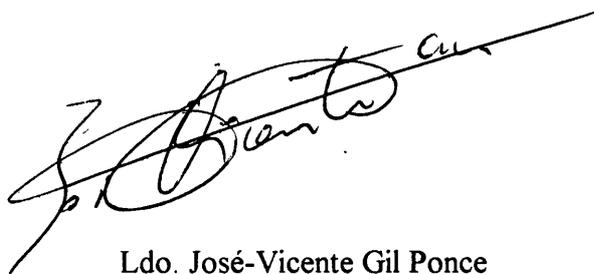


INFLUENCIA VARIABLES ENOLÓGICAS DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO EN LA ELABORACIÓN Y FRACCIÓN VOLÁTIL DEL VINO

Trabajo realizado por el Licenciado José-Vicente Gil Ponce en el departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de Valencia, para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Valencia, 30 de Mayo de 1997

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Vicente Gil Ponce', written in a cursive style with a long horizontal stroke extending to the right.

Ldo. José-Vicente Gil Ponce

UMI Number: U603058

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U603058

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES

Nº Registre 10478

DATA 24-7-97

SIGNATURA

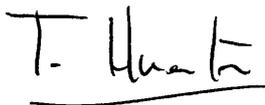
T.D 478

Nº LIBIG: j20882002

30 cm.

**Esta tesis doctoral ha sido dirigida por los doctores
Tomás Huerta Grau y Misericordia Jiménez Escamilla,
profesores titulares del Departamento de Microbiología de la
Universitat de València.**

Valencia, 30 de Mayo de 1997



Tomás Huerta Grau



Misericordia Jiménez Escamilla

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
0. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	3
1. FACTORES INFLUYENTES EN EL PROCESO DE VINIFICACIÓN	5
1.1 El sulfitado de los mostos	5
1.2 La adición de enzimas	7
1.3 Composición del mosto: adición de vitaminas y nitrógeno fácilmente asimilable	8
1.4 Aireación	9
1.5 Temperatura	10
1.6 Inoculaciones con levaduras	10
2. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD DEL VINO	13
3. EL AROMA DEL VINO	14
3.1 Generalidades sobre la percepción olfativa	14
3.2 Componentes del aroma del vino	15
4. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL	18
4.1 Análisis sensorial	18
4.2 Análisis por vía química	19
4.3 Análisis por cromatografía de gases	20
4.3.1. Principales métodos de extracción de la fracción volátil	20
4.3.1.1 <u>Inyección directa del vino</u>	20
4.3.1.2 <u>Destilación</u>	21

4.3.1.3 <i>Desmixtura</i>	21
4.3.1.4 <i>Espacio de cabeza</i>	21
4.3.1.5 <i>Extracción con gas inerte</i>	22
4.3.1.6 <i>Extracción con disolventes</i>	24
4.3.2 <i>Sistemas de detección</i>	25
4.3.2.1 <i>Detector de conductividad térmica (TCD)</i>	26
4.3.2.2 <i>Detector de captura electrónica</i>	26
4.3.2.3 <i>Detector de ionización de llama</i>	29
4.3.3 <i>Cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) como sistema de identificación</i>	29
MATERIAL Y MÉTODOS	31
1. MOSTOS UTILIZADOS Y TRATAMIENTOS PREVIOS	33
2. CEPAS MICROBIANAS EMPLEADAS	33
3 MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS	33
4. DISEÑO DE LAS EXPERIENCIAS	35
4.1. Experiencia OA27	37
4.2 Experiencia OA16	37
5 INOCULACIONES Y RECuentOS	39
6 EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES	40
7 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS	41
7.1 Cromatografía de Gases (GLC)	41
7.2 Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (GC-MS)	42
7.3 Identificación de los compuestos volátiles	42

7.4 Cuantificación de los compuestos volátiles	43
7.5 Cromatografía líquida (HPLC)	44
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
1. EVOLUCIÓN DE LAS POBLACIONES LEVADURIFORMES	47
1.1 Experiencia OA27	47
1.1.1 <i>Influencia de las inoculaciones con la cepa seleccionada</i> <i>T73 y <u>Kloeckera apiculata</u></i>	47
1.1.2 <i>Influencia de la oxigenación</i>	54
1.1.3 <i>Influencia de la adición de SO₂</i>	56
1.1.4 <i>Influencia de la temperatura de fermentación</i>	57
1.1.5 <i>Discusión</i>	57
1.2. Experiencia OA16	59
1.2.1 <i>Influencia de las inoculaciones con cepas de levaduras</i>	61
1.2.2 <i>Influencia del SO₂</i>	62
1.2.3 <i>Discusión</i>	63
2. DINÁMICAS DE CONSUMO DE AZÚCARES	65
2.1 Experiencia OA27	65
2.1.1 <i>Influencia de las inoculaciones con levaduras</i>	69
2.1.2 <i>Influencia de la adición de vitaminas y fosfato diamónico</i>	71
2.1.3 <i>Influencia de la oxigenación</i>	72
2.1.4 <i>Influencia de la adición de SO₂</i>	73
2.1.5 <i>Influencia de la temperatura</i>	73

2.1.6 <i>Discusión</i>	74
2.2 Experiencia O/A16	76
2.2.1 <i>Influencia de la inoculaciones con levaduras</i>	77
2.2.2 <i>Influencia de la adición de SO₂</i>	81
2.2.3 <i>Discusión</i>	81
3. COMPOSICIÓN DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL	83
3.1 Identificación y cuantificación	83
3.2 Experiencia O/A27	85
3.2.1 <i>Influencia de las inoculaciones con levaduras</i>	85
3.2.2 <i>Influencia de la adición de enzimas pectolíticos</i>	93
3.2.3 <i>Influencia de la adición de vitaminas y fosfato diamónico</i>	93
3.2.4 <i>Influencia de la oxigenación</i>	97
3.2.5 <i>Influencia de la temperatura</i>	99
3.2.6 <i>Discusión</i>	103
3.3 Experiencia O/A16	105
3.3.1 <i>Influencia de las inoculaciones con levaduras</i>	105
3.3.2 <i>Influencia de la inoculación con <u>Leuconostoc oenos</u></i>	110
3.3.3 <i>Influencia de la adición de SO₂ y la modificación del pH</i>	115
3.3.4 <i>Discusión</i>	118
CONCLUSIONES	125
BIBLIOGRAFÍA	131

INTRODUCCIÓN

0. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

Desde que hace 125 años Louis Pasteur realizara sus primeros estudios sobre la microbiología del vino (Amerine, 1985) numerosos estudios han ido revelando nuevos e interesantes capítulos acerca de la complejidad ecológica del proceso de vinificación. La diversidad biológica del ecosistema vínico abarca numerosos grupos microbianos. La transformación del mosto en vino es por tanto un complejo proceso ecológico y bioquímico en el que intervienen levaduras, bacterias, hongos filamentosos y sus virus. Desde un punto de vista puramente biotecnológico, el vino es un producto fruto de la biotransformación del mosto de uva, en el que concurren numerosos factores y parámetros extremadamente difíciles de controlar en su conjunto, dependiendo, de todos ellos, la calidad final del producto y, por tanto, su aceptación en el mercado. Las prácticas enológicas modernas obligan a emplear nuevas y más complejas tecnologías y el mayor grado de conocimiento del proceso fermentativo, tanto a nivel bioquímico como ecológico, hace que hayan aparecido numerosos factores que se pueden modificar con el fin de realizar un mejor control de la vinificación. Estos factores pueden ser de índole tan diversa como las inoculaciones con levadura seleccionada, el control de la temperatura, de la atmósfera, o las adiciones de factores nutricionales, enzimas pectolíticas, glicosidasas etc, la inducción de la fermentación maloláctica mediante inoculación con bacterias lácticas seleccionadas etc.

La inclusión de las nuevas tecnologías y la posibilidad de controlar todos estos parámetros hacen del vino un producto biotecnológico complejo y el estudio de la influencia de los factores en su elaboración y en su calidad, debe hacerse teniendo en cuenta esta complejidad. El mercado, cada vez más competitivo, demanda vinos de calidad consistente durante las sucesivas campañas y las bodegas deben utilizar todos los medios a su disposición para conseguir controlar al máximo el proceso de elaboración, así como los parámetros que en él influyen. En el presente trabajo proponemos una técnica basada en la elaboración de diseños factoriales equilibrados para abordar estos estudios. Esta técnica nos permite conocer el grado de influencia de los parámetros seleccionados en función de las partes del proceso de elaboración que se deseen mejorar. Los estudios de laboratorio nos ofrecen un conocimiento primario de cuales pueden ser las cuestiones más importantes a tener en cuenta en el proceso de elaboración y en que sentido es necesario actuar. Es necesario llevar a cabo estudios más concretos en la bodega, basándose en los resultados de laboratorio, a fin de concretar sobre el

terreno estos resultados. Todo este proceso nos debe llevar a un mejor conocimiento de todos los factores que afectan al complejo proceso de vinificación a todos sus niveles, a predecir las características del producto en función de los niveles de los distintos parámetros influyentes empleados y por tanto, como culminación de todo el proceso, a tomar decisiones perfectamente fundamentadas que nos lleven a la elaboración de un producto óptimo.

Los objetivos principales del presente trabajo fueron:

1. Estudiar, poner a punto y validar el uso de diseños experimentales mediante matrices factoriales equilibradas como un sistema de investigación y resolución de problemas y cuestiones de interés en vinificación.

2. Mediante estas herramientas estadísticas, estudiar la influencia de las variables enológicas más relevantes desde el punto de vista industrial, sobre la evolución del proceso fermentativo y la formación de la fracción volátil de los vinos.

3. Obtener conclusiones del peso e importancia real de las variables estudiadas así como conocer sus niveles de actuación más influyentes en el proceso de vinificación.

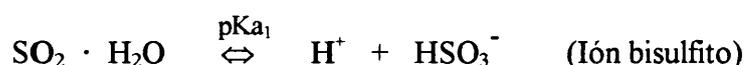
1. FACTORES INFLUYENTES EN EL PROCESO DE VINIFICACIÓN

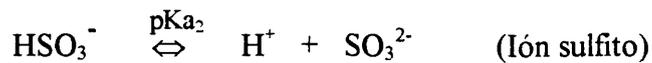
Son muy numerosos los factores que de una forma u otra pueden afectar al proceso de vinificación. De gran importancia son, por ejemplo, el cuidado en la vendimia y acarreo de las uvas, la meteorología, la higiene de los equipamientos de la bodega etc. Estos factores son o perfectamente controlables, o imposibles de controlar y no son el objeto de nuestro estudio. Estamos especialmente interesados en aquellos factores en los que el hombre interviene o puede intervenir de una manera activa y que también pueden determinar, en mayor o menor medida, la calidad final del vino.

1.1. El sulfitado de los mostos.

La adición de SO₂ a los mostos con el objeto de controlar los procesos de oxidación y restringir el crecimiento de la microbiota autóctona es una práctica ampliamente extendida en vinificación (Beech and Thomas, 1985). Como antimicrobiano, se espera que el SO₂ actúe incrementando la fase de latencia y restasando, por tanto el comienzo de la fermentación, que reduzca la velocidad de crecimiento de las levaduras y alargue la duración de la fermentación, que acelere la fase de muerte y que tenga efectos selectivos sobre las especies o cepas que crecen y contribuyen a la fermentación. Los factores que hacen que estos efectos sean más o menos significativos son la duración del contacto de las levaduras con el antiséptico, la concentración, la temperatura, el grado alcohólico, la composición del mosto que afectará a la relación entre el sulfuroso disociado y no disociado, el número de levaduras en el medio y la concentración de glucosa (King *et al.*, 1981; Sudraud y Chauvet, 1985; Rose and Pilkington, 1989).

Entre sus propiedades fisicoquímicas están su poder decolorante, es inflamable y con un fuerte olor sofocante. En solución acuosa se disocia de acuerdo con la siguiente ecuación de equilibrio:





Todas las formas de SO₂ en este equilibrio se denominan como SO₂ libre y su actividad como antioxidante y antimicrobiano depende de la cantidad de SO₂ molecular en solución (Ingram, 1948; Joslyn y Braverman, 1954; Usseglio-Tomasset *et al.*, 1981). La distribución porcentual de las distintas formas de SO₂ libre dependen del pH. así a pH inferior a 1.77 (pKa₁), la forma predominante es el SO₂ molecular y en valores de pH superiores a 7.2 (pKa₂), predomina en forma de iones sulfito. A un pH intermedio, esta presente en diferentes proporciones como ión bisulfito. (King *et al.*, 1981). En la mayor parte de los vinos, el pH oscila entre 3 y 4, siendo el 94-98% ión bisulfito y el resto SO₂ molecular.

Los mecanismos de actuación del SO₂ en el interior de las células son muy diversos. Rompe puentes disulfuro, puede reaccionar con coenzimas tales como NAD, FAD y FMN al igual que con cofactores y vitaminas. Muchos enzimas o sistemas de enzimas son inhibidos por el sulfuroso y a valores de pH menores de 4.0 causa una rápida disminución del ATP intracelular a través de su acción sobre la glicolisis y la cadena de transporte electrónico (Hinze y Holzer, 1985, 1986; Maier *et al.*, 1986). También se le achacan propiedades alterantes del metabolismo del RNA, y proteínas.

La principal levadura fermentativa, *Saccharomyces cerevisiae*, no es predominante entre la microbiota del mosto, que esta formada mayoritariamente por levaduras apiculadas de los géneros *Kloeckera* y *Hanseniaspora* y varias especies de otras levaduras (Zambonelli *et al.*, 1989). Uno de los objetivos buscados tras la adición del SO₂ es reducir el crecimiento de estas levaduras y por tanto aumentar selectivamente el crecimiento de *S. cerevisiae*. Sin embargo, Heard y Fleet (1988), ponen en duda la eficacia del SO₂ como agente controlador de la microbiota autóctona inicial, ya que su presencia se ha comprobado en bodegas que adicionan entre 50 y 100 mg/l de SO₂ al mosto (Fleet *et al.*, 1984; Heard y Fleet, 1988).

Los rangos de concentraciones a las que actúa el SO₂ sobre los diferentes microorganismos son muy amplios. Concentraciones que excedan de 30-50 mg/l retardan el crecimiento de *Leuconostoc oenos*, alterando la realización de la fermentación maloláctica (Davis *et al.*, 1985). Por otro lado, las levaduras más resistentes soportan bien concentraciones de hasta 100-125 mg/l, aunque las levaduras apiculadas son menos tolerantes que *S.*

cerevisiae, hecho lque resulta lógico considerando que algunas cepas de *S. cerevisiae*, presentan la cualidad de producir SO₂ a partir de los aminoácidos azufrados y sales de sulfato (Gaetano, 1988)

La moderna tecnología de vinificación depende en gran medida del uso correcto del SO₂ para conseguir producir vinos de calidad. La eliminación del SO₂ supone un grave riesgo de cara a la alteración del vino por levaduras y bacterias, pero no uso excesivo puede alterar la normal evolución del proceso e influir negativamente en la calidad.

1.2. La adición de enzimas

El vino puede ser visto como un producto de producción enzimática. Las actividades enzimáticas que se encuentran en el mosto y que actúan durante el proceso de vinificación, provienen de todos los grupos microbianos que concurren en ella. El estudio de muchas de las actividades enzimáticas presentes en los mostos en fermentación, han llevado a los enólogos a estudiar la idoneidad de la adición controlada de enzimas o preparados enzimáticas para conseguir potenciar ciertas características deseables en los vinos. Hoy en día es una práctica habitual en las bodegas la adición de algún tipo de cócteles enzimáticos, que viene a reforzar a los enzimas naturales provenientes de las uvas.

Sin duda los preparados comerciales de enzimas pectolíticos son los más ampliamente utilizados en las bodegas hoy en día. La mayor parte de estos enzimas provienen de cultivos de *Aspergillus niger*. La pulpa de la uva es muy rica en sustancias pécticas, por tanto, la hidrólisis incompleta de estas moléculas por parte de enzimas endógenos, puede originar problemas durante el proceso. La adición de pectinasas a la pasta tras el estrujado incrementa significativamente la producción del mosto (Ough y Crowell, 1979). El uso de enzimas pectolíticos para la maceración puede incrementar también el contenido en terpenos del vino (Ollivier, 1987). En la vinificación en tinto son frecuentes los vinos con un alto contenido en pectinas debido a un mayor prensado o a los tratamientos con calor que facilitan la extracción del color. En estos casos, se hace necesaria la adición de enzimas pectolíticos para facilitar la clarificación del mosto. Por todas estas razones, los enzimas pectolíticos son utilizados fundamentalmente para conseguir tres objetivos: a) aumentar el rendimiento del prensado o permitir un prensado más completo; b) facilitar la extracción de la materia colorante o de las

sustancias aromáticas, c) facilitar la clarificación y filtración del mosto (Paronetto y Paronetto, 1986)

Desde que el mecanismo enzimático de hidrólisis de los terpenil-glicósidos fue elucidado (Günata *et al.*, 1988), se han realizado numerosos estudios para encontrar enzimas fungicos capaces de aumentar el aroma del vino. Algunos ensayos realizados con una β -glicosidasa de *Aspergillus* spp. han mostrado resultados positivos al respecto bajo las condiciones normales de vinificación. Esta técnica puede utilizarse para reforzar el aroma varietal y el bouquet de ciertos vinos. También se están realizando actualmente aproximaciones basadas en la inserción de estas enzimas fúngicas en la levadura seleccionada empleada como iniciador de la fermentación, obteniéndose igualmente resultados positivos respecto a la apreciación organoléptica de los vinos producidos por esta levadura recombinante (Pérez-González, *et al.*, 1993).

1.3. Composición del mosto: adición de vitaminas y nitrógeno fácilmente asimilable.

La composición química del mosto afecta a la velocidad de la fermentación y a la concentración de la mayoría de los componentes del aroma del vino. La concentración de azúcar del mosto, la adición de suplementos nitrogenados, la presencia de ciertas vitaminas, la concentración de oxígeno disuelto y la concentración de sólidos insolubles, son variables relacionadas con la composición del mosto que afectan al crecimiento de las levaduras y, por lo tanto, al proceso de vinificación (Fleet y Heard, 1993).

Las principales fuentes de nitrógeno en el mosto son los aminoácidos libres y los iones amonio. Tradicionalmente se ha considerado que los mostos contenían cantidades en exceso de estas sustancias de las requeridas para el máximo crecimiento de las levaduras. Sin embargo, posteriores estudios han concluido que no siempre es ese el caso. Algunos mostos, pueden no tener suficiente nitrógeno fácilmente asimilable, especialmente los mostos sometidos a procesos de clarificación, para asegurar el crecimiento óptimo de las levaduras (Ingledeew y Kunkee, 1985, Salmon, 1989; Bely *et al.*, 1990). Además, la demanda de nitrógeno por parte de las levaduras se incrementa con el incremento de azúcar del mosto y con la cepa de *S. cerevisiae*. Debido a esto, la suplementación de los mostos con fosfato diamónico (DAP) u otras fuentes de aporte de nitrógeno fácilmente asimilable son ahora comunes para asegurar que

la disponibilidad del nitrógeno, no es factor que afecte al crecimiento de las levaduras. (Monk, 1982; Monk y Costello, 1984; Ingledew y Kunkee, 1985).

En condiciones normales, el mosto contiene cantidades suficientes de vitaminas (inositol, tiamina, biotina, ácido pantoténico o ácido nicotínico) para permitir el crecimiento normal de las levaduras (Monk, 1982; Ough *et al.*, 1989). Las pérdidas de vitaminas pueden darse en mostos que han tenido en excesivo procesado, en cuyo caso, se ha observado que la suplementación ha incrementado la tasa de crecimiento de *S. cerevisiae* (Monk, 1982; Monk y Costello, 1984). Levaduras de los géneros *Kloeckera* o *Candida*, presentan una mayor demanda vitamínica, por lo que este puede ser un factor que limite su contribución a la fermentación.

La vitamina B1 o tiamina es especialmente utilizada en enología por tener la capacidad de evitar la formación, durante la fermentación alcohólica de sustancias capaces de combinarse con el SO₂, y por lo tanto permite disminuir su dosis. Por otro lado se le atribuyen propiedades de aceleración de la fermentación alcohólica (Paronetto y Paronetto, 1986). Se ha descrito (Bach y Hess, 1983) que la adición de tiamina conlleva una limitada formación de acetaldehído y de ácido pirúvico.

