52	2,58	0,29	57,60	17,28	0,016
OPTI - WHITE 20 g.hi <sup>-1</sup>	14,30	5,81	3,53	2,35	0,27	71,68	21,12	0,011

Puede apreciarse que el tratamiento OptiWHITE, presentó un valor de Absorbancia a 420 nm (tonos amarillos), mucho más bajo que el tratamiento testigo. De acuerdo con este parámetro, considerando como una medida del estado de oxidación del vino terminado, el vino correspondiente al tratamiento OptiWHITE presentaría un color más conservado en cuanto a oxidación, que el tratamiento Testigo.

#### Análisis Sensorial:

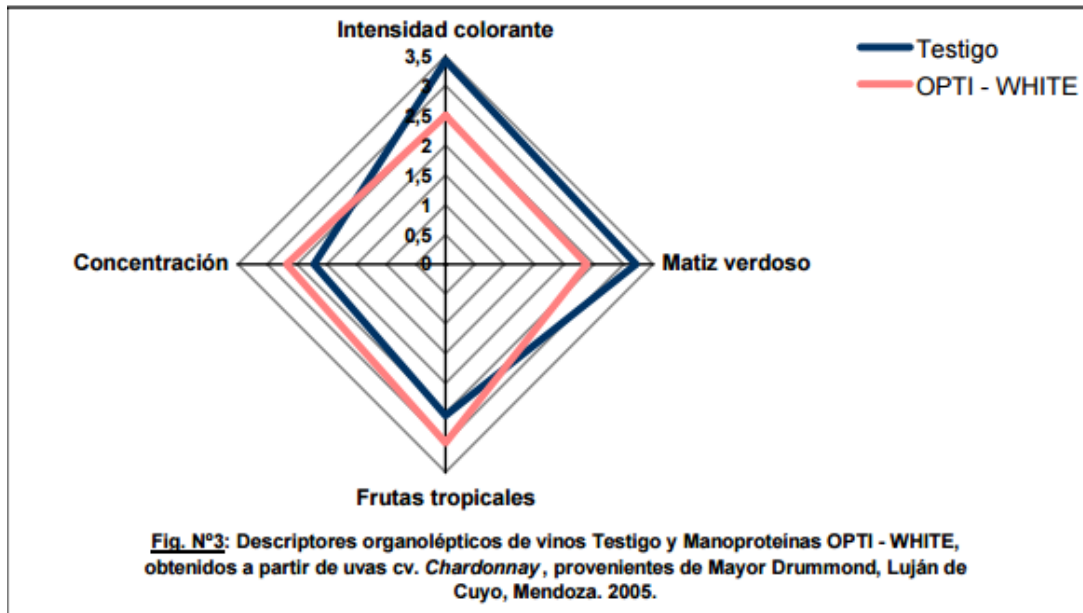
##### 1. Análisis descriptivo:

Se encontró que el vino tratado con manoproteínas OptiWHITE, fue percibido por los degustadores como con una menor intensidad de color y matiz verdoso, en comparación con el tratamiento Testigo. Para el resto de los descriptores organolépticos, el análisis de la varianza, utilizando el Test de Tukey, para un nivel de significancia del 0,05% no encuentra diferencia entre ambos.

**Tabla N°3:** Descriptores organolépticos de vinos obtenidos a partir de uvas cv. *Chardonnay*, provenientes de Mayor Drummond, Luján de Cuyo, Mendoza. Efecto del uso de manoproteínas sobre las características organolépticas de los vinos. 2005.

Tratamiento	Intensidad de color	Matiz verdoso	Intensidad aromática global	Frutos tropicales	Herbáceos	Concentración	Acidez	Calor en boca	Amargo	Untuosidad
Testigo	3,42 <sup>a</sup>	3,21 <sup>a</sup>	2,92 <sup>a</sup>	2,54 <sup>a</sup>	1,50 <sup>a</sup>	2,21 <sup>a</sup>	2,25 <sup>a</sup>	2,67 <sup>a</sup>	1,63 <sup>a</sup>	2,63 <sup>a</sup>
OPTI - WHITE 20 g.hi <sup>-1</sup>	2,50 <sup>b</sup>	2,38 <sup>b</sup>	3,04 <sup>a</sup>	3,00 <sup>a</sup>	1,75 <sup>a</sup>	2,67 <sup>a</sup>	2,67 <sup>a</sup>	2,71 <sup>a</sup>	2,13 <sup>a</sup>	2,79 <sup>a</sup>

\* Valores precedidos por letras diferentes indican diferencias significativas para el Test de Tukey y P<0,05



#### 3.1.3.4.3 Conclusiones:

No obstante lo dicho, cabe aclarar que, sin haber preferencia estadística, el vino correspondiente al tratamiento OptiWHITE resultaría algo más “preferido” por los degustadores en comparación con el vino testigo.

Siendo percibido por los degustadores el vino tratado con una menor intensidad del color y matiz verdoso, en comparación con el tratamiento Testigo.

### 3.2 Glutación y la legislación

El INV no tiene contemplado el uso del glutación en vinos (practica enológica ni tampoco como producto enológico).

La OIV está tratando el tema para su empleo en mostos y vinos pero aun sin aprobación plena de los países miembros. El método de determinación aprobado por este organismos es por determinación por electroforesis capilar.

En el Vandemecum se encuentran los productos de uso Enológico, otros productos y elementos de uso en establecimientos vitivinícolas aprobados por el INV, cualquier producto que no esté en este, no tiene el permiso legal del departamento de control y aprobación de productos –INV .

OptiWHITE, OptiMUM-WHITE, Springarom, Biarom, Fresharom, BoosterBlanc, Elevage GLU, el único que no se encuentra en la lista del Vandemecum es el ActimaxGSH.

Los productos antes mencionados no se encuentran dentro de los productos considerados dentro del grupo de Antioxidantes por el INV, sino en el grupo de Levaduras y Activadores.

La información técnica de cada producto sobre su concentración de glutación se ha realizado en países del exterior, en nuestro país, de la lista de productos aprobados tenemos muchos de estos de los que se desconocen su concentración en glutación.

N°	PRODUCTO	EMPRESA	MARCA	CERTIF. DE APROB.		RESOL. / DISP.	
				N°	FECHA	N°	FECHA
331	Levaduras Inactivas	Lallferm S.A.	Opti White	8-000353	03-02-05	B-5	28-01-05
438	Levadura Seca Inactiva	A.E.B. Argentina S.A	Batonnage Plus Elevage	8-000467	20-03-06	B-22	02-03-06
652	Paredes Celulares De Levaduras Y Tiamina	Saf Argentina S.A.	Springarom	8-000698	06-02-09	B-7	27-01-09
753	Paredes Celulares De Levaduras	Laffort Oenologie Argentina S.A.	Bioarom	8-000804	14-04-10	B-41	29-03-10
837	Paredes Celulares De Levaduras	Lallferm S.A.	OptiMUM White	8-000892	18-01-12	C-33	09-08-11
939	Levaduras Inactivas	Lallferm S.A.	Booster Blanc	8-000995	07-03-13	C-33	09-08-11
1037	Paredes Celulares De Levaduras	Laffort Argentina S.A	Fresharom	8-001099	23-04-14	B-41	29-03-10
1075	Levadura Inactiva	Durox Enología S.R.L.	Booster Blanc	8-001139	02-12-14	C-33	09-08-11

### 3.2.1 Otros- Productos enológicos comerciales En la legislación del INV

En la legislación del INV, principalmente dentro del Vandemecum, están aprobados para su uso en:

#### **LEVADURAS Y ACTIVADORES**

N°	PRODUCTO	EMPRESA	MARCA	CERTIF. DE		RESOL. /	
				APROB.	FECHA	DISP.	FECHA
535	Cáscaras De Levaduras	Centro Enológico Rivadavia S.A.	Génesis Fresh	8-000583	16-07-07	B-52	03-07-07
533	Cáscaras De Levaduras	Centro Enológico Rivadavia S.A.	Génesis Prime	8-000581	16-07-07	B-52	03-07-07
534	Cáscaras De Levaduras	Centro Enológico Rivadavia S.A.	Génesis Lift	8-000582	16-07-07	B-52	03-07-07
216	Nutriente En Polvo- Levaduras Nativas	Lallferm S.A.	Opti-Red	8-000226	29-05-02	B-21	10-05-02
327	Levaduras Inactivas	Lallferm S.A.	Red Style 1.0	8-000349	03-02-05	B-5	28-01-05
707	Mezcla De Activadores Y Nutrientes	Lallferm S.A.	White Style	8-000755	22-12-09	B-59	10-12-09
452	Cortezas De Levaduras	Abastecimientos Argentina S.A	EXTRAferm	8-000480	23-03-06	B-42	13-03-06
592	Paredes Celulares De Levaduras	Enobo S.A.	Súper Bouquet	8-000635	11-01-08	B-1	04-01-08

## ESTABILIZANTES

N°	PRODUCTO	EMPRESA	MARCA	CERTIF. DE APROB.		RESOL. / DISP.	
126	MANOPROTEINAS	Nutring S.A.	Mannovin	6-000292	27-11-08	B-63	21-11-08
147	MANOPROTEINAS	Laffort Argentina S.A	Mannostab	6-000326	14-04-10	B-46	31-03-10
345	MANOPROTEINAS	Laffort Oenologie Argentina S.A	Biolees	8-000372	09-03-05	B-20	03-03-05

### 3.3 Vinos Orgánicos:

La producción orgánica es un sistema sustentable en el tiempo y que mediante el manejo racional de los recursos naturales y evitando el uso de los productos de síntesis química, pueda brindar productos sanos. A su vez debe incrementar o mantener la fertilidad de los suelos y la diversidad biológica.

La producción orgánica tiene como objetivo principal la producción de alimentos con más sabor, saludables e inocuos para la salud humana y el medioambiente.

Para producir orgánicos este debe estar certificado por una empresa certificadora habilitada, regulada y controlada por el SENASA. Ley nac. 25127.

La calidad del producto final está íntimamente relacionada con el manejo en la producción de la uva, las técnicas, condiciones y oportunidad de la cosecha, el transporte, calidad de las instalaciones y el proceso de vinificación.

Como primera medida a tener en cuenta para la elaboración de vinos, “a partir de uvas orgánicas “u “orgánicos” (sin adición de SO<sub>2</sub>), se deberá tener la certificación definitiva de los viñedos, si estos fueran nuevos deben cumplir con los requisitos de agricultura orgánica desde el momento de implantarse, si fueran viñedos convencionales con una cierta antigüedad, deberán sufrir un período de TRANSICION. Este tiempo tendrá una duración estipulada por la certificadora.

#### 3.3.1 Vinificación:

Todas las etapas del proceso y las medidas de tratamiento de las uvas, como la preparación del mosto para vino orgánico deberán perseguir los siguientes objetivos:

- a) Evitar procesos que demanden un uso excesivo de agua y energía
- b) Limitar al mínimo el uso del Dióxido de Azufre (SO<sub>2</sub>)
- c) Evitar el uso de cualquier material o sust. que en su fabricación, empleo y/o eliminación sea problemática para la salud o medioambiente.

### 3.3.2 Clarificado-Estabilización de los fenoles

En este momento hay dos maneras de resolver los problemas de estabilidad de los fenoles: eliminar las más inestables o añadir los agentes de protección, que evitan o frenan las reacciones de oxidación.

Para eliminar selectivamente parte de los fenoles, se pueden utilizar los mismos adyuvantes usados en la fase de tratamiento del caldo o jugo, a saber, la caseína, la ovoalbúmina, la gelatina, la proteína vegetal, la ictiocola, etc.

Los taninos enológicos, de diferente origen botánico se extraen de diferentes formas y actúan como agentes protectores. Ellos actúan como antioxidantes produciendo radicales libres de ellos mismos antes de reaccionar con los fenoles del vino.

Recientemente las cáscaras de levadura ricas en glutationato (un péptido a base de azufre – naturalmente presente en las uvas y sintetizada por las levaduras – con propiedades antioxidantes fuertes); han dado propuestas para la misma función acción.

Estas preparaciones de levadura parecen también incrementar el contenido en polisacáridos del vino, con efectos positivos en el sabor y la estabilidad; no obstante, si se añade en cantidades muy altas, pueden afectar adversamente las notas sensoriales (p. e. sabores a queso), y también comprometen la estabilidad coloidal del vino.

### 3.3.3 Gestión del SO<sub>2</sub>.

#### 3.3.3.1 Características Analíticas

Contenidos de SO<sub>2</sub> máximos (en vinos orgánicos).

- Tintos 70 mg/l
- Blancos y Rosados 80 mg/l
- Dulces y abocados 100 mg/l
- Espumantes 80 mg/l



### 3.3.3.2 Relevancia de la utilización de dióxido de azufre en los mostos y vinos

Los sulfitos son hoy en día considerados como aditivos fundamentales en las diferentes etapas de la producción de vino, por su actividad antimicrobiana, antioxidante y anti-oxidativa.

El SO<sub>2</sub> ha sido la molécula “mágica” que nos ha ayudado en enología a controlar de forma tremendamente eficiente en estos aspectos.

#### 3.3.3.2.1 Beneficios del SO<sub>2</sub>:

- Realiza una selección de la flora microbiana ya que inhibe el crecimiento de levaduras no-Saccharomyces poco productores de alcohol y de bacterias no deseadas
- Inhibe las oxidasas que afectan a la uva, enzimas catalizadoras de oxidación de los fenoles y el aroma de los mostos.
- Efecto antioxidante: protege de consecuencias nefastas para el color y el aroma
  - “secuestra” el oxígeno antes de que reaccione con otros compuestos del vino
  - Reacciona con el peróxido de hidrógeno
  - Reduce las quinonas producidas por la oxidación a su forma fenol inicial.
- Facilita la extracción de fenoles y materias colorantes de las células del hollejo de la uva
- Reacciona con componentes del vino: acetaldehído, ácido pirúvico, ácido 2-oxoglutarico, antocianos, ácido cinámico y azúcares reductores, modulando las propiedades sensoriales del vino y modificando reacciones de polimerización de fenoles durante la crianza y conservación
- Protege el aroma del vino
  - Se une con el acetaldehído lo que evita la oxidación de este
  - La frescura se conserva durante el envejecimiento.

### 3.3.3.2.2 Perjuicios del SO<sub>2</sub>

- Destruye la tiamina (vitamina B1, pérdida del valor nutricional), un factor de crecimiento de la levadura que disminuye la producción de compuestos carbonílicos :

↓ tiamina → ↑ carbonílicos → ↓ SO<sub>2</sub> libre → ↑ dosis SO<sub>2</sub>

- Retrasa o impide la fermentación maloláctica
- En ciertas circunstancias origina sabores y olores a sulfhídrico y mercaptano
- Si la dosis adicionada es demasiado elevada el vino adquiere un olor picante característico de este producto y de sabor desagradable
- Se une a los antocianos decolorándolos.
- El consumidor demanda cada vez más alimentos con alto valor nutricional microbiológicamente seguros y los más “naturales” (sin aditivos químicos). Importante en alimentos ecológicos/orgánicos.

#### 3.3.3.2.2.1 Toxicidad de los sulfitos

Las alergias al vino no son tan raras y pueden provocar entre 15 y 30 minutos después del consumo de vino una rinitis, una crisis de asma, una urticaria o dolores abdominales.

Es a veces difícil de determinar con precisión cuál es el alérgeno responsable de manifestaciones alérgicas ya que numerosas sustancias son encontradas en el vino.

A pesar de las reacciones básicas señaladas anteriormente, el dióxido de azufre es bien conocido como una sustancia venenosa y alergénica (LD50: 0,7-2,5 mg/kg de peso corporal, dependiendo de las especies animales, la ingesta máxima diaria: 0,7 mg/kg de peso corporal), y por esta razón podría tener un fuerte impacto en la percepción de los consumidores en lo que respecta a la salud humana.

Se han atribuido numerosas reacciones a sulfitos como diarrea, dolores abdominales, náuseas, vómitos, urticaria prurito, angioedema, cefaleas, dolor torácico, lipotimia, eritemas inespecíficos, etc. Es conocida la importancia de los sulfitos como desencadenantes de bronco espasmos y asma grave.

En el Reglamento CE 1991/2004, los sulfitos deben indicarse en la etiqueta si el contenido global de vino es superior a 10 mg/L. Esto representa un grave problema para los productores de vino (si se plantea la oportunidad de reducir los niveles de SO<sub>2</sub>) y es un tema importante, sobre todo para el “sector ecológico”.

Y en el Reglamento (CE) N° 607/2009, la mención de la presencia de sulfitos en el producto se indicará de la siguiente forma: “Contiene”, seguida de alguna de las siguientes denominaciones “sulfitos” o “dióxido de azufre. Esto hace que, la indicación de la presencia de sulfitos en los vinos sea siempre obligatoria. Podrá ir acompañada del pictograma:



Incluso los vinicultores convencionales orientan su acción a la disminución de la cantidad de SO<sub>2</sub> en sus productos y, a menudo, los consumidores esperan encontrar menores niveles de los aditivos en vinos de viticultura ecológica. Es más, algunas preguntas relacionadas con el uso de sulfitos en enología están todavía en cuestión. Por ejemplo: “¿Hasta cuánto es posible reducir los niveles de dióxido de azufre, sin correr el riesgo de la degradación de la calidad, el sabor, el aumento de la contaminación microbiana, la oxidación durante la vinificación o el almacenamiento en barriles o botellas?”

### 3.3.3.3 Prácticas de vinificación importantes para reducir el nivel de azufre

Hoy en día diferentes prácticas alternativas y aditivos podrían utilizarse para reducir el uso de sulfitos en la elaboración del vino, pero la eliminación completa de los sulfitos es, por el momento, no es posible todavía.

La viabilidad de la reducción de dióxido de azufre es posible durante la etapa de vinificación. No en todas las fases del proceso de producción del vino existen tecnologías adecuadas disponibles o para sustituir parcialmente o reducir el dióxido de azufre.

- Gestión correcta de la inoculación de levaduras seleccionadas

La realización de la fermentación alcohólica sin adición de sulfitos, significa que la inoculación de levaduras seleccionadas se lleva a cabo en un medio altamente contaminados por microorganismos silvestres. En estas condiciones, las levaduras silvestres y las bacterias

lácticas pueden crecer y consumir el nitrógeno asimilable (YAN) que es una fuente básica de nutrición de las levaduras

Saccharomyces. Este consumo se produce en el caldo sólo en las primeras horas después del prensado y, en general, conduce inevitablemente a un lento proceso de fermentación.

Con el fin de evitar esta situación, cuando no se utiliza de SO<sub>2</sub> antes de la fermentación alcohólica, se recomienda hacer una muy temprana inoculación del cultivo de arranque (“starter”) seleccionado. Esta práctica permite la dominancia del Saccharomyces durante la fermentación, porque la fase de selección del iniciador, se reducirá

- Adición de YAN

Cuando la fermentación se gestiona sin dióxido de azufre, es también recomendable el control de la levadura de nitrógeno asimilable. Por lo general, los mostos de uvas ecológicas no son muy ricos en YAN y así deben ser reintegrados, de ser posible, antes de la inoculación de levaduras.

Por otra parte, una menor adición de SO<sub>2</sub> antes de la fermentación, puede reducir la producción de acetaldehído y así disminuir la incorporación del aditivo y mejorar su potencial actividad en las últimas etapas del proceso de vinificación

- Co-inoculación de levaduras y bacterias lácticas
- Tecnologías de hiperoxigenación y de hiper reducción

Las prácticas de hiperoxigenación y las tecnologías de hiper-reducción pueden también utilizarse para reducir los niveles de SO<sub>2</sub> en los mostos. La primera consiste en una enorme adición de oxígeno o aire con el fin de oxidantes completamente todas las materias inestables. La hiper-reducción se basa en la adición de ácido ascórbico o de otros antioxidantes para proteger a la misma debe partir de las reacciones oxidativas

- Conservación bajo gases inertes

#### 3.3.3.4 Aditivos Alternativos:

- Acido Ascórbico (Vitamina C):

Se encuentra en uvas sanas entre 50-100 mg/l. Se consume casi en su totalidad después del estrujado – prensado (reacción con quinonas de hidroxicinamoil-tartaricos para dar los ácidos originales). En el vino es un potente secuestrante del oxígeno, más rápido que el SO<sub>2</sub>.

Ascórbico + O<sub>2</sub> → H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> .Por ello se propone la adición conjunta con SO<sub>2</sub>

- Lías de vinificación:

Las lías solas o en combinación con otros antioxidantes (ascórbico) son efectivas en la “desactivación “del oxígeno y de los radicales libres, pero pueden inducir el pardeamiento durante el almacenamiento.

- Autolizados de levaduras

A partir de las propiedades antioxidantes de las lías de vinificación se han desarrollado diferentes sub-productos de las levaduras:

1. Levaduras Inactivas
2. Autolizados de levadura
3. Paredes celulares de levadura
4. Extractos de levadura

De acuerdo con los productos su capacidad antioxidante se relación con su capacidad de liberar al medio polisacáridos, macromoléculas antioxidantes y glutatión.

- Glutatión

Se encuentra en uvas y mostos (14-114 mg/l). Es capaz de inhibir ciertos radicales libres (DPPH).Frena la oxidación de ácidos hidroxicinamoil-tartaricos produciendo GRP, evitando la formación de quinonas y previniendo el pardeamiento.

Solo o en combinación con cafeico frena el descenso en terpenos y esterés típico de la evolución de vinos blancos en botella. En vinos Sauvignon blanc añadido en el embotellado preserva la concentración de ·MH después de 3 años de conservación. En condiciones

demasiado reductoras aumenta los niveles de H<sub>2</sub>S durante el embotellado y más en presencia de concentraciones elevadas de Cu (II)

En condiciones muy oxidativas altas concentraciones de GSH pueden inicialmente proteger contra la oxidación pero eventualmente provocan pardeamiento.

El uso de GSH no se permite aun. Existen preparados comerciales de derivados de paredes celulares de levadura que presentan con niveles altos de este compuesto.

- Polifenoles:

La adición prefermentativa de taninos enológicos se han mostrado efectivos: inhibición enzimática de las PPO's y actividad anti-radical. No afectan al proceso fermentativo y en algún caso se han comprobado que aportan incluso mejoras en la percepción sensorial cuando se comparan con vinos SO<sub>2</sub>.

- Chitosan- Chitin.

Polisacárido con más de 5000 unidades de glucosamina y acetilglucosamina respectivamente. Se obtienen de exo-esqueletos de crustáceos, paredes celulares de hongos. Chitosan también deriva de la Chitin por un proceso de de-acetilacion.

Su carácter antioxidante se debe probablemente a la eliminación de Fe y Cu y a la adsorción de fenoles oxidados. El desarrollo del color se limita y es comparable a la protección del sulfuroso.

- Sorbato (E200)

El ácido sorbico presenta una fuerte acción anti-fúngico pero no es anti-bacteriano y su uso está permitido por la OIV.

- Dicarbonato de dimetilo (E242)

Acción anti-fúngica: inhibe alcohol-deshidrogenasa y gliceraldehido-3-P-deshidrogenasa. Es más efectivo contra las levaduras que el SO<sub>2</sub>. Mata a las células mientras que el segundo solo inhibe su crecimiento manteniéndolas en estado de “viable pero no cultivables”.

## **Capítulo 4: Experiencias practicas enológicas:**

4.1 Efecto de la adición de levaduras inactivas ricas en glutatión sobre la calidad de los vinos rosados.....	161
4.1.2 Materiales y métodos .....	161
4.1.2.1 Tratamientos y desarrollo de la vinificación.....	161
4.1.2.2 Tratamiento estadístico .....	164
4.1.3 Resultados y discusión.....	164
4.1.3.1 Seguimiento de la fermentacion alcohólica: .....	164
4.1.3.2. Análisis de los resultados Físicos –Químicos sobre la adición de LSI-GSH sobre los.....	166
4.1.3.2.3 Análisis multivariante de fin de fermentación: .....	169
4.1.3.3 Test acelerado de oxidación .....	171
4.2 Nuevo método UPLC-MS / MS para evaluar el efecto de la preparación de levadura o levadura seca capa inactiva enriquecido en los niveles de glutatión en las celulas de levaduras ,mosto, vino y durante la fermentacion alcohólica .....	177
4. 2.1 Introducción .....	177
4.2.2 Materiales y métodos .....	179
4.2.2.1 Método UPLC-MS / MS .....	179
4.2.2.2 Determinación de GSH en libertad de varios GSH-IDYs .....	179
4.2.2.3 Influencia del tiempo, SO <sub>2</sub> y etanol sobre la liberación de GSH por GSH-IDYs en lasolución modelo.....	180
4.2. 2.4 Influencia de GSH-IDY añadió en diferentes etapas de fermentación en los niveles de GSH en el vino , produccion en pequeña y hran escala.....	180
4.2.2.5 Influencia de la cepa de levadura y tratamientos en viña sobre la canopia en niveles de GSH extra e intracelular durante la fermentacion alcohólica .....	183
4.2.2.5.1 Diseño experimental de la viña .....	183
4.2.2.5.2 Las condiciones de fermentación.....	183
4.2.2.6 Procedimiento de muestreo, preparación de muestras y análisis de GSH .....	184

4.2.2.7 Análisis Estadísticos .....	185
4.2.3 Resultados .....	186
4.2.3.1 Método UPLC-MS / MS .....	186
4.2.3.2 Determinación de GSH libre de varios GSH-IDYs.....	187
4.2.3.3 Influencia del tiempo, SO <sub>2</sub> y etanol sobre la liberación de GSH por GSH-IDYs en la solución modelo.....	189
4.2.3.4 Influencia de GSH- IDY añadido en diferentes etapas de fermentación en los niveles de GSH en el vino .....	193
4.2.3.4.1 Niveles de GSH para la fermentación a pequeña escala.....	193
4.2.3.4.2 Niveles de GSSG para la fermentación a pequeña escala.....	196
4.2.3.4.3 Niveles de GSH para fermentaciones a gran escala .....	197
4.2.3.5 Influencia en la deformación de la cepa de levadura y tratamientos en viña sobre la canopia en niveles de GSH extra e intracelular durante la fermentación alcohólica.....	199
4.2.3.5.1 Niveles de GSH extracelular .....	200
4.2.3.5.2 Niveles de GSSG extracelular .....	201
4.2.3.5.3 Los niveles totales de glutatión intracelular reducidas y oxidadas.....	203
4.3 Influencia de la cepa de levadura, el contacto prolongado lías y la suplementación de nitrógeno sobre la concentración de glutatión en el vino .....	206
4.3.1 Introducción .....	206
4.3.2 Materiales y métodos.....	207
4.3.2.1 Cepas de levadura y medios.....	207
4.3.2.2 Las condiciones de fermentación .....	207
4.3.2.3 Proyección en el jugo de uva para supervisar la evolución del glutatión durante la fermentación alcohólica.....	208
4.3.2.4 Influencia del envejecimiento y contacto con lías.....	210
4.3.2.5 Influencia de levaduras con diferentes contenidos de nitrógeno asimilable...	210
4.3.2.6 Influencia del estrés oxidativo en las condiciones de fermentación y ensayos de placa H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	211



4.3.2.7 Procedimiento de muestreo, preparación de muestras y análisis de glutatión.	212
4.3.2.8 Análisis Estadístico.....	213
4.3.3 Resultados y discusión.....	214
4.3.3.1 Detección preliminar de GSH en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cepas comercial utilizada durante la fermentacion alcoholica .....	214
4.3.3.2 Proyección en el jugo de uva.....	216
4.3.3.2.1 Evolución de GSH durante la fermentación alcohólica.....	216
4.3.3.3 Influencia del envejecimiento y contacto extendido en lías ,en niveles de GSH en el vino.....	222
4.3.3.4 Influencia de diferentes niveles YAN en evolución de GSH durante la fermentación .....	224
4.3.3.5 Influencia de diferentes contenidos GSH intracelular en la Resistencia al Estrés .....	226

## Capítulo 4: Experiencias prácticas

### 4.1 Efecto de la adición de levaduras inactivas ricas en glutatión sobre la calidad de los vinos rosados

#### 4.1.1 Objetivos y plan de trabajo:

El objetivo principal de este estudio fue:

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

Para conseguir este objetivo se procede a la elaboración de dos vinos rosados con distintas dosis de sulfuroso, de la variedad Cabernet sauvignon, siguiendo el método tradicional de vinificación en rosado que servirá de vinos control (VSO1 y VSO2).

Además se elaborarán otros cinco vinos (VDL1-VDL5), a los cuales se le adicionarán distintos preparados comerciales de LSI-GHS. Se lleva a cabo una analítica completa y un test de oxidación de los vinos. Finalmente, se llevó a cabo un estudio estadístico de los datos obtenidos en los análisis de los vinos de los distintos tratamientos

#### 4.1.2 Materiales y métodos:

##### 4.1.2.1 Tratamientos y desarrollo de la vinificación:

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



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

El despalillado y estrujado de la vendimia se realizó en una despalilladora-estrujadora de acero inoxidable y se sulfitó a 15 mg/L de sulfuroso total. A continuación, se maceró el mosto junto al hollejo durante 24 horas a una temperatura de 6°C. Posteriormente se procedió al prensado de la uva, utilizando para ello una prensa horizontal de membrana axial durante dos ciclos. Una vez obtenido el mosto se dejó durante 24 horas desfangado a una temperatura de 6°C.