1.4. Aireación

La aireación controlada del mosto antes de la fermentación o durante los primeros instantes de la misma, es estimulante para el crecimiento de las levaduras. (Ingledew and Kunkee, 1985; Sablayrolles and Barre, 1986) aunque son necesarios estudios más precisos al respecto. En el transcurso de la fermentación alcohólica el oxígeno interviene a nivel del metabolismo respiratorio además de en la biosíntesis de constituyentes de la biomasa como son los esteroides y los ácidos grasos. Por ello, un mayor aporte inicial de oxígeno puede favorecer la fase aerobia de las levaduras presentes en el mosto y, por tanto, provocar un rápido aumento de la biomasa. Esta mayor biomasa podrá luego conducir una fermentación alcohólica más rápida y controlada.

1.5. Temperatura

La temperatura a la que se lleva a cabo la fermentación alcohólica afecta a la velocidad de crecimiento de las levaduras y, por tanto, a la duración de la fermentación, a la contribución de las distintas especies y a las reacciones bioquímicas de las levaduras, que finalmente determinan la composición química del vino y sus cualidades sensoriales.

La velocidad de crecimiento de las levaduras y de la fermentación alcohólica tiene su máximo entre 20-25 °C (Amerine *et al*, 1980; Benda, 1982). En los últimos años existe una tendencia a fermentar los vinos blancos a bajas temperaturas con el fin de aumentar la producción y retención de compuestos volátiles (Killian y Ough, 1979; Kenke, 1984). Esto ha conducido a la selección de cepas de *S. cerevisiae* capaces de fermentar buenas velocidades a temperaturas bajas.

La temperatura de fermentación también afecta a la ecología de la fermentación. Así Fleet y Heard (1993) sugieren que *K. apiculata* presenta una mayor capacidad para crecer a temperaturas bajas que *S. cerevisiae*. Estudios realizados por Gao y Fleet (1988) mostraron que *K. apiculata* presentaba una mayor tolerancia al etanol a 10-15 °C, apoyando la idea general de que la tolerancia al etanol por parte de las levaduras está estrechamente relacionada con la temperatura.

Además de afectar a la ecología de la fermentación y al crecimiento de las levaduras, la temperatura también condiciona de forma directa la composición final del vino, ya que a temperaturas más altas se produce una mayor pérdida de los componentes más volátiles y de etanol, pudiendo afectar de manera significativa a la riqueza aromática de los vinos.

1.6. Inoculaciones con levaduras

Al comienzo de la fermentación espontánea existe en el mosto un claro predominio de levaduras apiculadas. La presencia de estas levaduras en el mosto de uva y su actividad fermentativa se describen ya en experiencias realizadas por Müller-Thurgau (1905-1907) y posteriormente en numerosos trabajos de Castelli *et al.* (1948, 1952, 1955), Florenzano (1949), Tarantola (1946) y Peynaud (1953).

Según esta bibliografía, no estaba todavía suficientemente clara la función que tales levaduras apiculadas podrían tener en la primera fase fermentativa de los mostos.

Sobre el papel desempeñado por el género *Kloeckera* en enología, se han realizados múltiples contribuciones experimentales. Por primera vez Müller-Thurgau (1905-1907) y posteriormente Tarantola (1946) y Saenko (1946) afirman que tales levaduras eran inadecuadas para el buen desarrollo de la fermentación vínica. Fueron estos resultados los que llevaron a pensar en técnicas tendentes a su eliminación y vislumbraron, ya a principios de siglo, los sistemas de fermentación con levadura única (fermentación en pureza).

Por otra parte y también a comienzos de siglo, no han faltado afirmaciones contrarias a ésta: Duclaux (1901) opinaba que sólo el hecho de la presencia constante del género, tendría que justificar su utilidad, Martinad (1912) también sostenía su utilidad en vinificaciones especiales.

Saenko (1946), en un examen rigurosamente cuantitativo, asociando esta especie a *Saccharomyces cerevisiae* en porcentajes crecientes del 1% al 40%, constataba que al porcentaje más bajo de apiculada correspondía un efecto que en lugar de depresivo, se hacía estimulante para la elíptica.

Otros autores estudiaron el comportamiento de varias combinaciones de levaduras como *Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora guilliermondii* y otras en asociaciones binarias, ternarias y cuaternarias, operando sobre mosto natural sin adición de SO₂. Llegaron a la conclusión de que la acción depresiva, tantas veces citada, puede ser consecuencia de la alteración de la composición química del mosto cuando se somete a tratamientos de esterilización por calor. Estas acciones no se producirían, por tanto, cuando se opera con sustrato natural (Suárez e Íñigo, 1990).

Toda esta controversia en torno a la conveniencia de las levaduras apiculadas en los primeros estadios del proceso fermentativo, provoca que la fermentación en pureza con levadura seleccionada prescindiendo de la flora salvaje, sea también controvertida.

La mayoría de los adelantos que se han producido en la industria vínica (Reed y Nagodawithana, 1988) durante los últimos 20 años, están relacionados con el desarrollo de levaduras seleccionadas como *starters* vínicos. Numerosos autores atribuyen a las fermentaciones inducidas con este tipo de levaduras, ventajas como un rápido comienzo, una fermentación uniforme y completa, nulos o muy bajos niveles de azúcares residuales, eliminación de productos indeseables, un total control microbiológico del proceso (Longo *et al.*, 1992) un vino de calidad más consistente (Kunkee *et al.*, 1970, 1977; Rankine y Lloyd,

1963), menor competencia por los nutrientes limitantes e, incluso, mayor calidad del producto final (Minárik *et al.*, 1978; Cuinier, 1983).

Mestre y Mestre (1946), Florenzano (1949), Reed (1982) y Amerine *et al.* (1982) consideran que en el caso de inocular el mosto con una levadura *starter*, la flora indígena debe ser reducida por decantación o, mejor, por centrifugación, evitando así los costos tanto económicos como organolépticos que produce la pasteurización y permitiendo que la flora salvaje se desarrolle en alguna medida, resultando vinos con un espectro aromático más extenso (Martínez *et al.*, 1990).

Heard y Fleet (1985) estudian la influencia que la flora salvaje puede tener sobre los mostos inoculados con levaduras *starters*. Sus datos reflejan que las levaduras presentes de forma natural en el mosto realizan una contribución significativa a la fermentación incluso cuando el mosto es inoculado con de 10^5 a 10^6 cels/ml de *Saccharomyces cerevisiae* y que por tanto, la afirmación de que la cepa inoculada suprime significativamente el desarrollo de las levaduras naturales durante las fermentaciones vnicas, no es estrictamente correcta. Estos mismos autores, usando métodos electroforéticos para diferenciar cepas de *S. cerevisiae* (Bouix *et al.*, 1981) muestran que en algunos casos la cepa inoculada no es la dominante al final de la fermentación. Concluyen diciendo que "en las fermentaciones inducidas, el principal efecto de las *S. cerevisiae* inoculadas es influir en el desarrollo de las cepas de *Saccharomyces* más que inhibir el crecimiento de las levaduras no-*Saccharomyces*".

Suárez e Íñigo (1990) argumentan que la técnica que se ha de aplicar en las fermentaciones en pureza, lleva implícita como primera operación la esterilización del mosto a fin de eliminar la flora salvaje. Una vez eliminada del sustrato, éste queda en condiciones de que desarrolle su actividad total la especie seleccionada. Esto significa, por tanto, la renuncia a cualquier tipo de efecto, tanto beneficioso como perjudicial, que pudiese desarrollar la flora salvaje.

Goto *et al.* (1992), encuentran que es incierto saber si la levadura usada como *starter* se desarrollará predominantemente en el vino, ya que dependerá en gran medida de la microflora presente en el mosto (no esterilizado), lo cual varía de un mosto a otro o en diferentes campañas. Estos autores advierten que es importante exigir que las levaduras usadas como *starters* se desarrollen en dominancia lo más pronto posible, por lo cual se hace necesario que la presencia de la levadura iniciadora sea seguida a través de la fermentación.

Recientemente Querol *et al.* (1992) han puesto a punto un rápido y novedoso método basado en el análisis de los fragmentos de restricción del DNA mitocondrial de la levadura, con el que es posible realizar el seguimiento de una cepa determinada de *S. cerevisiae* a lo largo del proceso fermentativo, pudiéndose así comprobar su implantación. Los resultados obtenidos demuestran que la cepa que fue utilizada como inductora de la fermentación (*S. bayanus* cepa T73 C.E.C.T. 1894, seleccionada por el mismo grupo de investigación) alcanza un 40% de la flora levaduriforme presente alrededor del 5º día de fermentación llegando, posteriormente a porcentajes en torno al 70-85 % de la flora levaduriforme total.

En los países más recientes en la producción de vino tales como Estados Unidos, Australia o Sudáfrica, donde no se ha establecido una flora deseable natural, hay una renuncia a confiar en la fermentación espontánea y se inoculan los mostos con levaduras seleccionadas para inducir la fermentación (Kunkee y Goswell, 1977; Lafon-Lafourcade y Ribéreau-Gayon, 1984), eliminando o inhibiendo previamente la flora no deseable por pasterización o mediante la adición de anhídrido sulfuroso. Esto puede ser debido a la escasa tradición vitivinícola desarrollada en estos países, que provoca que no dispongan de una flora levaduriforme autóctona arraigada, ideal para una fermentación espontánea favorable.

Sin embargo, entre los enólogos europeos predomina la idea de que la fermentación inducida por la flora autóctona, conduce a la obtención de vinos de mejor aroma y bouquet (Peynaud y Domerq, 1953, 1955; Peynaud y Ribéreau-Gayon, 1947; Marcus Gomes, 1969; Renaud, 1939, 1940; Rankine, 1968), apoyando la idea de que la posesión de una flora autóctona consolidada a través de una ancestral tradición vitivinícola produce mejores caldos si se permite su actuación espontánea.

2. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD DEL VINO

Son muchos y de muy diversa índole los factores que de una manera u otra condicionan la calidad del producto final. Serán factores influyentes en la calidad de un vino todos aquellos que puedan modificar en alguna medida cualquiera de sus características organolépticas: color, sabor, nitidez, olor y aroma. Por tanto estos factores serán, independientemente de la variedad o de los microorganismos participantes en el proceso, el tipo de suelo, el clima, el estado de madurez en el momento de la vendimia, el cuidado y la limpieza en todas las manipulaciones de

la uva hasta la bodega, así como los materiales que están en contacto con la uva, mosto y vino en la bodega a lo largo de todo el proceso de elaboración.

A parte de todos estos factores la calidad puede variar en función de la actuación del enólogo, que debe llevar a cabo un correcto control del proceso.

Dentro de los factores que afectan a la reproducibilidad de la fermentación y a la composición aromática Houtman *et al.* (1980) incluye la madurez de la uva, el azúcar, la concentración del inóculo, la aireación, la turbidez y el ergosterol. Ramey *et al.* (1986), Marais (1988), Marais y Rapp (1988) estudian factores tales como el tiempo de contacto con la piel de la uva o la temperatura.

3. EL AROMA DEL VINO

3.1 Generalidades sobre la percepción olfativa

Las percepciones olfativas son el resultado de procesos psicofisiológicos muy complejos. Resultan influenciadas por otras percepciones sensoriales, por la temperatura, por estímulos de las terminaciones nerviosas libres de las vías respiratorias y por motivaciones psicológicas diversas, responsables del carácter agradable o desagradable de las percepciones. Para que se produzca la sensación olfativa la molécula odorífera debe alcanzar al receptor olfativo, solubilizándose en la capa mucosa que lo recubre. Se habla de olor cuando las moléculas siguen la vía nasal directa y de aroma cuando las sustancias volátiles llegan al receptor vía retronasal.

No se conoce ninguna explicación simple al modo de actuar de las sustancias odorantes sobre los receptores basándose en los grupos funcionales de las moléculas. En efecto, moléculas de estructuras muy diferentes pueden provocar la percepción de olores prácticamente idénticos.

El umbral de percepción de una sustancia (concentración a partir de la cual se percibe su olor en solución) varía mucho dependiendo de que sustancia se trate y parece que también se ve influenciado por la mezcla con sustancias odoríferas diversas. El olor característico del etanol disimula o enmascara los otros olores y, por ello, vemos como un grado de alcohol elevado puede disminuir considerablemente la intensidad aromática de un vino (Peynaud, 1984). Los umbrales de detección de las sustancias volátiles en vino pueden ser bastante

diferentes de las determinadas en agua (Williams, 1978) y estos umbrales sirven únicamente de orientación de la calidad e intensidad del olor a altas concentraciones (Noble, 1988).

Ya hay identificadas centenares de moléculas volátiles odorosas en numerosos alimentos, aunque sólo en un número limitado de casos se han logrado identificar los constituyentes específicamente responsables del aroma, lo que ha permitido la reconstrucción bastante aproximada del aroma natural a partir de las moléculas de síntesis.

3.2 Componentes del aroma del vino

A pesar de las distintas sensaciones implicadas en la cata de un vino, la gran sensibilidad del receptor olfativo hace que el aroma y el olor desempeñen un papel preponderante en la apreciación de un buen vino. Los estímulos olfativos son moléculas volátiles de bajo peso molecular (siempre inferior a 300). No obstante, existe un límite inferior para su tamaño, ya que cuanto más pequeñas son, menor es su capacidad de fijación a los receptores. Además, para que una molécula pueda ser percibida, debe ser soluble en la capa mucosa que cubre al receptor olfativo, por lo que el grado de solubilidad de las distintas sustancias influirá notablemente en su percepción.

Cordonnier (1971) distingue tres tipos diferentes de aromas:

-Aroma primario, es el aroma aportado por la uva específico de cada variedad, nos recuerda a flores y frutos.

-Aroma secundario, es el aroma procedente de la fermentación y está influenciado por el tipo de levadura que actúa. (Soufleros y Bertrand, 1979).

-Aroma terciario, es el aroma formado en el envejecimiento de los vinos, también llamado "bouquet".

Posteriormente, Cordonnier y Bayone (1981) proponen una clasificación que incluye las variaciones en el aroma debidas a las operaciones prefermentativas, en la que distinguen:

-Aroma varietal, el debido a la variedad de uva de la que se extrae el mosto.

-Aroma prefermentativo, el aroma del vino debido a las manipulaciones que han ocurrido en la vendimia desde la recolección hasta el comienzo de la fermentación. Estas manipulaciones incluyen las agresiones mecánicas que sufren las uvas, la clarificación de los mostos y la adición de SO₂ entre otras. Esta fase corresponde bioquímicamente a un periodo

de actividad enzimática intensa que repercute en las manifestaciones oxidativas y clarificantes, pero que también tiene repercusiones en el aroma.

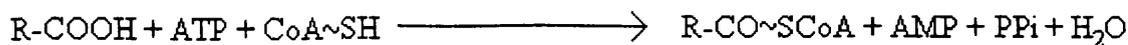
-Aroma fermentativo, el que se debe a los procesos físico-químicos que tienen lugar durante la fermentación con participación activa de las levaduras.

-Aroma post-fermentativo, al aroma que se origina por las transformaciones de óxido-reducción que ocurren durante la conservación y almacenamiento. Además, durante el periodo de envejecimiento pueden incorporarse al vino componentes del recipiente utilizado, como ocurre en el bouquet típico de los barriles de roble americano por aporte de la gamma-lactona del ácido 4-hidroxi-3-metiloctanoico y del antranilato de metilo.

Durante la fermentación se producen gran cantidad de sustancias volátiles debido al gran número de procesos químicos y bioquímicos que en ella tienen lugar. Las levaduras y el proceso fermentativo parecen jugar el papel principal en la producción de compuestos odoríferos. Soumalainen y Nykänen (1966) mostraron que el producto de la fermentación de la levadura en medio sintético contenía un gran número de compuestos volátiles. Varios cientos de estos compuestos se han identificado ya y la lista sigue creciendo actualmente. Estos pertenecen a numerosos grupos de compuestos orgánicos, tal y como se puede apreciar en las tablas 1a y 1b, aunque fundamentalmente el olor y aroma del vino consiste principalmente en alcoholes, ésteres, ácidos grasos y compuestos carbonílicos (Kunkee y Goswell, 1977).

Los ésteres etílicos de alto peso molecular son componentes deseables del aroma de los vinos, a los que proporciona un aroma afrutado. Se han identificado un gran número de componentes (Webb, 1967; Cordonnier, 1971; Schreier y Drawert, 1974; Bertrand, 1975). Por el contrario, el acetato de etilo es un éster cuya presencia es negativa en la apreciación organoléptica de cualquier vino, es responsable de la acescencia. El umbral de percepción es generalmente mayor que las concentraciones que normalmente forman las levaduras. Los ésteres se forman por síntesis intracelular a partir de ácidos grasos y cetoácidos activados por acetil-CoA (Nordstrom, 1964; Lechtonen y Suomalainen, 1977) (Figura 1). La biosíntesis de ésteres depende de la aireación del mosto, la temperatura de fermentación, la técnica de vinificación (Bertrand, 1975), pero también de la fertilización de las viñas y la madurez de las uvas (Houtman *et al.*, 1980).

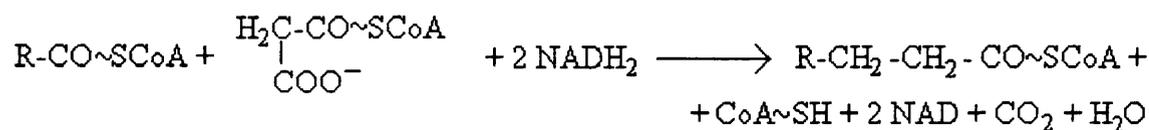
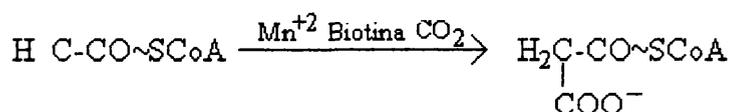
Activación de los ácidos monocarboxílicos:



Descarboxilación oxidativa de los 2-oxo ácidos:



Síntesis a partir de intermediarios de ácidos de larga cadena:



Los ésteres se forman por alcoholisis de los compuestos de acil-CoA:

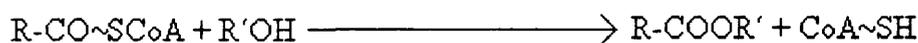


Figura 1. Formación de ésteres de ácidos alifáticos monocarboxílicos

Los alcoholes superiores están presentes en concentraciones del orden de 100 mg/l. Cuantitativamente son los componentes más importantes del aroma del vino, pero se está de acuerdo en que disminuyen la calidad del vino cuando se encuentran presentes en concentraciones elevadas (Wagener y Wagener, 1968; Amerine *et al.*, 1980). El mecanismo de síntesis ha sido objeto de numerosos trabajos entre los que cabe destacar los publicados por Äyräpää (1971), Usseglio Tomasset (1971) y Webb (1973). Los alcoholes superiores se forman a partir de los azúcares y por desaminación y descarboxilación de aminoácidos. Su síntesis se produce durante la fase de crecimiento exponencial de las levaduras (Volbretch y Radler, 1973) y su concentración relativa depende de las fuentes de nitrógeno presentes en el medio, aunque también es función de la especie de levadura e incluso de la cepa (Webb y Kepner, 1961; Webb *et al.*, 1966; Rankine, 1967; Castelli, 1973; Sponholz y Dittrich, 1974; Singh y Kunkee, 1976), del transcurso de la fermentación, pH, temperatura y técnica de vinificación (Bertrand, 1975). Varios autores, tales como Bertrand (1968, 1975), Roset *et al.* (1971), Park (1974), Soufleros y Bertrand (1979) y Ciolfi *et al.* (1985a, 1985b), han demostrado que para algunas levaduras, la producción de alcoholes superiores está directamente relacionada con la producción de etanol. Sin embargo, Zeeman *et al.* (1982),

analizando la producción de varios alcoholes superiores y ésteres por parte de 24 especies de levaduras vínicas encontraron pequeñas diferencias (excepto *Saccharomyces uvarum* que producía más 2-feniletanol que el resto) y no se encontró relación con la producción de etanol. Los ácidos grasos de 4 a 6 átomos de carbono afectan al aroma del vino a pesar de su reducida concentración (Webb, 1967). Los ácidos grasos de 8 y 10 átomos de carbono también participan en el aroma del vino y están presentes en concentraciones relativamente mayores (Drawert *et al.*, 1974). La concentración de estos componentes depende de la especie de levadura (Usseglio Tomasset, 1967). Se segregan durante la fermentación y su síntesis está activada por acetil Co-A y propionil Co-A (Figura 2) (Lehtonen y Suomalainen, 1977). También son de gran importancia en los vinos los compuestos carbonílicos, tío-éteres, en especial el 3-(metiltío)-1-propanol, gamma y delta lactonas, compuestos del nitrógeno y del azufre, terpenos... (Webb y Muller, 1972; Muller *et al.*, 1973; Schreier y Drawert, 1974).

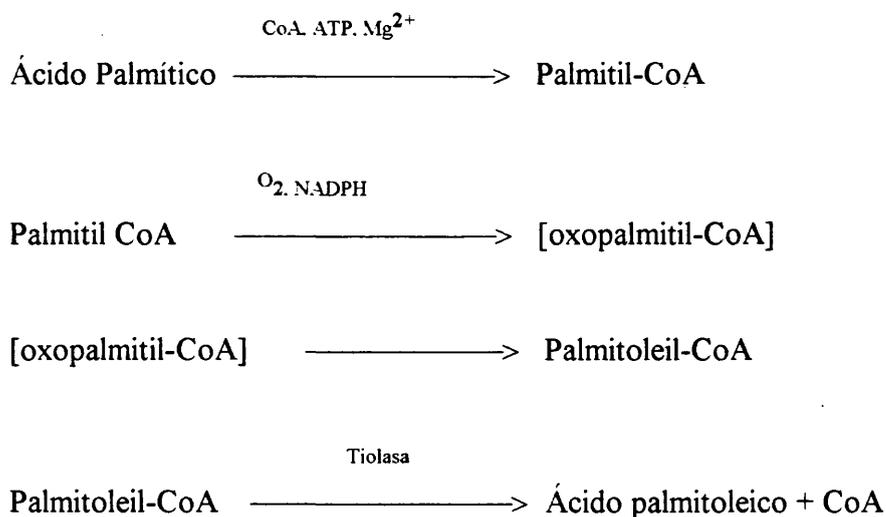


Figura 2. Reacciones de desaturación de ácidos grasos

4. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL

4.1 Análisis sensorial

Se denomina análisis sensorial al examen de las propiedades organolépticas de un producto, realizado con los órganos de los sentidos.

En el momento en que una pequeña porción de vino se contempla, se huele o se introduce en la boca, se desencadenan una serie de efectos que están relacionados entre sí y que dependen de la calidad, intensidad y duración del estímulo, de la modalidad de la sensación producida, de las características de los receptores sensoriales y de la atención y conocimientos básicos del individuo (Cabezudo, 1982). El éxito del análisis sensorial depende de que se logre la mayor proximidad entre la calidad e intensidad del estímulo y la respuesta dada por el individuo a la sensación percibida.

El análisis sensorial presenta inconvenientes debido a la subjetividad de la información que proporciona y a la imposibilidad de cuantificar, por lo que siempre es necesario complementarlo con otras medidas objetivas, bien por vía química o instrumental.

4.2 Análisis por vía química

La mayor parte de los análisis químicos de la fracción volátil, fundamentalmente volumétricos, tan solo aportan una visión global de la misma, o sobre un grupo de compuestos con semejantes propiedades químicas. Aunque esta información puede no estar directamente relacionada con la calidad del aroma, resulta útil si se utiliza adecuadamente para objetivos concretos, como el estudio comparativo del contenido total de sustancias volátiles de distintos vinos o la comparación de los efectos producidos por los diferentes procesos a los que se somete el vino. Entre estos métodos de análisis cabe destacar los de determinación de ésteres totales (método Peynaud), aldehídos (método de Jaulmes y Hamelle), acidez volátil (método de Duclaux-Gayon), grado alcohólico (método Nicloux) y alcoholes superiores (método Guymon-Heitz) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1972).

Frente al análisis sensorial, estos métodos presentan la ventaja de evitar la subjetividad de las evaluaciones organolépticas, y respecto a los métodos cromatográficos la de su mayor rapidez. Su principal inconveniente es que los resultados obtenidos están determinados por los compuestos mayoritarios de las fracciones analizadas, que en muchos casos tienen una repercusión pequeña o nula sobre el aroma del vino.

4.3 Análisis por cromatografía de gases

El estudio individual de los componentes de la fracción aromática de los vinos requiere el empleo de una técnica separativa; la más empleada en la actualidad es la cromatografía gaseosa por ser idónea para la separación de sustancias volátiles presentes en bajas concentraciones y posterior cuantificación, ya que se disponen de detectores muy sensibles. No obstante, la baja concentración de la mayoría de los compuestos volátiles suele requerir una concentración previa a la separación cromatográfica.

De este modo, para realizar el análisis individualizado de la fracción volátil de los vinos, se requieren varias etapas bien definidas:

- a)-Extracción de la fracción volátil del vino.
- b)-Concentración de dicha fracción.
- c)-Separación e identificación de los componentes que la forman.

Las técnicas de extracción más utilizadas son la extracción de componentes volátiles con disolventes orgánicos y concentración del extracto y la extracción por arrastre con una corriente de gas inerte.

La separación de los compuestos se realiza fundamentalmente por cromatografía gaseosa. La identificación suele efectuarse por espectrometría de masas. También resulta de mucha ayuda la identificación por técnicas exclusivamente cromatográficas, como el estudio comparativo de los tiempos de retención en disoluciones patrón y en el extracto analizado o el enriquecimiento de la muestra con patrones.

4.3.1 Principales métodos de extracción de la fracción volátil

4.3.1.1 Inyección directa del vino

Se utiliza para la determinación de compuestos que se encuentran en el vino a una concentración superior de 10 mg/L. El principal inconveniente es la introducción en el cromatógrafo de gases, sustancias poco o nada volátiles que deterioran rápidamente el sistema de inyección, originando "artefactos" en los cromatogramas.

4.3.1.2 Destilación

Se toma un volumen de vino y se destila a presión ambiente en un aparato de destilación de vidrio normalizado, recogiendo el destilado que se obtiene entre 89 y 93 °C, el cual es posteriormente analizado en el cromatógrafo de gases.

Mediante este procedimiento se concentran unas siete veces los componentes que aparecen en la zona media del cromatograma respecto a la inyección directa, excepto en el caso del 1-butanol para el que no se consigue un aumento notable de su concentración en el destilado, sin que se conozcan bien las causas (Gassiot *et al.*, 1982)

4.3.1.3 Desmixtura

Es un método de separación consistente en la formación de dos fases a partir de una mezcla homogénea de agua y un disolvente orgánico por adición de sales minerales. En el vino, la fase orgánica contiene fundamentalmente etanol y compuestos más solubles en éste que en agua (fenoles, alcoholes, ésteres...). La teoría de la desmixtura aplicada a vinos ha sido descrita ampliamente por Singleton (1961), destacando la importancia que juega el pH en el proceso.

Bertrand (1971) coloca 300 cm³ de vino, 37 g de (NH₄)₂SO₄ y 5 g de NaH₂PO₄ en un matraz de fondo redondo de cuello estrecho, se agita 10 minutos y se deja en reposo. Al cabo de dos horas se separa en el cuello del balón una fase orgánica de aproximadamente 1 cm³, que se introduce directamente al cromatógrafo. La abundancia de compuestos fenólicos en la muestra hace necesaria la limpieza frecuente de la cámara de inyección.

Mesias (1981) hace un estudio de la desmixtura con varias sales (NH₄)₂SO₄, Na₂SO₄ · 7H₂O, Na₂CO₃, K₂CO₃ y NaH₂PO₄. De ellas selecciona una mezcla de 20 g de (NH₄)₂SO₄ y 5 g de NaH₂PO₄, por considerar que modifica menos el pH.

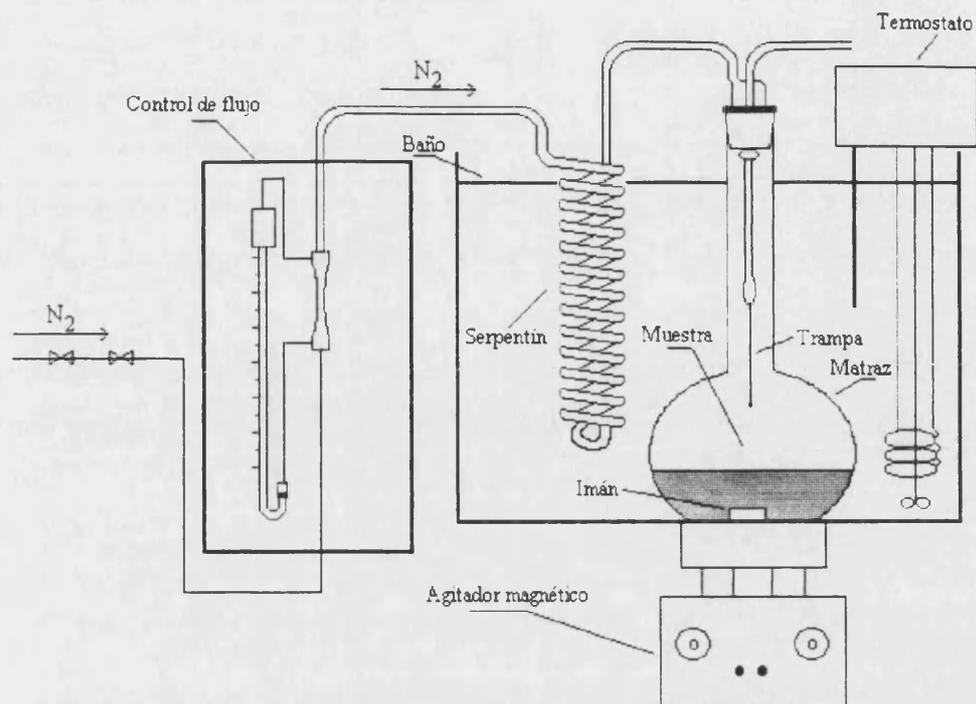
4.3.1.4 Espacio de cabeza

Consiste en analizar únicamente el vapor en equilibrio con el vino objeto del estudio, a una temperatura determinada y controlable. Los componentes de este vapor son arrastrados

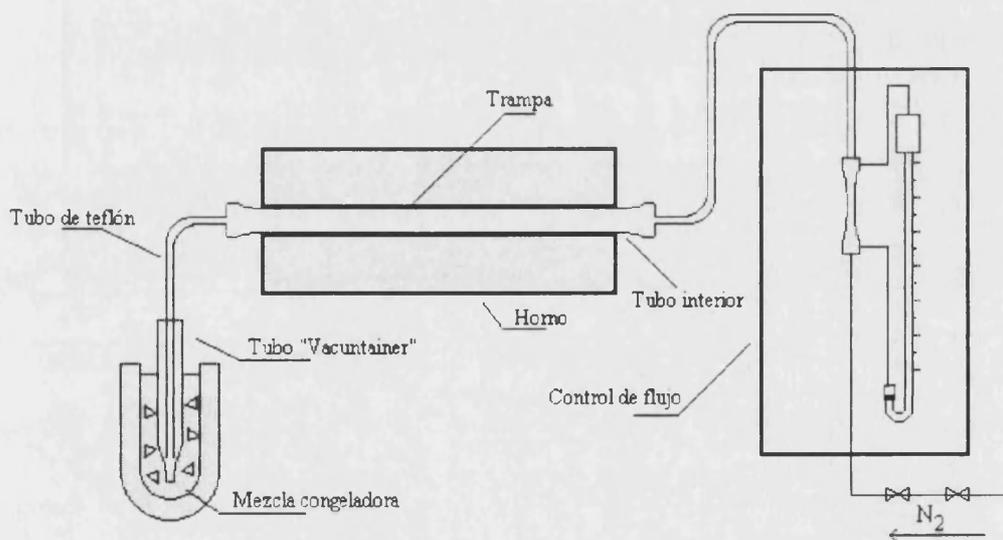
por una corriente de N₂ a la misma temperatura del líquido. Posteriormente las sustancias volátiles son retenidas en trampas de polímero poroso (Porapak Q, Tenax GC,...) que se someten a un proceso de lavado o desarrollo haciendo pasar a su través una corriente de nitrógeno a 250°C de modo que se elimine la mayor parte de agua y etanol retenidas. Por último, se efectúa la desorción de las sustancias volátiles retenidas haciendo pasar N₂ a 150-200 °C durante 30 minutos. Las sustancias desorbidas se pueden fijar mediante un sistema acoplado al inyector del cromatógrafo de gases (Bertuccioli y Montedoro, 1974); otros autores (Ortega *et al.*, 1987) emplean en la desorción un horno independiente, recuperándose los compuestos por condensación a bajas temperaturas, bien directamente (Etievant y Bayonove, 1983) o sobre un solvente apropiado y posterior concentración (Guichard y Ducret, 1984; Craig, 1988). El primer método permite una mejor recuperación, pero presenta el inconveniente de requerir un montaje mucho más complejo y caro.

4.3.1.5 Extracción con gas inerte

La extracción con gas inerte quizás sea el mejor método para el estudio de la fracción volátil de un vino, ya que se consigue reproductibilidad muy elevada. Sin embargo su utilización resulta ser muy compleja y por ello su uso no está muy extendido. La extracción con gas inerte lleva consigo una gran cantidad de etanol y acetato de etilo que enmascara varios picos del cromatograma, puestos en evidencia más fácilmente a partir de una extracción con disolventes. Consiste en arrastrar los restos más volátiles por medio de una corriente de gas inerte, siendo después condensado en trampas frías o retenidos en polímeros porosos del tipo Poropak Q o Tenax GC.



a) Dispositivo de toma de muestras



b) Dispositivo de desorción de muestras

Figura 3. Montaje para extracción del espacio de cabeza

El modo general para operar usando trampas frías lo describe Bertrand (1968), utilizando una corriente de nitrógeno (Figura 4). La extracción concluye en 30 minutos y se

obtienen 0.2-0.5 ml de extracto. Es inútil operar durante más tiempo, dado que se incrementa fuertemente la extracción de agua y alcohol, diluyéndose por tanto la muestra. Se puede operar también sustituyendo las trampas frías por columnas que contengan una determinada cantidad de polímero poroso (Comellas *et al.*, 1988), seguido de un proceso de lavado y desorción, o bien recogiendo los compuestos extraídos sobre un líquido adecuado, seguido de una extracción con disolventes (Craig, 1988).

En general, operando de forma rigurosamente definida el método es más reproducible y permite la cuantificación. Además permite una correcta separación de los componentes más volátiles ya que no se enmascaran por el frente del eluyente.

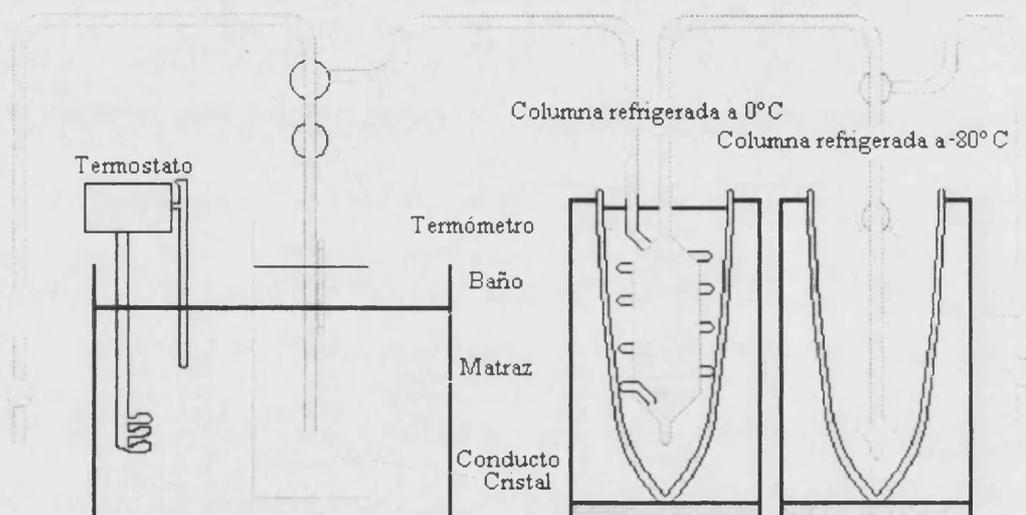


Figura 4. Montaje para extracción con gas inerte

4.3.1.6 Extracción con disolventes

Ha resultado ser el método más usado para concentrar y purificar los componentes volátiles de los vinos, ya que permite una gran concentración del aroma después de la evaporación del disolvente, cuyo punto de ebullición ha de ser lo más bajo posible. Por otra parte se puede operar sobre grandes volúmenes y tener así un extracto importante, permitiendo los trabajos analíticos de identificación. Para que el método sea reproducible hay que trabajar en condiciones rigurosamente controladas. También pueden haber problemas con las posibles

impurezas que pueda tener el disolvente, por lo que habrá que usarlo lo más puro posible y aún así tener en cuenta su posible efecto.

Con todo, la posibilidad de concentración permite poner en evidencia un gran número de sustancias presentes en forma de trazas. Existen varios procedimientos de extracción:

a) Extracción discontinua

Consiste en realizar lavados sucesivos de la muestra con disolvente orgánico inmisible y de bajo punto de ebullición. La mayor parte de los compuestos volátiles quedan en la fase orgánica debido a su diferente solubilidad. Para llevarla a cabo se emplean embudos de decantación, se reúnen las sucesivas fracciones y se concentra la muestra por evaporación del disolvente. La extracción es incompleta, observándose un empobrecimiento del número de picos criptográficos con respecto a una extracción en continuo.

b) Extracción continua

La extracción se realiza en un aparato tipo Kutacher-Stendel (figura 9), modificado según la densidad de los disolventes. El funcionamiento es similar al anterior. Consiste en hacer burbujear continuamente a través del vino el compuesto o mezcla utilizados como disolvente, recogiendo el extracto en un matraz conectado en paralelo. Por último es necesario evaporar el exceso de disolvente para concentrar el extracto. El tiempo de extracción varía dependiendo del disolvente o mezcla de disolventes empleados. El fundamento del método se estudia más detenidamente en el apartado (II. 6).

Recientemente se ha empleado un sofisticado montaje de extractor con disolventes basado en bajas temperaturas, un potente vacío y un aparato de concentración de dos etapas, capaz de hacer detectables compuestos que normalmente se describirían como trazas, del orden de ppb (Boison y Tomlinson, 1990).

4.3.2 *Sistemas de detección*

El cromatógrafo de gases posee un sistema continuo de detección por el que pasa el gas portador con los solutos separados procedentes de la columna. Su misión es poner de

manifiesto el paso de los solutos originando una señal eléctrica que, debidamente amplificada, es registrada o enviada a un microprocesador. El fundamento del detector es medir de forma continua una propiedad física o química del gas que circula a su través. Dependiendo del tipo de detector la propiedad registrada puede ser proporcional a la concentración absoluta del soluto o a su velocidad de flujo. Realiza dos funciones primordiales:

a) Indicar el momento exacto en que pasa el soluto (o su máxima concentración)), definiendo los tiempos de retención para el análisis cualitativo.

b) Originar una señal proporcional a la cantidad de soluto que pasa a su través, para fines cuantitativos.

Un detector ideal debe poseer una serie de características que determinan su aplicabilidad como son originar una señal estable, poseer una sensibilidad lo más elevada posible y un ruido de fondo lo más bajo posible.

4.3.2.1 Detector de conductividad térmica (TCD)

Este detector también es conocido como catarómetro (Figura 5). Responde a la concentración del soluto sin destruir la muestra en la detección. Se basa en el hecho de que un cuerpo caliente pierde calor a una velocidad que depende de la composición del medio gaseoso que lo rodea. Por tanto, la velocidad de pérdida de calor puede usarse para medir la composición del gas y por tanto se caracterizará por ser un detector de tipo diferencial, es decir, no mide una propiedad intrínseca del soluto que no posee el gas portador sino las diferencias entre una propiedad común a ambos. Su mayor desventaja es su baja sensibilidad, aunque existen métodos para mejorarla.

4.3.2.2 Detector de captura electrónica (ECD)

Este tipo de detector si que realiza medidas absolutas (mide una propiedad del soluto que no posee el gas portador), es muy selectivo, no destruye la muestra, y responde a la concentración. Es un detector de ionización que mide el descenso de la corriente producido entre dos electrodos entre los que sitúa una chapa de material radioactivo (^{63}Ni , ^3H) (Figura 6). Esta capa emite partículas que ionizan el gas originando un flujo de electrones lentos que

producen una corriente pequeña (10^{-8} A) y constante que es debidamente amplificada. Cuando a través del detector pasa un soluto cuyas moléculas pueden captar electrones, se produce un descenso de la corriente que se amplifica y registra convenientemente, dando un pico positivo en el cromatograma.