Al día siguiente se realizó un trasiego, eliminando las heces y se tomó una muestra para analizar pH, acidez total, densidad, °Brix, NFA, sulfuroso libre y total, IPT y color; obteniendo los siguientes resultados:

pH	T <sup>a</sup>	Densidad	°Brix	Acidez total	SO <sub>2</sub> libre	SO <sub>2</sub> total	NFA	IPT
3,54	11,4°C	1100 g/L	23 (13,45% grado alcohólico probable)	4,5 g/L	5 mg/L	15 mg/L	290 mg/L	14,25

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

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

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

Tabla 1. Codificación de los vinos y tipo de antioxidante añadido.		
Código	Adición de compuestos antioxidantes en mosto	Adición de compuestos antioxidantes en el embotellado
VSO1	30 mg/L SO <sub>2</sub> total	Llevar a 30 mg/L SO <sub>2</sub> libre
VSO2	15 mg/L SO <sub>2</sub> total	Llevar a 15 mg/L SO <sub>2</sub> libre
VDL1	15 mg/L SO <sub>2</sub> total + 300 mg/L LSI-GSH 1	Llevar a 15 mg/L SO <sub>2</sub> libre
VDL2	15 mg/L SO <sub>2</sub> total + 300 mg/L LSI-GSH 2	Llevar a 15 mg/L SO <sub>2</sub> libre
VDL3	15 mg/L SO <sub>2</sub> total + 300 mg/L LSI-GSH 3	Llevar a 15 mg/L SO <sub>2</sub> libre
VDL4	15 mg/L SO <sub>2</sub> total + 300 mg/L LSI-GSH 4	Llevar a 15 mg/L SO <sub>2</sub> libre
VDL5	15 mg/L SO <sub>2</sub> total + 300 mg/L LSI-GSH 5	Llevar a 15 mg/L SO <sub>2</sub> libre

Los vinos VSO1 y VSO2 se tomaron como vinos control, por lo que no se les añadió ningún derivado de LSI-GSH. Antes de dar comienzo a la fermentación alcohólica, el mosto de la muestra VSO1 fue llevado a 30 mg/l de SO<sub>2</sub> total.

El seguimiento de la fermentación alcohólica se realizó diariamente midiendo densidad y temperatura de cada depósito. Una vez finalizada la fermentación alcohólica se sulfitaron los vinos hasta conseguir la dosis de 30mg/l de SO<sub>2</sub> libre en el caso del vino VSO1, y de 15 mg/l de SO<sub>2</sub> libre en los demás vinos. Una vez corregido el sulfuroso, se guardaron los vinos en una cámara a una temperatura de 6°C durante 7 días para conseguir una correcta estabilización por frío. Se realizó una analítica final de todos los vinos midiendo los siguientes parámetros: pH, acidez total y volátil, grado alcohólico, azúcares reductores, polifenoles totales, antocianos totales, taninos totales, ácidos hidroxycinámicos, flavonoles y parámetros de color. Todas las analíticas se realizaron por duplicado para cada vino.

Los vinos fueron sometidos a un test acelerado de oxidación, calentando los vinos a 45°C durante 7 días con una cámara de aire, con el objeto de favorecer su oxidación. Se tomarán muestras a los 0, 1, 2, 4 y 7 días, y se evaluarán los siguientes parámetros por duplicado: IPT, antocianos totales, taninos totales, ácidos hidroxycinámicos, flavonoles y parámetros de color. Las muestras se centrifugarán a 4000 rpm durante 10 minutos antes de analizarlas.

#### 4.1.2.2 Tratamiento estadístico:

Con toda la información obtenida gracias a las analíticas realizadas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), con la intención de comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los parámetros físico-químicos ( $p < 0,05$ ), comprobando así el efecto de los preparados de LSI-GSH añadidos.

Posteriormente con el test de Tukey se realizaron los diferentes subconjuntos homogéneos definidos con letras. Además, se incluyó un análisis por componentes principales. Dichos análisis se llevaron a cabo con el programa estadístico Statgraphics Centurión XVI.

#### 4.1.3 Resultados y discusión:

##### 4.1.3.1 Seguimiento de la fermentación alcohólica:

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

En la gráfica de tiempo-densidad (Fig. 3.) se muestra de forma comparativa, la cinética de fermentación de todos los vinos.

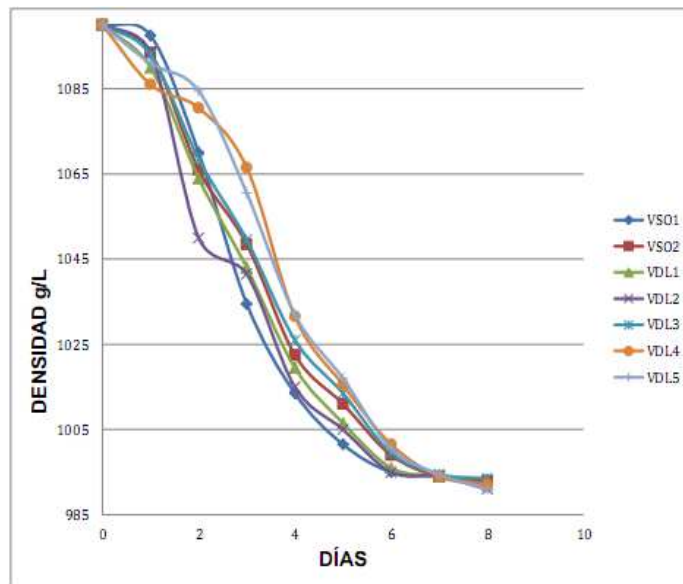


Fig. 3. Cinética de fermentación de los vinos rosados: VS01 (Vino control 1); VS02 (Vino control 2); VDL (Vinos que contienen derivados de LSI-GSH).

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

Si observamos las cinéticas de fermentación de los vinos control (VSO1 y VSO2), existe un ligero retraso en el inicio de fermentación del vino con la mayor concentración de SO<sub>2</sub> (VSO1), sin embargo, rápidamente se observa un incremento en la velocidad de su fermentación, superando al vino VSO2. Este fenómeno se debe a un efecto de activación que tiene el SO<sub>2</sub> en dosis normales de vinificación. La destrucción de sustancias tóxicas, la elevación de la actividad proteásica de la levadura que incrementa los niveles de nitrógeno orgánico asimilable y el mantenimiento en el medio de una mayor cantidad de oxígeno disuelto que favorece la multiplicación de las levaduras son algunas de las posibles causas que pueden explicar la acción estimulante del SO<sub>2</sub>.

Por otro lado, los vinos VDL1 y VDL2 presentan unas cinéticas de fermentación más rápidas que su vino control (VSO2) y el resto de los vinos suplementados con LSI-GSH, finalizando su fermentación un día antes. Es probable que el diferente efecto de los preparados de LSI-GSH en la velocidad de fermentación sea causado por su distinta composición. La mayor parte de estas preparaciones pueden incluir la parte soluble citoplasmática de las levaduras rica en nitrógeno que favorece el desarrollo de las levaduras. Sin embargo, este efecto no se ha observado en mostos con un alto contenido en nitrógeno asimilable (300 mg/L).

Por otro lado, la adición de la fracción insoluble de las levaduras puede mejorar la eficiencia de la fermentación en medios ricos en nitrógeno debido al efecto detoxificante de las paredes de levadura, ya que son capaces de adsorber metabolitos tóxicos como los ácidos grasos de cadena corta. Por otro lado, se ha descrito un mayor contenido en esteroides en estas preparaciones, lo que permitirá aumentar la permeabilidad de las membranas dando lugar a una mayor eficiencia en la fermentación.

El preparado LSI-GSH VDL4 promueve un comienzo más rápido de fermentación, aunque no acorta la duración total de la misma.

4.1.3.2. Análisis de los resultados Físicos –Químicos sobre la adición de LSI-GSH sobre los parámetros del vino:

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

Tabla 2. Parámetros básicos de los vinos rosados.

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

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

Para los parámetros pH, acidez total, grado alcohólico y acidez volátil no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos vinos control (VSO1 y VSO2), por lo que la reducción del nivel de SO<sub>2</sub> no afectó a estos parámetros.

La reducción en el nivel de sulfuroso no promueve notables cambios en los parámetros básicos ni en el color de los vinos, lo que nos lleva a la conclusión que la adición de LSI-GSH ha aportado el mismo efecto que el sulfuroso durante la fermentación en condiciones normales.

Si comparamos el vino control (VSO2) con los vinos con LSI-GSH, no se observan marcadas diferencias entre los vinos, a excepción de las encontradas para los vinos VDL2 y VDL3. En el vino VDL2 se observó la mayor acidez volátil (0,29 mg/L), no observándose diferencias estadísticamente significativas entre el control y el resto de vinos con LSI-GSH.

Por otro lado, el vino VDL3 además de tener un bajo valor de pH (3,09), presentó la acidez total más elevada, característica importante en un vino rosado, y un menor grado alcohólico (9,9%).

Existen pocos estudios que nos aporten información acerca del efecto de la adición de LSI-GSH durante la vinificación.

Recientemente, Andújar-Ortiz et al. analizaron el efecto que tenía el empleo de un preparado de LSI-GSH sobre la calidad de un vino rosado de Garnacha. Sus resultados no concluyeron que existieran diferencias importantes entre los valores de los parámetros básicos del vino (pH, acidez total y volátil y grado alcohólico).

Por otro lado, en un estudio realizado en vino Verdejo, la adición de LSI-GSH no modificó notablemente los valores de pH, acidez total y volátil y azúcares reductores, sin embargo, se obtuvieron vinos con un ligero incremento en su graduación alcohólica. Otros autores han abordado el estudio de diversas preparaciones comerciales de LSI durante la vinificación de vinos tintos y blancos, y han observado que los parámetros enológicos básicos (pH, acidez total y volátil y grado alcohólico) no se veían modificados por la adición de las LSI.

En este estudio, el índice de polifenoles totales (IPT) (Fig. 4) no presenta diferencias estadísticamente significativas, al igual que los flavonoles (Fig. 6) y los ácidos hidroxicinámicos (Fig. 5) entre los vinos.

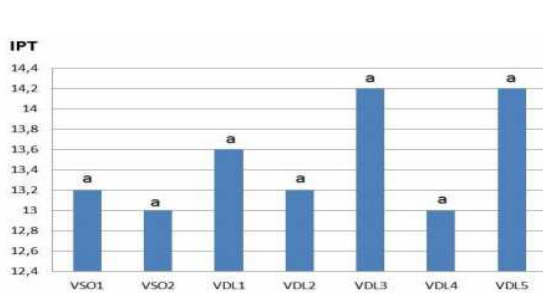


Fig. 4. IPT de los vinos rosados terminados

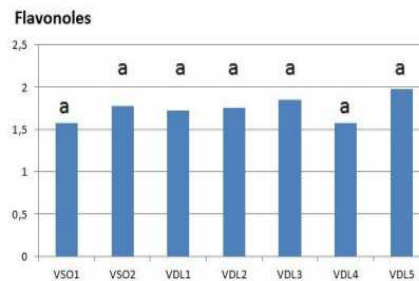


Fig. 6. Flavonoles (Abs 365) de los vinos rosados terminados.



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

En cambio en cuanto al nivel de antocianos y taninos (Fig. 7 y 8, respectivamente), el vino control VSO1 presentó los mayores niveles en estos parámetros. Probablemente el uso de una mayor dosis de SO<sub>2</sub> disminuyó la oxidación de estos compuestos. Por otro lado, no se



observaron diferencias estadísticamente significativas entre el vino control VSO2 y los vinos con LSI-GSH para los antocianos y taninos.

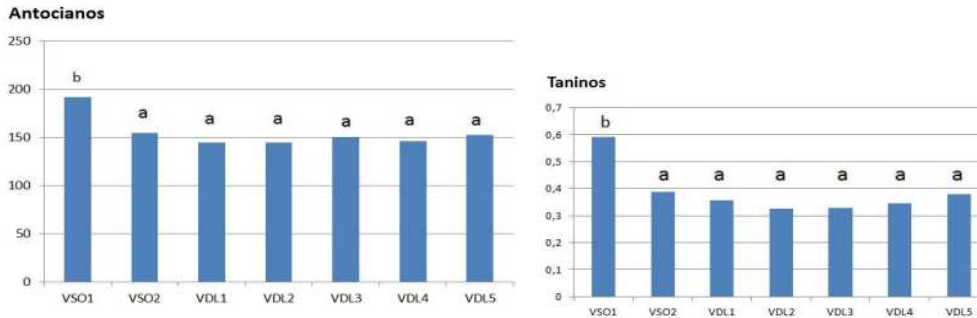


Fig. 7. Antocianos (mg/L) de los vinos rosados terminados. Fig. 8. Taninos (g/L) de los vinos rosados terminados.

A priori, se podría pensar que estos preparados no tienen un efecto protector frente a la oxidación de estos compuestos, sin embargo es conocido el poder antioxidante del GSH. Por otro lado, los polisacáridos de la pared celular presente en los preparados de LSI-GSH pueden formar compuestos insolubles que reducen los niveles de antocianos y taninos. De esta forma, es probable, que la acción antioxidante de las LSI-GSH (que implicaría un mayor nivel de antocianos y taninos que su vino control) se encuentre compensada por la formación de compuestos insolubles con los polisacáridos.

En cuanto a los parámetros de color, tanto el % de amarillo como el % de rojo sí presentan diferencias estadísticamente significativas entre las muestras (Fig. 9 y 10, respectivamente), en cambio el % de azules no (Fig. 11).

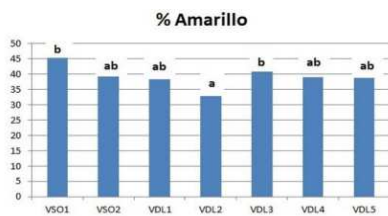


Fig. 9. % Amarillo de los vinos rosados terminados.

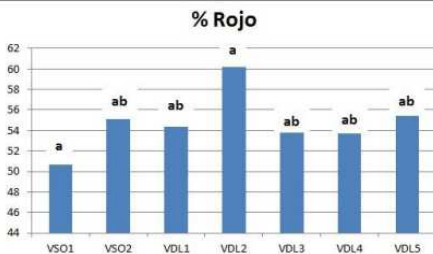


Fig. 10. % Rojo de los vinos rosados terminados.



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

En los vinos control la reducción de la dosis de SO<sub>2</sub>, no modificó los parámetros de color. Por otro lado, la adición de LSI-GSH no tiene una clara influencia en el color del vino. El vino VDL2 presentó los menores valores para el % de amarillo y los mayores para el % de rojo, sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Estos resultados están en consonancia con los encontrados por Andújar-Ortiz, que no encontraron claras diferencias entre los vinos rosado control y con LSI-GSH para los parámetros de color después de la fermentación alcohólica.

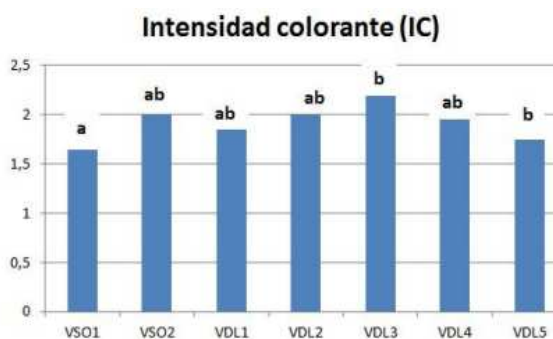


Fig. 12. Intensidad colorante de los vinos rosados terminados.

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

#### 4.1.3.2.3 Análisis multivariante de fin de fermentación:

Se realizó un análisis por componentes principales de las muestras de vinos para comparar el efecto que produce en los parámetros físico-químicos la utilización de diferentes preparados de LSI-GSH. Debido al elevado número de variables estudiadas, es necesario realizar una compresión de los datos, reduciendo el número de variables a unas pocas denominadas componentes principales (CP) pero manteniendo la máxima información. De este modo, en este análisis se emplearon 13 variables que fueron reducidas a cuatro CP con autovalores mayores o iguales a 1,0.

Estas cuatro CP juntas consiguieron explicar el 92,6% de la variabilidad de los datos originales. La CP1 explicó el 46,8% de la varianza; por otro lado, la CP2 explicó el 24,8% de la varianza.

En el gráfico de la Fig.13, se muestra el diagrama de dispersión de las muestras de vino y de las variables en función de las CP1 y CP2.

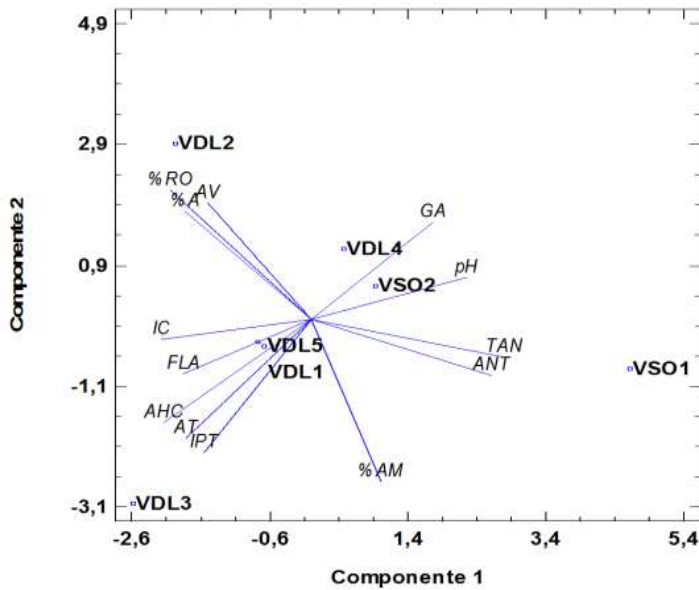


Fig. 13. Diagrama de dispersión de las muestras de vino y de las variables en función de las CP1 y CP2.

Puede observarse que hay cuatro vinos agrupados de dos en dos (VDL4 y VSO2) (VDL1 y VDL5), el resto de vinos aparecen separados a lo largo de todo el gráfico. Dependiendo de la cercanía de las muestras a unos parámetros u otros, su concentración será mayor o menor.

El vino VSO1, se encuentra separado del resto con valores positivos elevados de CP1 y valores algo negativos de CP2, por lo tanto este vino se caracteriza por altos valores de taninos, antocianos, pH y % amarillo.

Los vinos VSO2 y VDL4 presentan características similares al estar agrupados en el cuadrante positivo de la CP1 y de la CP2, caracterizándose por tener la mayor graduación alcohólica y el mayor pH, a la vez que presentan la menor acidez total y el menor nivel de IPT.

El vino VDL2 se encuentra en el cuadrante muy positivo de la CP2 y negativo de la CP1, presentando altos valores de % rojo, % azul y acidez volátil.

Los vinos VDL1 y VDL5 se encuentran agrupados en una región intermedia, presentando valores bajos para todos los parámetros.

Por último el vino VDL3 se encuentra en el cuadrante negativo tanto de CP1 como de CP2, presentando los mayores niveles de IPT, AT, AH y flavonoles; este vino además presenta la graduación y el pH más bajos.

Atendiendo a los distintos compuestos fenólicos analizados, hay indicios que los vinos suplementados con las LSI-GSH1 y LSI-GSH2 sufrieron menos grado de oxidación durante el test de oxidación. Si bien, este comportamiento no se puede corroborar con los parámetros de color.

#### 4.1.3.3 Test acelerado de oxidación:

Con el objetivo de comprobar el efecto que tiene la adición de preparados de LSI-GSH sobre la oxidación de los vinos rosados, se llevó a cabo una oxidación acelerada siguiendo el procedimiento propuesto por Singleton y Kramling. A continuación se muestran los resultados obtenidos en los análisis realizados durante los días 0, 1, 2, 4 y 7 de oxidación para los compuestos fenólicos y el color. Los resultados están expresados en % relativos, suponiendo el 100% el valor para después de la fermentación alcohólica (día 0).



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

### FLAVONOLES

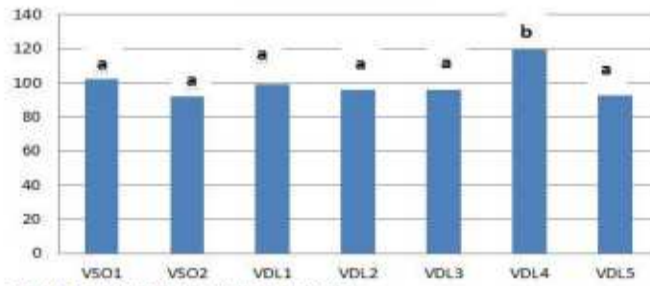


Fig. 19. Flavonoles al día 4 del test oxidación.

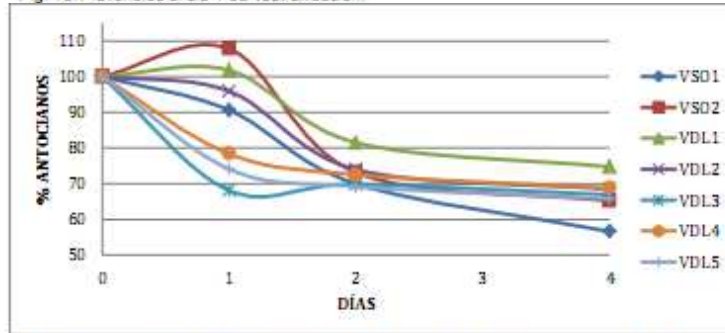


Fig. 20. Evolución relativa (en %) de antocianos durante el test de oxidación.

### ANTOCIANOS

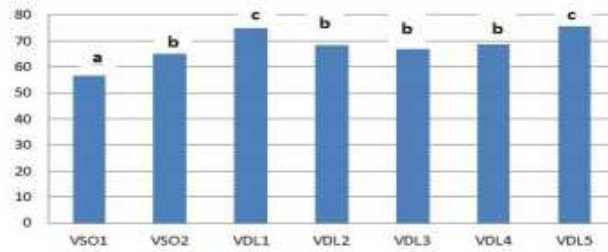


Fig. 21. Antocianos al día 4 de oxidación.

### Evolución Taninos - Oxidación

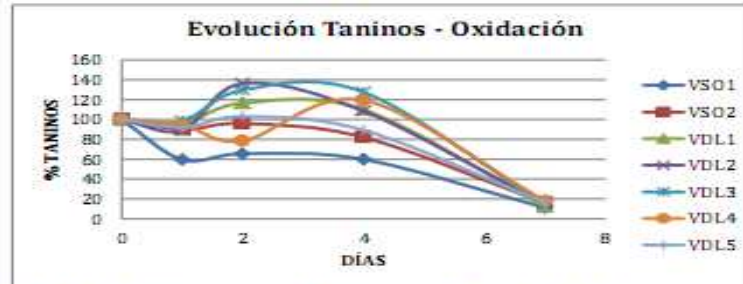


Fig. 22. Evolución relativa (en %) de taninos durante el test de oxidación.

### TANINOS

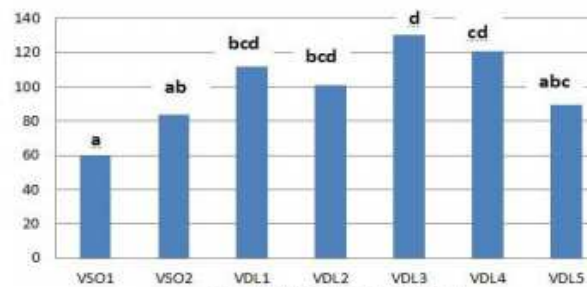


Fig. 23. taninos al día 4 de oxidación.

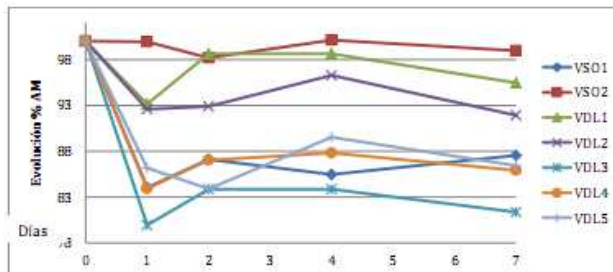


Fig. 24. Evolución relativa (en %) de amarillo durante el test de oxidación.

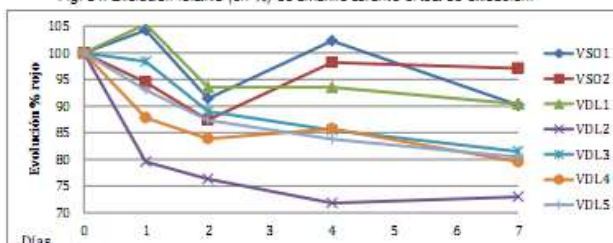


Fig. 25. Evolución relativa (en %) de rojo durante el test de oxidación.

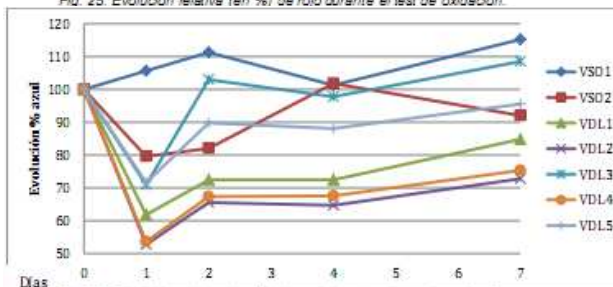


Fig. 26. Evolución relativa (en %) de azul durante el test de oxidación.

Durante el test acelerado de oxidación todos los vinos experimentaron un descenso medio en el nivel de polifenoles totales (Fig. 14), que fue más acusado para el vino VDL5. Por otro lado el vino VDL1 experimentó el menor descenso de todos.

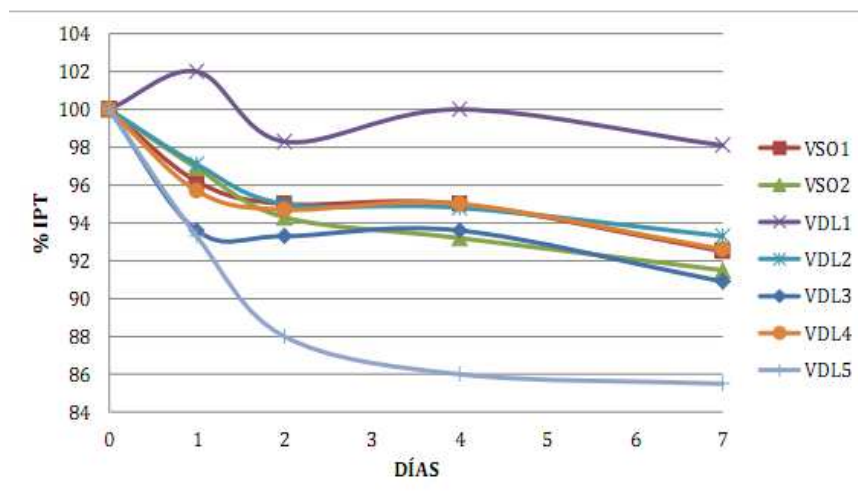


Fig. 14. Evolución relativa (en %) del IPT durante el test de oxidación.

Este fenómeno tiene explicación debido a la acción de las temperaturas elevadas que favorecen la oxidación de los vinos, conduciendo a una pérdida de compuestos polifenólicos. Del análisis de varianza realizado con los datos del 4º día de oxidación (Fig. 15) se determinó que no había diferencias estadísticamente significativas entre los dos vinos control.

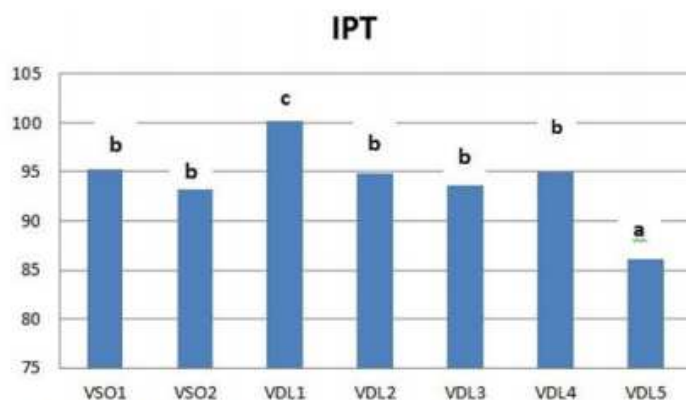


Fig. 15. IPT al 4º día de oxidación.

Por otro lado, el menor y mayor descenso en el % relativo de IPT se observó en los vinos VDL1 y VDL5, respectivamente. Finalmente, el resto de vinos suplementados con LSI-GSH no mostraron diferencias estadísticamente significativas con los vinos control.

Tanto los ácidos hidroxicinámicos como los flavonoles (Fig. 16 y 18, respectivamente), experimentaron un cierto aumento en el porcentaje de evolución, para todos los vinos durante el test acelerado de oxidación.

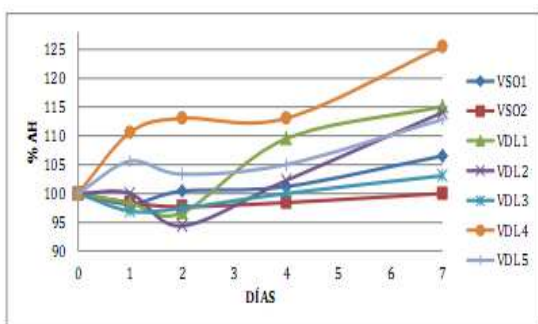


Fig. 16. Evolución relativa (en %) de ácidos hidroxicinámicos durante el test de oxidación

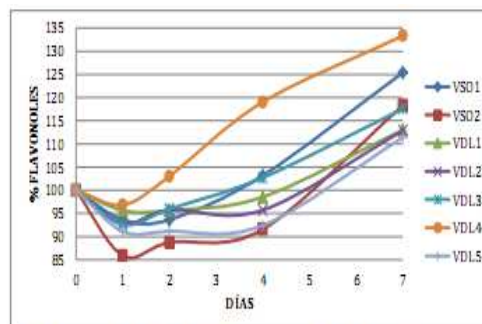


Fig. 18. Evolución relativa (en %) de flavonoles durante el test de oxidación

Probablemente, este comportamiento sea debido a la formación de compuestos oxidados con absorbancia a 320 y 365 nm. El estudio estadístico al 4º día de oxidación reveló que los vinos VDL1 y VDL4 son los que mostraron mayor absorbancia a 320 nm, mientras que el VDL4

mayor absorbancia a 365 nm. Además, no se observaron diferencias para ambos parámetros entre los vinos control.