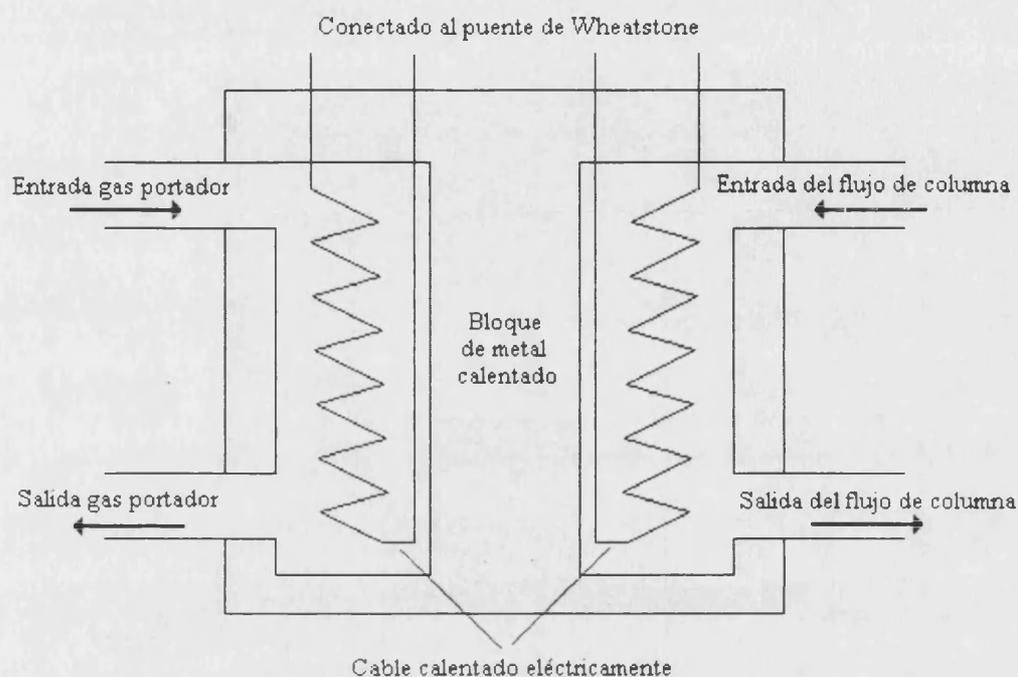


Figura 5. Detector de conductividad térmica o catarómetro

El ECD es insensible a hidrocarburos, alcoholes y cetonas. Es muy sensible para determinadas moléculas como carbonilos conjugados, nitrilos, compuestos aromáticos nitrados y compuestos organometálicos, responde a moléculas con átomos o grupos electronegativos, que tienen facilidad para captar electrones y es especialmente apto para captar compuestos orgánicos halogenados, por lo que es el mejor detector para el análisis de pesticidas, permitiendo alcanzar determinaciones del orden del picogramo. Su rango de linealidad es pequeño (se satura fácilmente), se destruye con el agua, por lo que las muestras deben estar totalmente secas.

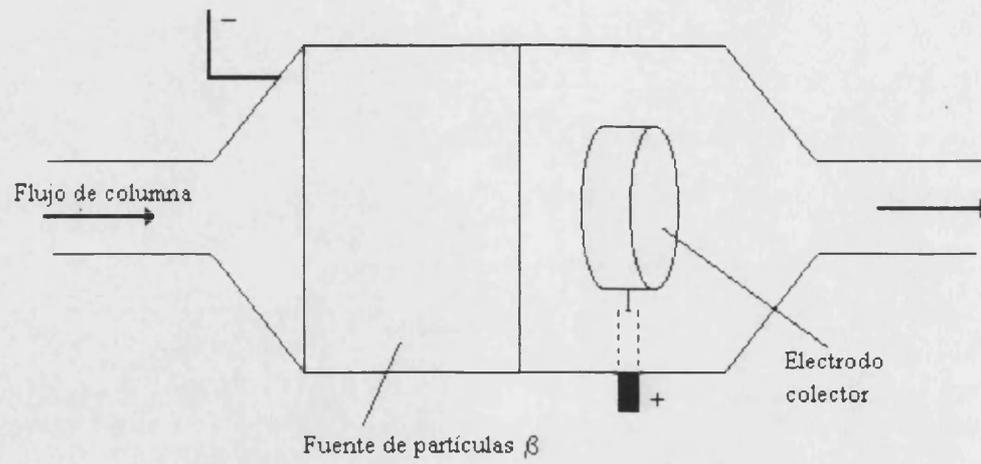


Figura 6. Detector de captura electrónica

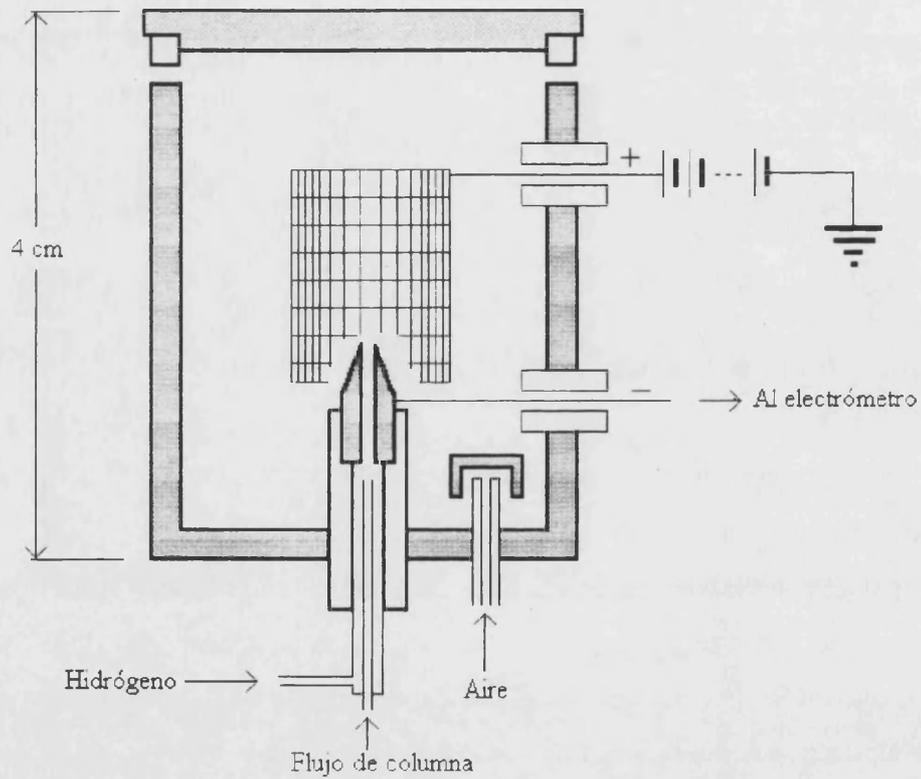


Figura 7. Detector de ionización de llama

4.3.2.3 Detector de ionización de llama (F.I.D.)

Al igual que el ECD realiza medidas absolutas pero es destructivo (destruye la muestra durante la detección) y de tipo universal, aunque en algunos casos puede hacerse selectivo, y responde a la velocidad de flujo del soluto. Está basado en la relación directa que existe entre la concentración de un gas y la concentración de partículas cargadas (iones positivos, negativos y electrones) existentes en el mismo. Se utiliza una llama de hidrógeno como fuente de ionización de las moléculas orgánicas que fluyen a su través.

En la figura 7 se muestra el detector, el cual dispone de un sistema de electrodos, situado el negativo en la base de la llama y el positivo, en forma de cilindro, alrededor de la misma, cargado con +300V. La corriente gaseosa que sale de la columna se mezcla con una corriente de hidrógeno que entra en el detector donde se produce la combustión. Para soportar la llama se introduce aire por la base del detector. Durante la combustión producida al llegar el compuesto orgánico a la llama, se forman partículas cargadas, lo que origina un flujo de corriente y disminuye la resistencia entre los electrodos. Esta corriente es débil ya que la resistencia de la llama es elevada (10^{12} ohmios) por lo que debe ser amplificada y posteriormente registrada. La magnitud de esta corriente es proporcional al número de especies cargadas que dependen de la naturaleza y velocidad del soluto, y por tanto directamente relacionado con la concentración del mismo. El FID responde sólo a sustancias que pueden ionizarse en una llama de aire e hidrógeno y no lo hace para la mayoría de compuestos inorgánicos incluyendo el N_2 , O_2 , CO_2 y agua. Así, aunque el FID es 1000 veces más sensible que el TCD, no puede usarse para detectar todo tipo de compuestos (Braun, 1987).

4.3.3 Cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) como sistema de identificación.

Actualmente, el uso de la espectrometría de masas acoplada a la cromatografía de gases es el método más aceptado para la identificación de los solutos separados cromatográficamente.

INTRODUCCIÓN

Un espectrómetro de masas es un instrumento algo complejo y sofisticado que sirve para caracterizar moléculas no cargadas fundamentalmente cuyo esquema se ofrece en la figura 8. La característica analítica principal de la espectrometría de masas es que la mayor parte de las moléculas neutras tienen un espectro de masas típico y diferente, lo que lo convierte en un arma poderosa para el análisis cualitativo y estructural.

En líneas generales, la muestra es vaporizada si es preciso o ionizada mediante diversos procedimientos, tales como impacto electrónico, ionización química, ionización a presión atmosférica etc. Esta ionización es seguida de una serie de reacciones de fragmentación y descomposición competitiva espontánea que produce iones adicionales. Los iones positivos y negativos son separados en el vacío de acuerdo con su relación masa/carga (m/z) en un campo electromagnético o eléctrico. Posteriormente estos iones son detectados y sometidos a un tratamiento de datos para ofrecer un espectro de masas que, en realidad, es un histograma de abundancia relativa de los diferentes iones producidos, clasificados según su relación m/z . Potentes sistemas informáticos, con amplia memoria, comparan estos espectros con los introducidos previamente (de 5000 a 30000) y se ofrece la identificación del compuesto con una determinada probabilidad.

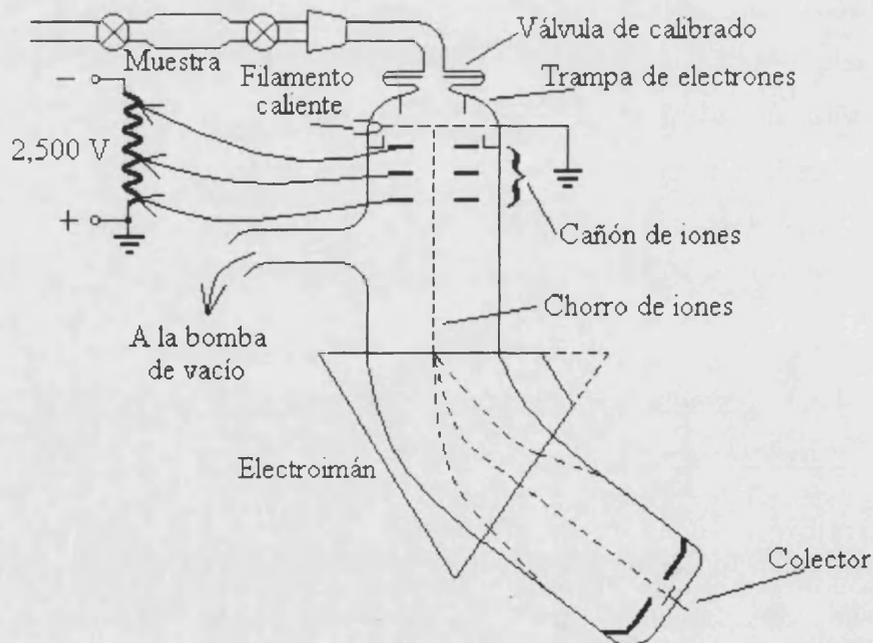


Figura 8. Esquema de un espectrómetro de masas

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MOSTOS UTILIZADOS Y TRATAMIENTOS PREVIOS

Los mostos utilizados provienen de uvas de las variedades *Monastrell* y *Bobal*. El mosto de la variedad *Monastrell* pertenecía a la campaña 1993 y fue utilizado para la realización de la experiencia OA27. Su contenido inicial de azúcar era de 282 g/l y la población levaduriforme $5 \cdot 10^5$ ufc/ml. El mosto de la variedad *Bobal*, pertenecía a la campaña 1994 y se empleó en la realización de la experiencia OA16. Su contenido inicial de azúcar fue de 198 g/l y su población levaduriforme $1 \cdot 10^5$ ufc/ml. Los mostos fueron mantenidos en frío a -5°C hasta el comienzo de las experiencias sin realizar con ellos ningún tratamiento previo a parte de los debidos a las variables ensayadas. Las fermentaciones se llevaron a cabo en recipientes estériles de 2 l de capacidad y 1.5 l de mosto y permitiendo el intercambio gaseoso con el ambiente.

2. CEPAS MICROBIANAS EMPLEADAS

- *Saccharomyces cerevisiae* cepa T73. Cepa seleccionada a partir de mosto de la variedad *Monastrell* (Querol *et al.*, 1991). Actualmente comercializada por LALVIN[®] Lallemand Inc. Montreal H1W 2N8, Canadá.

Kloeckera apiculata, cepa vínica cedida por la Colección Española de Cultivos Tipo con el número 1120.

Leuconostoc oenos cepa M42. Cepa vínica seleccionada por su capacidad de crecer en vino y realizar la fermentación maloláctica.

3. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Agar Extracto de Malta al 2%

-Extracto de malta	20 g
-Glucosa	20 g
-Peptona micológica	1 g
-Agar	20 g
-Agua destilada	1000 ml

Se ajusta el pH a 6.8 y se esteriliza a 121°C durante 20 minutos.

Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD)

-Extracto de levadura	10 g
-Peptona micológica	20 g
-Glucosa	20 g
-Agua destilada	1000 ml

Se ajusta el pH a 6.8 y se esteriliza a 115 °C durante 30 minutos.

MLO (Medio para Leuconostoc oenos) (Batterman y Radler, 1991)

-Tryptona	10 g
-Extracto de levadura	5 g
-Fructosa	5 g
-Glucosa	10 g
-Citrato diamónico	3.5 g
-Clorhidrato de cisteína	0.5 g
-Tween 80	1 ml
-MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
-MnSO ₄ ·H ₂ O	0.05 g
-Zumo de tomate	100 ml

Se ajusta el pH a 4.8 con HCl 10N y se esteriliza a 121°C durante 20 minutos

Reactivos

Se empleó un preparado comercial de enzimas pectolíticos denominado Biopectinasa (Biocon Española S.A). vitaminas B1 y C (Fluka), fosfato diamónico (Panreac) y Metabisulfito potásico (Panreac).

4. DISEÑO DE LAS EXPERIENCIAS

Las experiencias realizadas consistieron en diseños factoriales equilibrados no completos. Estos diseños están basados en las matrices ortogonales propuestas por el Dr. G. Taguchi (Ross, P.J., 1988). La filosofía de estos diseños consiste en estudiar el efecto de determinadas variables sobre algunas de las características del sistema con el fin de obtener respuestas acerca de la variabilidad que ocasionan sobre esas características. El hecho de que sean equilibrados u ortogonales implica que el efecto principal de una variable no tiene influencia sobre el resto de variables, pudiéndose estudiar, con un número reducido de ensayos, los efectos principales de las variables o los efectos de sus interacciones dobles, dependiendo de la construcción del diseño. Los diseños aquí empleados no son completos puesto que no se ensayan el número total de combinaciones posibles para las variables y sus niveles de actuación. Este es precisamente uno de los atractivos de la técnica estadística ya que se obtiene la información que se necesita con un número significativamente reducido de pruebas y los resultados se pueden analizar sin necesidad de aplicar técnicas avanzadas de estadística.

El proceso de construcción de los diseños factoriales tuvo los siguientes pasos:

1. Selección de los factores y/o las interacciones que iban a ser evaluadas.

Se realizó un estudio bibliográfico y una puesta en común con enólogos para escoger las variables más apropiadas a ser estudiadas así como escoger el número de niveles de las mismas y sus valores.

2. Selección de la matriz ortogonal (OA) apropiada.

En función del número de variables y el número de niveles, se escogieron las matrices apropiadas con suficientes grados de libertad para poder evaluar todos los efectos de interés seleccionados previamente.

De este modo se construyeron dos diseños factoriales equilibrados que se explican a continuación.

Tabla 1. Diseño factorial de las 27 microvinificaciones realizadas

Trial no.	GLasa	Vit. C	DAP	Inóculo T73	Tiamina	<i>K. apiculata</i>	Agitación	Sulfuroso	Oxígeno	Temperatura
1	0	0	0	0	0	0	Sin	0	0	15
2	0	0	0	0	0.6	5E+04	Sin	50	20	25
3	0	0	0	0	2	1E+06	Con	100	40	32
4	0	50	150	1E+06	0	5E+04	Sin	100	40	32
5	0	50	150	1E+06	0.6	1E+06	Con	0	0	15
6	0	50	150	1E+06	2	0	Sin	50	20	25
7	0	100	300	1E+07	0	1E+06	Con	50	20	25
8	0	100	300	1E+07	0.6	0	Sin	100	40	32
9	0	100	300	1E+07	2	5E+04	Sin	0	0	15
10	20	0	150	1E+07	0	0	Con	0	20	32
11	20	0	150	1E+07	0.6	5E+04	Sin	50	40	15
12	20	0	150	1E+07	2	1E+06	Sin	100	0	25
13	20	50	300	0	0	5E+04	Sin	100	0	25
14	20	50	300	0	0.6	1E+06	Sin	0	20	32
15	20	50	300	0	2	0	Con	50	40	15
16	20	100	0	1E+06	0	1E+06	Sin	50	40	15
17	20	100	0	1E+06	0.6	0	Con	100	0	25
18	20	100	0	1E+06	2	5E+04	Sin	0	20	32
19	50	0	300	1E+06	0	0	Sin	0	40	25
20	50	0	300	1E+06	0.6	5E+04	Con	50	0	32
21	50	0	300	1E+06	2	1E+06	Sin	100	20	15
22	50	50	0	1E+07	0	5E+04	Con	100	20	15
23	50	50	0	1E+07	0.6	1E+06	Sin	0	40	25
24	50	50	0	1E+07	2	0	Sin	50	0	32
25	50	100	150	0	0	1E+06	Sin	50	0	32
26	50	100	150	0	0.6	0	Sin	100	20	15
27	50	100	150	0	2	5E+04	Con	0	40	25

Todas las sustancias en mg l. GLasa, β -glucosidasa; D.A.P., fosfato diamónico; Inóculo T73 y *K. apiculata* en células/ml; Temperatura en grados Celsius.

4.1. Experiencia OA27

La matriz de la experiencia OA27 se muestra en la tabla 1. Dicha experiencia consistió en el estudio de 10 variables, 9 de ellas a tres niveles de actuación y 1 a dos niveles. Las variables y sus niveles de actuación se detallan en la tabla 2. Debido al número de variables tan sólo es posible estudiar, mediante esta experiencia, los efectos principales de las variables estudiadas y no sus interacciones dobles. El objetivo de esta experiencia era conjugar múltiples variables enológicas, además de las inoculaciones con levadura seleccionada y con levadura de bajo poder fermentativo. Así podríamos tener una idea de que variables tienen un mayor peso sobre los diferentes parámetros medidos durante el proceso de vinificación y a partir de los vinos obtenidos.

Tabla 2. Variables ensayadas y sus niveles de actuación en la experiencia OA27

Variables	Niveles		
	1	2	3
1 Enzimas pectolíticos	0	20	50
2 Vit. C	0	50	100
3 D.A.P.	0	150	300
4 Inóculo T73	0	10^6	10^7
5 Tiamina (Vit. B1)	0	0.6	2
6 Inóculo <i>K. ap.</i>	0	$5 \cdot 10^4$	10^6
7 Agitación	Sin	Con	Con
8 SO ₂	0	50	100
9 Oxígeno	2.25	20	40
10 Temperatura	15 °C	25 °C	32 °C

*Vit. C = vitamina C; D.A.P = fosfato diamónico; Inóculo T73 e Inóculo K. ap. = concentración del inóculo de la cepa seleccionada T73 y de *Kloeckera apiculata* respectivamente, en células/ml; Las concentraciones se expresan en mg/l.*

4.2. Experiencia OA16

La matriz de la experiencia OA16 se muestra en la tabla 3. En esta experiencia se estudiaron 5 variables a dos niveles de actuación, como se detalla en la tabla 4. Dada la

asignación de las variables a las columnas de la matriz ortogonal, en esta experiencia es posible analizar, además de los efectos principales de las variables, los efectos de sus interacciones dobles.

Puesto que las variables inoculación con *L. oenos* y pH, fueron introducidas al final de la fermentación alcohólica (día 9), los datos que se obtuvieron hasta entonces sólo dependerán de las otras tres variables, quedando por lo tanto como una experiencia de ocho microvinificaciones distintas por duplicado. Así, la matriz OA16, quedará transformada en una matriz OA8 tal y como refleja la tabla 5. Por tanto, en función de que datos se estén analizando, se utilizará una u otra matriz.

Tabla 3. Diseño factorial de las 16 microvinificaciones realizadas en la experiencia OA16

	1	2	4	8	15
	T73	<i>K. apic</i>	<i>L. oenos</i>	SO ₂	pH
1	0	0	0	0	3,2
2	0	0	0	50	3,5
3	0	0	10 ⁹	0	3,5
4	0	0	10 ⁹	50	3,2
5	0	10 ⁶	0	0	3,5
6	0	10 ⁶	0	50	3,2
7	0	10 ⁶	10 ⁹	0	3,2
8	0	10 ⁶	10 ⁹	50	3,5
9	10 ⁶	0	0	0	3,5
10	10 ⁶	0	0	50	3,2
11	10 ⁶	0	10 ⁹	0	3,2
12	10 ⁶	0	10 ⁹	50	3,5
13	10 ⁶	10 ⁶	0	0	3,2
14	10 ⁶	10 ⁶	0	50	3,5
15	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁹	0	3,5
16	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁹	50	3,2

T73, K. ap., y L. oenos = Concentración de los inóculos con la cepa T73 de *Saccharomyces cerevisiae*, *K. apiculata* y *Leuconostoc oenos* respectivamente en cels/ml. SO₂ en mg/l

El objetivo de esta experiencia fue profundizar en la influencia de las variables puramente microbiológicas, como son las inoculaciones con las mismas cepas de levadura que en la experiencia OA27 e incluir la inoculación de una bacteria láctica para la realización de la fermentación maloláctica, junto con dos factores que intervienen en su desarrollo, el nivel de sulfuroso y el pH del vino.

Tabla 4. Variables ensayadas y sus niveles de actuación en la experiencia OA16

Variables	Niveles	
	1	2
T73	0	10^6
<i>K. apic</i>	0	10^6
<i>L. oenos</i>	0	10^9
Sulfuroso	0	50
pH	3,2	3,5

T73, *K. ap.*, y *L. oenos* = Concentración de los inóculos con la cepa T73 de *Saccharomyces cerevisiae*, *K. apiculata* y *Leuconostoc oenos* respectivamente en cels/ml. SO_2 en mg/l

Tabla 5. Diseño factorial OA8 resultante de el OA16 antes de la inclusión de las variables inoculación con *L. oenos* y modificación del pH.

	1	2	8
	T73	<i>K. apic</i>	SO_2
A	0	0	0
B	0	0	50
C	0	10^6	0
D	0	10^6	50
E	10^6	0	0
F	10^6	0	50
G	10^6	10^6	0
H	10^6	10^6	50

T73, y *K. ap.* = Concentración de los inóculos con la cepa T73 de *Saccharomyces cerevisiae* y, *K. apiculata* respectivamente en cels/ml. SO_2 en mg/l

5. INOCULACIONES Y RECIENTOS

Para realizar las inoculaciones de las levaduras, estas fueron inoculadas previamente en YEPD y crecidas en agitación a 28°C durante 24h. Para ajustar el volumen de inóculo se realizaron recuentos con la cámara de Thoma. El volumen de inóculo determinado se centrifugó a 10.000 rpm 10 min y el pellet fue resuspendido en el mosto a inocular.

Las inoculaciones con la cepa M42 de *Leuconostoc oenos* se realizaron creciendo previamente las células en MLO y transfiriéndolas después a vino para su aclimatación antes de la inoculación en los vinos.

Los recuentos de levaduras viables se realizaron por siembra en superficie de diluciones decimales sucesivas en el medio Agar Extracto de Malta. Las placas se incubaron durante una semana a 28°C y todos los recuentos se hicieron por duplicado.

6. EXTRACCIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES

La extracción se realizó por un procedimiento análogo al descrito por Rapp *et al.* (1976) y por Usseglio-Tomasset y Di Stefano (1980), y puesto a punto por Mateo *et al.* (1990) utilizando un extractor líquido-líquido continuo (Afora ref. 5156) representado en la figura 9 y formado por:

Matraz de fondo plano 1000 ml (Ref. 41)

Embudo interior terminal perforado (Ref. 5156/3)

Refrigerante Dean-Stark (Ref. 1649)

Cuerpo extractor 500 ml (Ref 5156/2)

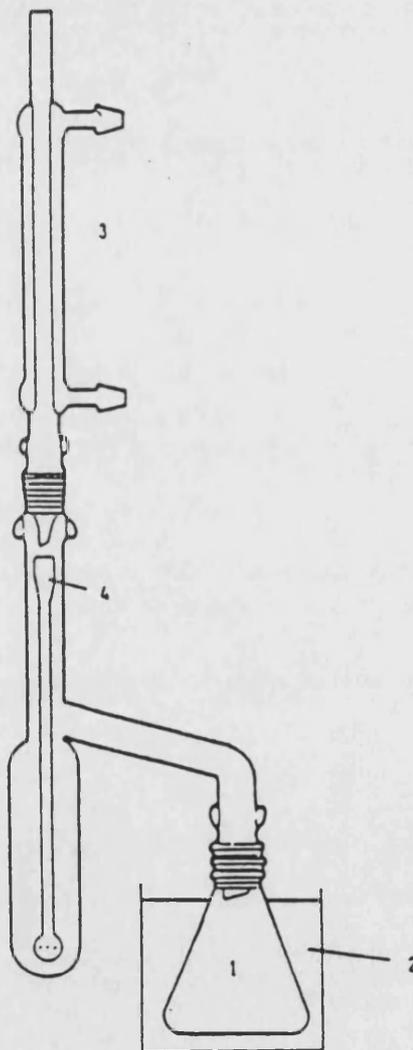


Figura 9. Extractor líquido-líquido continuo para disolventes más ligeros que el vino

Como mezcla extractora se empleó diclorometano y pentano en la relación volumétrica 2:3. A las muestras se les añadió NaCl (8%) para facilitar la extracción de las sustancias volátiles (Lamikaura, 1987). La mezcla extractora se hace destilar en el matraz (1) por calentamiento en baño de agua a 50°C (2), los vapores se condensan en el refrigerante (3) y el líquido cae por la varilla embudo interior (4), la cual posee un ensanchamiento inferior con perforaciones por las cuales burbujea el disolvente en el seno del vino. Estas burbujas de mezcla extractora ascienden por ser menos densas que el líquido y vuelven a caer al matraz completándose en ciclo de extracción. La extracción se prolonga durante 24 horas.

El extracto obtenido se deseca con Na₂(SO₄) anhidro, se filtra y se concentra por evaporación con ayuda de una columna Vigreux hasta un volumen final de 1 ml, guardándose el tubo herméticamente cerrado a -20°C hasta el momento del análisis cromatográfico

7. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS

7.1 Cromatografía de Gases (GLC)

Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Series II equipado con un detector de ionización de llama (FID). Como gas portador se utilizó Helio con una pureza del 99,998%. Para el detector se usó Hidrógeno y aire sintético de la misma pureza. La señal cromatográfica se registró e integró mediante el equipo HP Vectra QS/16S asistido por el programa HP 3365 Chemstation.

La columna utilizada fue una HP20M (Carbowax 20M) de 50 m de longitud, 0.2 mm de diámetro interno, 0.2 µm de espesor de fase. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

-Temperatura inicial	60°C
-Tiempo isoterma inicial	5 min
-Gradiente de temperatura	2.5 °C/min
-Temperatura final	190°C
-Tiempo isoterma final	22 min
-Discriminación de flujo	1:50
-Presión en cabeza de columna	20 psi

-Flujo gas portador	0.5 ml/min
-Flujo de aire	400 ml/min
-Flujo de Hidrógeno	30 ml/min
-Temperatura inyector y detector	250 °C
-Flujo gas auxiliar (He)	30 ml/min

Se inyectaron manualmente volúmenes de 0.5 µl.

7.2 Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (GC-MS)

El espectrómetro de masas utilizados fue el modelo Trio 1000 de Fisons Instruments, con un cromatógrafo de gases Fisons Instruments modelo... GC 8000 Series. Los datos fueron registrados y analizados mediante el programa Lab-Base™.

Las condiciones cromatográficas para los análisis de espectrometría de masas fueron las mismas del apartado anterior exceptuando la presión en cabeza de columna (8 psi) y el tiempo de isoterma final (28 min). El tiempo de retraso para el disolvente fue de 9 min. El rango de masas empleado estuvo entre 30 y 300, con un 0.7 s de tiempo de *scan* y 0.1 s de tiempo de *interscan*. La energía de los electrones fue de 70 eV.

7.3. Identificación de los compuestos volátiles

Para la identificación de los componentes de la fracción volátil se utilizaron dos métodos. El primero basado en la comparación con los tiempos de retención relativos con los de patrones conocidos, usándose para ello el 2-nonanol. Por otro lado, se comprobaron todas las identificaciones mediante espectrometría de masas (GC-MS) y comparación con los espectros de las librerías NBS o Willey o por comparación con los espectros obtenidos para los patrones puros.

7.4. Cuantificación de los compuestos volátiles

La cuantificación de los componentes de la fracción volátil se realizó por el método del patrón interno. Para ello se construyeron disoluciones patrón para imitar las condiciones del vino con la siguiente composición:

-Glicerol	4 g
-Ácido tartárico	2.5 g
-Etanol	12 % v/v
-2-nonanol (patrón interno)	0.820 g
-Agua destilada	500 ml

A este medio base se le añadieron las concentraciones adecuadas de todos los patrones a cuantificar en los rangos esperados según la bibliografía. Mediante estas disoluciones patrón se calcularon los factores de respuesta según la expresión:

$$Fr_i = (C_i / A_i) / (C_{p_i} / A_{p_i})$$

Fr_i = Factor de respuesta cromatográfico del componente i; C_i = Concentración del componente i; C_{p_i} = Concentración del patrón interno; A_i = Área cromatográfica del componente i; A_{p_i} = Área cromatográfica del patrón interno

A partir de los cromatogramas de las disoluciones patrón se realiza la representación de A_i/A_{p_i} frente a C_i/C_{p_i}, obteniéndose rectas cuyas pendientes corresponden a los factores de respuesta cromatográficos de los distintos componentes. Conocidos estos factores de respuesta respecto al 2-nonanol, las concentraciones de cada componente en las muestras problema se calculan mediante la expresión:

$$C_i = (Fr_i \cdot C_{p_i} \cdot A_i) / A_{p_i}$$

Al no disponer patrones puros o de todos los componentes que fueron identificados, no todos fueron cuantificados. Para aquellos que no pudieron ser cuantificados, se le calculó su área normalizada (A_i / A_{p_i}) y esta relación se expresó en tanto por ciento respecto a la muestra #1 de los diseños factoriales realizados a fin de darle un mayor sentido a los valores obtenidos.

7.5. Cromatografía líquida (HPLC)

Para los compuestos identificados por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se utilizó un cromatógrafo Merck-Hitachi siguiendo el procedimiento descrito por Frayne (Frayne, 1986) con algunas modificaciones. Se utilizó la precolumna catión H^+ (Merck) y dos columnas AminexTM HPX-87H conectadas en serie. Las columnas se mantuvieron a 60 °C. La fase móvil fue H_3PO_4 0.05% en agua destilada y purificada por un sistema Milli-Q (Millipore). La velocidad de flujo empleada fue de 0.7 ml/min. Para la detección de las sustancias eluidas se emplearon los detectores de ultravioleta a 210 nm y de índice de refracción conectados en serie. El análisis de los cromatogramas se efectuó basándose en un patrón externo y la estimación de las concentraciones se efectuó a partir de la altura de los picos cromatográficos. La identificación se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención con los de los patrones.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los efectos de las variables sobre los distintos datos analizados se evaluaron mediante análisis de la varianza para varias variables (ANOVA) y la significación estadística se evaluó mediante el test F de Snedecor. La significación estadística para la comparación viene dada por el valor de p , que nos indica la probabilidad de rechazar la hipótesis nula, o en otras palabras, la probabilidad de errar la afirmación de que los distintos niveles de la variable sean significativamente diferentes. Las influencias de las variables se consideraron significativas a partir de $p < 0.05$. Para comparar las medias de los distintos niveles se calcularon los intervalos LSD (Least Significance Difference), considerando dos medias significativamente distintas cuando dichos intervalos no solapan. Los análisis de la varianza fueron realizados mediante el programa Statgraphics v. 4.2. Los intervalos LSD fueron calculados y representados con el programa Microsoft Excel v. 5.0.

El análisis cromatográfico se realizó por triplicado, calculando los coeficientes de variación para las medias de los tres análisis. El coeficiente de variación se calculó mediante la expresión:

$$CV = (\text{Desviación típica} / \text{Media}) * 100$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- EVOLUCIÓN DE LAS POBLACIONES LEVADURIFORMES

1.1 Experiencia OA27

Tal y como se detalla en la tabla 1, la experiencia OA27 consistió en la realización de 27 microvinificaciones en las que se evaluaba el efecto de 10 variables, estudiándose 9 de ellas a tres niveles de actuación y una a dos niveles (tabla 2).

En la figura 10 se muestra la evolución de las poblaciones levaduriformes en cada una de las 27 experiencias. Se puede observar una gran variabilidad de comportamientos en los crecimientos globales de levaduras en las vinificaciones. Para los análisis estadísticos, los número de viables se expresaron en millones de ufc/ml, realizándose el análisis a partir de los datos obtenidos en los días 1, 2, 3, 4, 6, , 9, 16 y 23 a partir de la inoculación inicial del mosto (día 0). La adición de enzimas pectolíticos, vitamina C, fosfato diamónico y tiamina tuvo una influencia prácticamente nula en la evolución de las poblaciones a lo largo de todo el proceso fermentativo, por lo que dichas variables no se analizan en los apartados siguientes.

1.1.1 Influencia de las inoculaciones con la cepa seleccionada T73 y *Kloeckera apiculata*

Tal y como era de esperar, en los primeros días de la fermentación (días 1, 2, 3, 4 y 6) se encontraron medias de viables significativamente más elevadas en las fermentaciones que habían sido inoculadas con T73. Los intervalos LSD para las medias en estos días se muestran en la figura 11. En las experiencias inoculadas con *K. apiculata* también se observó un efecto similar, es decir, se encontraron medias mas elevadas especialmente en las vinificaciones que fueron inoculadas con el nivel mas alto (10^6 cels/ml), aunque estas diferencias nunca fueron estadísticamente significativas. En la tabla 6 se muestran las medias de levaduras viables de las experiencias agrupadas según el nivel de inoculación con *K. apiculata*, durante la primera semana de fermentación.

En los días de fermentación 9 y 16, no se detectaron diferencias apreciables entre las fermentaciones inoculadas y no inoculadas con las levaduras. Sin embargo, al final de la fermentación (día 23), se observaron claras diferencias entre las experiencias inoculadas y las

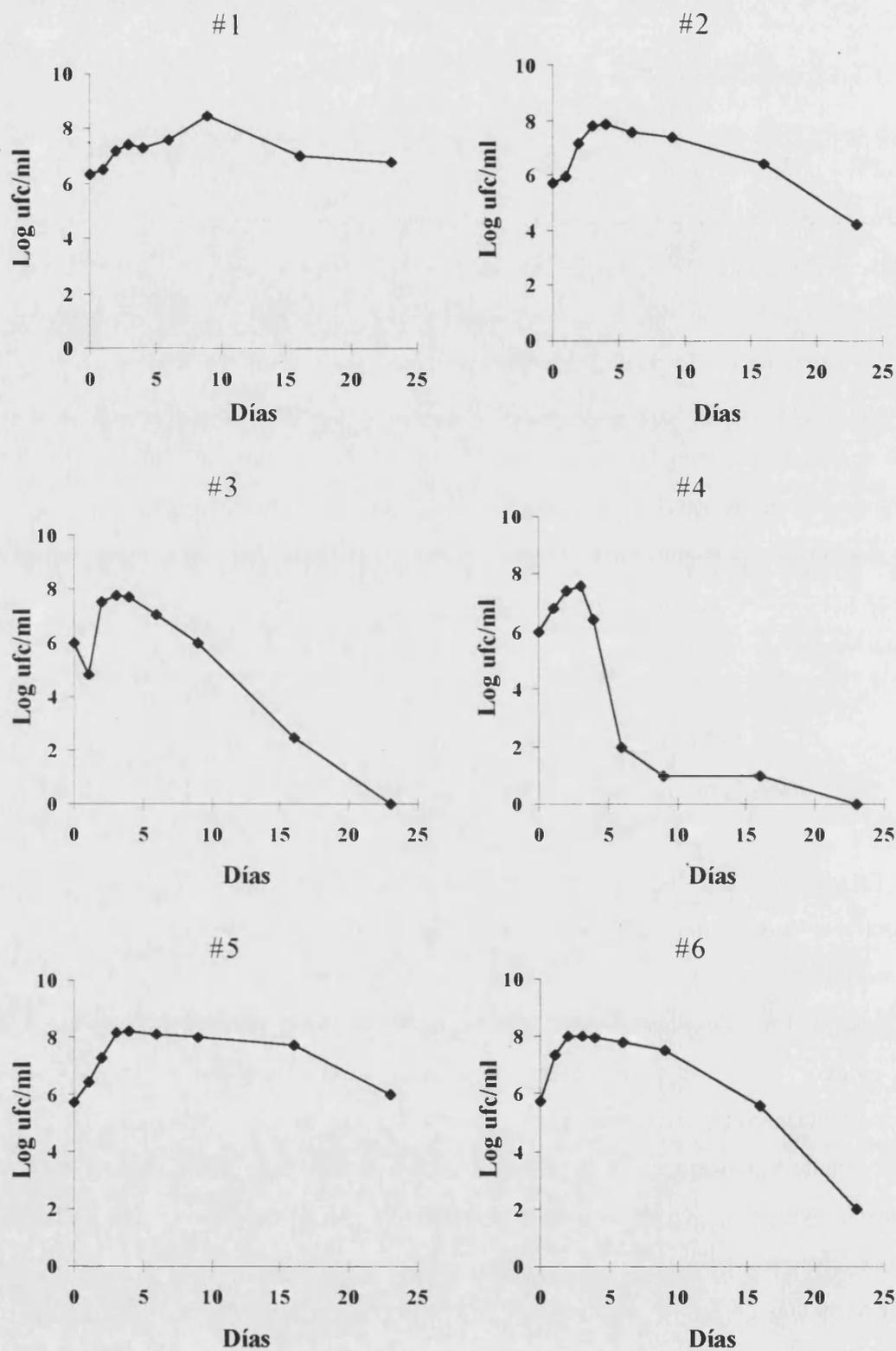


Figura 10 (sigue)

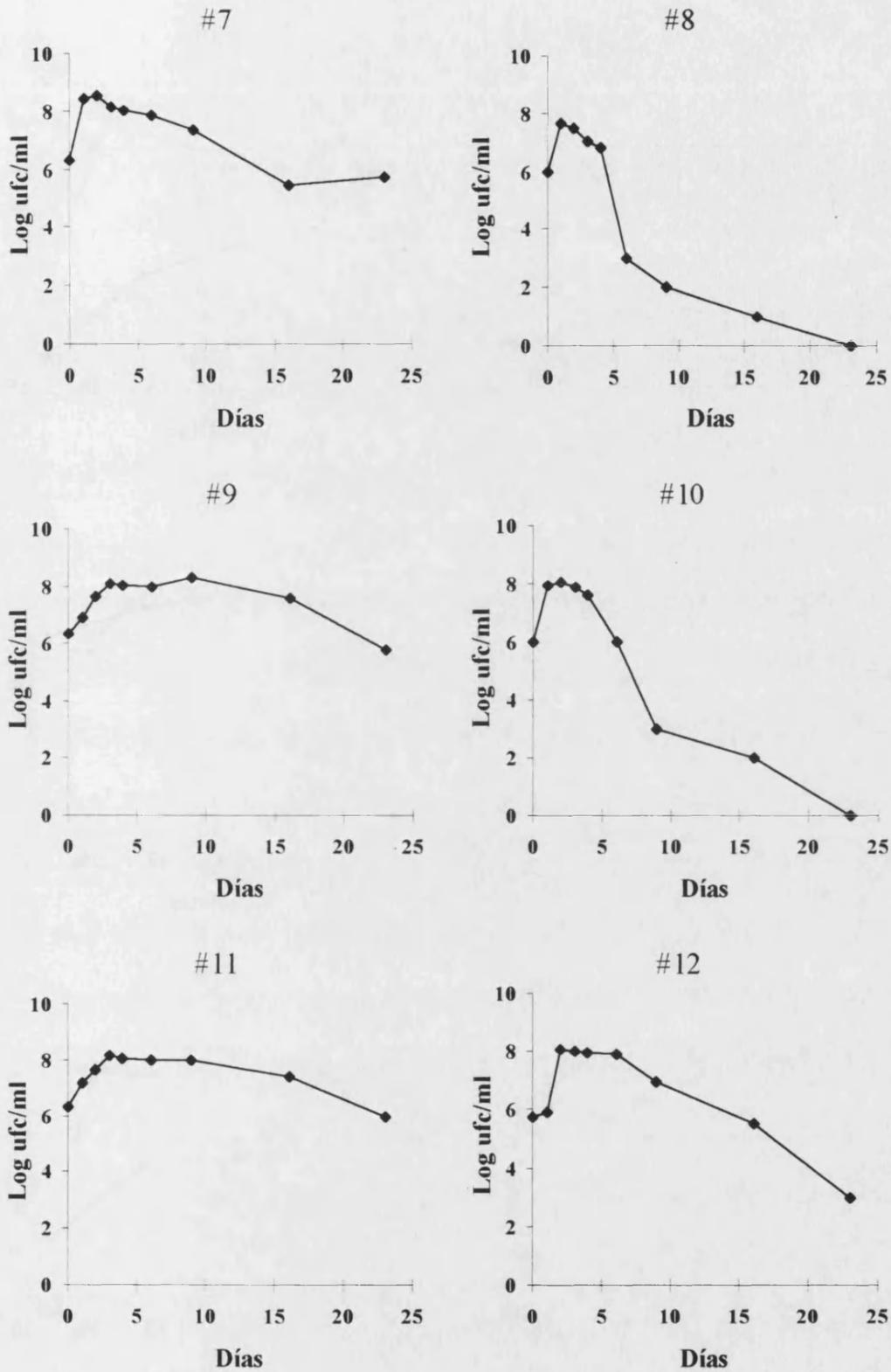


Figura 10 (Sigue)