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

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

Este fenómeno es normal debido a que la exposición prolongada de un vino a un tratamiento térmico en presencia de oxígeno, produce que los compuestos fenólicos se oxiden a coloraciones amarillas, pudiendo polimerizarse y precipitar disminuyendo su contenido total.

Finalmente, para una mejor comprensión de los resultados al 4º día de oxidación se realizó un análisis por componentes principales con las variables significativas. La CP1 recoge el 45,7% de la variabilidad de los datos, mientras que la CP2 el 28,8%. En la Fig. 27 se observa que las muestras se agrupan en varios subgrupos. Cabe destacar el grupo formado por los vinos VDL1 y VDL4 que presentan los mayores niveles para los % relativos para todos los parámetros analizados, lo que nos puede indicar que los vinos suplementados con los



derivados de LSI-GSH1 y LSI-GSH4 sufrieron un menor grado de oxidación, si bien, es preciso comentar que no se observaron diferencias estadísticas para los parámetros de color.

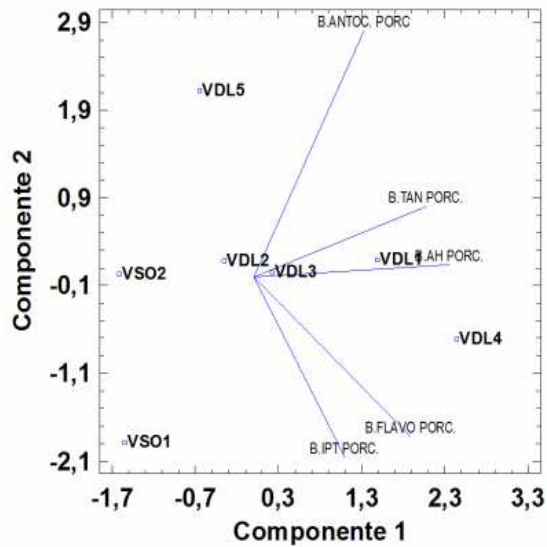


Fig. 27. Diagrama de dispersión de las muestras de vino y de las variables al 4º día de oxidación en función de las CP1 y CP2.

La conclusión final de este estudio es que el empleo de levaduras inactivas ricas en glutatión sí tiene consecuencias sobre la oxidación de los vinos rosados, limitando las pérdidas de color.

Sin embargo no se puede corroborar esta afirmación con absoluta certeza, para ello sería necesario desarrollar estudios complementarios que aporten nuevos datos con los que poder comparar los resultados obtenidos.

## 4.2 Nuevo método UPLC-MS / MS para evaluar el efecto de la preparación de levadura o levadura seca cepa inactiva enriquecido en los niveles de glutatión en las células de levaduras, mosto, vino y durante la fermentación alcohólica

### 4.2.1 Introducción

La actividad antioxidante de glutatión reducido (GSH) en el mosto y el vino ha sido bien establecida.

El glutatión reducido (GSH), la forma dominante en las bayas de uva se ha encontrado que puede aumentar o disminuir durante la fermentación alcohólica.

La evolución de GSSG, formado tras la oxidación de GSH, durante la fermentación alcohólica, encontró que los niveles de GSSG aumentaron inicialmente y luego disminuyeron durante la fermentación del jugo de Koshu. También han informado de niveles de GSSG en el jugo de uva blanca con diferentes adiciones de oxígeno en un rango de 0,46 mg /L a 2,93 mg/ L.

Manejo oxidativo del jugo condujo a niveles significativamente más altos de GSSG. La cuantificación de GSSG puede resultar interesante ya que, posiblemente, podría ser utilizado como un indicador para la oxidación.

En vino niveles de GSH elevados pueden contribuir indirectamente a la calidad del vino. Sin embargo, la adición de la categoría alimenticia GSH al mosto o vino no está permitido por la regulación del vino actual. Hay, sin embargo, otros aditivos permitidos disponibles en el mercado que pretenden aumentar los niveles de GSH vino y tener efectos positivos en la calidad del vino, especialmente en términos de aroma y la preservación del color . Estos productos, que se refiere como preparaciones de levaduras secas inactivas enriquecidas-GSH (GSH-IDYs) se incorporan durante la fermentación alcohólica y pretenden aumentar el contenido de GSH vino, ya sea por la liberación de GSH en el vino, o permitiendo que la levadura para asimilar precursores de GSH para síntesis de GSH durante la fermentación alcohólica. GSH, que presenta más de 95% de los tioles no proteicos en *Saccharomyces cerevisiae*, puede dar cuenta de 0,5 a 1% del peso seco celular, dependiendo de las condiciones de crecimiento. GSH-IDYs se fabrican a partir de la inactivación térmica de *S. cerevisiae* cultivado bajo condiciones específicas que estimulan la acumulación intracelular de GSH.

Hasta la fecha hay sólo un estudio ha evaluando los niveles de GSH liberados de GSH-IDYs. Cuando se añade a 0,3 g / l para modelar el vino, los niveles de GSH liberados de cuatro GSH-IDYs diferentes oscilaron entre 1 y 2 mg / l, mientras que el total de niveles GSH oscilaron entre 1,82 mg / L y 2,72 mg / L. Además, los efectos de ciertos parámetros de vino, tales como etanol y dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), sobre la liberación de GSH por GSH-IDYs no se han dilucidado.

Del mismo modo, el tiempo de adición óptima de este producto durante la fermentación alcohólica, no se ha determinado en detalle.

Existen diversos métodos de análisis que se han desarrollado para el determinación de GSH, GSSG y el total de GSH en la uva, mosto y vino.

Recientemente un método de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UPLC) acoplado con un detector de matriz de foto (PAD) también se ha desarrollado utilizaron la electroforesis capilar acoplada con detección de fluorescencia inducida por láser y espectrometría de absorción atómica.

Muchas de las metodologías antes mencionadas requieren mucho tiempo y se necesitan una amplia preparación de la muestra. Por lo tanto surge la necesidad de un método rápido, preciso y robusto que requiere la preparación de muestras mínimo para la determinación simultánea de GSH y GSSG en el jugo de uva y el vino.

El objetivo de este estudio fue, por tanto, desarrollar un método UPLC-MS / MS confiable, rápido y selectivo para la determinación simultánea de GSH y GSSG en el jugo de uva, mosto y vino. El método también permite la determinación simultánea de GSH y GSSG en células de levadura, así como GSH-IDYs.

Este método se aplicó para evaluar los niveles de GSH y GSSG extracelulares durante la fermentación alcohólica complementados con GSH-IDY. Además, los efectos de la cepa de levadura y tratamientos de canopia de vid en ambos niveles extra e intracelulares de GSH y GSSG en un Sauvignon blanc deben durante la fermentación alcohólica se evaluaron.

## 4.2.2 Materiales y métodos

### 4.2.2.1 Método UPLC-MS / MS

UPLC-MS / MS Se realizaron análisis sobre una Waters Acquity UPLC conectado a un espectrómetro de masas Waters Xevo de triple tetrapolo usando ionización por electrospray en el modo positivo.

Separación se realizó en una columna Waters Acquity BEH Fenil (100 x 2,1 mm, 1,7 micras), utilizando un ácido trifluoroacético 0,4% (disolvente A) a acetonitrilo (Disolvente B) gradiente (Tabla 4.1). El volumen de inyección fue de 3µL

Tabla 4.1 concentración de Solventes en el gradiente de elución; A: ácido trifluoroacético 0,4% (v / v), B: acetonitrilo.

Time (min)	Flow (mL/min)	% A	% B
0	0.3	100	0
0.1	0.3	100	0
3.5	0.5	98	2
3.8	0.5	0	100
4	0.5	0	100
4.01	0.3	100	0
5.5	0.3	100	0

Los ajustes de MS se optimizaron para mejor sensibilidad, se utilizó un voltaje de cono de 18V para GSH reducido y 20V para GSSG oxidada. Los datos fueron adquiridos en el modo de monitorización de reacción múltiple (MRM). Una transición MRM de 308,1> 179.1 a una energía de colisión de 17V se utilizó para GSH.

Una transición MRM de 613.1> 355.1 a una energía de colisión de 20V se utilizó para GSSG. Las recuperaciones fueron probados en diversas matrices incluyendo el jugo blanco y el tinto de uva y el vino, jugo de uva medios químicamente definidos, la solución vino de modelo y de solución salina tampón fosfato. Se encontró que una dilución de cinco veces en agua era óptima para dar los mejores recuperaciones y formas de los picos.

### 4.2.2.2 Determinación de GSH en libertad de varios GSH-IDYs

El GSH, GSSG y los niveles de GSH total (GSH + 2 X GSSG equivalentes molares) liberados en solución del modelo de cinco GSH-IDYs comerciales diferentes fueron evaluados utilizando una solución modelo. Los GSH-IDYs fueron suministrados por diferentes fabricantes (Lallemand, LAFFORT, Springer Oenologie y Enartis).

La solución modelo consistió en 5 g / L de ácido tartárico se ajustó a pH 3,3 usando NaOH 5 M . Gas N<sub>2</sub> se burbujeó a través de las soluciones modelo para alcanzar una concentración de O<sub>2</sub> <1 mg / L (medidor de oxígeno NomaSense con sonda de inmersión).

1 g de GSH-IDY fue transferido cuantitativamente en un matraz aforado de 100 ml, lleno hasta la marca con solución de modelo y se agita durante 10 minutos donde después de los análisis se realizó el muestreo de GSH. Este experimento se realizó por triplicado.

#### 4.2.2.3 Influencia del tiempo, SO<sub>2</sub> y etanol sobre la liberación de GSH por GSH-IDYs en la solución modelo

Con el fin de determinar los efectos del dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) y etanol (EtOH) sobre la liberación de GSH en la solución modelo, SO<sub>2</sub> (50 mg / L, K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) y EtOH (12% v / v) adiciones a la solución de modelo de acuerdo con la Tabla 4.2.

1 g de GSH-IDY fue transferido cuantitativamente a un matraz aforado de 100 ml, lleno hasta la marca con el modelo solución y se agita durante 10 minutos donde después se extrajo la primera muestra de GSH. Los vinos modelo se mantuvieron a 20 ° C después de lo cual se extrajeron muestras adicionales después de 1 hora y 24 horas de tiempo de contacto.

El contenido de GSH se determinó como mg / L o GSH GSSG liberado de 0,3 g / L de GSH-IDY. Este experimento se realizó por triplicado para dos GSH-IDYs.

**Table 4.2** Codes and description of the different model wines prepared.

Code	EtOH (% v/v)	SO <sub>2</sub> (mg/L)
-EtOH/-SO <sub>2</sub>	0	0
+EtOH/-SO <sub>2</sub>	12	0
-EtOH/+SO <sub>2</sub>	0	50
+EtOH/+SO <sub>2</sub>	12	50

\*Added as tartaric acid

*Tabla 4.2 Códigos y descripción de los diferentes vinos modelo preparadas.*

#### 4.2. 2.4 Influencia de GSH-IDY añadió en diferentes etapas de fermentación en los niveles de GSH en el vino en producción a pequeña y gran escala

Para la producción de vino en pequeña escala, las uvas se cultivan y procesan de acuerdo con prácticas vitícolas y enológicas estándar. Mosto de Sauvignon blanc se obtuvo de bodega KWV, en Paarl, en bidones de 20 litros de acero inoxidable.

Tras la trituración, se añadió una dosis de 50 mg / L de SO<sub>2</sub> al jugo. El aire en los contenedores había sido desplazada por el gas CO<sub>2</sub> .Gas adicional de CO<sub>2</sub> fue volado en el

espacio de cabeza para excluir cualquier contacto de oxígeno y los recipientes fueron transportados a la bodega experimental de la Universidad de Stellenbosch.

A su llegada a la bodega experimental, se midieron parámetros de vino estándar analíticos (°Brix, pH, acidez valorable como equivalentes de ácido tartárico) utilizando un GrapeScan FT 120 instrumentos. Concentración de amoníaco se cuantificó por Bioanálisis usando el método UV-glutamato deshidrogenasa enzimática. Nitrógeno Libre de ácido  $\alpha$ -amino se determinó por el ensayo espectrofotométrico o-ftaldehído / N-acetil-L-cisteína descrito por Dukes y Butzke. YAN se expresa como la suma del nitrógeno ácido  $\alpha$ -amino (FAN), además de nitrógeno amoniacal. SO<sub>2</sub> libre y unida de los jugos se midió utilizando el método de aspiración. Los valores se presentan en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3 Composición del mosto Sauvignon blanc.

Table 4.3 Composition of the Sauvignon blanc must.

Free SO <sub>2</sub> (mg/L)	Total SO <sub>2</sub> (mg/L)	YAN <sup>a</sup> (mg/L)	°Brix	pH	TA <sup>b</sup> (g/L <sup>c</sup> )
12.5	44	380	21.8	3.38	6.68

a) YAN: levadura de nitrógeno asimilable  
(amoníaco nitrógeno ácido +  $\alpha$ -amino)

b) acidez tratable

c) equivalentes de ácido tartárico

A continuación, el zumo se desplazó con gas CO<sub>2</sub> en botellas de vidrio de 2 litros a un volumen de 1,8 litros por botella.

Las botellas de vidrio se habían llenado previamente con agua que luego se desplazó con gas CO<sub>2</sub> para lograr atmósfera inerte. La concentración de SO<sub>2</sub> libre de cada tratamiento se ajustó a 30 mg / L por medio de 2,5% de adición SO<sub>2</sub> (solución K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) y los niveles de SO<sub>2</sub> fueron confirmados por una unidad de titulación Metrohm.

A continuación, el zumo se inoculó con levadura *S. cerevisiae* QA23 a 0,3 g / L rehidratado en GoFerm Protect® de acuerdo con la recomendación del proveedor. GSH-IDY-4 además en 0,3 g / L se hizo para los diferentes tratamientos que se enumeran en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4 Tiempo de GSH-IDY-4 adiciones a Sauvignon Blanc mosto durante la fermentación alcohólica.

Table 4.4 Time of GSH-IDY-4 additions to Sauvignon blanc must during alcoholic fermentation.

Code	Description
Control	No addition made
Juice	Addition made to settled juice directly before inoculation with yeast
1/3	Addition made 1/3 through fermentation (at 14.5 °Brix)
2/3	Addition made 2/3 through fermentation (at 7.3 °Brix)

Luego, cada botella se selló con un tapón de goma provisto de una bolsa de aire para liberar CO<sub>2</sub> durante la fermentación y luego se pesa. La fermentación se inició a temperatura ambiente después de lo cual las botellas se transfirieron a una habitación de temperatura controlada fijado en 15 ° C. FermaidK® nutriente de levadura a 0,25 g / L se añadió a la fermentación debe después de que se habían fermentado 5 ° Brix.

Las botellas se pesaron cada día para seguir el progreso de la fermentación. Cuando la pérdida de masa se detuvo durante tres días consecutivos, GrapeScan FT 120 da como resultado confirmó que todos los vinos secos se fermentan hasta un contenido de azúcar residual <5 g / L. Este experimento, todos los controles y los tratamientos, se realizó por triplicado. Se tomaron muestras tres veces durante el curso del experimento; muestras de jugo extraídos antes de la inoculación, el mosto de muestras en medio de muestras de fermentación y el vino alcohólicas después de la finalización de la fermentación alcohólica.

Fermentaciones a mayor escala se realizaron en dos bodegas comerciales diferentes para evaluar la influencia de las adiciones de GSH-IDY de mostos en los niveles de GSH en el vino. El mismo mosto de Sauvignon blanc utilizado en la escala pequeña fermento se utilizó para producir vino en una escala más grande en KWV, una bodega comercial en Paarl, Sudáfrica.

En el otro experimento a gran escala, llevó a cabo en la bodega Hartenberg, Stellenbosch, Sudáfrica, se utilizó jugo de Riesling. 1 600 tanques de fermentación litros se utilizaron a KWV mientras que 10 000 tanques de litros se utilizaron en la bodega Hartenberg. Los tanques (de control y tratamiento de GSH-IDY) se llenaron alternando con el jugo establecido para asegurar la homogeneidad.

Los mostos de Sauvignon Blanc y Riesling se inocularon con 0,3 g / L de *S. cerevisiae* QA23 levadura y D254 , respectivamente, rehidratada en GoFerm Protect® de acuerdo con las recomendaciones del proveedor.

Además GSH-IDY-4 en 0,3 g / L se hizo para el tratamiento de GSH-IDY tercera en la fermentación alcohólica (correspondiente a "1/3", como aparece en la Tabla 4.4). FermaidK® levadura de nutrientes (Lallemand) a 0,25 g / L fue añadido a la fermentación después del 5 ° Brix que habían fermentado.

Debido a las limitaciones de capacidad de las bodegas comerciales, las fermentaciones a gran escala no se repitieron. Tres muestras fueron tomadas durante el curso del experimento; muestras de jugo extraídos antes de la inoculación, el mosto de muestras en medio de muestras de fermentación y el vino alcohólicas después de la finalización de la fermentación alcohólica.

#### 4.2.2.5 Influencia de la cepa de levadura y tratamientos en viña sobre la canopia en niveles de GSH extra e intracelular durante la fermentación alcohólica

##### 4.2.2.5.1 Diseño experimental de la viña

Este ensayo se realizó en 2011 en un Sauvignon blanc comercial (*Vitis vinifera* L) Edificio situado en la región de Overberg . Las viñas (clon 316 injertados sobre portainjertos 101.14 Ruggeri) se plantaron en 2004. La dirección de la fila era NW-SE (2,8m x 1,5m). El sistema de crecimiento y formación fue la espaldera posicionado (VSP) espaldera (2 niveles de alambres móviles) y el sistema de poda del cordón de división.

Dos tratamientos se aplicaron a la canopia del Sauvignon blanc: el lado con radiación solar de la mañana con racimos expuestos al 100% y el otro con racimos sombreadas al 100%. Una hoja total y la extracción lateral en la zona de racimo (40 cm altura desde el cordón) se aplicó del 17 al 29 de diciembre de 2010.

El tratamiento con sombra era un canopia gruesa permanente en la zona del racimo durante el crecimiento del fruto y maduración. La parcela experimental fue presentado en un diseño de bloques al azar. El experimento fue diseñado más de 5 filas con 4 repeticiones de 5 plantas por tratamiento y por fila. Sólo totalmente expuestos y racimos totalmente sombreadas fueron recogidos de los tratamientos respectivos y se utilizan para producir el vino de estudio.

##### 4.2.2.5.2 Las condiciones de fermentación

Ambos tratamientos fueron el 01 de marzo 2011 cosechadas a mano a  $\pm 23$  ° Brix. Los rendimientos para los dos tratamientos fueron 203,6 kg y 350,9 kg para los tratamientos expuestos y sombreadas, respectivamente. Uvas de los dos tratamientos fueron despalladas y aplastados por separado. Treinta mg / L de SO<sub>2</sub> se añadió a la masa de uva mediante la adición de 2,5% de SO<sub>2</sub> (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Las uvas fueron prensadas a 0,5 bares y el mosto recogido en contenedores previamente forradas con hielo seco . Enzima pectolítica (Rapidase® Vino Súper), se añadió a 0,03 ml / l para el jugo, el espacio superior del recipiente lleno de gas CO<sub>2</sub> , sella y deja reposar durante la noche a 4 ° C. El mosto claro se acumuló en un recipiente bajo



gas CO<sub>2</sub>, mezclado homogéneamente y se divide en botes de 20 litros de acero inoxidable (que había sido llenado previamente con gas CO<sub>2</sub>) a un volumen de aproximadamente 15 litros y se cerró con una bolsa de aire. El ° Brix y los niveles de SO<sub>2</sub> libre se midieron en esta etapa. El contenido de azúcar de los tratamientos expuestos y sombreadas fue 23,5 y 22,7 ° Brix, respectivamente, con el nivel de SO<sub>2</sub> libre es de 25 mg / l para ambos tratamientos.

A continuación, el zumo se inoculó con *S. cerevisiae* VIN7 y Cross Evolution a 0,3 g / l de acuerdo con las recomendaciones y las fermentaciones de los proveedores se realizaron a 15 ° C. Fosfato diamónico en 0,3 g / L se añadió a la fermentación debe después de que había fermentado 5 ° Brix. GrapeScan FT 120 análisis de los vinos confirmó la finalización de la fermentación alcohólica, con la concentración de azúcar residual de todos los tratamientos que son inferiores a 2 g / L. El vino fue trasegado de las lías con gas CO<sub>2</sub>, se hizo una adición de 40 mg / L de SO<sub>2</sub> al vino después de lo cual fue estabilizado en frío a 4 ° C durante 1 semana. Todos los vinos fueron embotellados bajo gas CO<sub>2</sub> en verde 750 ml botellas y sellados con tapones de rosca. Muestras de mosto y el vino para la determinación de GSH y GSSG se elaboraron cinco veces durante la fermentación alcohólica correspondiente a 0%, 25%, 50%, 75% y 100% finalización de la fermentación en términos de pérdida de azúcar.

Muestras de levadura para la determinación de GSH intracelular y GSSG se extrajeron cuatro veces durante la fermentación alcohólica correspondiente a 25%, 50%, 75% y 100% de finalizada la fermentación en términos de pérdida de azúcar.

#### 4.2.2.6 Procedimiento de muestreo, preparación de muestras y análisis de GSH

Las muestras destinadas a GSH análisis se hizo mediante la transferencia del volumen requerido bajo gas CO<sub>2</sub> en botellas de plástico de muestreo que habían sido llenados previamente con gas CO<sub>2</sub>.

Las muestras se elaboraron con una jeringuilla a través del tapón de goma bajo reflujo CO<sub>2</sub>. Antes de la toma de muestras, se hicieron 1.000 mg / L SO<sub>2</sub> (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)y 500 mg / l de ácido ascórbico ,adiciones a las botellas de muestreo con el fin de evitar la oxidación. Gas adicional CO<sub>2</sub> fue soplado en el espacio de la cabeza de la botella de muestreo y luego se congeló inmediatamente a -20 ° C hasta que se analizara la muestra.

El muestreo en las bodegas comerciales se llevó a cabo exactamente de la misma manera que la descrita anteriormente con la excepción de que las muestras de 500 mL se recogieron directamente de los tanques utilizando los grifos de muestreo.

Para el análisis de GSH extracelular, las muestras se descongelaron el día de análisis y 2 ml centrifugaron (Centrífuga 5415 D) a 12 800 rpm durante 5 minutos a 20 ° C. El sobrenadante se diluyó cinco veces con agua de grado HPLC suplementado con 1,000 mg / L de SO<sub>2</sub> y una solución de ácido ascórbico 500 mg / L recién preparado para proteger la muestra contra la oxidación.

Las muestras extraídas para determinar el GSH y GSSG contenido liberado de las GSH-IDYs se centrifugaron inmediatamente (Centrífuga 5415 D) a 12 800 rpm durante 5 minutos a 20° C. El sobrenadante también se diluyó cinco veces con agua de grado HPLC SO<sub>2</sub> y ácido ascórbico que contiene como se describe anteriormente.

Mostos y muestras de vino para la determinación del contenido de GSH intracelular fueron extraídas de la siguiente manera.

Los mostos se mezclaron homogéneamente por burbujeo de los botes con gas N<sub>2</sub>. Una parte alícuota de 2 ml se elaboró y se centrifugó (Hermle Z233 M-2) a 5 000 rpm durante 5 minutos. Los sobrenadante se descartaron y el sedimento se lavó con 1 ml de una M EDTA 1 mM y Tris 20 (pH 8,5) solución. Las células lavadas se re suspendieron en PBS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,3 mM, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl 137 mM y KCl 2,0 mM, pH 7,4) que contiene 10% de ácido metafosfórico e interrumpió con perlas de vidrio (500 micras de diámetro) durante 20 minutos a 8°C. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación (12 000 rpm, 10 minutos, 12°C). Concentración de glutatión se determinó en el sobrenadante y se expresó como mg de GSH (o GSSG) por g de células (como peso húmedo). El sobrenadante se diluyó pero no inyecta directamente.

#### 4.2.2.7 Análisis Estadísticos

Todos los análisis se realizaron utilizando Statistica V. 10 software. Unidireccional modelo de ANOVA, de tres vías de mixto ANOVA y de medidas repetidas ANOVA de se han utilizado para los análisis estadísticos.

Diferencias significativas fueron juzgados en un nivel de significación del 5% (p <0,05).

## 4.2.3 Resultados

### 4.2.3.1 Método UPLC-MS / MS

En comparación con HPLC convencional, UPLC ofrece una mayor sensibilidad, velocidad y resolución para determinaciones analíticas, en particular cuando se combina con espectrómetros de masas capaces de adquisiciones de alta velocidad. UPLC-MS / MS cromatogramas para las normas de GSH y GSSG se muestran en la Figura 4.1. Los tiempos de elución fueron 2,1 y 1,65 min para GSSG y GSH, respectivamente.

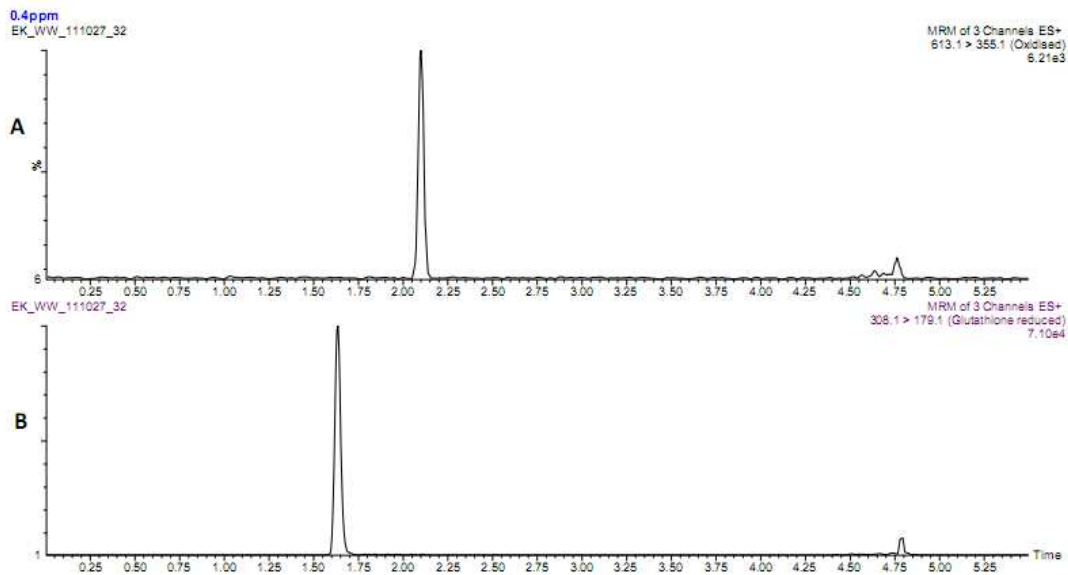


Figure 4.1 UPLC-MS/MS chromatograms of (A) GSSG (2.10 min) and (B) GSH (1.65 min) standards.

Figura 4.1 UPLC-MS / MS cromatogramas de (A) GSSG (2.10 min) y (B) GSH (1.65 min) normas

Las recuperaciones de GSH y GSSG fueron probados en diversas matrices incluyendo el vino blanco y el tinto, jugo de uva y jugo de uva con medios químicamente definidos y solución salina tampón fosfato y se demostró ser mejor que el 80%.

El límite de detección (LOD) de GSH fue de 0,002 mg / L, mientras que el límite de cuantificación (LOQ) fue de 0,01 mg / l. El LOD y LOQ de este método para GSSG fueron 0,001 mg / L y 0,005 mg / L, respectivamente.

LOD fue tomada en una señal a ruido de 3 y LOQ a una señal a ruido de 10. El método produjo respuestas lineales de hasta 20 mg / L y 40 mg / L de GSSG y GSH, respectivamente.

Tomado en cuenta la dilución de cinco veces, éstos se mejoran los intervalos de concentración en comparación con los reportados previamente. La preparación rápida de muestras que

implica una etapa de centrifugación rápida seguida por dilución permitiendo a GSH y GSSG ser cuantificada en menos de 8 minutos. Este tiempo de análisis, incluso se puede acortar si la muestra es microfiltrada (0,22 m, PVDF) en lugar de centrifugado durante 5 minutos.

Este método representa ventajas significativas sobre otros métodos para la determinación de GSH y GSSG en el zumo de uva y el vino. En primer lugar, el método permite la cuantificación directa y simultánea de GSH y GSSG sin la necesidad de derivatización o una etapa de reducción para cuantificar GSSG.