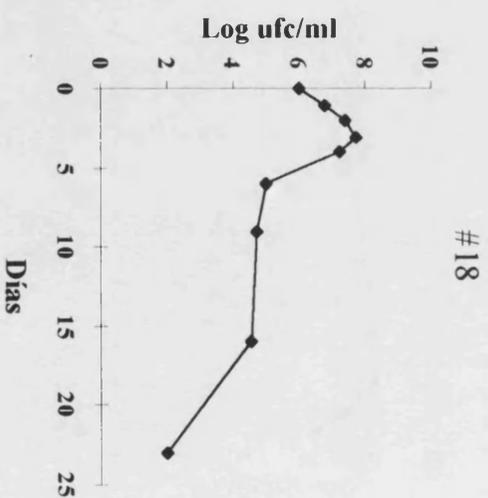
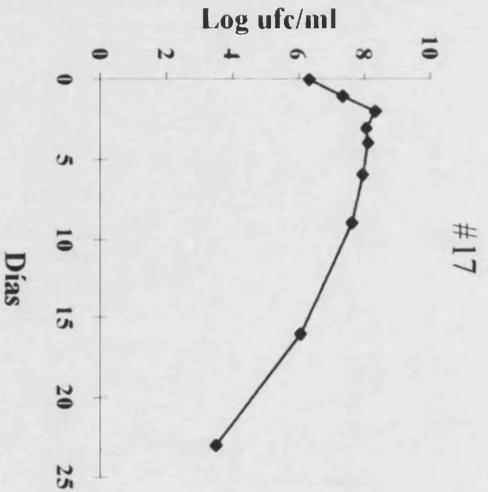
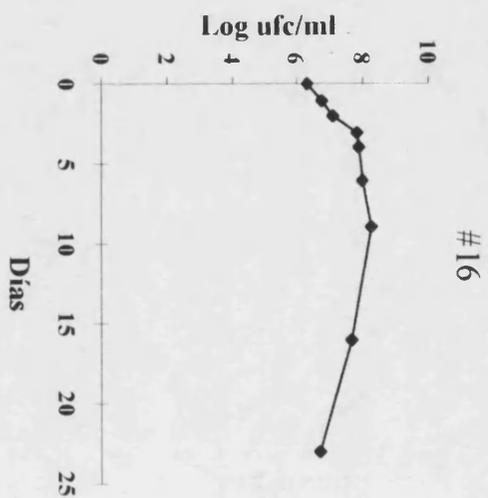
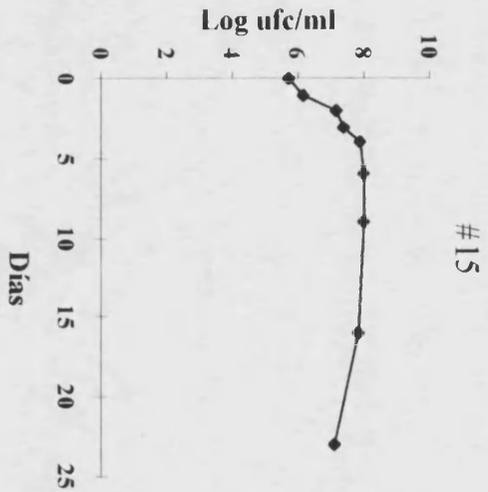
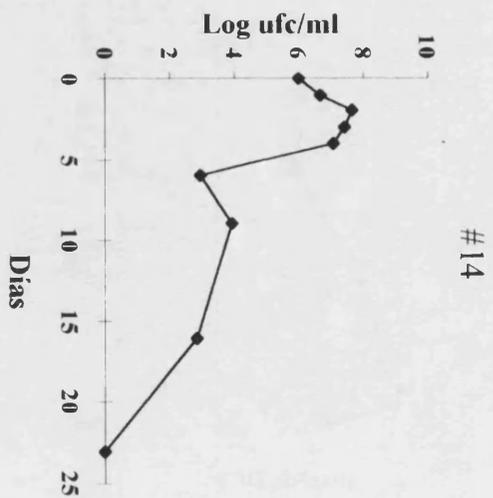
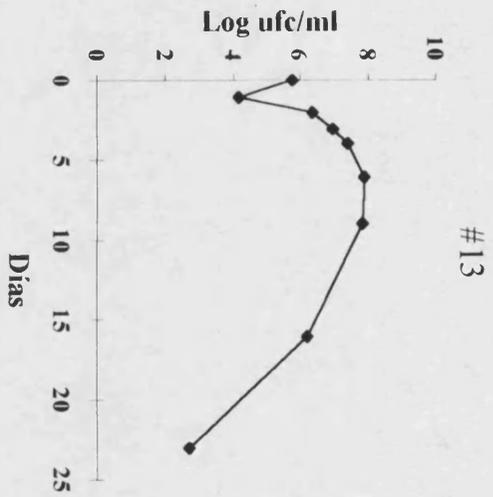


Figura 10 (Sigue)

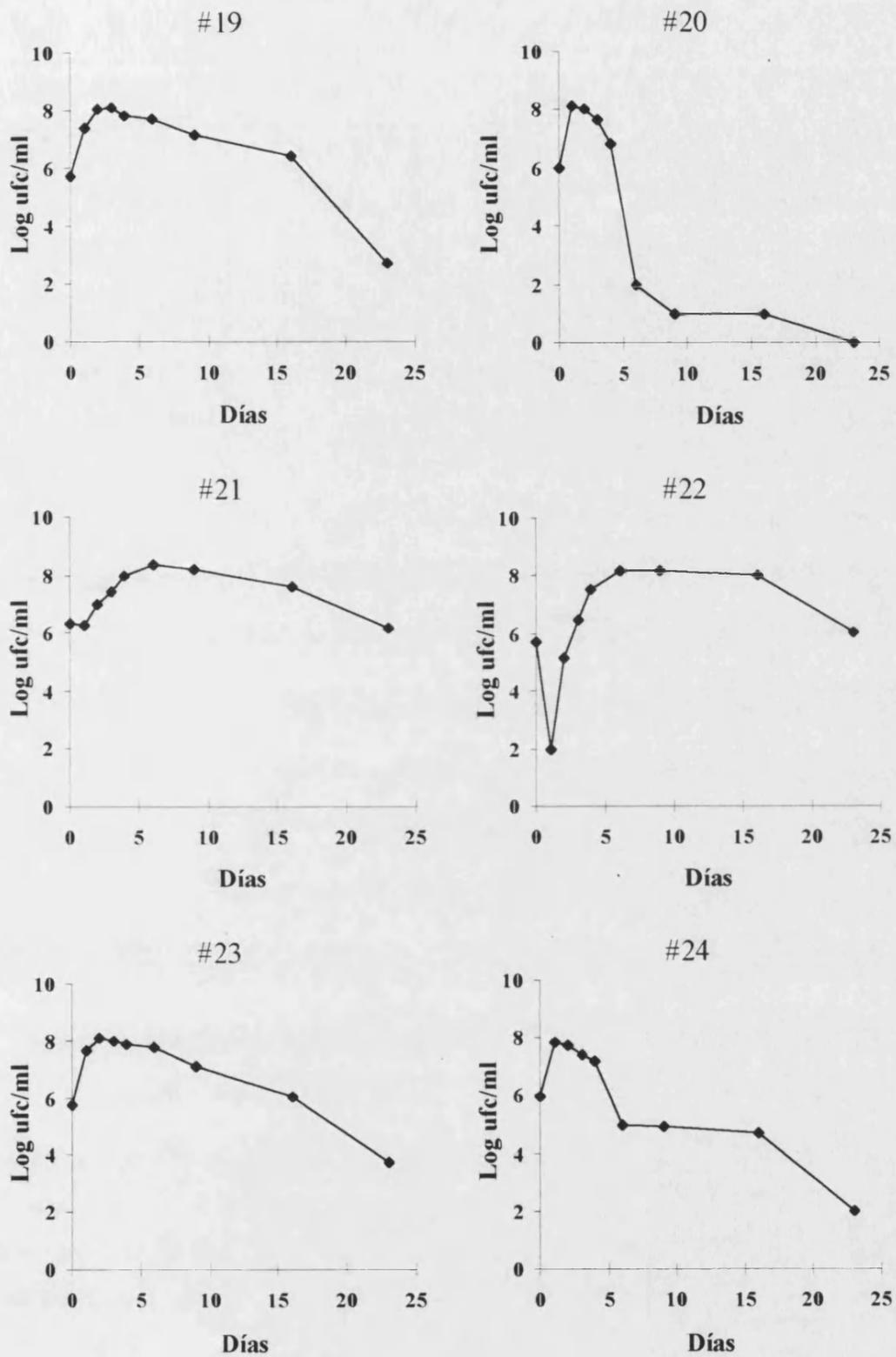


Figura 10. (Sigue)

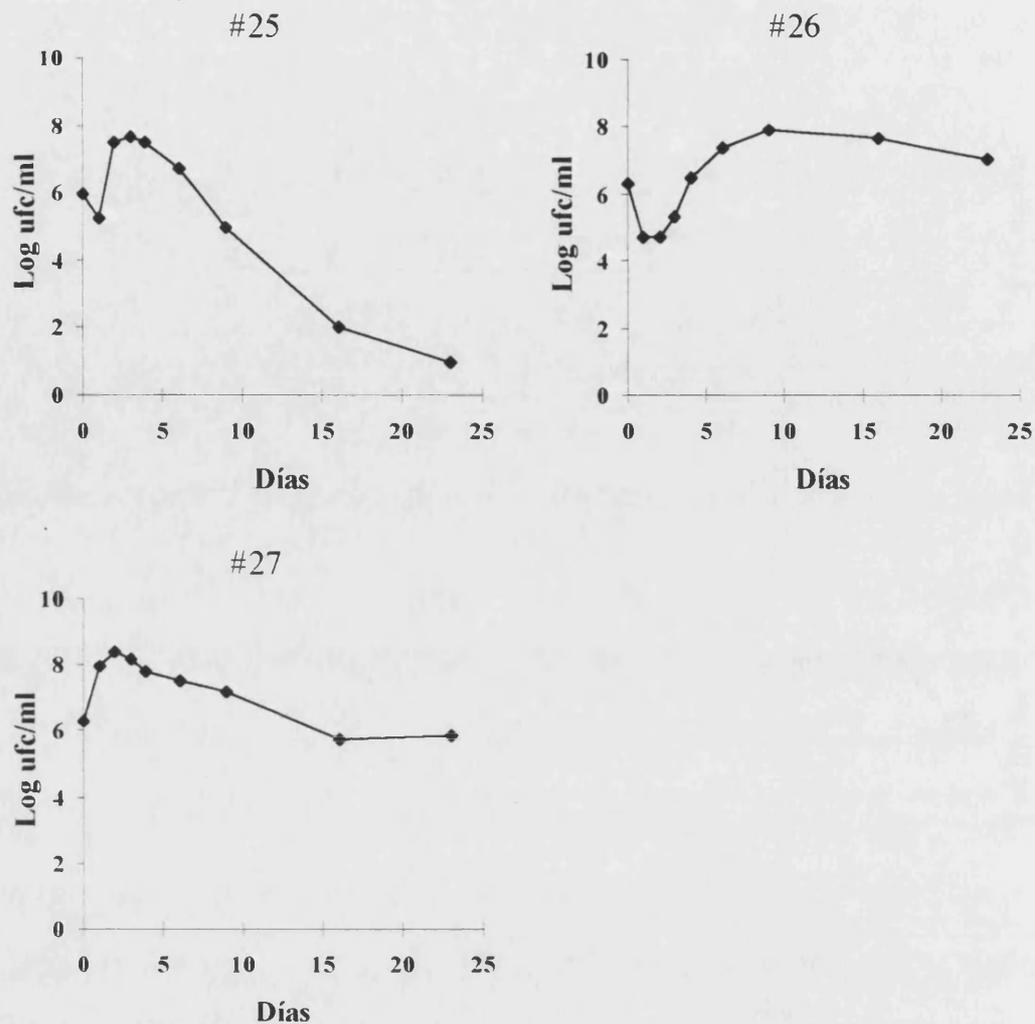


Figura 10. Evolución del número total de levaduras viables en la experiencia OA27.

Tabla 6. Concentraciones medias de levaduras viables en millones de ufc/ml.

Inóculo <i>K. apiculata</i>	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 6
0 cels/ml	31	73	57	50	41
5×10^4 cels/ml	29	57	70	50	55
1×10^6 cels/ml	38	81	78	77	76

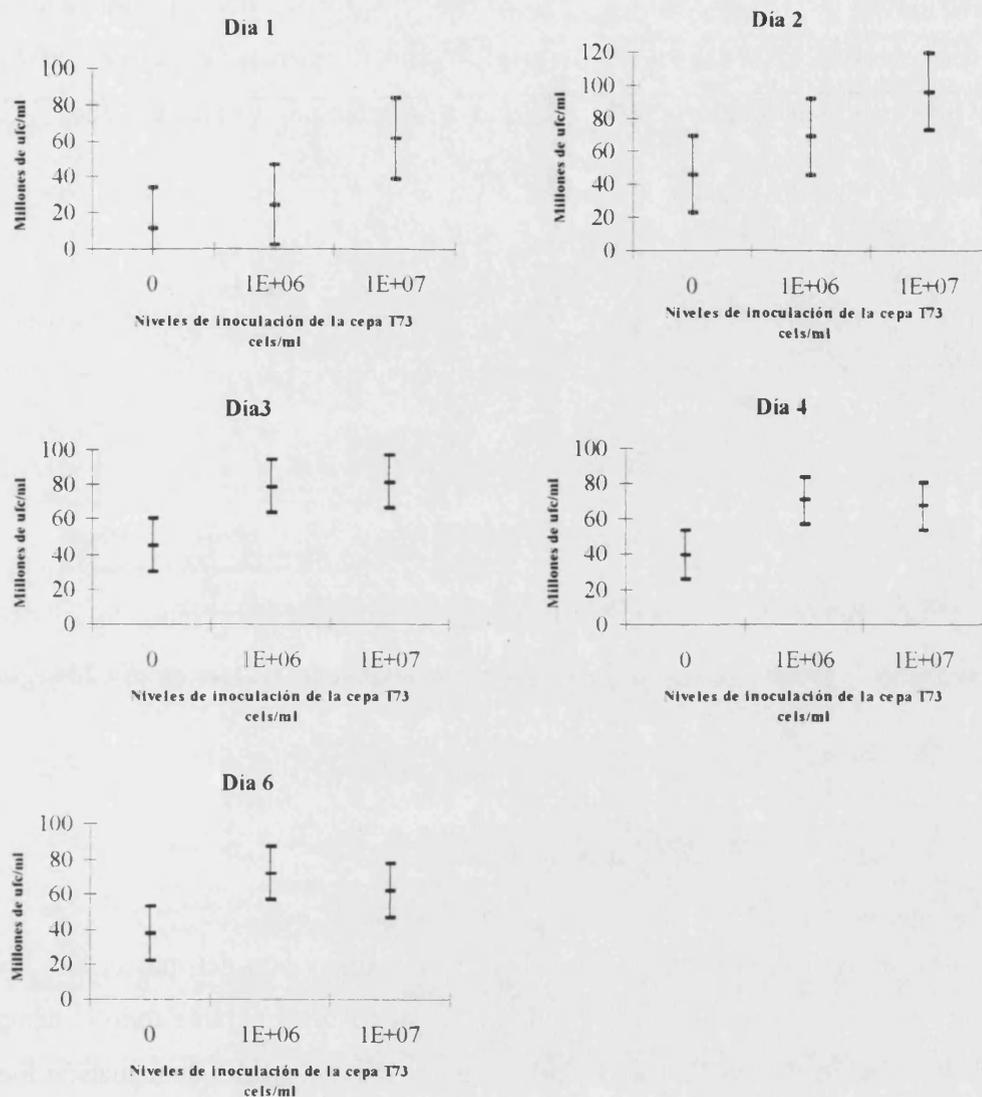


Figura 11. Intervalos LSD para las medias de levaduras viables según el nivel de inoculación de la cepa T73 durante la primera semana de fermentación

no inoculadas con ambas cepas. Las medias de viables para los vinos no inoculados con T73 fueron significativamente superiores a las de los que si fueron inoculados, dándose el mismo resultado para la inoculación con *K. apiculata*. Estos efectos se pueden observar en la representación de los intervalos LSD para estas medias (figura 12).

Los resultados obtenidos a partir del análisis de la influencia de las inoculaciones sobre la población levaduriforme total, a lo largo del proceso, indican el éxito de las inoculaciones, al menos para mantener números de viables más elevados durante la primera semana de

fermentación. El hecho de que al final de la fermentación, el número de viables fuera significativamente superior en las experiencias no inoculadas, hace pensar que existen levaduras naturales del mosto capaces de permanecer en números más elevados en los instantes últimos del proceso fermentativo, cuando el porcentaje de etanol es ya muy elevado.

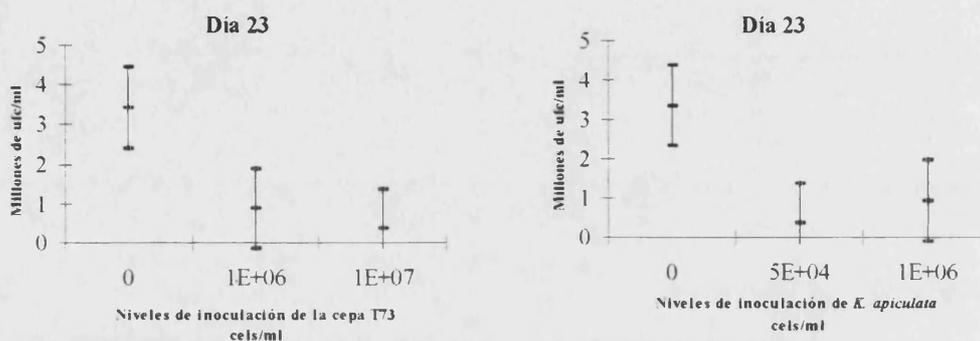


Figura 12. Intervalos LSD para las medias de levaduras viables en día 23 según los niveles de inoculación de T73 y K. apiculata

1.1.2 Influencia de la oxigenación

Se estudiaron dos variables relacionadas con la oxigenación del mosto, la adición de oxígeno antes de realizar las inoculaciones y la agitación continua durante todo el tiempo que duró la experiencia. En el caso de la adición de oxígeno, los tres niveles de actuación fueron 0, 20 y 40 ppm respectivamente. Para la agitación, sólo se comparó la presencia o ausencia de la misma.

La adición inicial de oxígeno no presentó apenas influencia sobre las poblaciones levaduriformes. Tan sólo en el día 9 de fermentación se encontraron números de viables significativamente más elevados en las fermentaciones en las que no se adicionó oxígeno con respecto a las que fueron adicionadas con 40 ppm. Por lo tanto, se debe concluir que la oxigenación inicial del mosto no es un factor que afecte de forma significativa a la evolución de las poblaciones levaduriformes implicadas en la fermentación.

Sin embargo, la influencia de la agitación, fue muy significativa, especialmente en los dos primeros días de fermentación, en los que las muestras que fueron fermentadas con

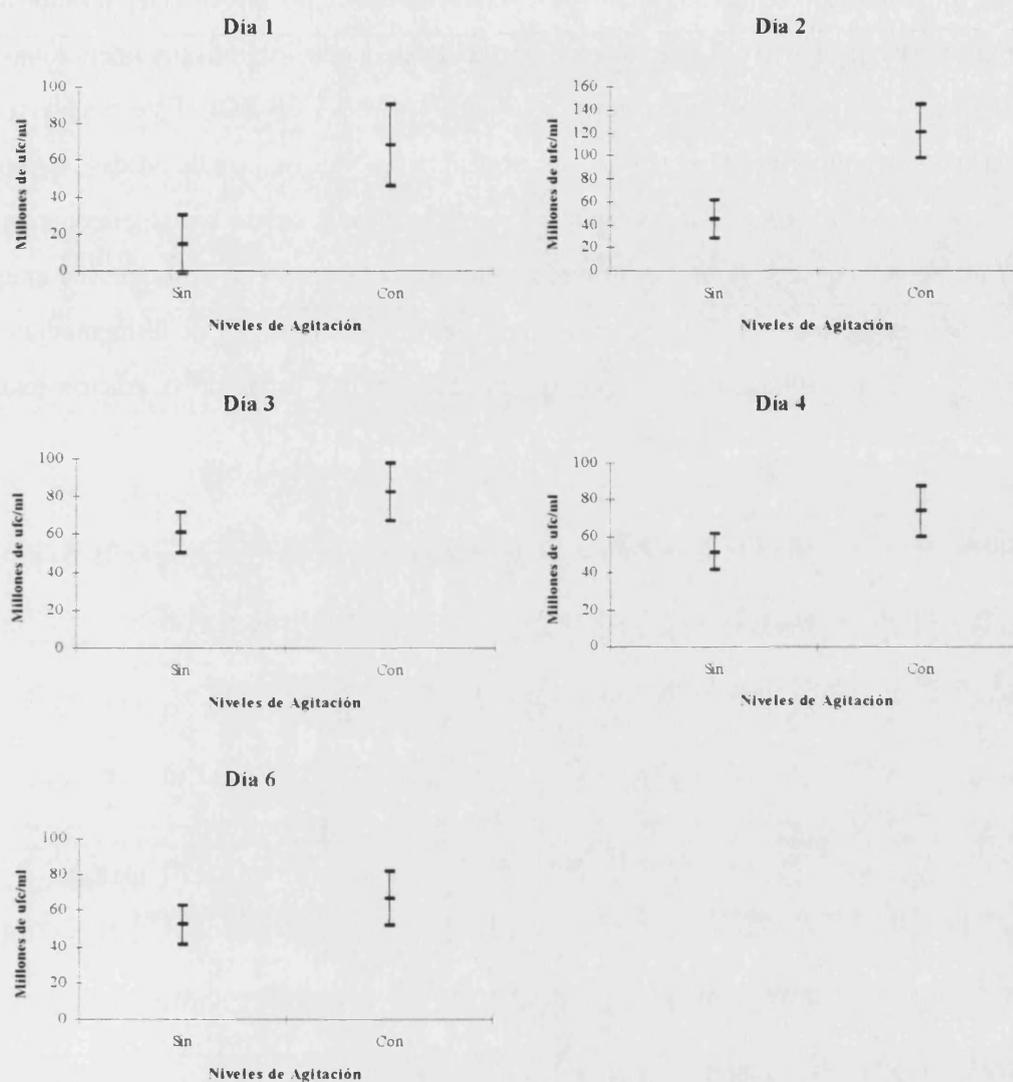


Figura 13. Intervalos LSD para las medias de levaduras viables en la primera semana de fermentación según los niveles agitación

agitación, tuvieron medias de viables significativamente más elevados ($p < 0.01$ y $p < 0.001$ para los días 1 y 2 respectivamente) que las que no fueron agitadas. Los intervalos LSD para las medias se representan en la figura 13, en la que también se puede observar como en los días 3, 4 y 6 también se produjo este efecto, aunque sin alcanzar significación estadística

1.1.3 Influencia de la adición de SO₂

La adición de anhídrido sulfuroso tuvo influencia sobre las poblaciones levaduriformes al comienzo de la fermentación, encontrándose medias de viables significativamente más bajas en las vinificaciones que fueron suplementadas con 100 mg/l de SO₂. Este hecho se puso especialmente de manifiesto al tercer día de fermentación, ya que la adición de 100 mg/l de SO₂, supuso una media de viables significativamente inferior a las de las experiencias que no fueron suplementadas o las adicionadas con 50 mg/l. En la figura 14 se observan los intervalos LSD para estas medias en los tres primeros días. A partir del cuarto día de fermentación ya no se observaron diferencias significativas en las poblaciones por causa de la adición inicial de sulfuroso.

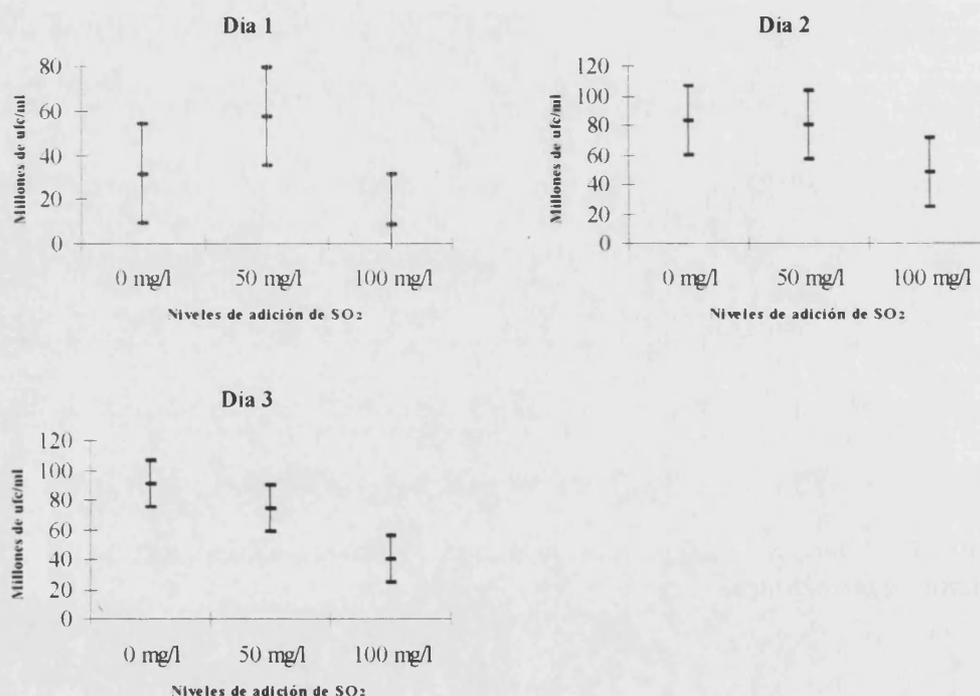


Figura 14. Intervalos LSD para las medias de levaduras viables en los tres primeros días de fermentación según los niveles de adición de anhídrido sulfuroso

1.1.4. *Influencia de la temperatura de fermentación*

La temperatura es, sin duda, el factor que se esperaba que fuera mas influyente en la variabilidad poblacional. Esto fue corroborado por el análisis de las experiencias, aunque los efectos sobre las poblaciones levaduriformes debidos a las diferentes temperaturas de fermentación ensayadas, no fueron los mismos durante el transcurso de toda la fermentación. Así, en día 1, la media de viables de las experiencias fermentadas a 15 °C, fue significativamente inferior a las realizadas a 25 °C; en día 2 y 3 los viables de las fermentaciones realizadas a 25 °C fueron significativamente superiores ($p < 0.01$) a los de las experiencias que fermentaron a 15 y 32 °C; en día 4 la población total de las experiencias fermentadas a 32 °C fue significativamente inferior ($p < 0.001$) que las fermentadas a 15 y 25 °C; en día 6, las fermentaciones realizadas a cada una de las tres temperaturas presentaron medias de viables significativamente inferiores ($p < 0.0001$) según se incrementó la temperatura; finalmente en los días 9, 16 y 23 se encontró el mismo efecto, los viables de las microvinificaciones elaboradas a 15 °C, significativamente superiores a las realizadas a 25 y 32 °C, ($p < 0.0001$ para estos tres días). En la figura 15 se pueden observar los intervalos LSD para las medias de viables de las experiencias agrupadas en función de la temperatura de fermentación. Esta influencia de la temperatura, se vio especialmente agravada debido a la rápida pérdida de viabilidad en las experiencias a 32 °C y por el más lento crecimiento de las levaduras en las experiencias a 15 °C.

1.1.5. *Discusión*

La variable que más influyó en la evolución de las poblaciones levaduriformes en las fermentaciones fue la temperatura. Esto, evidentemente, no es un resultado inesperado dada la estrecha dependencia de los microorganismos a sus valores óptimos de temperatura de crecimiento. Sin embargo, cabe destacar la falta de viabilidad encontrada en las fermentaciones elaboradas a 32 °C cuando el nivel de etanol de los mostos empezaba a ser elevado. Este hecho provocó, que ocho de las nueve experiencias que fermentaron a esta temperatura sufrieran una parada fermentativa con una considerable cantidad de azúcares residuales, quedando de manifiesto la peligrosidad que conlleva el aumento de la temperatura de fermentación y la estrecha relación con los problemas de parada fermentativa (Heard and Fleet, 1993).

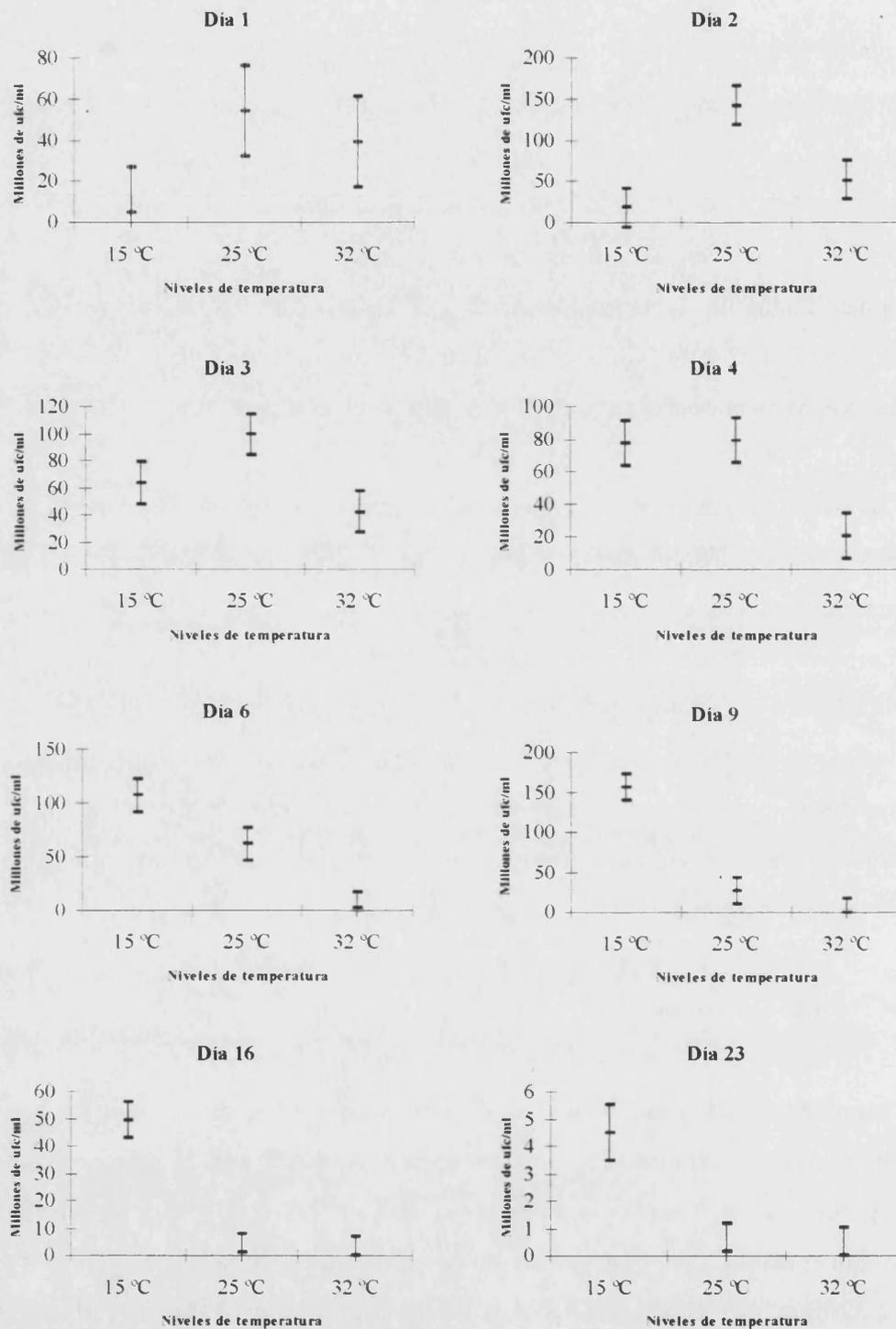


Figura 15. Intervalos LSD para las medias de viables según la temperatura de fermentación

La influencia de la agitación, que se dejó notar fundamentalmente en los tres primeros días de fermentación, era igualmente esperada, aunque no fue tan importante como la temperatura. La adición de oxígeno al principio del proceso no produjo diferencias significativas en el crecimiento de las levaduras, por lo que sus efectos no son equiparables a los de la agitación ni tan sólo al comienzo del proceso fermentativo. El incremento de la aireación del mosto por agitación, sin duda debe aumentar la fase aerobia inicial de las levaduras y, por tanto, provocar un significativo aumento de la biomasa.

Las inoculaciones mostraron que son capaces de aumentar significativamente las poblaciones presentes en los mostos durante la primera semana de fermentación, lo cual es un argumento a favor de la inoculación de cepas seleccionadas al menos con el fin de aumentar artificialmente el número de levaduras fermentativas. El hecho de que al final del proceso fermentativo, las microvinificaciones que fueron inoculadas con alguna de estas cepas, presentaran medias de viables inferiores a las no inoculadas, hace pensar en un posible efecto del desplazamiento de alguna de las cepas autóctonas mejor adaptadas a las fases finales de la fermentación alcohólica.

El nivel más alto de adición de sulfuroso, 100 mg/l supuso una causa de reducción del número de viables en los primeros días de la fermentación, aunque no lo fue así la adición de 50 mg/l. Esto nos indica el rango aproximado a partir del cual empieza a afectar la adición de sulfuroso a las poblaciones levaduriformes encargadas de conducir el proceso de elaboración del vino.

1.2 Experiencia OA16.

En la tabla 3 se detalla la composición factorial de las 16 microvinificaciones que constituyeron el diseño factorial OA16. En esta experiencia se trataba de evaluar los efectos de variables puramente microbiológicas, como la inoculación de levaduras de alto y bajo poder fermentativo (como en el apartado anterior), la inoculación de una cepa de *Leuconostoc oenos* al final de la fermentación alcohólica para la realización de la fermentación maloláctica, así como dos factores estrechamente relacionados con el control microbiológico del proceso, la adición de sulfuroso y la corrección del pH antes del inóculo de la bacteria láctica. Puesto que estas dos últimas variables se introdujeron al final de la fermentación alcohólica (día 9), hasta ese momento las 16 microvinificaciones diferentes se quedan en realidad en 8 experiencias por

duplicado (tabla 5) y es así como se ha considerado al realizar los análisis estadísticos para los recuentos del día 1 y como 8 experiencias sin duplicar para los días 2, 3, 4 y 8.

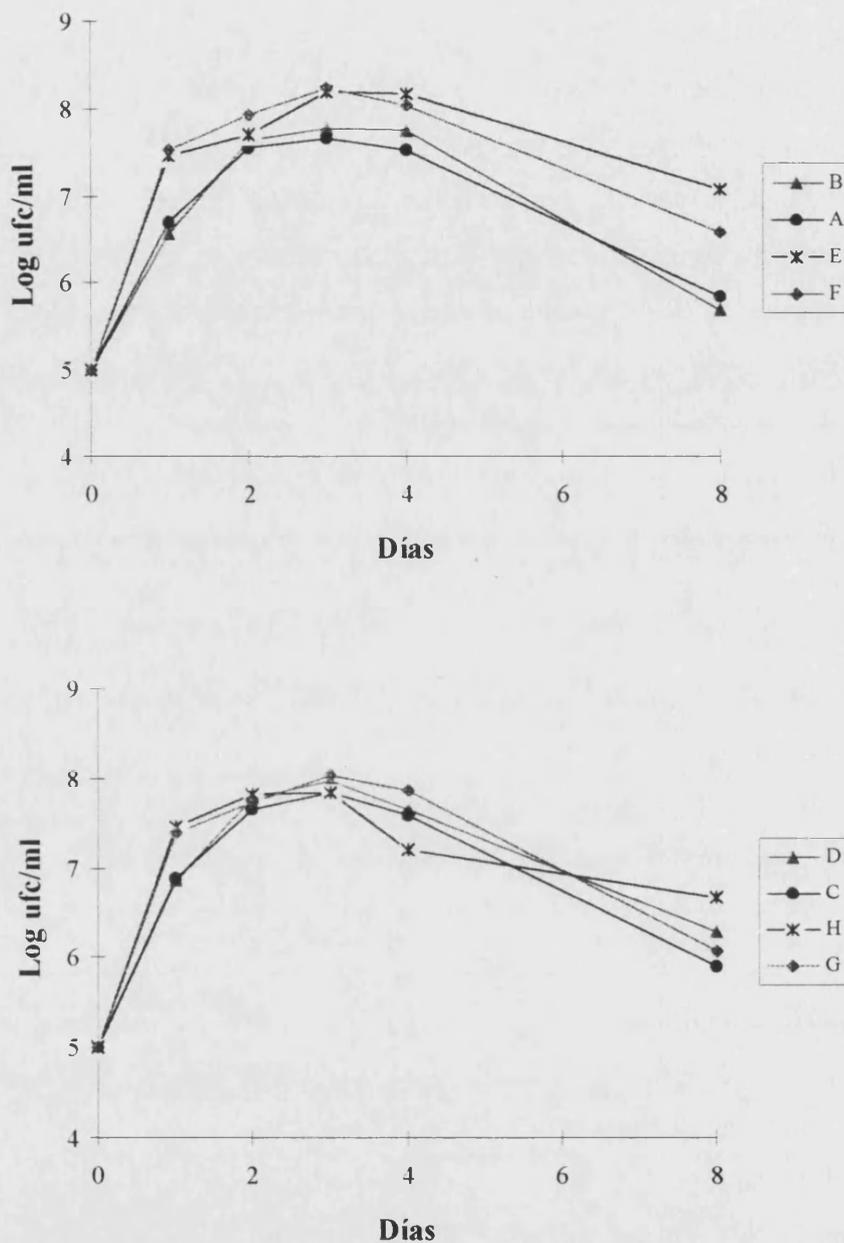


Figura 16. Evolución de las poblaciones levaduriformes

La figura 16 muestra la evolución de las poblaciones en las ocho experiencias distintas realizadas. Para facilitar su observación se han dividido en dos gráficas en cada una de las

cuales se representan dos de las cuatro experiencias inoculadas con la cepa T73 (E, F, G y H), frente a dos de las cuatro sin inocular (A, B, C, D).

1.2.1. Influencia de las inoculaciones con cepas de levaduras

La inoculación con la cepa seleccionada T73, presentó una notable influencia en la evolución de las poblaciones levaduriformes durante todo el proceso, aunque de una manera más marcada en los primeros días de fermentación. Así, el análisis estadístico de las poblaciones en día 1, mostró la clara influencia de la inoculación con la cepa T73, siendo la media de las experiencias inoculadas significativamente más elevada que la de las experiencias sin inocular ($p < 0.0001$). Los intervalos LSD para estas medias se muestran en la figura 17. El mismo tipo de influencia significativa fue encontrada a partir del análisis de los días 2 ($p < 0.05$), 3 ($p < 0.01$), 4 ($p < 0.05$). En día 8 ya no se encontró significación estadística, aunque las medias de viables de las fermentaciones inoculadas con la cepa T73 fueron igualmente superiores a las de las fermentaciones no inoculadas, con lo que seguía notándose al final de la fermentación alcohólica, cierto efecto de la inoculación inicial.

La inoculación con la cepa de bajo poder fermentativo (*K. apiculata*), no tuvo tanta influencia en los valores globales de levaduras viables a lo largo del proceso. Tan sólo en día 4, se observó una influencia significativa de la inoculación con esta cepa, ya que la media de viables para las experiencias inoculadas fue significativamente inferior ($p < 0.05$) que la de las experiencias no inoculadas, tal y como se muestra en los intervalos LSD para estas medias en la figura 17.

La estructura del diseño factorial OA16 nos permite estudiar además de los efectos principales de las variables, los efectos de sus interacciones dobles. Así el efecto de la interacción entre las dos cepas inoculadas, resultó ser significativo en los días 1, 3 y 4 (siempre con $p < 0.05$). Este hecho fue debido a que entre las fermentaciones no inoculadas con T73, las que sí lo fueron con *K. apiculata*, presentaron medias significativamente superiores (ver figura 19). Este hecho se puede explicar por una más rápida implantación en el mosto de las cepas de alto poder fermentativo y, por tanto, no permitiendo el cómodo desarrollo de la cepa de *K. apiculata*.