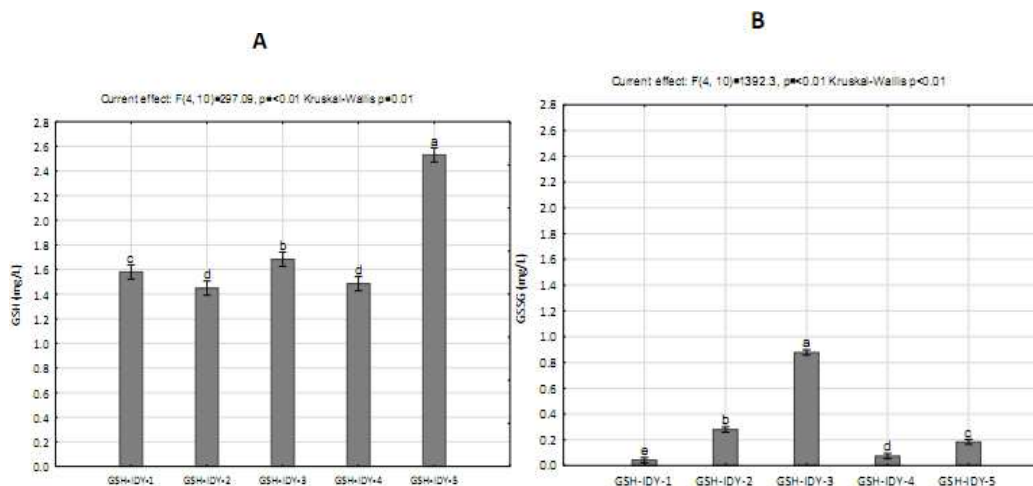
No se requiere preparación de la muestra, aparte de una etapa de centrifugación rápida y dilución. Por otra parte, este método tiene actualmente el más corto tiempo de análisis para la cuantificación de GSH y GSSG en muestras de jugo y el vino. En vista de la creciente presión medioambiental, la reducción en la generación de disolvente con esta técnica es, pues, otra ventaja.

El corto tiempo de análisis y una excelente sensibilidad del método permiten el análisis de rutina de un gran número de muestras que podría añadir un valor significativo a GSH relacionada la investigación en el vino.

#### 4.2.3.2 Determinación de GSH libre de varios GSH-IDYs

El contenido de GSH y GSSG en esta sección se presentan como un 0,3 g / L de GSH-IDY. Además con el fin de comparar los datos con los que el mosto y vino de Sauvignon blanc y el estudio de Andújar-Ortiz donde se utilizó la misma dosis.

Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la cantidad de GSH publicado por el diferente GSH-IDYs, se puede ver en la Figura 4.2.



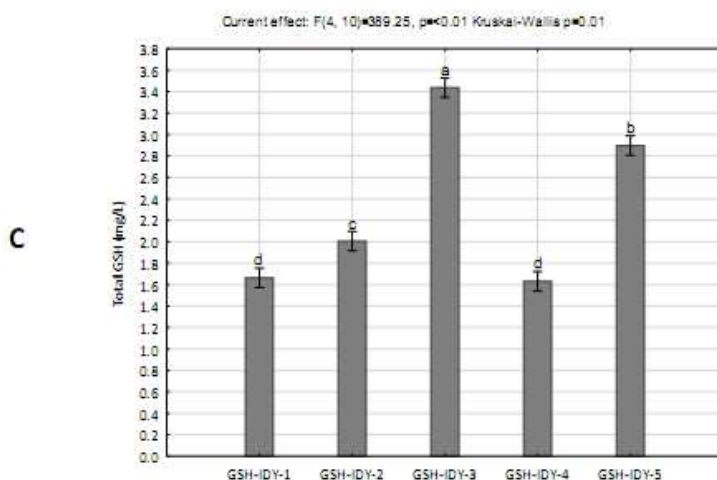


Figura 4.2 (A) reducido (GSH), (B) oxidado (GSSG) y (C) el contenido total de glutatión liberado por varios GSH-IDYs.

Las barras verticales indican el 95% intervalo de confianza para los medios. Las letras indican diferencias significativas en un nivel de significación del 5%.

El GSH liberada por las diversas preparaciones osciló entre 1,45 mg / l y 2,53 mg / l, lo que corrobora con los datos de Andújar-Ortiz quien informó de cuatro preparaciones de GSH-IDYs para liberar entre 1 mg / L y 2 mg / L GSH en soluciones de vino sintéticos. Estos autores propusieron que las diferencias en las cantidades liberadas pueden ser atribuidas a diferencias en los procesos de fabricación entre las preparaciones, especialmente en términos de los nutrientes proporcionados durante el crecimiento del cultivo de levadura.

Varias estrategias de cultivo para optimizar la producción fermentativa de GSH por *S. cerevisiae* han sido reportados en la literatura, con la cisteína siendo establecida como una de adición de ácido amino clave para la producción de GSH .La posibilidad de que las diferentes cepa también podrían haber sido responsables de las diferencias observadas en la cantidad de GSH en libertad, no debe ser descuidado. Además, el daño térmico durante el proceso de secado también puede reducir el contenido de GSH presente en GSH-IDYs , que también puede dar cuenta de la gran variación reportada por los contenidos de GSSG (0,04 mg / L a 0,88 mg / L GSSG).

Los contenidos totales de GSH liberados, variaron de 1,63 mg / L a 3,44 mg / L que es también similar a los resultados por Andújar-Ortiz que informaron los niveles totales de GSH en el intervalo de 1,82 mg / L a 2,72 mg / L. GSH-IDY-3 muestra el más alto contenido total de GSH, sin embargo, el alto contenido de GSSG de este producto se atribuye a la alta GSH total observada.

Estos datos ilustran la variación que existe entre GSH-IDYs en términos de contenido de GSH. Además, se muestra la importancia de diferenciar entre GSH y el total de contenido de GSH, ya que es la forma reducida que es el antioxidante activo en el vino.

Sin la literatura no se puede conocer en la preparación industrial de GSH-IDYs, y no se sabe si se permite enriquecimiento exógeno de GSH durante el proceso de fabricación de estos datos se puede deducir que el proceso de producción de GSH-IDY-5 está optimizado hasta tal punto que resulta en un contenido considerablemente mayor GSH.

Ese enriquecimiento con exógenos GSH se produjo durante la fabricación de este producto sólo puede ser especulado. Sin embargo, este producto podría probablemente ser más eficientes en la reducción de los fenómenos de oxidación en vinos en comparación con los otros GSH-IDYs en este estudio.

Los GSH-IDYs comerciales probadas, diferían significativamente en la cantidad de GSH y GSSG niveles liberados en una solución modelo, que pone de relieve la variabilidad entre los productos en términos de su potencial antioxidante.

#### 4.2.3.3 Influencia del tiempo, SO<sub>2</sub> y etanol sobre la liberación de GSH por GSH-IDYs en la solución modelo.

La Figura 4.3 presenta los niveles de GSH liberados en una solución modelo para los respectivos tratamientos (con o sin SO<sub>2</sub> / EtOH) 10 minutos después de la adición de la GSH-IDY. Las condiciones en la solución del modelo en términos de concentración de O<sub>2</sub>, pH, ácido tartárico, el etanol y el contenido de SO<sub>2</sub> fueron manipuladas para simular el jugo de uva o vino (dependiendo del contenido de etanol presente).

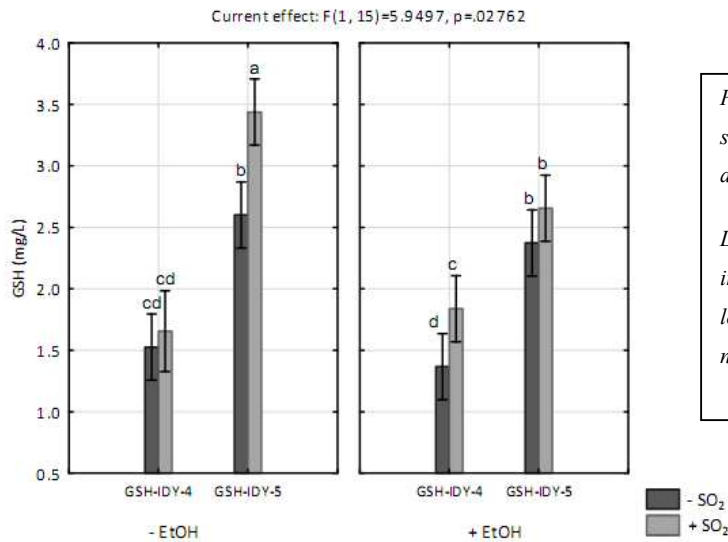


Figura 4.3 contenido de GSH liberado en solución modelo de 10 minutos después de la adición de la GSH-IDYs.

Las barras verticales indican el 95% intervalo de confianza para los medios. Las letras indican diferencias significativas en un nivel de significación del 5%.

Esto se hizo con el fin de establecer el efecto de etanol y SO<sub>2</sub> sobre la liberación de GSH en virtud de jugo de uva o el vino como condiciones. SO<sub>2</sub>, al ser un antioxidante, puede impedir la oxidación de GSH, mientras que el etanol podría influir en la solubilidad o extracción de GSH en la solución del modelo. Es evidente que, con independencia del tratamiento, GSH-IDY-5 liberados significativamente más GSH en la solución del modelo en comparación con GSH-IDY-4.

Parece como si, además SO<sub>2</sub> a la solución modelo resultó en ligeramente superior liberados valores de GSH, aunque las diferencias no fueron significativas en todos los casos. En ausencia de etanol, GSH-IDY-5 liberados significativamente más GSH en el / + tratamiento SO<sub>2</sub> EtOH en comparación con el tratamiento / -SO<sub>2</sub> EtOH. Igual cantidad de GSH fueron liberados por + EtOH tratamientos / + SO<sub>2</sub> GSH-IDY-5 en el EtOH / -SO<sub>2</sub>, + EtOH / -SO<sub>2</sub> y. Exactamente lo opuesto se observó en el caso de GSH-IDY-4 donde además SO<sub>2</sub> no resultó en significativamente mayor

En cambio, fue en el etanol que contiene tratamientos donde significativamente más ( $p < 0,05$ ) GSH Fue producido en EtOH / + tratamiento SO<sub>2</sub> +, en comparación con el tratamiento / -SO<sub>2</sub> + EtOH.

Sin embargo, el contenido de GSH del tratamiento / + SO<sub>2</sub> + EtOH no difirió significativamente del EtOH / -SO<sub>2</sub> y tratamientos EtOH / + SO<sub>2</sub>.

Teóricamente hablando, SO<sub>2</sub>, al ser un antioxidante, puede proteger indirectamente GSH contra la oxidación, por reacción con oxidantes como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, capaces de oxidar GSH, pero si esto sucedió en nuestras condiciones es poco clara. Sin embargo, este efecto protector sólo se observó en ausencia de etanol para GSH-IDY-5 y en presencia de etanol para GSH-IDY-4. Por tanto, es evidente que los dos productos comportarse de manera diferente en respuesta a etanol y SO<sub>2</sub> adiciones. Sin embargo, ya que no hay diferencia significativa en liberado GSH se pudo observar entre el EtOH / + SO<sub>2</sub> y + EtOH / + tratamientos de SO<sub>2</sub> para GSH-IDY-4, el efecto del etanol sobre la liberación de GSH en el corto plazo parece insignificante. Los niveles de GSSG fueron todas por debajo de 0,2 mg / L, consistente con los datos de GSH-IDY-4 y GSH-IDY-5 en la figura 4.2, con no significativa diferencias observadas entre los diferentes tratamientos.

La significativa menor GSH contenidos para GSH-IDY-5 en el / -SO<sub>2</sub> tratamiento EtOH y GSH-IDY-4 en el tratamiento / -SO<sub>2</sub> + EtOH tanto, no se asociaron con mayores contenidos de GSSG, lo que sugiere que la oxidación no era responsable de los valores más bajos de GSH obtenidos. En consecuencia, se postula que la extracción de GSH de la GSH-IDYs se vio afectada en estos dos tratamientos, lo que conduce a valores más bajos de GSH en comparación con los otros tratamientos.

Curiosamente, cuando un factor de tiempo se introdujo en el experimento mediante el análisis del contenido de GSH publicado por GSH-IDYs después de una hora y 24 horas de tiempo de contacto, el efecto del SO<sub>2</sub> no tenía influencia significativa en los niveles de GSH . Figura 4.4 por tanto, sólo muestra el efecto de etanol y GSH-IDY.

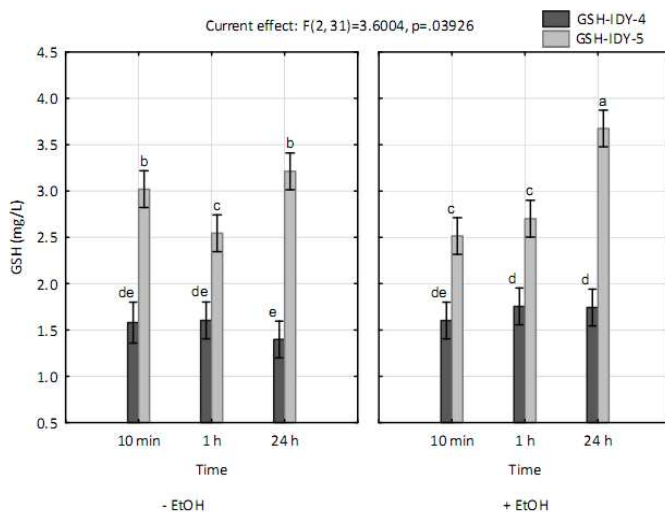


Figura 4.4 contenido de GSH liberado en solución modelo de 10 minutos, 1 hora y 24 horas después de la adición de la GSH-IDYs. Las barras verticales indican el 95% intervalo de confianza para los medios. Las letras indican diferencias significativas en un nivel de significación del 5%.



Con un tiempo de contacto más largo, el GSH-IDYs podría haber liberado compuestos solubles tales como cisteína con propiedades reductoras, que podrían haber eclipsado el efecto protector de SO<sub>2</sub> en GSH. Autores han reportaron algunas preparaciones IDY para contener cantidades suficientes de proteína reducida cisteína (RPC) para servir como antioxidante eficaz.

Sin embargo, en otro estudio que investigó los compuestos solubles liberados en una solución modelo mediante preparaciones IDY, no se hizo mención de la cisteína y la incertidumbre sigue siendo si no se detecta o simplemente no se midió.

No obstante, durante un tiempo de contacto más largo, etanol parece haber tenido un mayor efecto sobre la liberación de GSH por el GSH-IDYs, especialmente en el caso de GSH-IDY-5. El contenido de GSH para GSH-IDY-4 quedó constante en la 1 hora del experimento sin diferencias significativas observadas entre el etanol tratamiento deficiente y el tratamiento que contiene etanol. Curiosamente, una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en el contenido de GSH lanzado pudo observar después de 24 horas de tiempo de contacto con el tratamiento de etanol que contiene presentan un mayor contenido de GSH en comparación con el etanol tratamiento deficiente.

En el caso de GSH-IDY-5, fluctuantes contenido de GSH se observaron durante el transcurso del experimento y los contenidos diferían significativamente ( $p < 0,05$ ) entre el tratamiento que contiene etanol y el etanol que carecen de tratamiento. Después de 10 minutos de adición GSH-IDY, cantidades significativamente menores de GSH fueron liberados en el tratamiento con etanol en comparación con el tratamiento sin etanol. Sin embargo, después de una hora de tiempo de contacto, el contenido de GSH de la que carece de etanol tratamiento había disminuido significativamente mientras que la del tratamiento que contiene etanol, se mantuvo constante.

Después de 24 horas de tiempo de contacto, los valores de GSH aumentaron para ambos tratamientos, pero el contenido de GSH de la etanol que contiene tratamiento fue significativamente ( $p < 0,05$ ) más alta que el tratamiento sin etanol, similar a los resultados obtenidos para GSH-IDY-4.

Por otra parte, el contenido de GSH para el tratamiento sin etanol sólo aumentó hasta el nivel presente inicialmente después de 10 minutos de su adición mientras que la del etanol que contiene el tratamiento, el aumento de los niveles significativamente más altos que

inicialmente presente. Por tanto, parece como si el etanol puede preferiría tener un efecto estimulante sobre la liberación de GSH cuando GSH-IDYs están sometidos a más largo tiempos de contacto.

El contenido de GSSG de los tratamientos respectivos de nuevo eran todos por debajo de 0,2 mg / L y no aumentar o disminuir durante el curso del experimento (resultados no mostrados). La reducción en el contenido de GSH para el tratamiento carente de etanol, no podría por lo tanto ser atribuido a la oxidación de GSH a GSSG. La posibilidad de que el GSH fue atado temporalmente por otra sustancia en el GSH-IDY y posteriormente puesto en libertad, no debe excluirse. Esto es parcialmente apoyado por el trabajo realizado por Andújar-Ortiz , que informó de que la cantidad de GSH se libera en una solución vino modelo permaneció bastante estable durante un período de nueve días mientras que se observó una ligera reducción del contenido total de GSH. Sin embargo, este estudio proporciona los primeros resultados preliminares sobre los efectos del SO<sub>2</sub> y el etanol sobre la liberación de GSH por GSH-IDYs.

Dependiendo del tipo de GSH-IDY y tiempo de contacto con el producto, SO<sub>2</sub> y etanol puede afectar los niveles de GSH observados en solución del modelo. Se requiere más investigación para determinar los efectos de otros parámetros, tales como el pH y la concentración de O<sub>2</sub> en la liberación de GSH por GSH-IDYs.

#### 4.2.3.4 Influencia de GSH- IDY añadido en diferentes etapas de fermentacion en los niveles de GSH en el vino

##### 4.2.3.4.1 Niveles de GSH para la fermentación a pequeña escala

Todos los tratamientos presentan un contenido de azúcar residual <5 g / L.. La suplementación con preparación GSH-IDY no tuvo ningún efecto sobre la tasa de fermentación (resultados no mostrados), a pesar de que posiblemente contribuye a los nutrientes de levadura en forma de aminoácidos y péptidos. Figura 4.5 presenta las concentraciones de GSH para los diferentes tratamientos durante la fermentación alcohólica.

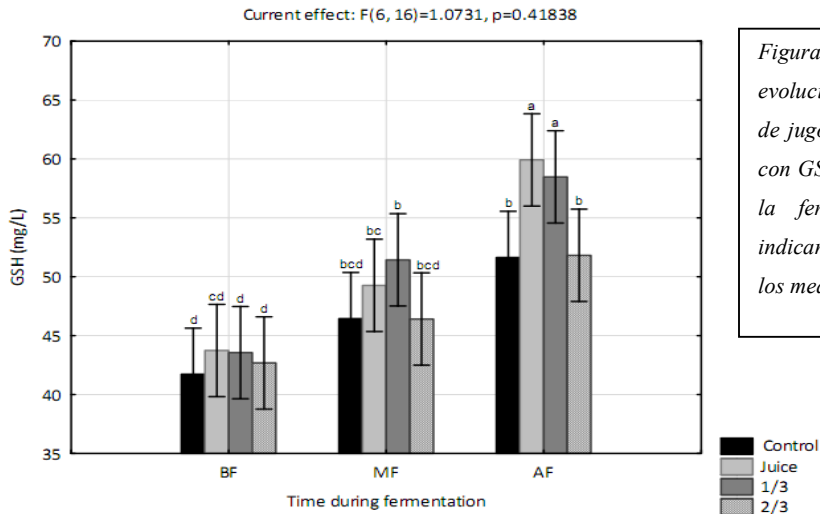


Figura 4.5 glutación reducido (GSH) evolución durante la fermentación alcohólica de jugo de Sauvignon blanc complementado con GSH-IDY-4 en diferentes etapas durante la fermentación. Las barras verticales indican el 95% intervalo de confianza para los medios.

Es evidente que el contenido de GSH aumentó durante la fermentación, independientemente del tratamiento aplicado. Aunque la interacción entre el momento de la suplementación y el tiempo GSH-IDY durante la fermentación no es apoyada por un valor de  $p < 0,05$ , tendencias importantes con respecto a la influencia de los tratamientos sobre el contenido de GSH todavía se puede ver que se apoya en la literatura.

De estos datos, parece como si el "jugo" y tratamiento "1/3" resultaron en un mayor contenido de GSH después de la fermentación en comparación con el control y tratamiento "2/3". Las concentraciones finales de GSH para el "jugo" y "tercera" tratamientos fueron 59,9 mg / L y 58,5 mg / L, respectivamente, mientras que las de el control y tratamiento "2/3" eran 51,6 mg / L y 51,8 mg / L. La diferencia entre el contenido de GSH del control y "jugo" o tratamiento "1/3" era por lo tanto aproximadamente 7-8 mg / L. Esto fue bastante interesante, tener en cuenta la cantidad de GSH liberado de GSH-IDY-4 en la solución del modelo según lo cual era de aproximadamente 1,6 mg / L.

Estudios demuestran que numerosos compuestos nitrogenados solubles fueron puestos en libertad por la preparación de levadura seca inactiva cuando se prueba en soluciones de vino modelo, algunas tienen un efecto estimulante sobre la síntesis de GSH por la levadura. Esto condujo a la hipótesis de que los nutrientes proporcionados por la preparación GSH-IDY (aminoácidos libres, péptidos etc.) suplementado en el inicio o después de un tercio de la fermentación alcohólica se habían completado llevado a aumento de la síntesis de GSH y posterior liberación por la levadura en comparación con el control y tratamiento "2/3".

El hecho de que el contenido de GSH del tratamiento "2/3" no difería de la de control puede haber sido debido al hecho de que la suplementación se hizo demasiado tarde durante la fermentación alcohólica para que la levadura se beneficiara del aumento de nutrientes para sintetizar y liberar GSH. De hecho, etanol inhibe la importación de iones de hidrógeno acoplado de aminoácidos y es probable que las células de levadura fueron incapaces de asimilar los aminoácidos suministrados por el GSH-IDY para producir y secretar GSH en una etapa tan tardía durante la fermentación alcohólica. GSH-IDY-4 lanzado aproximadamente 1,6 mg / L de GSH en la solución modelo. Sin embargo, la diferencia en la concentración de GSH entre el control y el tratamiento "2/3" no fue significativamente diferente.

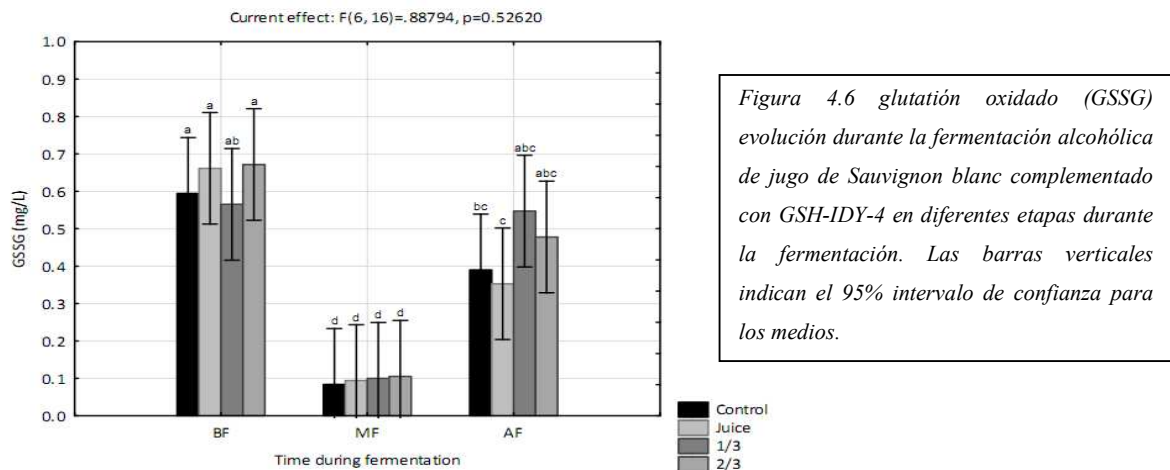
Otra explicación para el aumento de los niveles de GSH observados por el "jugo" y el tratamiento "1/3" es la absorción preferencial de los nutrientes proporcionados por la preparación GSH-IDY sobre GSH temprano durante la fermentación, lo que resultó en niveles más altos de GSH en el final de la fermentación alcohólica. La falta de enriquecimiento de nutrientes durante las primeras etapas de la fermentación en el control y tratamiento "3.2" puede haber provocado la absorción de GSH por la levadura con la consiguiente disminución de los niveles de GSH en el mosto y / o vino.

Sin embargo, este estudio demuestra que no es necesariamente el contenido de GSH liberado de la GSH-IDY específica que conduce a un aumento de los niveles de GSH en el vino. Parece que es más bien una función de tiempo de adición permitiendo la absorción de ciertos nutrientes por la levadura que conduce a un aumento de niveles GSH en el vino. Si esto es como resultado de un aumento de la síntesis de GSH y la secreción por la levadura o la absorción preferencial de los nutrientes más de GSH, sigue siendo poco claro y una mayor investigación es, pues, necesario. El tiempo de suplementación recomendada actual de la GSH-IDY específico es tercera en fermentación alcohólica.

Hemos demostrado que la suplementación a su jugo directamente después de la traducido en igual contenido de GSH vino en comparación con el tratamiento "1/3". Esto podría simplificar el proceso de elaboración del vino, en el sentido de que el enólogo no tiene que controlar las fermentaciones especialmente para la adición de la GSH-IDY en la fase correcta. La inoculación de la levadura y la adición de GSH-IDY puede por lo tanto ser hecho consecutivamente con el GSH-IDY que se investigó.

#### 4.2.3.4.2 Niveles de GSSG para la fermentación a pequeña escala

Figura 4.6 presenta los valores de GSSG durante la fermentación alcohólica para los diferentes tratamientos. Una vez más, la interacción entre la etapa de la suplementación con GSH-IDY y la etapa de muestreo durante la fermentación no es apoyada por un valor de  $p < 0,05$  y, en consecuencia, sólo tendencias pueden ser discutidos.



La concentración de GSSG fue inicialmente muy baja ( $< 0,7$  mg / L), que es normal

En el medio de fermentación, los niveles de GSSG para todos los tratamientos habían disminuido a aproximadamente 0,1 mg / L. Al final de la fermentación se había incrementado de nuevo para llegar a niveles que van desde 0,35 mg / L a 0,56 mg / L. Los primeros trabajos realizados por Cassol y Adams sugirió que el glutatión está presente en el vino blanco como el disulfuro, GSSG. Sin embargo, parece que aunque los niveles de GSSG siguen siendo muy bajos durante fermentación alcohólica

Aunque GRP no se midió durante este estudio, se ha demostrado por otros autores que los niveles de GRP no varió drásticamente durante la fermentación alcohólica. Bajos niveles de oxígeno y la inhibición de la polifenol oxidasa con  $\text{SO}_2$  inhibe la formación de GRP en gran medida. También se tomaron varias medidas para prevenir la formación de GRP y la consiguiente pérdida de GSH.

El jugo se trató muy reductora y los niveles de  $\text{SO}_2$  también se ajustaron a 30 mg / L libre y 60 mg / L de  $\text{SO}_2$  total. Andújar-Ortiz observaron diferencias significativas en el contenido de GSH después de la fermentación alcohólica entre un control y GSH-IDY complementado vino.

Sin embargo, el GSH total para el GSH-IDY complementado en vino era el doble que en el vino control (16 mg / L en comparación con 8 mg / L).

Aunque no se midieron el contenido GSSG de los vinos, los autores explican esta gran diferencia de GSH por una rápida oxidación de GSH a GSSG. Esto está en contraste con nuestros hallazgos que muestran que la suplementación GSH-IDY al jugo o mosto de fermentación no conduce a niveles elevados de GSSG severamente en comparación con el tratamiento control. La fermentación alcohólica es normalmente un ambiente reductor, con poco oxígeno entra en contacto con el vino, lo que podría explicar los bajos niveles de GSSG observados en nuestro estudio.

#### 4.2.3.4.3 Niveles de GSH para fermentaciones a gran escala

Debido a las limitaciones de capacidad de las bodegas comerciales, las fermentaciones a gran escala no se replicaron (Figura 4.7). Estos datos deberían, por tanto, sólo se pueden ver como los resultados preliminares.

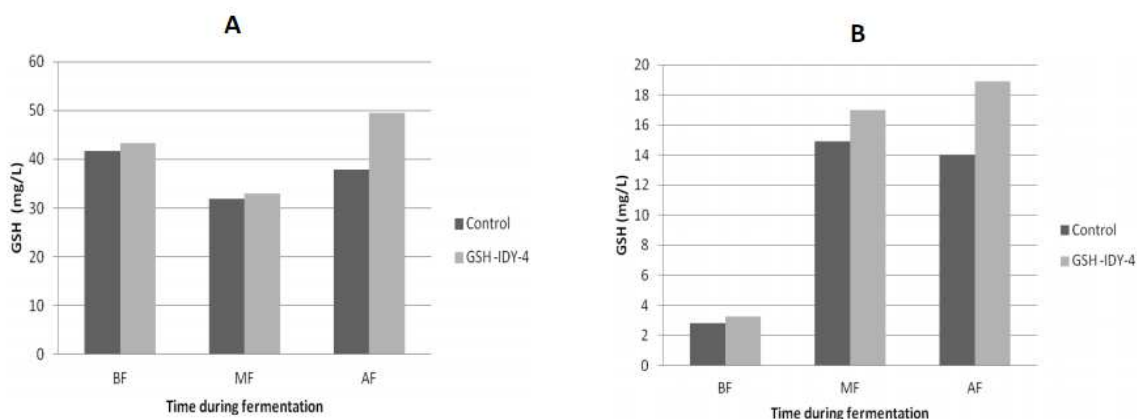


Figura 4.7 contenido de GSH de escala comercial fermenta durante

(A) y Sauvignon blanc

(B): Riesling complementa con GSH-IDY-4 a 30 g / hL tercera en la fermentación alcohólica.

La adición de GSH-IDY-4 a los respectivos jugos se realizó según las recomendaciones del fabricante es decir, después tercio de la fermentación alcohólica se ha completado. Zumos suplementadas con GSH-IDY-4 resultaron en contenido de GSH mayor vino en comparación con el vino de control. Esto es contrario a los datos por Andújar-Ortiz quienes encontraron diferencias estadísticas en GSH entre un control y GSH-IDY complementado fabricados comercialmente Vino rosado en Sauvignon.

El contenido de GSH del mosto Sauvignon blanc fue inicialmente 42 mg / L, similar al contenido de GSH de los pequeños fermentaciones escala. Sin embargo, contrariamente a los aumentos de los niveles observados en el medio de fermentación en los pequeños fermentaciones escala en comparación con los niveles de GSH zumo, el contenido de GSH de los fermentos a gran escala fueron de aproximadamente 10 mg / L inferior. El contenido final de GSH para el vino de control fue de 37 mg / L, mientras que la del vino al que GSH-IDY fue agregado tenía una concentración de GSH de 49 mg / L. El contenido de GSH en el final de la fermentación alcohólica para las pequeñas y grandes fermentos escala de la misma jugo diferían en casi 10 mg / L.

Varios factores en los fermentos escala comercial podría haber posiblemente influido en la concentración de GSH, por exposición al oxígeno instancia superior, las diferencias de temperatura de fermentación y los valores de presión más altas en los tanques más grandes.

Sin embargo, es evidente que la suplementación con GSH-IDY resultó en un mayor contenido de GSH después de la fermentación alcohólica. La misma observación en términos de aumento de los niveles de GSH se hizo en el caso del mosto Riesling complementado con GSH-IDY.

Curiosamente, el bajo contenido inicial de GSH de la Riesling debe de aproximadamente 3 mg/L aumentó considerablemente durante la fermentación alcohólica para llegar a una concentración de 14 mg / L y 19 mg / L para el control y el vino complementado, respectivamente. Por tanto, es claro a partir de estos datos que la suplementación del mosto con GSH-IDY temprana durante la fermentación alcohólica conduce a un aumento de los niveles de GSH en los vinos resultantes.

El efecto estimulante propuesta de los aminoácidos en la síntesis de GSH por la levadura en condiciones de vinificación con el consiguiente aumento de los niveles de GSH vino debe ser examinado más. Aunque varios autores han utilizado estrategias de adición de aminoácidos para mejorar la producción de GSH en *S. cerevisiae*, el GSH produce siempre había sido en forma intracelular.

Incluso aunque Gex1, un antiporter / protones GSH transporte de GSH al medio extracelular, recientemente se ha identificado en *S. cerevisiae* existe, poca o ninguna información en cuanto a cómo y en qué condiciones GSH es secretada por la levadura. El mecanismo exacto

por el cual los preparativos GSH-IDY conduce a un aumento de los niveles de GSH en el vino por lo tanto tiene que ser dilucidado.

Suplementación con GSH-IDY podría resultar en niveles elevados de GSH vino, siempre que la suplementación se hace dentro del primer tercio de la fermentación alcohólica. Además, la diferencia en el contenido de GSH entre el control y GSH-IDY complementado vino era cinco veces mayor que el contenido de GSH liberado en una solución modelo.

Más productos GSH-IDY también deben ser empleadas en fermentaciones alcohólicas para validar la estrategia de adición temprana y para evaluar los niveles de GSH presentes después de la fermentación.

#### 4.2.3.5 Influencia en la deformación de la cepa de levadura y tratamientos en viña sobre la canopia en niveles de GSH extra e intracelular durante la fermentacion alcohólica

La figura 4.8 muestra la duración de la fermentación de los diferentes tratamientos. La velocidad de fermentación de los diferentes tratamientos difería ligeramente. Cross Evolución fermentado ligeramente más rápido que VIN7, mientras que la duración de la fermentación también era más larga para los tratamientos expuestos, que pueden atribuirse al contenido de azúcar reducido superior del mosto procedente de los tratamientos expuestos.

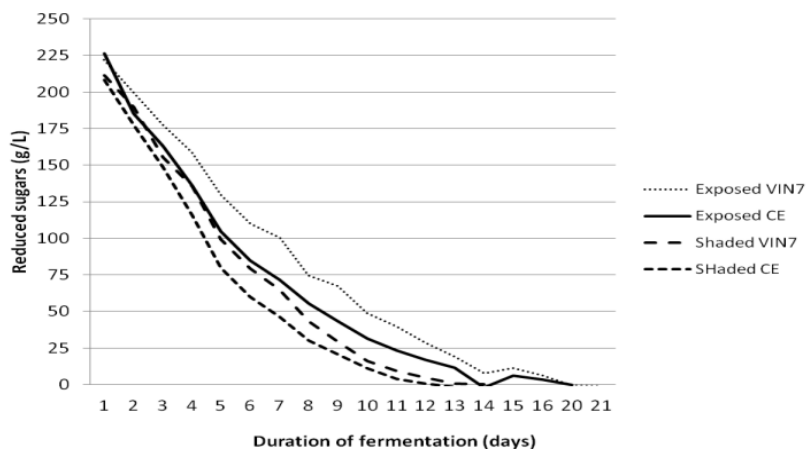


Figura 4.8 El consumo de azúcares reducidos durante la fermentación alcohólica para los tratamientos expuestos y sombreadas fermentados con cepas Cross Evolución y VIN7.

Los tratamientos en Canopia pueden afectar a los niveles de GSH presentes en el zumo, ya que el jugo de los racimos expuestos tenía un contenido de GSH significativamente mayor en comparación con la de los racimos sombreadas. Se demostró que los niveles de GSSG extracelulares, en general, se mantuvieron bajas (<2 mg / L) durante la fermentación



alcohólica, lo que indica que la disminución en los niveles de GSH de vino no es únicamente atribuible a la oxidación del GSH a GSSG.

#### 4.2.3.5.1 Niveles de GSH extracelular

La evolución de GSH durante la fermentación alcohólica para los diferentes tratamientos se muestra en la Figura 4.9.

El contenido promedio de GSH del jugo para los tratamientos expuestos y sombreadas era 75 mg / L y 70 mg / L, respectivamente. Tales niveles altos se han reportado antes en el zumo de uva que había sido aplastado y tratada de forma reductora.

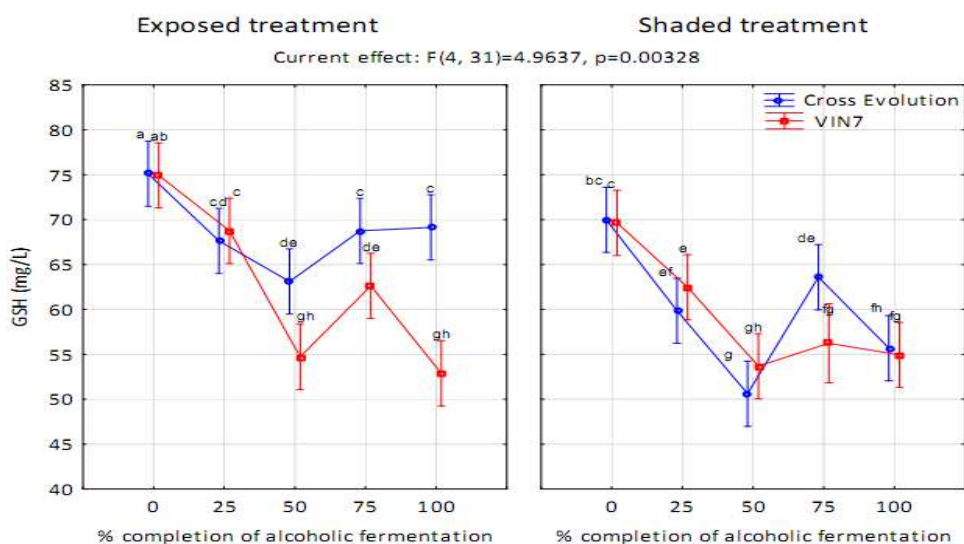


Figura 4.9 GSH evolución durante la fermentación alcohólica para diferentes cepas de levadura y diferentes tratamientos de canopia.

Las barras verticales indican el 95% intervalo de confianza para los medios. Las letras indican diferencias significativas en un nivel de significación del 5%.

El promedio ° Brix para el zumo del tratamiento expuesto y sombra fue de 22,4 y 21, respectivamente. El tratamiento de eliminación de la hoja (tratamiento expuesto) por lo tanto resultó en bayas con un contenido de sólidos solubles más alta. Por tanto, parece como si el mayor contenido de sólidos solubles del jugo del tratamiento expuesta se correlaciona con un mayor contenido de GSH. Autores han demostrado que un aumento en sólidos solubles en bayas de uva se acompaña de un aumento en el contenido de GSH. Sin embargo, esta correlación sólo se mantuvo hasta las bayas llegó a 16 ° Brix, donde después el contenido de GSH estabilizado.

Estos resultados sugieren que el aumento de la exposición al sol en el viñedo podría conducir a un aumento de la acumulación de GSH en las bayas, pero esta postulación requiere mayor investigación. Sin embargo, esta es la primera vez que el contenido de GSH en jugo en relación con un tratamiento de eliminación de la hoja en el viñedo, se informó.

El contenido de GSH extracelular difería significativamente ( $p < 0.05$ ) durante la fermentación alcohólica para las diferentes cepas de levadura y los tratamientos aplicados con dosel. Durante la primera mitad de la fermentación alcohólica, se observó una disminución en el contenido de GSH para todos los tratamientos. Sin embargo, el contenido de GSH del mosto del tratamiento expuesto, fermentado con Croos Evolution, no disminuye en la misma medida que los otros tratamientos.

Contenido Extracelular de GSH luego aumentó, con diferencias que se observan de nuevo entre los tratamientos. En el último trimestre de la fermentación, una disminución en el contenido de GSH se observó de nuevo en el VIN7 expuesto y sombreado tratamientos Croos Evolution. Curiosamente, el contenido de GSH del jugo fermentado con Cross Evolución en el tratamiento expuesto se mantuvo constante, lo que resulta en el contenido de GSH más alto después de la fermentación alcohólica.

No hay diferencias significativas en el contenido de GSH se pudieron observar entre los otros tratamientos. Así, la evolución de GSH difería según la cepa de levadura utilizada y la composición del jugo. Una posible explicación de esto es el diferente comportamiento de la misma levadura en las diferentes condiciones de los dos zumos (mayor contenido de azúcar, etc.), posiblemente influir en el metabolismo de GSH en el nivel intracelular que fue entonces también se expresó en el medio extracelular.

#### 4.2.3.5.2 Niveles de GSSG extracelular

La evolución de GSSG extracelular durante la fermentación alcohólica para los diferentes tratamientos se muestra en la Figura 4.10. Los niveles de GSSG extracelulares fueron inicialmente muy baja ( $< 0,2$  mg / L) y se mantuvieron relativamente constantes hasta el 75% de nivel de finalizada la fermentación alcohólica.

El último trimestre de fermentación fue asociado con un aumento en el contenido de GSSG con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) se observa entre las cepas y los tratamientos aplicados en canopia. Tanto para los tratamientos expuestos y sombreadas, Cruz evolución dio lugar a

vinos con una significativamente más bajos niveles de GSSG extracelulares al final de la fermentación alcohólica en comparación con VIN7.

El tratamiento expuesto fermentado con VIN7 fermenta el más lento, lo que podría haber dado lugar a más oxígeno que entra en contacto con el vino en las últimas etapas de este tratamiento, lo que lleva a los niveles más altos de GSSG. Sin embargo, los niveles de GSSG fueron, en general, sigue siendo relativamente bajo en comparación a los niveles de GSH en el final de la fermentación.

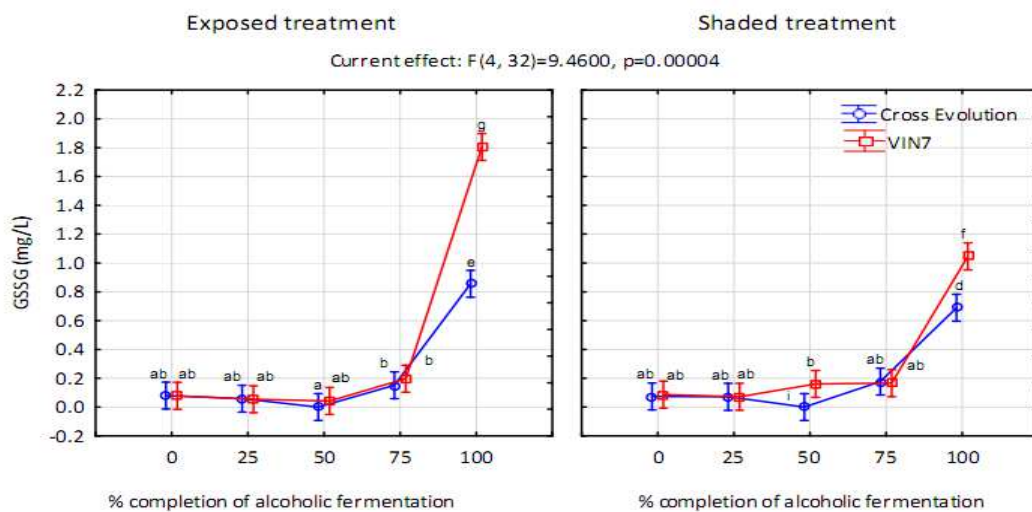


Figura 4.10 extracelular GSSG evolución durante la fermentación alcohólica para diferentes cepas de levadura y diferentes tratamientos de dosel. Las barras verticales indican el 95% intervalo de confianza para los medios. Las letras indican diferencias significativas en un nivel de significación del 5%.

Por tanto, es claro que los niveles máximos de GSSG extracelulares (0,69 a 1,8 mg / L) se llegó al final de la fermentación, (correspondiente a 13 a 21 días de fermentación) .Por otra parte, estos autores informaron de una disminución en el contenido GSSG extracelular hacia el final de la fermentación alcohólica. Debe, sin embargo, mencionar que estos autores hacen uso de una cepa de levadura diferente (Uvaferm CM) que podría haber tenido una influencia en los niveles extracelulares de GSSG observados durante la fermentación alcohólica. Las condiciones de fermentación son también muy variables de un cultivar a otro, lo que puede explicar con más detalle las diferencias observadas en GSSG evolución en los dos estudios.

#### 4.2.3.5.3 Los niveles totales de glutatión intracelular reducidas y oxidadas

Aunque anteriormente se sugiere que varios factores podrían haber influido en el metabolismo de GSH levadura que dio lugar a las diferentes evoluciones extracelulares GSH observadas para las diferentes cepas de levadura y tratamientos en canopia, no se observaron diferencias significativas en GSH intracelular entre tratamientos de canopia o diferentes cepas de levadura. La evolución del total de GSH intracelular de las diferentes cepas y tratamientos de canopia es así como se combina en la figura 4.11.

Intracelular homeostasis GSH se mantiene a través de un sistema complejo que implica la captación de GSH, el uso, la síntesis y la secreción y es importante tener en cuenta que las tendencias de concentración de GSH extracelular no necesariamente se reflejarán en el nivel intracelular. Las diferencias significativas en el contenido total de GSH podría, sin embargo, se observan en relación con el tiempo durante la fermentación alcohólica ( $p < 0,05$ ).

El contenido total de GSH intracelular aumentó durante el curso de la fermentación alcohólica, con una ligera disminución observada al final de la fermentación. El contenido de GSH intracelular total al final de la fermentación alcohólica varió desde 0,93 hasta 1,18 mg células GSH / gramo de peso en húmedo como que se traduce en aproximadamente 0,5% del peso seco de células de levadura como se informa en la literatura.

Con respecto al contenido intracelular de GSH, de nuevo, no hay diferencias significativas podrían ser observado en las concentraciones de GSH intracelular entre las diferentes cepas de levadura y tratamientos dosel sobre el curso de la fermentación alcohólica. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en el transcurso de la fermentación alcohólica. El contenido intracelular de GSH aumentó a medida que avanzaba la fermentación alcohólica y se estabilizó en el nivel de finalización en el 75% de la fermentación alcohólica.

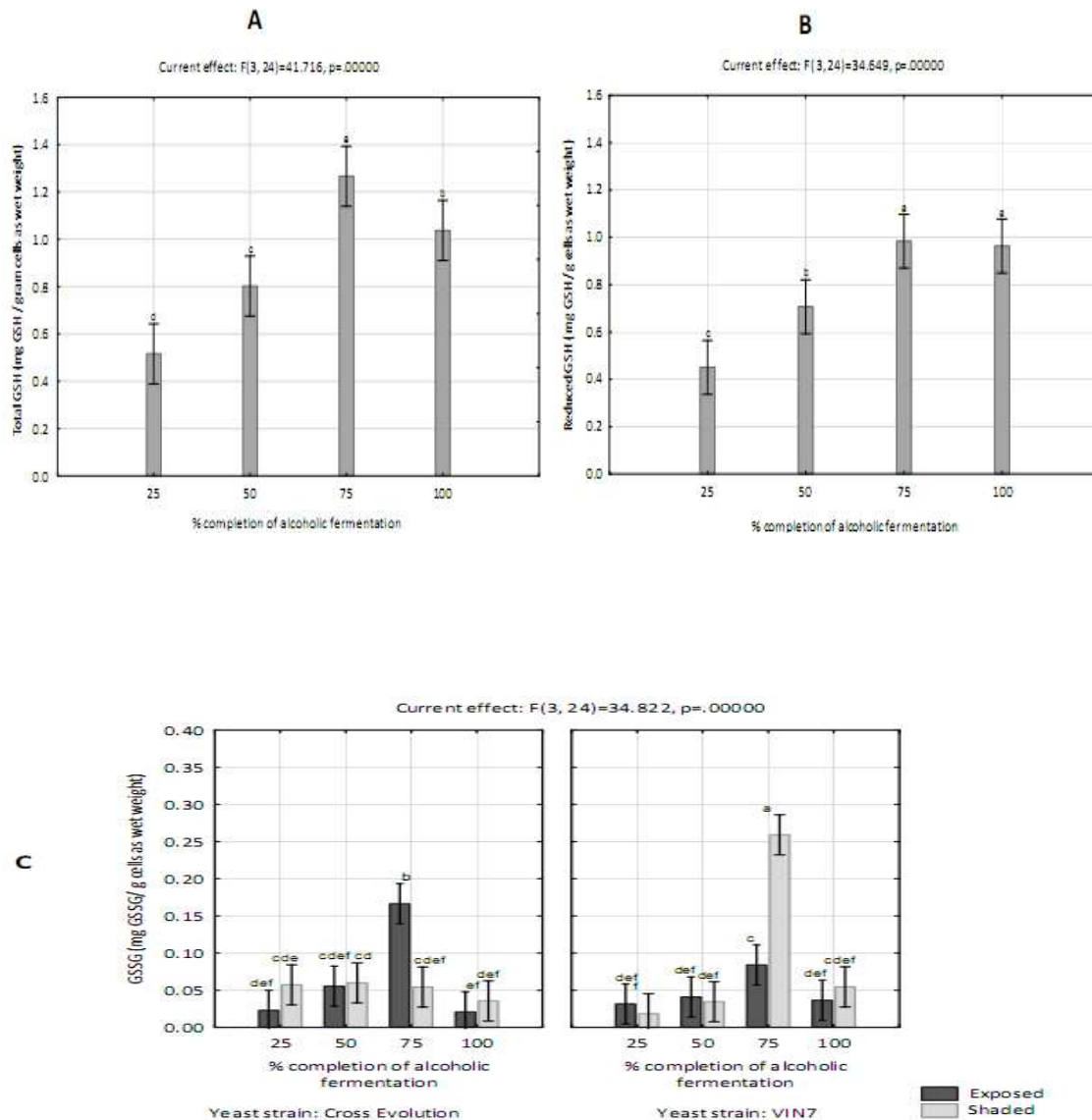


Figura 4.11 Evolución de (A) en total (todos los tratamientos combinados), (B) reducida (todos los tratamientos combinados) y (C) oxidado glutatión intracelular durante la fermentación alcohólica.

Las barras verticales indican el 95% intervalo de confianza para los medios. Las letras indican diferencias significativas en un nivel de significación del 5%.

El contenido total de GSH intracelular consistió sobre todo en la reducción de GSH GSSG mientras que sólo representaba una pequeña cantidad del total de GSH. Esto es consistente con otros estudios que informan que el estado redox intracelular de glutatión es predominantemente en una forma reducida (relación redox de GSH: GSSG  $\sim 11 \pm 16: 1$ ).

En general, los niveles intracelulares de GSSG eran muy bajos a lo largo de la fermentación alcohólica y pequeñas diferencias podrían ser observadas entre las cepas de levadura y los tratamientos de la canopia.

Sin embargo, en el nivel de terminación 75% de la fermentación alcohólica, el contenido de GSSG diferían significativamente ( $p < 0,05$ ) para dos fermentos. La necesidad del tratamiento expuesta fermentada con la cepa Croos Evolución muestran un contenido significativamente mayor GSSG intracelular en comparación con la necesidad del tratamiento con sombra. Por el contrario, significativamente mayor contenido de GSSG para el mosto fermentado con VIN7 cepa, se observó para el tratamiento sombreada.

Factores de estrés al azar en el nivel intracelular podría haber sido responsable de los mayores niveles de GSSG intracelulares en los dos fermentos específicos. Sin embargo, tener en cuenta las muy bajas concentraciones varían de GSSG, estas diferencias significativas no tuvieron un impacto importante en la evolución de GSH intracelular global observado.

Hasta donde sabemos, este es el primer reporte de intracelulares de GSH y GSSG niveles de cepas de levadura del vino comerciales en la fermentación de mosto. Niveles de GSH intracelular aumentaron a medida que avanzaba la fermentación alcohólica mientras que los niveles de GSSG intracelulares se mantuvieron relativamente constantes a lo largo de la fermentación alcohólica.

### 4.3 Influencia de la cepa de levadura, el contacto prolongado lías y la suplementación de nitrógeno sobre la concentración de glutatión en el vino.

#### 4.3.1 Introducción

La oxidación de los vinos blancos con la consiguiente pérdida de aroma característico, el desarrollo del carácter y sabor del envejecimiento atípico y el pardeamiento visual constituye un problema bien conocido en la industria del vino.

Un Vino blanco, en particular, Sauvignon blanc, es sensible a la exposición al oxígeno que puede tener un impacto negativo en la calidad del vino. El dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) es el conservante más utilizado en la elaboración del vino, mostrando propiedades antioxidantes, antimicrobianas y anti-enzimáticas. Sin embargo, a pesar de SO<sub>2</sub> es muy eficiente para proteger contra la oxidación del vino, las preocupaciones relacionadas con la salud se han traducido en presión de los consumidores para reducir su uso.

El uso de otros antioxidantes puede permitir el uso de SO<sub>2</sub> dosis inferiores en el vino.

En vista de los efectos positivos que GSH puede tener sobre la calidad del vino, en términos de limitar el pardeamiento y la pérdida de aroma, la gestión prudente de este antioxidante, por medio de factores como la elección enológica cepa de levadura, lías de contacto extendido y la manipulación de jugo contenido de nitrógeno asimilable, sería de gran valor.

Este estudio se llevó a cabo tanto para determinar la influencia de la cepa de levadura del vino comercial, contactos lías y el contenido de nitrógeno asimilable en la concentración de GSH en el vino. Finalmente, los resultados preliminares sobre la respuesta al estrés oxidativo en la levadura en relación con diferentes contenidos de GSH intracelular, también se reportan.

## 4.3.2 Materiales y métodos

### 4.3.2.1 Cepas de levadura y medios

Strain	Company
VIN7, VIN 13, Alchemy 1, Alchemy 2, NT 116	Anchor
D21, QA23, DV10, Rhône4600, V1116, Ba11, R2, Cross Evolution, EC1118*	Lallemand
CK S102, UCLM S325	Springer Oenologie
X16, X5, VL3	Laffort
ES181, Top Essence	Enartis

\* not used in screening experiment, but in grape juice experiment (2011 season).

*Saccharomyces cerevisiae* comerciales cepas de vino usados en este estudio, enumerados según el fabricante.

\* No utilizado en el experimento de selección, pero el experimento jugo en la uva (temporada 2011).

Un medio de zumo químicamente definido de uva se utilizó para las fermentaciones de vino sintéticos.

El contenido de nitrógeno asimilable levadura de este medio de 300 mg / L en forma de libre de nitrógeno amino alfa y  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Las cepas se cultivaron en un mínimo de base nitrogenada de levadura (YNB) suplementado con 0,67% w / v de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos (Difco) y 2% w / v de glucosa ,donde se indica. Cuando sea necesario, medios de comunicación YNB se solidificaron por la adición de 2% (w / v) de agar.

Las células se rompieron en tampón PBS (4,3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,4 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,0 mM, pH 7,4) que contenía ácido metafosfórico al 10% .

### 4.3.2.2 Las condiciones de fermentación

Una parte alícuota de 90 ml CDGJM se dividió en botellas de vidrio 100 ml (calor esterilizó a 120 ° C, 20 minutos) y se trataron con GSH a una concentración final de 40 mg / L .

Levaduras secas activas se rehidrataron según lo recomendado por los proveedores y se inoculó en los medios de fermentación para dar una concentración celular de  $1 \times 10^6$  células / mL Las botellas se sellaron con tapones de goma esterilizados equipados con cerraduras de fermentación (codos burbujeantes  $\text{CO}_2$  llenos de agua) y fermentada a 20 ° C.

El progreso de fermentación se monitorizó mediante el pesaje de las botellas diariamente. Cuando la pérdida de masa acumulada fue estable durante tres días, las fermentaciones completadas fueron confirmados por el GrapeScan FT 120 con resultados que muestran las concentraciones de azúcar residual todas por debajo de 5 g / L.



Las fermentaciones se llevaron a cabo por triplicado. Las muestras destinadas a análisis de GSH se toman directamente antes de la inoculación y después de la finalización de la fermentación alcohólica.

#### 4.3.2.3 Proyección en el jugo de uva para supervisar la evolución del glutatión durante la fermentación alcohólica

Varias cepas del experimento de selección llevado a cabo en el zumo de uva químicamente definido también fueron utilizadas en un estudio adicional en el zumo de uva. Se usaron mostos de Sauvignon blanc después de establecerse a partir de dos bodegas diferentes (sótano 1 y 2 de la bodega ubicada en la región de Durbanville y vino Franschhoek, respectivamente).

Las uvas se cultivan y procesan de acuerdo con prácticas vitícolas y enológicas estándar. Los mostos fueron recolectados en 40 litros bidones de acero inoxidable de la cual el aire se desplaza anteriormente por el gas CO<sub>2</sub>. Gas adicional de CO<sub>2</sub> introducido en el espacio de cabeza para excluir el oxígeno y evitar la oxidación. El hielo seco se añadió también a los botes para emitir gases de CO<sub>2</sub> durante el transporte a la bodega experimental de la Universidad de Stellenbosch.

Se midieron los parámetros analíticos general de vino (° Brix, pH y acidez titularle como equivalentes de ácido tartárico) en los mosto se midieron con un instrumento GrapeScan FT 120. SO<sub>2</sub> libre y unido se midió utilizando una unidad de titulación Metrohm.

Concentración de amoníaco se cuantificó usando el método UV-glutamato deshidrogenasa enzimática Bioanálisis. El nitrógeno Libre de ácido  $\alpha$ -amino se determinó por el ensayo espectrofotométrico o-ftaldehído / N-acetil-L-cisteína. YAN se expresa como la suma del nitrógeno ácido  $\alpha$ -amino (FAN), además de nitrógeno amoniacal.

**Table 3.2** Composition of the different Sauvignon blanc juices used in the study.

Juice	Free SO <sub>2</sub> mg/L	Total SO <sub>2</sub> (mg/L)	YAN <sup>a</sup> mg/L	°Brix	pH	TA <sup>b</sup> g/L <sup>c</sup>
A and B	11	38	350	22.6	3.26	5.37
C	28	50	310	22.6	3.32	3.38
D	9	36	320	22.4	3.49	4.8

*Composición de los diferentes zumos de Sauvignon blanc utilizados en el estudio.*

*a) YAN: levadura de nitrógeno asimilable (amoníaco nitrógeno ácido +  $\alpha$ -amino)*

*b) la acidez valorable*

*c) equivalentes de ácido tartárico*

A continuación, el zumo se dividió en botellas de vidrio de 4,5 litros que había sido burbujeado vigorosamente con gas CO<sub>2</sub> antes del llenado. Se analizó el contenido de GSH de mosto de A de la bodega 1 y se encontró que 20 mg / L. Las botellas de mosto fueron

divididas en dos grupos, uno de los cuales, se añadieron GSH a 80 mg / L, denominado jugo B. El contenido de GSH de jugo de la bodega 2 se analizó y se encontró que 10 mg / L y no ajustada. El contenido promedio de GSH de los diferentes jugos se enumeran en la Tabla 3.3.

Para la cosecha de 2011, se instaló el jugo de Sauvignon blanc fue nuevamente obtuvo de bodega 1. Exactamente el mismo protocolo se siguió para la cosecha de 2010 con la excepción de que 2 litros en lugar de botellas de vidrio 4,5 litros se utilizaron como unidades de fermentación. Este jugo se conoce como jugo de D.

*Tabla 3.3 Promedio de concentración de GSH de los diferentes jugos blanc Sauvignon.*

Juice	Average GSH content (mg/L)	Cellar
A	20	1
B	80	1
C	10	2
D	15	1

La concentración de SO<sub>2</sub> libre de cada tratamiento se ajustó a 30 mg / L por medio de 2,5% de adición SO<sub>2</sub> (solución K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) y los niveles de SO<sub>2</sub> fueron confirmados por una unidad de titulación Metrohm .

A continuación, el zumo se inoculó con diferentes preparaciones comerciales de *S. cerevisiae* en 0,3 g / L de acuerdo a las recomendaciones de los proveedores. Las cepas utilizadas para los zumos de A, B y C fueron VIN7, QA23, Croos Evolución y VL3. Jugo D se inoculó con las cepas mencionadas anteriormente, además de otros tres cepas; R2, X16 y EC1118 .

A continuación, cada botella se selló con un tapón de corcho equipado con una esclusa de aire para liberar CO<sub>2</sub> durante la fermentación y se pesaron. La fermentación se inició a temperatura ambiente después de lo cual las botellas se transfirieron a una habitación de temperatura controlada fijado en 15 ° C. FermaidK® levadura de nutrientes a 0,25 g / L y fosfato diamónico (DAP) a 0,1 g / l se añadieron a la fermentación debe después del 5 ° Brix había fermentado a cabo.

Las botellas se pesaron cada día para seguir el progreso de la fermentación. Cuando la pérdida de masa se detuvo durante tres días, GrapeScan FT 120 resultados de análisis confirmaron que todos los vinos se fermentan hasta un contenido de azúcar residual <5 g / L.

Este experimento se llevó a cabo por cuadruplicado en la temporada 2010 y el triplicado en la temporada 2011. Las muestras destinadas a análisis de GSH se tomaron cinco veces durante la

fermentación de acuerdo con la pérdida de peso que correspondía a 0, 25%, 50%, 75% y 100% la pérdida de azúcar.

Se tomaron muestras de jugo antes de la inoculación después de que había sido dividido en las botellas separadas.

#### 4.3.2.4 Influencia del envejecimiento y contacto con lías

Los vinos fermentados con cepas Croos Evolución y QA23 en 2010 con una concentración inicial de GSH de 20 mg / l se utilizaron para este experimento. Estos vinos se dividieron en cuatro tratamientos diferentes: vino sin lías, vino con lías, vino con lías y enzima añadida y vino modelo con lías.

El primer tratamiento fue de acumular el vino con las lías de levadura bajo gas inerte con CO<sub>2</sub> en una botella de vidrio de 100 ml. Las lías de levadura y el vino se mezclaron luego homogéneamente después de lo cual se dividió en tres botellas de 100 ml.

Enzima Extralyse se añadieron a una concentración final de 3 g / hL a una botella. El cuarto tratamiento fue centrifugada a 5000 rpm durante 5 minutos, el medio sobrenadante se desechó y el vino añadido al modelo de las lías (retenido). La solución vino modelo consistía en etanol 13% y 5,3 g de ácido tartárico / L, y el pH se ajustó a 3,3 con una solución de hidróxido de potasio 5 M .

Las botellas de 100 ml se roció con gas CO<sub>2</sub> para lograr una atmósfera inerte antes del llenado. Una vez que se llenaron las botellas, gas adicional de CO<sub>2</sub> fue volado en el espacio de cabeza, las botellas selladas herméticamente y almacenados en un cuarto oscuro a 20 ° C. Muestras de vino para análisis de GSH fueron tomadas después de 3, 6 y 12 meses de envejecimiento. El experimento se realizó por triplicado.

#### 4.3.2.5 Influencia de levaduras con diferentes contenidos de nitrógeno asimilable

Se utilizó un medio de mosto de uva químicamente definido con las siguientes modificaciones: 110 g de glucosa y 110 g de fructosa. El nitrógeno asimilable por levadura (YAN) contenido se ajustó a tres niveles diferentes: 100 mg / L, 250 mg / L y 350 mg / L mediante el ajuste del nitrógeno libre  $\alpha$ -amino y el contenido de NH<sub>4</sub>Cl.

Otro tratamiento donde se incluyó 0,25 g / L FermaidK® nutriente de levadura se complementó a un medio que contiene 350 mg / L YAN.

Los códigos para los diferentes tratamientos se enumeran en la siguiente tabla

Code	YAN content (mg/L)	GSH content (mg/L)	FermaidK® (g/L)
LL	100	10	0
ML	250	10	0
HL	350	10	0
HLF	350	10	0.25
LH	100	40	0
MH	250	40	0
HH	350	40	0
HHF	350	40	0.25

*Tabla 3.4 Código y descripción de diferentes combinaciones de Yan y GSH utilizadas en medio jugo de uva de constitución química definida.*

Una parte alícuota de 250 ml definidos químicamente medio de mosto de uva se dividió en matraces Erlenmeyer (250 ml, se esterilizó a 120 ° C, 20 minutos) equipado con un puerto de brazo lateral sellado con un septo de caucho para el muestreo y se trataron con GSH a una concentración de 10 mg / L y 40 mg / L.

El mosto sintético se inoculó con *S. cerevisiae* cepa QA23 de acuerdo con las recomendaciones del proveedor, los frascos cerrados con cámaras de aire y la fermentación procedido a 15 ° C. Este experimento se realizó por triplicado.

Las muestras destinadas a análisis de GSH se tomaron cinco veces durante la fermentación de acuerdo con la pérdida de peso correspondiente a 0, 25%, 50%, 75% y 100% de pérdida de azúcar.

#### 4. 3.2.6 Influencia del estrés oxidativo en las condiciones de fermentacion y ensayos de placa $H_2O_2$

La cepa de levadura comercial *S. cerevisiae* QA23 se utilizó en este estudio. Los cultivos de la cepa de levadura se cultivaron durante la noche a 30 ° C con agitación recíproca en los medios de comunicación YNB con 2% w / v de glucosa para servir como precultivos. Medios de comunicación YNB se inoculó a una  $DO_{600nm} \sim 0,1$  para servir como un segundo precultivo que se hizo crecer a 30 ° C con agitación recíproca. Frascos que contienen 100 ml por triplicado recientemente

Soportes preparados YNB suplementado con 0 mg / L, 20 mg / L y 120 mg / L GSH se inoculó a un  $OD_{600nm} \sim 0,1$  y se incubaron a 30 ° C con agitación. Las células se

recogieron a una DO 600nm ~ 1 y se lavaron dos veces con medios de comunicación YNB frescas.

Las placas utilizadas para la evaluación de los efectos de las concentraciones de GSH diversos precultivo (0 mg / l, 20 mg / l y 120 mg / L) en la resistencia al estrés oxidativo se prepararon un día antes de la fueron vistos los cultivos. Medio de agar YNB con 2% w / v de glucosa se dejó enfriar a 50 ° C antes de la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0 mM, 0,2 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM y 4 mM). Las placas se almacenaron durante la noche a 8 ° C en la oscuridad. Con el fin de controlar el efecto de diferentes concentraciones de GSH intracelular en el crecimiento y la supervivencia contra el estrés oxidativo, cultivos de las cepas cultivadas en diferentes concentraciones de GSH fueron vistos en cuatro diluciones seriadas 10x (10-1, 10-2, 10-3 and 10-4) sobre las placas. Las placas se incubaron a 30 ° C durante 3 días y supervisado para el crecimiento.

#### 4.3.2.7 Procedimiento de muestreo, preparación de muestras y análisis de glutatión.

De las muestras antes descritas se tomaron muestras mediante la transferencia del volumen requerido bajo gas CO<sub>2</sub> en botellas de plástico de muestreo que habían sido llenados previamente con gas CO<sub>2</sub>.

Las muestras de la sección 3.2.3 y 3.2.4 se elaboraron con una jeringa a través del tapón de goma bajo reflujo CO<sub>2</sub>. A 1 000 mg / L de SO<sub>2</sub> (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, EVERINTEC, Italia) y soluciones de ácido 500 mg / L ascórbico recién preparados también se han añadido a las botellas de muestreo antes de la toma de muestras.

Estas altas concentraciones de SO<sub>2</sub> y de ácido ascórbico se utilizaron para inhibir completamente la polifenol oxidasa residual o actividad lacasa en las muestras .

Gas adicional CO<sub>2</sub> se insufló en el frasco de muestreo después de la muestra se transfirió para inhibir cualquier actividad de la enzima de oxidación residual. Las muestras se congelaron inmediatamente a -20 ° C hasta que analiza la muestra.

Para los análisis de GSH extracelular, las muestras se descongelaron el día de análisis y se centrifugó 4 ml a 12 800 rpm durante 5 minutos a 20 ° C. 2 ml del sobrenadante se añadió a 100 µ de 14 mg / L acetaldehído y se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente.

La derivatización a continuación se llevó a cabo en resumen, 100 l de 43,2 mg / L para-benzoquinona (PBQ) fue añadido a la muestra seguido de la adición de 1 ml de 53 mg / L de ácido 3-mercaptopropiónico (MPA) a reaccionar con el exceso de PBQ.

La mezcla de reacción se mezcló, y se hizo un microfiltrado utilizando una filtro de PVDF de 0,22 micras y se colocaron en viales claros antes de la inyección. GSH en el mosto y el vino se detectó y se cuantificó mediante un método de cromatografía líquida de ultra rendimiento .

La separación se realizó usando un Waters Acquity UPLC equipado con un detector de matriz de foto (eλ PAD) .

La columna, una columna BEH-C18 (1,7 m x 100 mm x 1.7mm Waters), se mantuvo a 25 ° C. La fase móvil consistió en agua / ácido trifluoroacético (0,05% v / v y metanol. La detección se llevó a cabo a 303 nm para GSH. El volumen de inyección de la muestra derivada fue 2 microlitro.

Para el experimento de estrés oxidativo y evaluar las concentraciones de GSH intracelular, las muestras para la determinación de contenido de GSH intracelular fueron extraídas de la siguiente manera. El medio de crecimiento fue homogéneamente mezclado, una parte alícuota de 2 ml y se centrifugó dibujado a 5000 rpm durante 5 minutos.

El sobrenadante se descartó y el sedimento se lavó con 1 m de un M EDTA 1 y 20 mM Tris (pH 8,5) solución. Las células lavadas se re suspendieron en PBS y se rompieron con perlas de vidrio (500 micras de diámetro) durante 20 minutos a 8 ° C.

Los restos celulares se eliminó por centrifugación (12 000 rpm, 10 minutos, 12 ° C). Concentración de GSH se expresó como mg de GSH por g células (peso tan húmedo).

#### 4.3.2.8 Análisis Estadístico

Todos los análisis se realizaron utilizando Statistica V. 10 software .De un solo sentido ,de doble sentido de ANOVA y modelo mixto repitió medidas ANOVA de para la estadística analiza las diferencias significativas fueron juzgados en un nivel de significación del 5% (p <0,05).

### 4.3.3 Resultados y discusión

#### 4.3.3.1 Detección preliminar de GSH en *Saccharomyces cerevisiae* cepas comercial utilizadas durante la fermentación alcohólica

Una proyección de 20 cepas de levadura comerciales se llevó a cabo en un medio químicamente definido jugo de uva. El medio se suplementó con GSH a 40 mg / L para parecerse a un mosto de uva natural. Este nivel de GSH está en el intervalo de concentraciones de GSH que ocurren naturalmente en los mostos de uva blanca obtenidos por trituración y prensado en condiciones reductoras . Todas las fermentaciones secas alcanzadas (nivel de azúcar residual <5 g / L).

Las tasas de fermentación de los diferentes tratamientos difieren ligeramente con la fermentación más rápida completada después de 12 días. Todas las fermentaciones alcohólicas se completaron después de 16 días (resultados no mostrados). Con el fin de caracterizar las cepas de levadura en términos de contenido de GSH en los vinos resultantes, las concentraciones de GSH de los diferentes tratamientos se midieron directamente después de la finalización de la fermentación alcohólica. El contenido de GSH en el mosto de uva químicamente definido (40 mg / L) disminuyó considerablemente durante la fermentación alcohólica para llegar a niveles que van desde 0,5 mg / L a 3,5 mg / L en el final de la fermentación (Figura 3.1).

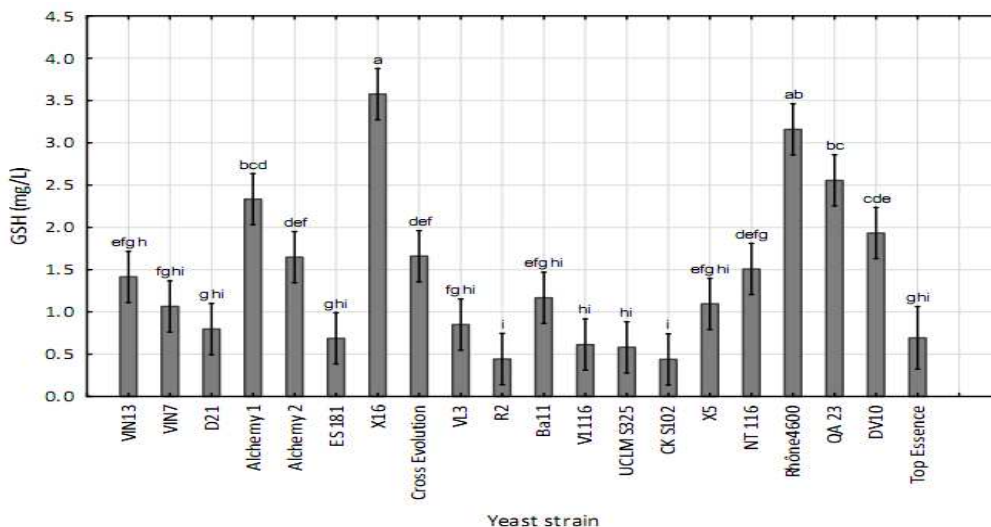


Figura 3,1 concentración glutatión reducido(GSH) al final de la fermentación alcohólica para 20 cepas de *S. cerevisiae* comerciales diferentes. Las barras verticales indican los intervalos de confianza del 95% para los medios. Las letras indican diferencias significativas en un 5% ( $p < 0,05$ ) nivel de significación.

Dado que el medio sintético no contenía compuestos fenólicos o polifenol oxidasa, la formación de orto-quinonas con la posterior adición de GSH para formar 2-S-glutationilo ácido caftarico (GRP), era imposible. Por lo tanto habría habido pérdida de GSH debido a su incorporación en GRP. Por otra parte, también vale la pena señalar que la oxidación de GSH depende del pH y que los valores de pH por debajo de 7 por lo general impide auto-oxidación de GSH. Las condiciones ácidas en este experimento (pH = 3,3) por lo tanto habrían limitado la auto-oxidación de GSH. Por otra parte, las condiciones reductoras que haría mantener más GSH en forma reducida, se lograron luego por la fermentación alcohólica.

Aunque el medio de mosto de uvas contenía trazas definidas químicamente de cobre ( $\text{CuCl}_2$ , 15 g / L) y hierro ( $\text{FeCl}_2$ , 30 g / L), que catalizan reacciones de oxidación, las cantidades eran muy por debajo de los niveles generalmente presentes en la uva naturales debe (0,33 y 1,01 mg / L, respectivamente). Por lo tanto, se puede suponer que el GSH presente contenido después de la fermentación alcohólica fue un resultado directo de la interacción de levadura con GSH.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en el contenido final de GSH entre los distintos tratamientos.

Las cepas R2 y CK S102 resultaron en vinos sintéticos con el menor contenido de GSH mientras que las cepas X16 y Rhône4600 tienen siete veces mayor contenido de GSH.

Por lo tanto, parece como si la cepa de levadura puede tener un impacto en el contenido de GSH presente después de la fermentación alcohólica. Además, los datos sugieren que la subespecie *S. cerevisiae* var. *bayanus* puede resultar en concentraciones de GSH más alto al final de la fermentación en comparación con *S. cerevisiae* var. cepas *cerevisiae*.

De la figura 3.1 que de hecho parece que X16, DV10 y QA23 (*S. cerevisiae* var. *Bayanus*) resultaron en vinos con contenido de GSH en el extremo superior de la gama de concentración. Sin embargo, otro var *S. cerevisiae*. *bayanus* cepas, tales como R2 y ES 181, y en menor medida NT116, estaban en el extremo inferior de la gama de concentración. Por lo tanto, no hay ninguna conclusión definitiva en este sentido, se requiere más investigación.



### 4.3.3.2 Proyección en el jugo de uva

#### 4.3.3.2.1 Evolución de GSH durante la fermentación alcohólica

Sobre la base de los datos de mosto sintético, se seleccionaron cuatro cepas de levadura para su posterior evaluación en la uva verdadero jugo de A, B y C en 2010. En el jugo de D, durante el 2011, se llevaron a cabo tres cepas adicionales. Los datos de fermentación para los respectivos jugos se muestran en la Tabla 3.5 y la Tabla 3.6, respectivamente.

Todas las fermentaciones secas (azúcar residual <5 g / L), para la cosecha 2010 no difirió significativamente entre los diferentes mostos. Esto implica que la suplementación con GSH para el zumo de B en la temporada de 2010 a una concentración de 80 mg / L no tuvo ningún efecto sobre la tasa de fermentación, a pesar de que contribuye a valores más altos de nutrientes en forma de aminoácidos. Sin embargo las diferencias, significativas en la duración de la fermentación se observaron para las diferentes cepas utilizadas (Tabla 3.5).

Tabla 3.5 Duración de la fermentación \* para las cuatro cepas de *Saccharomyces cerevisiae* estudiados en mostos A, B y C en 2010.

Yeast strain	Fermentation duration (days)
VIN7	18(1)a
VL3	14(0.51)b
Cross Evolution	12(0.74)c
QA23	12(0.65)c

\* Los valores son medias (DE), (n = 12), letras distintas denotan diferencias significativas a p<0,05.

\*Values are means (SD), (n = 12), different letters denote significant differences at p<0.05.

Las cepas Croos Evolución y QA23 completaron fermentación alcohólica significativamente más rápido que VIN7 y VL3. La duración de la fermentación de jugo de D también difirió significativamente según la cepa de levadura utilizada (Tabla 3.6). Cepa VIN7 completó la fermentación alcohólica última, consistente con los hallazgos de jugo de A, B y C.

Table 3.6 Duration of fermentation\* for the seven *Saccharomyces cerevisiae* strains studied in juice D in 2011.

Yeast strain	Fermentation duration (days)
Vin7	18(0.58)a
VL3	14(0.58)bc
CE	13(0.58)cf
QA23	12(0.58)ef
X16	13(0.58)bcd
EC1118	12(0.58)def
R2	13(0.58)bde

\*Values are means(SD) of triplicate analysis; different letters denote significant differences at p<0.05.

Tabla 3.6 Duración de la fermentación \* para los siete cepas de *Saccharomyces cerevisiae* estudiados en jugo D en 2011.

\* Los valores son medias (DE) de análisis por triplicado; letras distintas denotan diferencias significativas a p <0,05.

Las concentraciones de SO<sub>2</sub> libres para los distintos tratamientos medidos al final de la fermentación alcohólica para la temporada de 2010 se enumeran en la Tabla 3.7.

Curiosamente, el vino B, muestra los valores de SO<sub>2</sub> libre significativamente más altos después de la finalización de la fermentación alcohólica en comparación con los vinos A y C.

Esto puede ser atribuido a un mayor contenido de GSH inicial de jugo de B (80 mg / L), asistiendo SO<sub>2</sub> en su papel como antioxidante y retener más SO<sub>2</sub> en forma libre.

Table 3.7 SO<sub>2</sub> concentration (mg/L)\* for juice A, B and C of the 2010 season.

Yeast strain	SO <sub>2</sub> (mg/L)		
	Wine A	Wine B	Wine C
Vin7	10.3(1.71)e	17.0(1.41)b	11.0(1.41)e
VL3	10.8(1.26)e	16.5(0.58)b	11.5(0.58)de
CE	13.5(1.00)c	17.0(1.15)b	12.8(0.50)cd
QA23	11.0(0.82)e	20.0(0.82)a	13.0(0.00)c

\*Values are means (SD), for quadruplet analysis (n = 4), different letters denote significant differences at p<0.05.

Tabla 3.7 concentración de SO<sub>2</sub> (mg / L) \* para el jugo de A, B y C de la temporada 2010.

\* Los valores son medias (SD), para el análisis de cuadruplicados (n = 4), letras diferentes indican diferencias significativas a p < 0,05.

Las evoluciones de GSH durante la fermentación alcohólica de los zumos de A, B, C y D se muestran en la Figura 3.2.

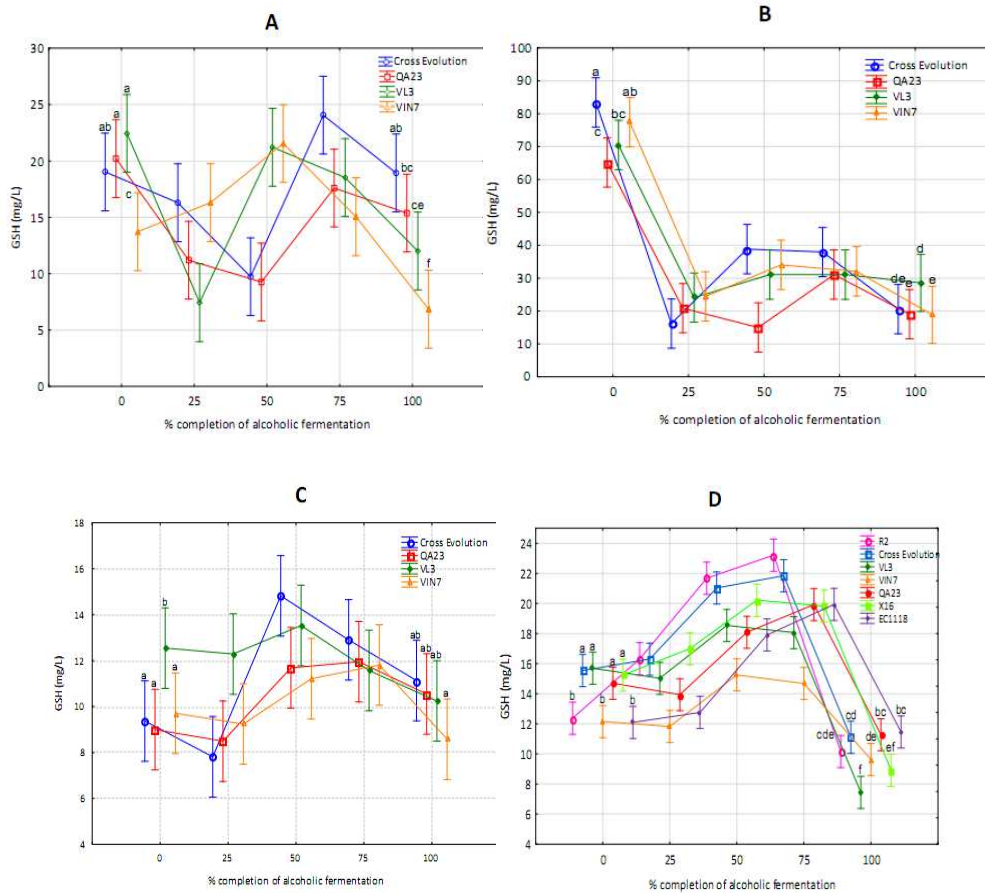


Figura 3.2 Evolución del glutatión reducido (GSH) durante la fermentación alcohólica para diferentes cepas de levadura para el mosto de A, B, C y D. Barras verticales denotan 95% intervalo de confianza para los medios. Las letras indican diferencias significativas en un 5% ( $p < 0,05$ ) nivel de significación.

La evolución de GSH difería mucho dependiendo de la concentración inicial de GSH presente en el mosto y la cepa de levadura utilizada que pone de relieve la variabilidad en GSH evolución bajo diferentes condiciones.

La observación general es que los niveles de GSH disminuyeron y aumentaron, con el grado y la fluctuación de tiempo de modificaciones en la flora dependiendo de la cepa de levadura y mosto.

En el inicio de la fermentación alcohólica, los niveles de GSH bien disminuyeron (jugos A y B) o se mantuvieron relativamente constantes (jugos C y D). La única excepción en este sentido es el contenido de GSH de jugo de A fermentada con VIN7 cepa, y el jugo de D fermentada con cepas R2 y X16 que aumentó ligeramente a El inicio de la fermentación. El contenido de GSH de jugo B disminuyó rápidamente en casi un 50 mg / L durante el primer trimestre de fermentación, con independencia de la cepa de levadura.

En general, el segundo trimestre de fermentación se asoció con un aumento en el contenido de GSH, la única excepción aquí, siendo el jugo fermentado con la cepa A Croos Evolución y jugos A y B fermenta con QA23 cepa.

El contenido de GSH, ya sea aumentado, disminuido o se mantuvo constante en el tercer trimestre de fermentación, mientras que el último trimestre de la fermentación se asoció con una disminución en el contenido de GSH. Curiosamente, el grado de disminución para el mosto de D era más grave en comparación a los mostos de A, B y C. máximo de niveles GSH (aparte de tiempo cero forma que coincide con el inicio de la fermentación) se alcanzaron en 50% o 75% de finalizada la fermentación alcohólica.

Resulta interesante, en algunos casos, la concentración de GSH aumentó durante la fermentación alcohólica a niveles más altos que inicialmente presente en el mosto. Esto se observa especialmente en el mosto de D.

El grado de aumento, se diferenció entre las cepas con cepa R2 presentan el mayor volumen de ventas GSH, pasando de 12 mg / L al inicio de la fermentación a 23 mg / L en 75% la finalización de la fermentación. Cross Evolución siguió más o menos la misma tendencia, aumentando de 15 mg / L a 22 mg / L mientras que VIN7 no aumentó de manera significativa como las otras cepas. En general, los niveles de GSH en los vinos estaban a la par o inferiores a los niveles inicialmente presentes en el jugo de uva. Al final de la fermentación alcohólica,

diferencias significativas en el contenido de GSH se pudieron observar para los vinos fermentados con diferentes cepas. Debe, sin embargo, tener en cuenta que, de algunos casos, el contenido de GSH de ciertos mostos ya habían sido significativamente más baja en el inicio de la fermentación.

Se tomaron varias medidas para asegurar la homogeneidad en términos de contenido de GSH entre los diferentes tratamientos; el mosto se mezcla homogéneamente antes de ser dividido en las diferentes botellas. Por lo tanto, todas las botellas también se rociaron vigorosamente con gas CO<sub>2</sub> antes de jugo de división para asegurar atmósfera inerte. Las botellas también fueron primero asignados al azar antes de la asignación de los diferentes tratamientos (inoculación con diferente cepa de levadura). Además, las muestras de GSH se toman directamente antes de la inoculación, para eludir la influencia de la cepa de levadura puede tener en la medición.

A pesar de todas las medidas tomadas para asegurar la homogeneidad, bajo, pero las variaciones significativas en el contenido inicial de GSH fueron observadas. No hay una posible explicación de esta desviación en el contenido de GSH se puede dar en esta etapa, pero bajos niveles de oxidación inicialmente no se pueden excluir.

Esta variación en el contenido de GSH de vino entre las diferentes cepas, por lo tanto, debe interpretarse con cautela. Las cepas inoculadas en los mostos con contenidos significativamente iguales GSH por lo tanto deben ser comparados con unos a otros después de la fermentación alcohólica.

El contenido de GSH de vino A fermentada con la cepa Cross Evolución fue significativamente mayor que el vino fermentado con la cepa VL3. Vino B fermentada con la cepa VL3 tenía un contenido significativamente mayor de GSH en comparación con el vino fermentado con cepas VIN7 y QA23.

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el contenido de GSH entre el vino fermentado con C Croos Evolución, QA23 y VIN7. Vino D fermentada con la cepa de la Croos La evolución no fue significativamente diferente en el contenido de GSH de vinos fermentados con cepa QA23, pero de hecho a partir de cepas y X16 VL3. El contenido de GSH de vino fermentado con cepa D EC1118 fue significativamente más alto que el fermentado con cepa VIN7.

Como se mencionó anteriormente, la observación general en términos de evolución GSH durante la fermentación alcohólica es que los niveles disminuyeron y aumentaron, dependiendo de la etapa cepa de levadura, mosto y tiempo durante la fermentación. Varias hipótesis de la disminución en el contenido de GSH se pueden dar.

La disminución de GSH en las primeras etapas de la fermentación puede ser debido a la incorporación de GSH para formar GRP. Sin embargo, los niveles de oxígeno bajos y la inhibición de la polifenol oxidasa con SO<sub>2</sub> inhibe la formación de GRP en gran medida. Se tomaron varias medidas para prevenir la formación de GRP y la consiguiente pérdida de GSH.

No sólo fue el mosto tratado muy reductivo, los niveles de SO<sub>2</sub> libres también se ajustaron a 30 mg L / libre y 60 mg / L de SO<sub>2</sub> total.

Además, GSH presente en el jugo puede ser absorbido por la levadura a través de la ATP impulsada, de alta afinidad GSH transportador, Hgt1p en el que está implicado en muchos mecanismos de respuesta al estrés.

GSH también puede reaccionar con peróxido de hidrógeno y someterse a reacción de adición con compuestos de aldehído como el acetaldehído, que constituye aproximadamente el 90% del contenido total de aldehído en el vino y aunque se une principalmente por SO<sub>2</sub>, la posibilidad de incorporación GSH en complejos de aldehído no debe ser excluida.

En algunos casos, las concentraciones de GSH aumentaron a niveles superiores a los niveles inicialmente presentes en el mosto. Una posible explicación para esta observación es de la *novo* síntesis de GSH por la levadura seguido por la secreción de la misma en el mosto. Se atribuye el aumento en la concentración de GSH durante la fermentación a la formación de GSH por *S. cerevisiae* producido endógenamente en el citosol de la levadura puede ser secretada en condiciones de crecimiento normales, que luego se recogió de nuevo por el transportador de GSH levadura. Además, el GSH secretada se encontró que era principalmente en la forma reducida (GSH).

El GSH intracelular puede así estar en el ciclo con la GSH extracelular presente en el medio que podría explicar las fluctuaciones observadas de GSH durante la fermentación alcohólica en este estudio. El mecanismo exacto de exportación de GSH no se conoce, pero un nuevo intercambiador de GSH, Gex1, fue identificado recientemente en *S. cerevisiae*. Este transportador se encuentra tanto en la membrana vacuolar y plasma y parece ser un / GSH

antiporter de protones . Esto podría explicar aún más el pH extracelular influencia tiene sobre la secreción de GSH. El crecimiento de *S. cerevisiae* en pH 3.5 llevó a la secreción significativa GSH mientras que el crecimiento a pH 6 condujo a muy poca o prácticamente ninguna secreción de GSH .El pH bajo relativo de jugo de uva y el mosto (pH 3-3,6) plantea otra posible explicación de las fluctuaciones observadas de GSH durante la fermentación.

Además, GSSG también se puede reducir de nuevo a GSH por la acción enzimática de la glutatión reductasa, se deriva de la levadura ya que esta enzima fue indetectable en el zumo de uva. Por tanto, parece como si las enzimas reductasa secretadas y el suministro de NADPH por la levadura pueden influir aún más los niveles de GSH en un medio de fermentación.

La incertidumbre se mantiene en cuanto a qué conduce exactamente a la fuerte disminución de la concentración de GSH en el último trimestre de la fermentación. Esto podría ser debido a una rápida absorción de GSH por la levadura que conduce a disminución de los niveles extracelulares. Hgt1p, la alta afinidad de la levadura

GSH transportador, es, de hecho, al máximo inducido bajo limitación de azufre. Se propone que la cisteína es la molécula principal represor del transportador. El agotamiento de cisteína (aunque no se mide) en el último trimestre de la fermentación lo tanto, podría conducir a una mejor absorción de GSH. Otros autores atribuyen el aumento en los niveles de GSSG durante la fermentación alcohólica a la oxidación de GSH por peróxido de hidrógeno y otros radicales formados durante la fermentación.

Han informaron de que el contenido de nitrógeno asimilable por levadura puede influir en la capacidad de la levadura para liberar GSH y que se necesita un contenido de 200 mg / L para permitir la liberación de GSH durante la fermentación. El contenido de nitrógeno asimilables por levadura de los cuatro zumos estaban sin embargo muy por encima de este límite, excluyendo la posibilidad de que las fuentes de nitrógeno limitantes podrían haber influido potencialmente los datos .

Sin embargo, las tendencias observadas en las pequeñas fermentaciones escala en los medios de jugo de uva definidos químicamente no se confirmaron en las fermentaciones de jugo de uva. Algunas de las cepas reaccionaron de manera diferente en los dos medios. Colar X16 que se tradujo en el contenido de GSH más alto y la tensión R2 que se tradujo en el menor contenido de GSH en el vino sintético, mostró diferentes tendencias en el vino.

Es evidente que se observaron diferentes evoluciones de GSH durante la fermentación alcohólica como resultado de las diferentes cepas utilizadas. La concentración inicial de GSH Un inconveniente importante de este estudio fue la falta de conocimiento sobre el origen de GSH durante la fermentación alcohólica es decir, lo que se deriva del jugo de uva y qué cantidad fue producida por la levadura. CROOS EVOLUCION y QA23 constantemente llevaron a ligeramente mayor contenido de GSH en el vino.

#### 4.3.3.3 Influencia del envejecimiento y contacto extendido en lías en niveles de GSH en el vino.

El contenido de GSH en el final de la fermentación alcohólica de los vinos fermentados con cepas QA23 y Cross Evolution con un contenido inicial de GSH de 20 mg / L, no fueron significativamente diferentes. Estos vinos fueron sometidos a un período de envejecimiento de un año en el que se midió el contenido de GSH vino no destructiva después de 3, 6 y 12 meses de envejecimiento. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 3.8.

El contenido de GSH de ambos vinos disminuyó después de 3 meses de envejecimiento a concentraciones por debajo de 11,1 mg / L .

No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos después de 3 meses de envejecimiento de los vinos fermentados con QA23. Sin embargo, los vinos fermentados con Croos Evolución, mostraron una diferencia significativa en el contenido de GSH entre el vino envejecido sin lías y vinos envejecidos en presencia de lías.

Tratamiento	Meses de crianza	GSH* (mg/L)	
		Cross Evolution	QA23
Sin lías	3	10.9(1.66)a	9.6(1.72)ab
Con lías	3	9(1.57)b	11.1(1.60)a
Con lías, enzimas	3	9.3(1.91)b	9.8(0.89)ab
Vino modelo	3	nd	Nd
Sin lías	6	4.5(0.68)d	5(0.73)d
Con lías	6	6.4(2.20)c	4.7(0.44)d
Con lías, enzimas	6	5.4(0.63)cd	4.6(0.41)d
Vino modelo	6	nd	Nd
Sin lías	12	1(0.15)e	0.8(0.07)e
Con lías	12	1.1(0.16)e	0.9(0.11)e
Con lías, enzimas	12	1.2(0.13)e	1(0.05)e
Vino modelo	12	nd	Nd

Tabla 3.8 concentración de GSH para diferentes tratamientos durante un periodo de envejecimiento de 12 meses.

\* Los valores son medias (DE) de análisis cuádruple; letras distintas denotan diferencias estadísticamente significativas a  $p < 0,05$ .

n.d: no detectado

Vasserot demostró la capacidad de las lías de levaduras de consumir tioles aunque el establecimiento de puentes disulfuro con unidades SH de los residuos cisteinil del manoproteína pared celular de la levadura. La formación de puentes parecía ser independiente de oxígeno molecular, pero requiere la presencia de cationes metálicos.

El mayor contenido de GSH para los vinos sin lías en comparación con aquellos con lías, posiblemente, puede atribuirse a la absorción de GSH por las lías de levadura. Este rasgo, sin embargo, parece ser cepa específica, ya que sólo se observó para la Croos Evolution. Después de 6 meses de envejecimiento, se observó una disminución adicional en el contenido de GSH para ambas cepas a concentraciones que van de 4,5 mg / L a 6,4 mg / L. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de GSH entre los tratamientos, a excepción de los vinos fermentados con Croos Evolución en el caso del vino envejecido sin lías y con las heces.

En este caso concreto, las lías de levaduras pueden haber tenido un efecto protector sobre GSH. Este fenómeno se atribuye a la capacidad de consumo de oxígeno de las lías de levadura para limitar la oxidación de GSH.

Sorprendentemente, el contenido de GSH (20 mg / L) de vino envejecido en presencia de lías en barricas usadas, se mantuvo constante a lo largo de un período de envejecimiento 7 mes . Esto está en marcado contraste con nuestro estudio que muestra claramente una disminución significativa en el contenido de GSH durante un período de 6 meses. Además, este estudio se realizó bajo condiciones reductoras, lo que limita la oxidación de GSH.

Curiosamente, los autores no detectaron el dímero GSH, GSSG, después de 6 meses de edad, y sugirieron que la pérdida de GSH no se atribuyera a la dimerización de GSH, sino más bien a la formación de ácido caftarico 2-S-glutationil (GRP) Aunque este compuesto no se midió. Autores postularon que GSH se libera tras la autólisis de la levadura de la misma manera en la que los grupos de aminoácidos son liberados durante la autólisis.

La hipótesis en este caso fue que una enzima que acelera la autólisis y la posterior liberación de compuestos intracelulares, podría dar lugar a mayores niveles de GSH extracelular, siendo un compuesto citoplasmática. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el contenido de GSH en los tratamientos que fueron suplementados con Enzima Extralyse.



Además, no se detectó GSH en el transcurso del experimento en el vino modelo que fue envejecido en presencia de lías. El límite de detección para el método UPLC utilizado en este experimento es 0,017 mg / L, lo que sugiere que el GSH que puede haber sido liberado de la levadura durante la autólisis, estaba en cantidades insignificantes.

Después de 12 meses de envejecimiento, el contenido de GSH en todos los tratamientos disminuyó a niveles por debajo de 1,2 mg / L y no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Está claro que tiene efecto las lías de levadura sobre los niveles de GSH en vino necesita de mayor investigación, en combinación con otros factores, como diferentes cepas de levadura y los niveles de oxígeno.

La influencia del envejecimiento sobre las concentraciones de GSH en el vino, es evidente que el GSH disminuye durante el envejecimiento, independientemente de la cepa de levadura o presencia de las lías. La influencia de las heces en la preservación de GSH en el vino durante el envejecimiento, parece ser insignificante. Además, parece muy poco probable que el GSH es liberada de las lías de levaduras en la autólisis de la levadura como se ha sugerido anteriormente.

#### 4.3.3.4 Influencia de diferentes niveles YAN en evolución de GSH durante la fermentación

Para evaluar si los niveles diferentes de nitrógeno asimilable de levadura (YAN) tienen una influencia en el contenido de GSH presente en el vino sintético después de la fermentación alcohólica, el contenido de YAN de un medio de zumo de uva químicamente definido se ajustó a tres niveles diferentes y se fermenta con QA23 cepa de levadura. Dos diferentes niveles de GSH se ensayaron también, con todas las fermentaciones que completan la fermentación alcohólica.

Diferentes niveles iniciales de GSH no afectaron velocidad de fermentación. Sin embargo, el contenido de nitrógeno asimilable de levadura afectó a la velocidad de fermentación con el nivel más bajo YAN (100 mg / L) de completar la fermentación alcohólica cuatro días después de los tratamientos con un contenido YAN de 250 mg / L y 350 mg / L. Los tratamientos con un contenido de YAN inicial de 350 mg / L complementado con el nutriente de la levadura, FermaidK®, fermentación alcohólica terminado tres días antes de los tratamientos con la misma YAN contenido no suplementado con FermaidK®.

Figura 3.3 presenta la evolución de GSH durante la fermentación alcohólica de los diferentes tratamientos.

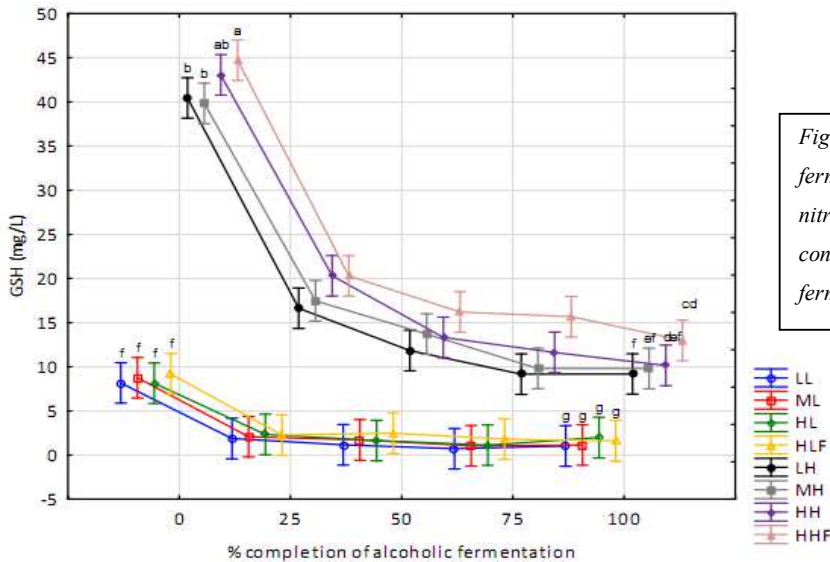


Figura 3.3 Evolución de GSH durante la fermentación alcohólica con diferente nitrógeno asimilable de levadura y el contenido de GSH en el inicio de la fermentación.

El contenido de GSH para todos los tratamientos disminuyó considerablemente durante la fermentación alcohólica, en consonancia con los resultados para el zumo B del trabajo anterior. Al final de la fermentación alcohólica, no se observaron diferencias significativas en el contenido de GSH entre los tratamientos para los vinos bajos de GSH, lo que sugiere que YAN no tuvo influencia en los niveles extracelulares de GSH presentes en los vinos sintéticos. Este fue también el caso del alto tratamiento con GSH, sin diferencias significativas observadas entre la baja, media y alto Tratamientos de Yan.

El tratamiento HHF complementado con FermaidK®, no difirió significativamente del tratamiento HH, lo que sugiere que la suplementación con un nutriente de la levadura en un nivel alto YAN tal, no daría lugar a un aumento de los niveles de GSH extracelular. Por tanto, parece que el mayor contenido de YAN en forma de alfa libre de nitrógeno amino y NH<sub>4</sub>Cl no dio lugar a mayores niveles de GSH extracelular presentes después de la fermentación alcohólica.

Debe tenerse en cuenta que varios otros factores en los diferentes mostos podrían haber influido en la producción de GSH.

Varios autores opinan de que el contenido de GSH en las uvas está estrechamente relacionada con el estado de nitrógeno en vid estimada como el contenido de levadura asimilable de nitrógeno.

Es importante señalar que el mayor contenido de GSH en las uvas es una función de las condiciones más favorables de nitrógeno durante la fase de crecimiento de las uvas y que la manipulación del contenido YAN de un jugo en el sótano, no sería necesariamente resultar en niveles más altos de GSH en el vino.

Los diferentes resultados pueden haber sido obtenidos si el estudio se repitió con otras cepas de levadura. Las cepas difieren en sus requerimientos de nitrógeno que pueden posiblemente influir en el contenido de GSH presente después de la fermentación alcohólica.

La hipótesis de que el aumento de los niveles de YAN conduciría a una mayor síntesis de GSH por la levadura con la secreción posterior del mismo en el medio del vino, por lo tanto se demuestre lo contrario. Se puede argumentar que los iones de amonio suprimen la absorción de aminoácidos libres como el precursor de aminoácidos cisteína, glutamato, glicina y serina, que podría haber limitado la síntesis de GSH.

Sin embargo, fosfato de amonio, siendo la fuente de nitrógeno más fácilmente asimilable a la levadura, es un constituyente común de productos de suplementación de nitrógeno utilizado en sótanos. Por tanto, la investigación futura en este aspecto debe incluir la evaluación de los diferentes niveles YAN en la ausencia o presencia de amoníaco.

La influencia de los diferentes niveles YAN sobre la concentración de GSH en el vino parece ser insignificante. Manipular el contenido de nitrógeno de mosto con suplementación, por ejemplo, fosfato diamónico, no conduce necesariamente a un aumento de los niveles de GSH. Sin embargo, los resultados se pueden demostrar diferentes cuando este experimento se repite con diferentes cepas de levadura.

#### 4.3.3.5 Influencia de diferentes contenidos GSH intracelular en la Resistencia al Estrés Oxidativo

Para probar la respuesta de estrés oxidativo de células de levadura con diferentes niveles de GSH intracelular, se siguió un enfoque clásico que no implican el uso de agentes que agotan GSH o GSH mutantes deficientes.

En primer lugar, se trataba de determinar si las células de levadura alcanzarían diferentes niveles de GSH intracelular cuando se crece en medio suplementado con diferentes concentraciones de GSH. Medios de comunicación YNB, se añadieron con GSH a 0 mg / L, 20 mg / L y 120 mg / L de GSH, se inoculó con *S. cerevisiae* cepa QA23 y crecido hasta

mediados del registro fase (DO600nm ~ 1) donde después se determinó el contenido intracelular de GSH.

Los resultados se muestran en :

Tabla 3.9 concentración intracelular de GSH \* de las células cultivadas en medios con diferentes concentraciones de GSH (tratamiento).

**Table 3.9** Intracellular GSH concentration\* of cells grown in media with different GSH concentrations (treatment).

Treatment	mg GSH/ g cells
0 mg/L GSH	0.56(0.05) a
20 mg/L GSH	2.06 (0.04) b
120 mg/L GSH	2.45 (0.04) c

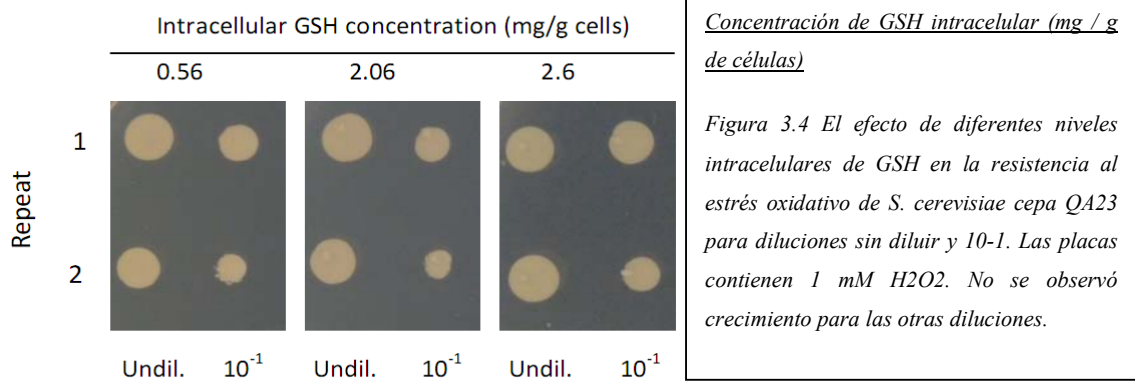
\* Los valores son medias (SD) de análisis por triplicado; letras distintas denotan diferencias significativas a  $p < 0,05$ .

Las células cultivadas en medios deficiente de GSH, acumularon aproximadamente 0,56 mg células GSH / g (como peso húmedo). Curiosamente, aunque significativamente diferente, la diferencia de GSH intracelular contenidos entre las células cultivadas en presencia de 20 mg / L y 120 mg / L no difieren en gran medida, siendo 2,06 mg células / g y células de 2,45 mg / g, respectivamente. Estos valores se traducen en aproximadamente 1% del peso seco de células .

Se ha informado de que las células de *S. cerevisiae* que entran en la fase estacionaria adquieren resistencia contra varias tensiones ambientales, tales como el calor, osmótica y el estrés oxidativo . Por esta razón, las células fueron cosechadas en fase semilogarítmica para eludir esta resistencia.

Para probar si los diferentes contenidos intracelulares de GSH darían lugar a diferentes respuestas al estrés oxidativo, cultivos de las cepas con diferente contenido de GSH intracelular fueron vistos en cuatro diluciones seriadas 10x en placas que contienen diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En placas que contenían 2 mM y 4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no se observó crecimiento (resultados no mostrados). Crecimiento en placas que contenían 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se muestra en la Figura 3.4.



Es evidente que las células cultivadas a la fase log en presencia de GSH diferente concentraciones, lo que resulta en diferentes contenido intracelular de GSH, muestran ninguna diferencia en la viabilidad celular. Esto sugiere que las células cultivadas en medios deficientes de GSH, sintetizan GSH suficiente para adquirir suficiente resistencia al estrés a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bajo las condiciones utilizadas en este experimento.

Este experimento fue, sin embargo, sólo se llevó a cabo con una cepa de levadura. Resultado diferente se puede observar cuando este experimento se repite con más cepas y diferentes condiciones de fermentación, tales como mosto de uva. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio publicado la evaluación de la respuesta al estrés oxidativo de una cepa de levadura comercial de vinos con diferentes niveles de GSH intracelular.

Parece que las células de levadura cultivadas en un medio deficiente de GSH son capaces de producir suficiente GSH para proteger las células contra el daño oxidativo. No se observaron diferencias significativas entre las cepas con diferentes contenidos intracelulares de GSH.

## **Capítulo 5: El papel del glutatión en el ser Humano**

5.1 Biosíntesis en el cuerpo humano .....	230
5.2 GPX's humanas .....	231
5.3 Usos terapéuticos y nutricionales del glutatión.....	232
5.3.1 Enfermedades .....	232
5.3.2 Alimentos ricos en Glutatión.....	234
5.3.3 Suplementación .....	235

## Capítulo 5: El papel del glutatión en el ser humano

Apenas hace veinte años que se conoce la existencia de esta proteína que los científicos califican como “pequeña”, por estar formada por tres aminoácidos.

### 5.1 Biosíntesis en el cuerpo humano:

Aunque todas las células del cuerpo humano son capaces de sintetizar el glutatión, la síntesis de glutatión del hígado se ha demostrado que es esencial.

El hígado es la glándula de mayor tamaño en el organismo, entre el 2% y 5% del peso corporal; mientras que el riñón solo representa entre 0,05% y 0,1%. Sin embargo, la biotransformación de sustancias tóxicas y su excreción como un mecanismo de protección para el organismo constituye la función metabólica más importante que realizan estos dos órganos en su conjunto.

Las sustancias dentro del sistema portal, que incluyen Metabolitos y materiales tóxicos, son recibidas por los macrófagos, y los hepatocitos para ser procesados metabólicamente, y ser vertidos a la circulación al riñón y ahí ser nuevamente procesadas y excretadas.

La vía de eliminación es la transferasa de glutatión (TG), catalizadora de la conjugación con el GSH, y eliminada como un compuesto no tóxico en forma de ácido mercaptúrico en la bilis. El GSH representa el más abundante antioxidante endógeno involucrado en numerosas funciones vitales de la célula. La cisteína es el principal aminoácido para la síntesis de GSH, la cual es catalizada por la gammaglutamil-cisteína-sintetasa (GGCs) y es considerada de velocidad limitada en la síntesis de GSH. Los niveles de cisteína intracelular pueden ser influidos por altos valores de gammaglutamil-cisteína, o por un sistema de transportación de aminoácidos como el ciclo gamma-glutamilo. Si los niveles de GSH se mantienen, el daño celular tiende a ser menor porque la actividad de las especies reactivas producidas por un xenobiótico podría reducirse.

En mamíferos, el hígado constituye el órgano central para el metabolismo de GSH, que se encuentra generalmente en altas concentración y podría proveer GSH a otros tejidos vía circulación interorganos.

## 5.2 GPX's humanas

Los tipos de glutatióna peroxidasa humana son:

- Glutatión peroxidasa 1 (GPX1). Tiene como función proteger la hemoglobina de los eritrocitos de una rotura oxidativa. Se constituye como un homotetrámero y su localización celular es el citoplasma.
- Glutatión peroxidasa 2 (GPX2). Tiene como función proteger a los mamíferos de la toxicidad de los hidroperóxidos orgánicos ingeridos. Pueden actuar como aceptores el tert-butil hidroperóxido, el cumenohidroperóxido y el hidroperóxido del ácido linoleico. En cambio, el fosfatidilcolina hidroperóxido no actúa como aceptor. Se constituye como un homotetrámero y su localización celular es el citoplasma. Se expresa sobre todo en el hígado y tracto gastrointestinal.
- Glutatión peroxidasa 3 (GPX3). Tiene como función proteger a las células y enzimas del daño oxidativo catalizando la reducción por la glutatióna del peróxido de hidrógeno, peróxidos de lípidos e hidroperóxidos orgánicos. Se constituye como un homotetrámero que es secretado en el plasma.
- Glutatión peroxidasa 5 (GPX5). Tiene la misma función que la GPX3 y constituye un sistema de protección contra el daño de los peróxidos en los lípidos de las membranas del espermatozoide. Esta enzima es secretada en el epidídimo.
- Glutatión peroxidasa 6 (GPX6). Es una proteína secretada y se expresa en el epitelio olfativo.
- Glutatión peroxidasa 7 (GPX7). Es una proteína secretada.

Existe otra GPX marcada como probable y llamada Glutatión peroxidasa 8 (GPX8) que es una proteína de membrana.

Sus efectos beneficiosos forman una larga lista: “es producido por el cuerpo y se encuentra en las células, más específicamente en el citoplasma. Su principal función es el desecho de desperdicios de la célula. Es el protector más poderoso y más fuerte de nuestros millones de células. Aumentando los niveles de GHS, mejoramos nuestra salud celular mejorando la salud de nuestros cuerpos enteros desde la cabeza a los pies. Se compara a otros antioxidantes mejor conocidos, como el resveratrol, las vitaminas A. E. C. y al selenio. Tener adecuadas



concentraciones de glutatión en el organismo nos ayuda a mantener, principalmente, un equilibrio óptimo en la eliminación de radicales libres (efecto antioxidante), así como auxiliar para la desintoxicación de las células del hígado debido a que esta proteína tiene una excelente capacidad de reaccionar con sustancias tóxicas y favorecer su eliminación.

Además de su poder antioxidante y desintoxicante, el glutatión proporciona aumento de energía, refuerza el sistema inmune y particularmente es clave para la activación de los linfocitos y plaquetas, mejora la memoria y la concentración, disminuye el tiempo de recuperación después de entrenamientos deportivos o de una cirugía, reduce la proliferación de células con tendencia a la malignidad, jugando un papel clave en la colaboración para la defensa de diferentes enfermedades causadas por la presencia de radicales libres,

### 5.3 Usos terapéuticos y nutricionales del glutatión:

Por la deficiencia de este antioxidante se pueden producir enfermedades a causa de radicales libres, esa reducción es posible gracias a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, una enzima de la ruta de las pentosas fosfato. De hecho, una deficiencia de esta enzima puede tener efectos similares a la deficiencia de glutatión en términos de protección contra los radicales libres. El glutatión protege a las células de varios contaminantes y venenos, entre ellos algunos procedentes de la combustión y el humo de los cigarrillos. También retrasa el daño causado por la radiación.

#### 5.3.1 Enfermedades:

- Envejecimiento: Se sabe que el envejecimiento va acompañado de una precipitada caída de nuestros niveles de glutatión. Estos niveles bajos también se encuentran a menudo en varias enfermedades asociadas con el envejecimiento, tales como cataratas, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, arterioesclerosis y otras.
- Problemas neurológicos: los bajos niveles de glutatión se asocian con algunos trastornos neurodegenerativos, como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Lou Gehrig, Alzheimer, Parkinson y otros.
- Cáncer: El glutatión juega un papel importante en la eliminación de diversos cancerígenos, manteniendo al mismo tiempo la optimización de funciones inmunitarias que hacen más eficaces las defensas anti-tumorales.

- Enfermedades del corazón y derrames cerebrales, colesterol: El aumento de los niveles de glutatión combate la oxidación de los ácidos grasos presentes en el torrente sanguíneo, incluyendo el colesterol, lo que retrasa el proceso de formación de placas en las arterias, que es la causa subyacente de la mayoría de los problemas de corazón.
- Diabetes: Los diabéticos son más propensos a las infecciones y problemas circulatorios, daño renal y ceguera. El glutatión protege de estas complicaciones relacionadas con la diabetes.
- Enfermedades pulmonares: Los médicos están utilizando medicamentos precursores de glutatión en diversas enfermedades pulmonares, como el asma, la bronquitis crónica y el enfisema. Destacan las nuevas propiedades terapéuticas para proteger de los daños causados por el humo del cigarrillo, la fibrosis pulmonar y otras enfermedades.
- Problemas digestivos: El glutatión protege contra la inflamación en los casos de gastritis, úlcera gástrica, pancreatitis, inflamación intestinal, úlcera de colon y enfermedad de Crohn.
- Hepatitis: El hígado es el órgano principal de almacenamiento de glutatión. Hay deficiencia de glutatión en la hepatitis alcohólica, así como en casos de hepatitis viral, entre ellos la hepatitis A, B y C. La elevación de los niveles de glutatión restablece las funciones del hígado.
- Problemas renales: Las personas que tienen daño renal o se someten a diálisis tienen altos niveles de oxidación, debido al estrés y la disminución de los niveles de glutatión. Elevar el glutatión ayuda a prevenir la anemia.
- Embarazo, parto, lactancia materna: El papel del glutatión en el desarrollo del feto y la placenta es crucial. Actúa en la placenta con el fin de neutralizar los contaminantes antes de que lleguen al niño en desarrollo. Se han relacionado varias complicaciones durante el embarazo con los bajos niveles de glutatión.
- SIDA: El glutatión juega un papel fundamental en el buen funcionamiento del sistema inmunológico; además, se ha demostrado una relación directa entre una mayor carga viral de VIH y una disminución de los niveles de glutatión intracelular.

### 5.3.2 Alimentos ricos en Glutación:

Es muy importante mencionar que es mucho más importante enfocarse en alimentos que contienen precursores de glutación, que glutación en sí mismo. Esto se debe a que el glutación posee una estructura química que es débil al proceso digestivo. El glutación puede ser sintetizado a partir de los aminoácidos L-cisteína, ácido L-glutámico y glicina. El ácido glutámico y la glicina se encuentran en casi todos los alimentos que comemos, pero la cisteína es mucho más escasa.

Fuentes de GSH recomendadas son los espárragos, espinacas, brócoli, ajo, col, cebollas, berros y coles de bruselas. Algunas especias como el comino y la canela también elevan modestamente los niveles de GSH. Otros alimentos que contienen glutación en menos cantidad son melón, aguacate, pomelo, duraznos, naranjas, nueces, pavo y pollo. En resumen, los productos lácteos, los cereales y el pan son generalmente bajos en GSH, frutas y vegetales tienen cantidades moderadas o altas de GSH, y carnes recién preparadas tienen un contenido relativamente alto de GSH. También la ingesta de alimentos como las uvas o el vino.

Sin embargo, y esto es fundamental, es mucho más importante enfocarse en alimentos que contienen precursores de glutación que glutación en sí mismo. Un precursor es un elemento que requiere el cuerpo para producir el glutación, en este caso son cisteína, ácido glutámico y glicina. Esto se debe a que el glutación posee una estructura química que es débil al proceso digestivo, haciéndola inútil muchas veces, segundo, para aprovechar el glutación, el cuerpo tiene de todas formas que romperlo en sus componentes para poder crear el suyo propio y obtener los beneficios del mismo.

El ácido glutámico y la glicina se encuentran en casi todos los alimentos que comemos, pero la cisteína es mucho más escasa encontrándose en huevos, ajo, leche. Sin embargo, la cisteína es sumamente sensible al calor, de manera que si se calientan estos alimentos pierden por completo su cisteína, inactivándola. La leche pasteurizada se le llama desnaturalizada por este hecho, porque al calentarla pierde muchas de sus propiedades útiles.

También se recomienda el consumo de alimentos ricos en selenio, conocido por ayudar a elevar los niveles de glutación, alimentos como las nueces de Brasil, nueces, y alimentos del mar contienen selenio.

### 5.3.3 Suplementación:

Convertir el glutatión en un suplemento alimenticio ha sido difícil. La investigación sugiere que el glutatión por vía oral no se absorbe bien a través del tracto gastrointestinal, sin embargo, las concentraciones de glutatión en el suero sanguíneo y los tejidos pueden aumentar ingiriendo precursores de la cisteína. Entre los precursores de glutatión ricos en cisteína están:

- la N-acetilcisteína (NAC)
- la proteína de suero de leche desnaturalizada.

Estos suplementos han demostrado aumentar el contenido de glutatión dentro de la célula. La N-acetilcisteína es un suplemento disponible de forma genérica que aumenta el glutatión intracelular reducido y total en un 92% y un 58% respectivamente. Una proteína de suero de leche llamada Immunocal aumenta los niveles de glutatión en los linfocitos del sistema inmunitario en un 35,5%, y también aumenta el pico de potencia y el rendimiento muscular en un 13%.

- Un nuevo profármaco, que combina la glutatión frágil precursor de cisteína con la ribosa monosacárido. D-ribosa-L-cisteína es capaz de pasar a través de la digestión intacta y crear un impulso significativo y sostenido en la producción de glutatión sistémica. Una vez dentro de la célula, la cisteína se convierte en glutatión, mientras que la ribosa se utiliza para la energía celular en forma de trifosfato de adenosina.

De tal forma que, para poder tener los beneficios que aporta el glutatión a nuestro organismo, es esencial proveer al cuerpo de suplementos -precursores- que apoyen su producción natural a nivel celular, y no quedarnos únicamente con el glutatión que proviene de los alimentos que consumimos, ya que este, resulta insuficiente.

El exceso de suplementos de glutatión en el cuerpo puede verse inundado de glutatión y resultar perjudicial, además de tener que trabajar el doble para poder romper el glutatión en sus tres componentes para después poder producir el suyo propio.

### **Conclusión:**

En la última década la naturaleza competitiva del mercado global del vino se ha incrementado, con vinos de calidad que desean entrar en el mercado de todo el mundo. La comprensión del consumidor del valor del producto ha aumentado resultando en discriminación de la calidad del vino.

Esto se traduce en bodegas siendo desafiado para producir vinos consistentes y, si es posible más de alta calidad. Del mismo modo, las demandas del consumidor para vinos saludables como resultado de la presión para reducir el uso de conservantes químicos, como el dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) en el vino.

Un producto mejorado, tanto en términos de calidad y aceptación del consumidor, por lo tanto, sería conferir una ventaja competitiva para el enólogo.

La importancia del glutatión (GSH) en la limitación de oxidación de mostos y vinos, junto con su efecto protector sobre diversos compuestos aromáticos positivos y efecto inhibidor sobre la formación de envejecimiento malos sabores, confieren calidad única mejorar y preservar la calidad de posibilidades en el vino.

Además, los niveles de antioxidantes más altos en el vino, tal como GSH, podría permitir el uso de dosis reducidas de SO<sub>2</sub> sin comprometer la calidad sensorial del vino y a la vez también poder introducirnos en la vinificación orgánica.

Para esto debemos tener conocimientos y estrategias de manejo de la vid para modificar sus concentraciones desde el comienzo.

Para la formación de glutatión en la vid tenemos que tener una planta equilibrada y nutrida, dentro de los nutrientes el principal es el nitrógeno que va a ser el precursor que forme los péptidos que se derivan de los aminoácidos. Entonces tenemos que tener conocimientos de la composición físico-químicas del suelo y estrategias de manejo en función de la edad de la planta, momentos fenológicos, control del vigor, formas de fertilización y las diversas formas del manejo del suelo.

Cada situación de estrés provoca una respuesta única, desarrollado diferentes procesos fisiológicos y bioquímicos de aclimatación. Cuando tenemos un exceso de un metal, la destoxicación implica un gasto de este antioxidante, reduciendo los niveles iniciales en un mosto. En otros casos, el precio a pagar por la liberación fotosintética de O<sub>2</sub> es la producción

de los EROs, si la planta no tiene capacidad de potencial de barrido, en esta última instancia puede conducir a la muerte. La generación de EROs implica también un gasto de antioxidantes para someterse a la conversión de un radical destructivo.

Una forma para calcular estas situaciones de tensión, los sistemas in vitro ofrecen un método práctico y fácil de manipular para el estudio de estrés, y notar los valores medidos antes y durante el crecimiento en este.

Otras veces cuando el estrés se debe a una déficit hídrico, hay diferentes mecanismos de resistencias a nivel celular y molecular, una de estas respuestas a esta limitación es la modificación de la expresión genética, el péptido glutatión juega un rol importante siendo la principal fuente de tioles no proteicos en la mayoría de las células, participando en la tolerancia a la baja disposición de agua, ya sea con fines estructurales o con fines reguladores.

Cuando el estrés se produce por patógenos una de la respuesta antioxidante en las vides, hacia la fase tardía de la infección, el glutatión está presente y puede ser una de las razones para retomar los niveles de control.

La exposición a la radiación solar no solo afecta la concentración de azúcares en las bayas, sino también incrementa la capacidad antioxidante como los fenoles en hollejos (antocianos y polifenoles totales) y otros metabolitos secundarios, determinada como capacidad de absorción de radicales oxígeno. Esto significa que a mayor estrés por radiación UV-B y ABA aumenta la defensa natural de la planta.

Los diversos cultivares que en terroirs como La Rioja, España, presentando altas y bajas concentraciones de glutatión como resulta ser el Tempranillo Blanco como una variedad que da un mosto con alta concentración, en nuestro terroir, puede variar debido a las características físico-químicas del suelo, la altura a nivel del mar, las condiciones de estrés a las que estamos expuestos, y se necesitarían hacer pruebas para saber cuáles son los cultivares de nuestra zona que presentan mayor concentración.

Los Contenido de GSH en el jugo de uva también es dictado por varios factores, como la exposición al oxígeno, la actividad de la tirosinasa, maceración de la piel de la uva durante el período previo a la fermentación y condiciones apremiantes.

Es evidente que GSH desempeña un papel integral como antioxidante en la oxidación de los mostos blancos. Se neutraliza orto-quinonas, lo que limita la formación de pigmentos de

pardeamiento en cierta medida. GSH ejerce un efecto protector sobre varios aromas del vino deseables, mientras que al mismo tiempo, se limita la formación de indeseables envejecimiento malos olores en el vino. Además, su papel como precursor de aroma en la baya ha sido el foco de muchos estudios que dilucidar la participación de glutatión en la producción tiol varietal.

La fermentación de *S. cerevisiae* puede tener un impacto en la concentración final GSH en el vino debido al metabolismo de los mismos por la levadura. Los transportistas, tanto para la absorción y la secreción de GSH han sido identificados en *S. cerevisiae* que puede resultar en la fluctuación de las concentraciones de GSH durante la fermentación alcohólica del vino. También se sugiere que el GSH, siendo un compuesto intracelular, se libera tras la autólisis de levadura.

Aunque  $\text{SO}_2$  es muy eficiente en la protección contra la oxidación del vino, ciertos consumidores son sensibles a este antioxidante y una tendencia creciente, para reducir el uso de  $\text{SO}_2$ , se observa actualmente. GSH puede ayudar  $\text{SO}_2$  en su papel como antioxidante, permitiendo el uso de los niveles de  $\text{SO}_2$  inferiores y la superación posible de resistencia de los consumidores.

La gestión prudente de GSH durante el proceso de elaboración del vino, destinado a retener altos niveles en el vino final, puede por lo tanto ser muy valiosa para la calidad del vino, sobre todo la de vino blanco, al limitar la oxidación, oscurecimiento y la pérdida de aroma.

Es evidente que se necesitan más investigaciones sobre diversos aspectos de GSH en el vino, especialmente el papel que diferentes cepas de levadura, adiciones GSH-LSI y los niveles de oxígeno desempeñan en los niveles de GSH en el vino durante el proceso de vinificación.

El GSH disminuye durante el envejecimiento, independientemente de la cepa de levadura o presencia de las lías. La influencia de los diferentes niveles NFA sobre la concentración de GSH en el vino también hace referencia que en la necesidad de nitrógeno de las levaduras va a consumir otros compuestos, pero no el GSH, esto no implica que aumenta su concentración inicial, sino que se conserva para otros usos.

Parece que las células de levadura cultivadas en un medio deficiente de GSH son capaces de producir suficiente GSH para proteger las células contra el daño oxidativo

Las pruebas de fermentaciones de jugo de uva, entregan información valiosa sobre la evolución de GSH durante la fermentación alcohólica. Se demostró que el contenido de GSH fluctúa durante la fermentación alcohólica, en función de la cepa de levadura y el contenido inicial de GSH del jugo.

Sugiriendo que la diversidad de las cepas de *S. cerevisiae* LSI no solo difieren en las características del producto final sino también en su metabolismo de GSH y GSH que se asimila en ciertas etapas y liberado de nuevo en otros durante la fermentación alcohólica.

Hay tener en cuenta que los niveles de GSH después de la fermentación alcohólica no eran estrictamente atribuible a una cepa específica de levadura sola. Otros factores en el mosto y influyen en los niveles de GSH observados después de la fermentación alcohólica.

Análisis sensoriales de estos vinos también proporcionaría información valiosa sobre el impacto organoléptico suplementación GSH-LSI tiene en materia de vinos.

En nuestro país, la legislación nacional vitivinícola no tiene contemplado el uso de glutatión, ni como productos ni como practicas enológicas, siendo muy difícil tratar de alcanzar a otros elaboradores internacionales y competir directamente en calidad, si disponemos de recursos e informaciones más antiguos como las manoproteinas, levaduras secas inactivas, cortezas de levadura, siendo participes de otros puntos de vista en calidad, pero sin saber la concentración específica de antioxidantes presenten , y en nuestro interés del glutatión.

Los precios de los productos que aumentan exógenamente la concentración inicial de GSH, influyen notablemente en los costos finales, dependiendo del tipo de vino y de las economías regionales y/o globales los enólogos pueden decidir si invertir y hacer uso de este antioxidante, sabiendo los beneficios que proporcionaría a un vino blanco o rosado a largo plazo. La otra forma de manipular la concentración, es la viticultura aplicada a incrementar la concentración desde el viñedo para el futuro mosto.

De mi parte antes de empezar el trabajo creí que las propiedades del glutatión eran limitadas y por eso tan poco conocidas y estudiadas en nuestro país, pero al final me di cuenta que estamos limitados a los costos y a los métodos de cuantificación de GSH y no a la falta de sabiduría y que siempre se puede mejorar y nunca hay que dejar de perfeccionarnos día a día.



## **Bibliografías:**

1. ADAMS O. Douglas; LIYANAGE Chandrika. Glutathione Increases in Grape Berries at the Onset of Ripening. Traducción:” Los aumentos de glutatión en bayas de uva en el inicio de la maduración” En American Journal of enology and viticulture.s/l. 1993.
2. ALUQUÓ A. Gustavo. Nutrición y Fertilización en Viñedos. INTA. s/f. 83p.
3. ANDERSON M.E.; Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation..Traducción:“ El glutatión: una visión general de la biosíntesis y la maduración” En Chemico-Biological Interactions. s/l.1998
4. ANDUJAR ORTIZ Inmaculada; POZO BAYON Maria Ángeles; MORENO ARRIBAS Victoria ; y otros. Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography–Fluorescence Detection for the Analysis of Glutathione and Its Precursor  $\gamma$ -Glutamyl Cysteine in Wines and Model Wines Supplemented with Oenological Inactive Dry Yeast Preparations. Traducción:“Fase invertida de detección de cromatografía líquida de alto rendimiento –fluorescencia para el análisis de glutatión y su precursor  $\gamma$ -glutamil cisteína en vinos y vino modelo complementado con los preparados enológicos de levadura seca inactiva” En Food Analytical Methods.Madrid.2011.2p
5. Anónimo.”Alergia al vino: alérgenos ocultos. Sulfitos” En CCM Salud. Francia.2012.4p.
6. ANONIMO.”Alimentos que ayudan a elevar los niveles de glutatión en el organismo” En Salud Natural y Bienestar. s/l.2002
7. AZ3Oeno.Abriendo Nuevas rutas. Vinificación-Conocer, interpretar y lograr los aromas del vino. s/l. s/f.(14-24)p.
8. BALBOA LAGUNERO Tania. Mejora de la calidad aromática de los vinos ecológicos mediante reducción de aromas de oxidación. Madrid. 2012.(8/39)p.
9. BERLI Federico J.; ALONSO Rodrigo; BELTRANO José; y otros. High Altitude Solar UV-B and Abscisic Acid Sprays Increase Grape Berry Antioxidant Capacity. Traducción: Efectos de la radiación solar UV-B en viñedos cultivados a mayor altura y uso del sprays ABA sobre la capacidad antioxidante de las bayas. Argentina .2014.15p.
10. BOURBOULOUX A.; SHAPI P.; CHAKLADARA.; y otros. Hgt1p, a high affinity glutathione transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Traducción:”Hgt1p ,

- un transportador de alta afinidad por glutatión de la levadura *S.cerevisiae*” En J. Agric.Food Chemicals.s/l. 1998.
11. CARDENAS RODRIGUEZ Noemí; PEDRAZA CHAVERRI José. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes :aspectos básicos.D.F.Mexico.2005.10p
  12. CARVALO Luisa; VIDIGAL Patricia ; AMANCIO Sara. Homeostasis, Estrés oxidativo en la vid (*Vitis vinifera* L.) .*Environ*. 2015. 38p
  13. CASASSA Federico. Protección oxidativa .Glutatión, Acido Ascórbico y SO<sub>2</sub>,Viejos conocidos, nuevos conceptos.EEA Mendoza INTA. s/f.19p.
  14. CASTELLUCCI Federico; Resolución OIV/OENO 345/2009.Determinación del glutatión en mostos y vinos mediante electroforesis capilar. Zagreb.2009.7p.
  15. CATANIA S.; AVAGNINAS. Los defectos en los vinos.EEA Mendoza.2007.
  16. CONN Simon; CIRTIN Chris; BEZIER Annie; y otros. Purification, molecular cloning, and characterization of glutathione S-transferases (GSTs) from pigmented *Vitis vinifera* L. cell suspension cultures as putative anthocyanin transport proteins. Traducción: Purificación , clonación molecular y caracterización de glutatión S-transferasas (GSTs) en pigmentos de *Vitis Vinifera* L.Cultivos de células como las proteínas de supuestos transportes de antocianina.13ed. s/l. 2008. 27 p.
  17. DOUGLAS O. Adams. Phenolics and Ripening in Grapes Berries. Traducción: Polifenoles y maduración de las bayas de uva. s/l. 2006 . 8p
  18. FRACASSETTI; LAWRENCE N.; TREDoux A.G.J.; y otros. Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method. Traducción:”Cuantificación de glutatión, catequina y ácido cafeico en el jugo de uva y el vino por el nuevo método de cromatografía líquida de ultra rendimiento. s/l. 2011.11p.
  19. GARCIA ROMERO Esteban. Itinerarios para la obtención de vinos sin sulfitos. s/l. s/f. 58p.
  20. GASTELLI PEREZ Luis Pedro; PEREZ DE ALEJO José Luis. “Métodos para medir el daño oxidativo” En *Revista Cubana Med Milit. Cuba*.3ed.2000. 7p.
  21. GONZALEZ ROA Cecilia Catalina. Determinación de especies de glutatión por electroforesis capilar en plantas bajo estrés por cobre (Cu).Santiago, Chile. 2005. 68p.
  22. GONZALEZ ROYO Elena; URTASUM Ardoni; GIL Mariona ; y otros.”Efecto de la cepa de levadura y la suplementación con levadura inactiva durante la fermentación alcohólica y en polisacáridos en el vino” En *Enoviticultura*.14ed. España.2013.8p

23. HELMUT Sies."El glutati3n y su papel en las funciones celulares" En Free Radical Biology and Medicine.Alemania.1999
24. HIDALGO J. Tratado de Enologia. Tomo I y II. Madrid Espa1a.2011.
25. INV Productos Enol3gicos. VANDEMECUM de productos de uso enol3gico, otros productos y elementos de uso en establecimientos vitivin3colas. Argentina. Julio 2015.(501-517; 535-616)p.
26. KAMIO Xavier." El glutati3n amigo fiel de la fruta" En OENOBLOG. 2011.3p.
27. KONTOGEOGOS N.; ROUSSIS I.G. Research Note: Total Free Sulphydryls of Several White and Red Wines. Traducci3n: " Nota de Investigaci3n : Contenido total de sulfidrilo libre en varios vinos blancos y tintos".Grecia.2014.3p.
28. KRITZINGER C. Engela. Influence of yeast strain, extended lees contact and nitrogen supplementation on glutathione concentration in wine. Traducci3n: Influencia de la cepa de levadura, el contacto prolongado l3as y la suplementaci3n de nitr3geno sobre la concentraci3n de glutati3n en el vino. s/l.2015.10 p
29. KRITZINGER C. Engela; STANDER Aletta Marietjie. Assessment of glutathione levels in model solution and grape ferments supplemented with glutathione-enriched inactive dry yeast preparations using a novel UPLC-MS/MS method... Traducci3n: Evaluaci3n de los niveles de glutati3n en soluciones modelo y fermentos de uva suplementadas con preparaciones de levaduras secas inactivas enriquecidas con glutati3n utilizando un nuevo m3todo UPLC-MS/MS. s/l .2015.14 p.
30. LEJONAGOITIA Jos3 Luis."¡El Resveratrol ha muerto ,viva el glutati3n!" En Sociedad de Cata Bacchus. s/l. 2012. 3p.
31. LISJAKK;STANDER; PREWOOD; y otros. Usina LC-MSMS to assess glutathione levels in South African white grape juices and wines made with different levels of oxygen..Traducci3n: "El uso de LC-MSMS para evaluar los niveles de glutati3n en los zumos de uva blanca de Sud3frica y de los vinos elaborados con diferentes niveles de ox3geno" En J. Agric. Food Chemicals
32. MARTINEZ J.;LOPEZ R.; SANTAMARIA P.; y otros. Elaboraci3n de vinos blancos mediante hiperoxigenaci3n. Experiencias en Rioja.7ed.Logro1o.1995.10p.
33. MARTINEZ Juana; LOPEZ Eva; GARCIA ESCUDERO Enrique. Efecto varietal sobre el contenido de glutati3n en mostos y vinos blancos. Logro1o (La Rioja) Espa1a.2014.4p.

34. NAVARRO Aviño; AGUILAR Alonso; LOPEZ Maya. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. 2ed. Valencia. 2007. 6p.
35. ORTEGA IZQUIERDO Antonio Fernando. Estudio del envejecimiento oxidativo para la obtención de vinos del tipo oloroso. Córdoba, Argentina. 2013. (9-22)p.
36. PENNA N.C; DUTRA BURIGO Carla Cristina; HUBER L.S. “Influencia del glutatión en la fermentación maloláctica en vinos de la variedad Niágara” En Alimentaria Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos. s/l. 2003. (117-122)p
37. PENNINCKJ M.J.; An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. Traducción: Una visión general sobre el glutatión en *S. cerevisiae* frente a levaduras no convencionales. Bélgica. 2002.
38. PENNINCKX Michael J.; ELSKENS Marc T. Metabolism and functions of glutathione in micro-organisms. Traducción: Metabolismo y funciones del glutatión en microorganismos. Bélgica. 1993
39. PEREYRA CARDOZO M.; QUIRIBAN A. Las proteínas en la tolerancia al estrés hídrico en plantas. Santa Rosa, Argentina. 2014. 13p.
40. PEREZ Guillermo. “Glutatión” En COENZIMA.COM. s/l. s/f.
41. RIBEREAU; GAYON. Traité d'oenologie. Microbiologie du vin. Paris 1998
42. RODRIGUEZ NOGALES José Manuel; VILACRESPO Josefina; FERNANDEZ Encarnación. “Efecto del uso de levaduras inactivas ricas en glutatión sobre las características enológicas en vinos blancos” En Documento Internacional de la OIV. España .2014. 2p.
43. ROLAND Aurelie; CAVELIER Florine; SCHNEIDER Remi. “Los tioles varietales :información actualizada sobre las vías de la biogénesis y el impacto de técnicas vitivinícolas” En ACE Revista de Enologia. Francia. 2012. 5p.
44. ROUSSIS I.G.; PATRIANAKO U.M; DROSSIADIS A. Protection of Aroma Volatiles in a Red Wine with Low Sulphur Dioxide by Mixture of Glutathione, Caffeic Acid and Gallic Acid. Traducción: Protección de los compuestos volátiles del aroma en un vino tinto con baja dosis de Dióxido de Azufre por una mezcla de glutatión ,ácido cafeico y ácido gálico. Grecia .2013. 4p.
45. SARASA SAGÜES Ana; BUJANDA AGUIRREZABAL Faustino; CIBRIAIN SABALA Félix; y otros. Gestión del suelo vitícola: cubiertas vegetales e incidencia en la calidad del mosto y vino. s/l. 2013. 9p.

46. SONNI F.; MOORE E.G.; CLARK A.C.; y otros. "Impacto del glutatión sobre la formación de methylmethine y carboxymethine con puentes de (+) – catequina dímeros en un sistema modelo de vino" En J Agric Food Chem.13ed.Bolonia Italia.2011
47. The Wine EXPERT. El Glutatión y su aplicación en el vino. España-Portugal. s/f.6p.
48. TOMOCHIKA K.; SHINODA S.; ONO B.; y otros. Glutathione Transport Systems of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Traducción:"Sistemas de transporte de glutatión en levadura *S. cerevisiae*" En Biosci Biotechnol Biochem.10ed. s/l. 1998.
49. TREGOAT O.; LACROUT F.; PONS A. ; y otros. Efecto de las aplicaciones de nitrógeno foliar y azufre en expresión aromática de *Vitis vinifera* en Sauvignon Blanc. Francia. 2008. 8p.
50. TRIOLI G.; HOFMANN U. Código de Buenas Prácticas Vitivinícolas Ecológicas.Italia.2006.10p.
51. TRISTAN QUEZADA Teódulo; MARTINEZ ORTIZ Raúl; JUAREZ Fernando; y otros. Estudio comparativo de concentración del glutatión redujo y actividades de gammaglutamiltransferasa y transferasa de glutatión en hígado y riñón de pollos y ratas.2ed.Mexico.2002.11p.
52. UNIVERSIDAD POLITECNICA DE MADRID. Levaduras inactivas para preservar el aroma de vinos jóvenes.Madrid.2014.
53. VIVIANCOS DIAZ Pedro; HERNÁNDEZ CORTÉS José A."Mecanismos antioxidantes de defensa: Mecanismos no enzimáticos" En cienciasceba's Blog. s/l. 2013.3p
54. WATERHOUSE L. Andrew ."Observaciones recientes en la oxidación del vino" En Google Scholar..California. s/f.9p.
55. WEBER Vanessa; TRENTIN LIZOT Bruna; BARRETO MANQUE Pedro Luis; y otros. "Preparación y caracterización de microparticulas de mediante Spray-Drying" En Documento Internacional OIV. Brasil. 2014. 3p.
56. ZALDIVAR Santamaría Elvira. Diagnostico de longevidad en vino: Protectores antioxidantes y marcadores de oxidación.España.2013.32p.
57. ZURBANO P.; FERREIRA V.; ESCUDERO A.; y otros. Role of Hydroxycinnamic Acids and Flavanols in the Oxidation and Browning of White Wines. Traducción:"Papel de los Ácidos Hidroxicinamicos y flavanoles en la oxidación y pardeamiento en vinos blancos" En J. Agric. Food Chemicals. España. 1998

**Anexo: Productos Enológicos:**

Empresa	Marca	Descripción	Dosis de Aplicación	Modo de Utilización
Lallemand	OptiWhite	Levadura Inactiva para vinos blancos y rosados	30-40g/Hl	Diluir OptiWhite en 10 veces su peso  Añadir al inicio de la fermentacion
Lallemand	OptiMUM-White	Levadura inactiva especifica rica en glutatión para la producción de vinos blancos y rosados	30g/Hl	Se añade al principio de la fermentacion alcohólica (tras el desfangado)
Springer OEnologie	Springarom	Levaduras inactivas para vinos blancos y rosados aromáticos	30g/Hl	Añadirse antes del inicio de la fermentacion o después de asentarse y justo antes de la inoculación de levaduras en el caso de vinos muy clarificados.
Laffort	Fresharom o Bioarom	Levaduras inactivas para vinos blancos y rosados	30g/Hl	Incorporar durante el primer tercio de la fermentacion alcohólica
Lallemand	Booster Blanc	Levadura inactiva para vinos blancos y rosados aromáticos	30g/Hl	Disolver en 10 veces su volumen en mosto o agua.  Se puede añadir al mosto desde la moledora o también al final de la

				fermentacion.
Agrovin	ActimaxGSH	Levaduras autolisadas, para vinos blancos y rosados aromáticos	Condición normal: 10-20g/Hl Condiciones difíciles: 20-30g/Hl Dosis Max.: 40g/Hl	Disolver en aproximadamente 10 veces su peso en mosto o agua y añadir al depósito durante el encubado.
AEB group	Elevage	Preparados de pared celular de levadura. Para vinos sensibles al pardeamiento	10 a 40g/Hl	Dispersar directamente al vino, después del primer trasiego efectuado a final de fermentacion.
OENOBANDS SAS	EXTRAferm	Cortezas de levadura. Para todo tipo de vinos	De 20 a 40g/Hl De 30 a 40g/HL De 20 a 40g/Hl	Diluir en 10 volúmenes de líquido. Antes de la fermentacion Final de la fermentacion Al vino terminado a detoxificar
Laffort	Mannostab	Manoproteína específica de la corteza de levaduras para vinos antes del embotellado	10 a 30 g/Hl	Diluir en 10 veces su peso de agua llevada a 30°C. La incorporación se hará antes de la última filtración

Oenofrance	Génesis Lift	Corteza de levadura para todo tipo de vino	Vino blanco: 4 a 20 g/Hl Vino rosado: 10 a 40 g/Hl. Dosis máx.: 40g/Hl	Diluir en 5 veces su volumen de vino. Añadir al tanque o barril
Oenofrance	Génesis Prime	Paredes celulares de levadura, para todo tipo de vinos.	Vino blanco: 10 a 20 g/Hl Vino rosado :20 a 40g/Hl Dosis max. 40g/Hl	Diluir de antemano en 5 veces su volumen de vino. Añadir al tanque o barril
Oenofrance	Génesis Fresh	Levaduras inactivas ricas en glutatión(85%) y celulosa microcristalina para vinos blancos y rosados	25 a 35g/Hl	Diluir de antemano en 5 veces su volumen de vino. Adicionar al tanque antes de la levadura.
Lallemand	White-Style	Levadura inactiva y enzima betaglucanasa. Para vinos blancos	Vino tranquilo: 30g/Hl Vino Espumante: 5 a 10 g/Hl	Disolver en 10 veces su volumen en agua o mosto. Emplear después de la fermentacion alcohólica o durante la 2ª fermentacion en espumantes.
Enobiotech	Mannovin	Levadura inerte para Elevage de vinos estructurados	Dosis máx.: 40 g/Hl Dosis mín.: 5g/Hl	Agregar al vino después de la primera decantación o durante el almacenamiento
Lallemand	Opti-RED	Derivado de levadura natural para vinos		Disolver en 10 veces su volumen



		tintos Premium	Adición temprana: 226g/ton  Adición tardía:  20-30g/Hl	de mosto o agua.  Añadir a la moledora o al final de la fermentación.
--	--	----------------	---	---

Lallemand	RED-Style	Levadura inactiva y enzima de maceración para vinos tintos	227g/ton	Mezclar en 10 veces su volumen en el mosto o agua. Uso durante la maceración.
-----------	-----------	--	----------	---

Laffort	Biolees	Parietal de levadura (manoproteínas) rico en péptidos sápidos y en polisacárido vegetal. Para vinos blancos o tintos	10 a 30 g/Hl	Disolver en 5 a 10 veces su peso en volumen de agua o vino a tratar. Agregar durante un remontado.
---------	---------	--	--------------	--

Agrovin	Súper Bouquet	Autolisado de levadura. Para todo vino blanco y tinto	Fermentación: 10 a 30 g/Hl  Crianza y vino terminado: 20-40g/Hl  Vino espumoso: 10-30g/Hl	Disolver en 10 veces su peso en vino o mosto y añadir al depósito o bodega.
---------	---------------	---	--	---