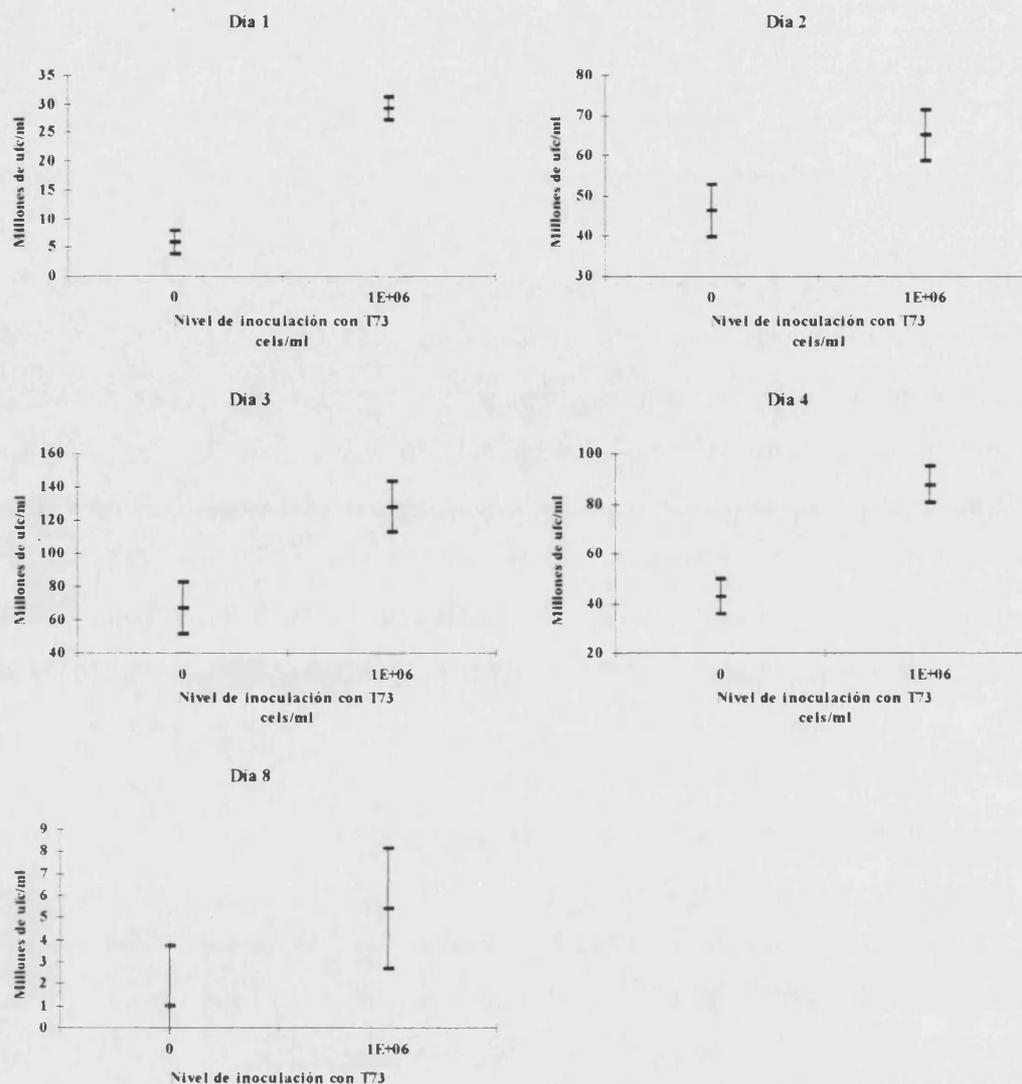


Figura 17. Intervalos LSD para las medias de viables según la inoculación con la cepa T73

De la misma forma, por este motivo se podría explicar la poca influencia global de la inoculación con *K. Apiculata*, sobre la evolución de las poblaciones levaduriformes.

1.2.2. Influencia del SO₂

La adición de 50 mg/l de anhídrido sulfuroso, apenas tuvo efectos relevantes sobre la evolución de las poblaciones. La cantidad ensayada no es principio demasiado elevada para inhibir el crecimiento de las levaduras utilizadas, tal y como ya se concluyó para la experiencia

OA27. Si que se halló significativa la influencia de la interacción entre la adición de SO_2 y la inoculación con la cepa T73 en día 4 ($p < 0.05$), debido a una media de viables superior para las experiencias realizadas con inoculación de la cepa y sin sulfuroso, como se puede ver en la figura 20.

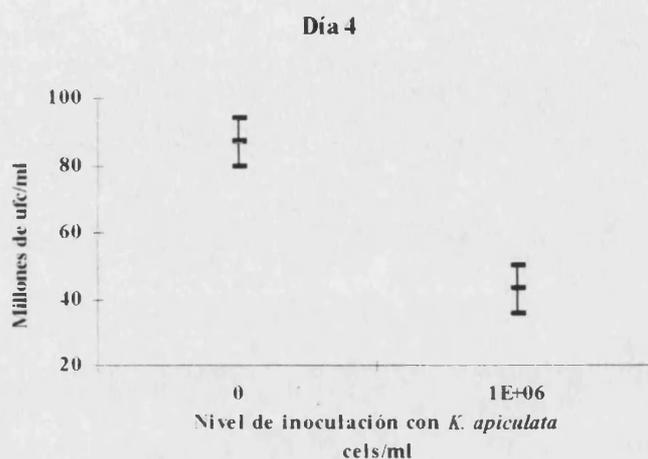


Figura 18. Intervalos LSD para las medias de las levaduras viables según el nivel de inoculación con *K. apiculata*

1.2.3. Discusión

La inoculación con la cepa seleccionada de alto poder fermentativo, T73, fue sin duda el hecho que condicionó de forma más notable, la evolución de las poblaciones en el curso de la fermentación. Las experiencias que fueron inoculadas mantuvieron números de viables más elevados durante todo el proceso, lo cual corrobora el éxito de la inoculación. La inoculación con la levadura de bajo poder fermentativo, *K. apiculata*, no tuvo sin embargo un efecto excesivamente perceptible, aunque se notó con más intensidad en las experiencias en las que no fue inoculada la cepa T73, lo que pone de manifiesto las dificultades para desarrollarse en un medio donde ya se produce un rápido crecimiento de levaduras de alto poder fermentativo.

La adición de 50 mg/l de SO_2 no fue muy importante de cara a la reducción del número de levaduras viables en el mosto, aunque como se desprende del estudio de la interacción entre la inoculación con la cepa T73 y el sulfitado, el número total de viables fue más elevado en las

muestras que siendo inocuadas, no fueron sulfitadas, concluyendo que el sulfitado reduce en cierta medida el éxito de la inoculación con cepa seleccionada.

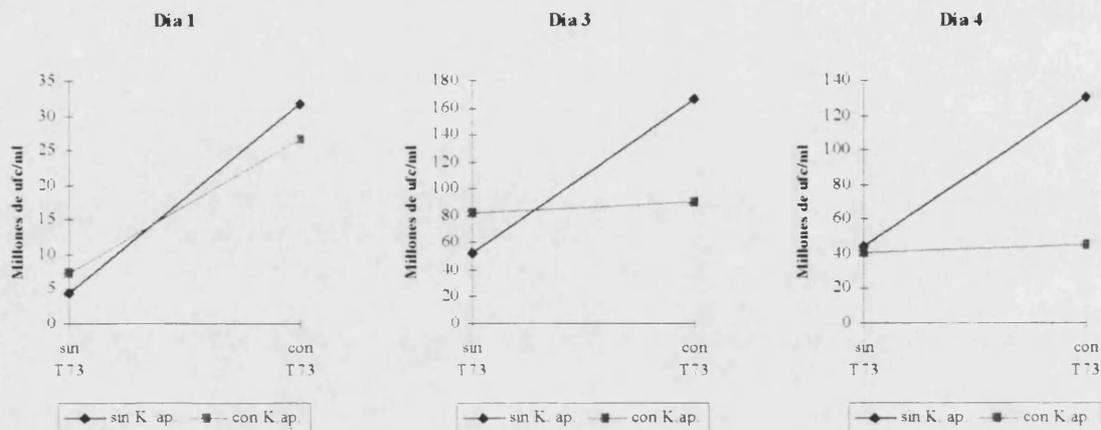


Figura 19. Representación de las interacciones entre los niveles de inoculación con T73 y *K. apiculata*

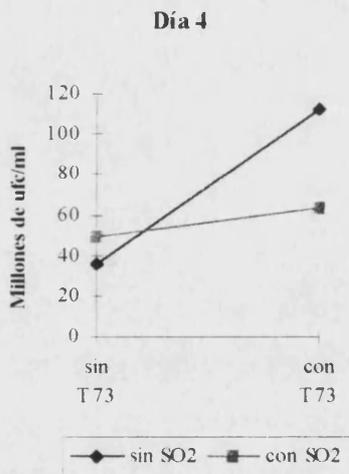


Figura 20. Representación de las interacciones entre los niveles de inoculación con T73 y adición de SO₂

2.- DINÁMICAS DE CONSUMO DE AZÚCARES

2.1. Experiencia OA27.

Para realizar el estudio de la influencia de las 10 variables de la experiencia OA27 en la evolución del proceso fermentativo, se han calculado los siguientes cinco parámetros relacionados con el consumo de los azúcares del mosto: el azúcar residual, el azúcar en día 15 (día en el que acabaron las experiencias más rápidas) y las velocidades medias de consumo del 10, 50 y 90% de los azúcares del mosto. El azúcar residual no es en sí un parámetro cinético, ya que no depende del tiempo que invirtió cada vinificación en alcanzar su valor final. El contenido en azúcares en día 15 nos da información acerca de la velocidad de consumo del azúcar en el instante en el que las primeras experiencias habían finalizado su fermentación alcohólica y, por tanto, éste sí es un parámetro que nos dará una idea de rapidez de fermentación en las distintas microvinificaciones. Por último, las velocidades medias de consumo del 10, 50 y 90% de los azúcares son medidas de las velocidades fermentativas en las etapas inicial, intermedia y final del proceso.

Del estudio de todos estos parámetros obtendremos una buena información acerca de la influencia de las variables enológicas en la evolución de la fermentación alcohólica en sí misma, y de que manera aumenta o disminuye dicha velocidad por acción de las distintas variables ensayadas. En la tabla 11 se muestran los valores para las 27 experiencias así como sus medias. De la simple observación de la tabla queda de manifiesto la gran influencia de la temperatura de fermentación de 32 °C, ya que 8 de las 9 experiencias que fueron realizadas a esta temperatura acabaron con cantidades de azúcares residuales superiores a 12 g/l y por tanto, con problemas de paradas fermentativas. El efecto de la temperatura, así como el de las nueve variables restantes se muestra en los siguientes apartados.

En la figura 21 se pueden ver las dinámicas de consumo de azúcares de las 27 experiencias, observándose la gran variabilidad de comportamientos cinéticos que se produjeron entre las vinificaciones.

Tabla 11. Valores de diferentes parámetros relacionados con el consumo de azúcar en las microvinificaciones de la experiencia OA27

	AZRES	AZ15	V10	V50	V90
#1	6.6	90.9	4.1	12.2	11.3
#2	2.1	2.7	11.5	32.1	59.5
#3	12.5	12.0	14.8	48.6	38.5
#4	50.0	52.4	80.6	65.6	5.6
#5	2.8	10.4	7.1	17.9	19.7
#6	4.6	3.6	22.0	54.7	43.8
#7	2.1	2.8	25.2	54.4	47.5
#8	46.9	55.0	94.0	70.5	5.6
#9	2.2	5.6	14.1	26.5	23.3
#10	11.4	12.0	88.1	83.9	39.7
#11	2.7	11.4	14.1	25.7	22.1
#12	2.8	4.1	18.1	39.9	37.9
#13	2.6	3.3	12.0	34.7	32.2
#14	31.3	32.2	20.1	54.2	6.4
#15	3.3	133.3	4.7	10.5	11.8
#16	2.6	25.0	8.1	19.7	18.5
#17	2.2	3.3	19.2	43.0	44.6
#18	3.0	3.2	50.4	67.8	37.9
#19	4.8	6.3	21.7	53.0	38.2
#20	20.8	20.0	64.1	75.8	50.8
#21	2.4	11.4	6.6	22.6	20.5
#22	3.1	17.2	4.9	16.5	18.8
#23	2.6	5.0	25.6	56.9	40.6
#24	35.0	52.0	88.1	74.2	5.6
#25	21.2	23.6	18.6	51.1	27.6
#26	3.8	89.3	6.0	12.1	13.4
#27	2.1	5.6	13.8	30.3	28.9
Medias	9.5	25.7	28.1	42.7	26.7

AZRES = azúcares residuales (g/l); AZ15 = contenido de azúcares en día 15 (g/l); V10, 50 y 90% = velocidades medias de consumo del 10, 50 y 90% respectivamente (g l⁻¹ · día⁻¹)

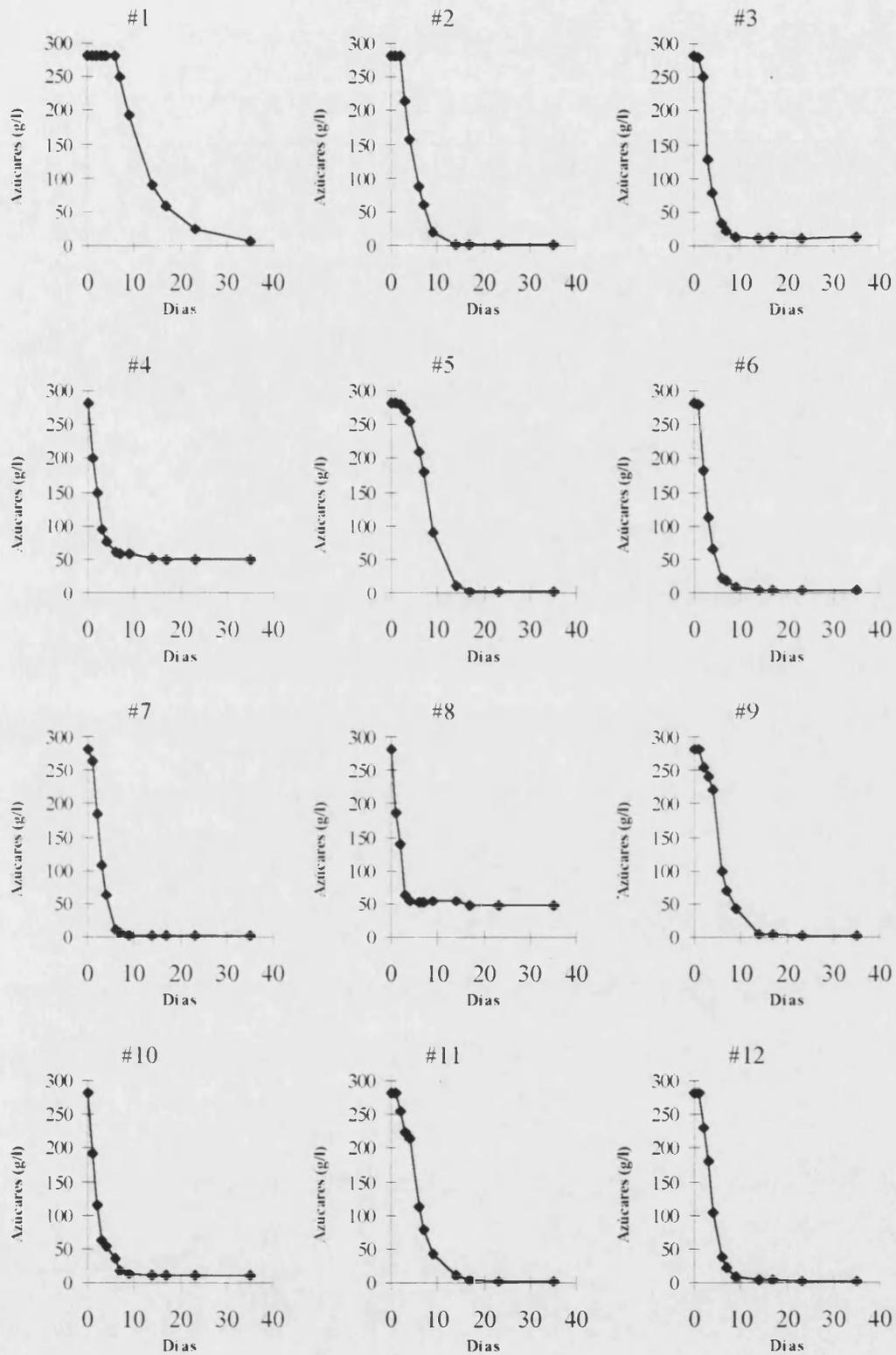


Figura 21. (sigue)

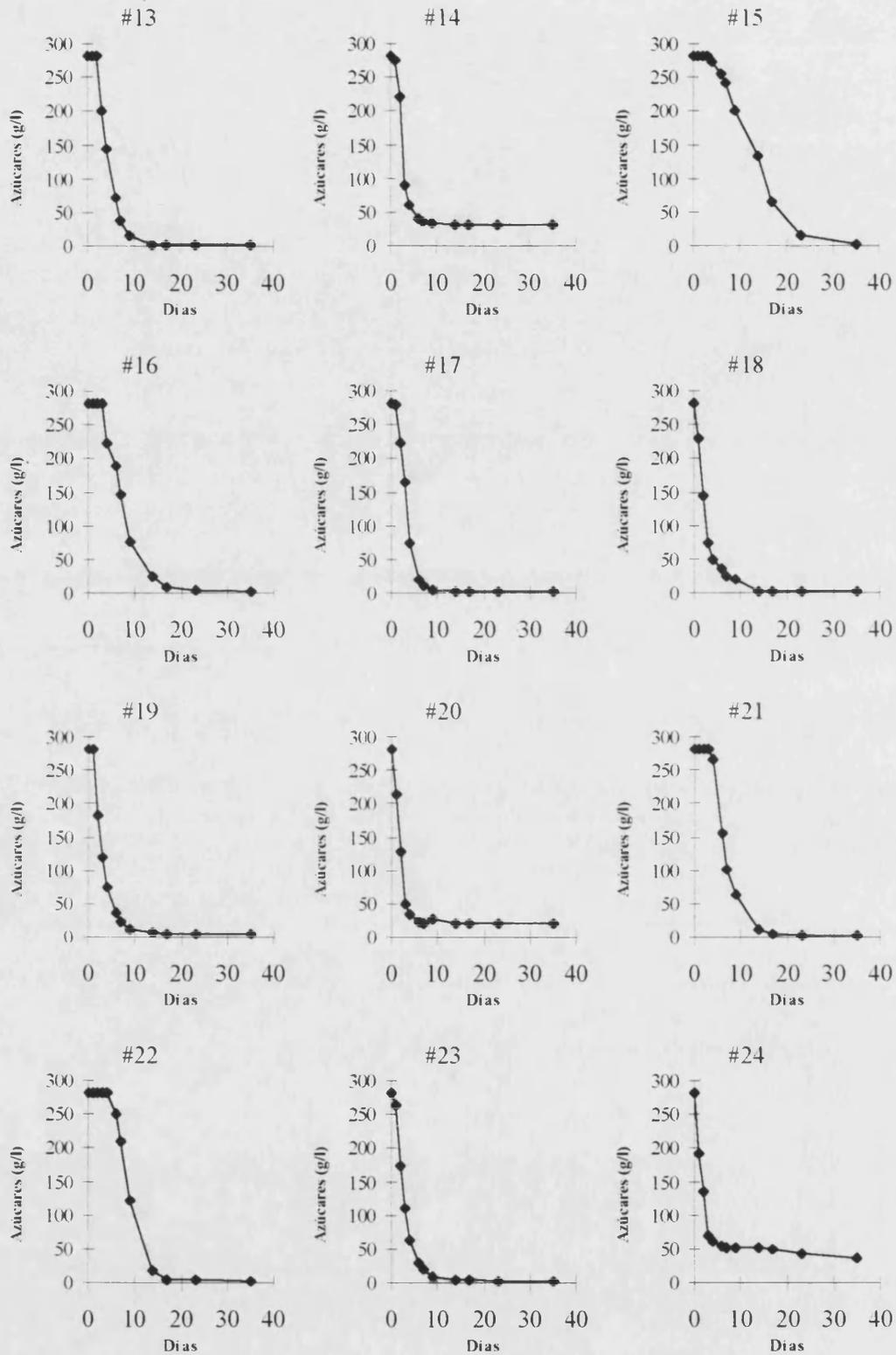


Figura 21. (sigue)

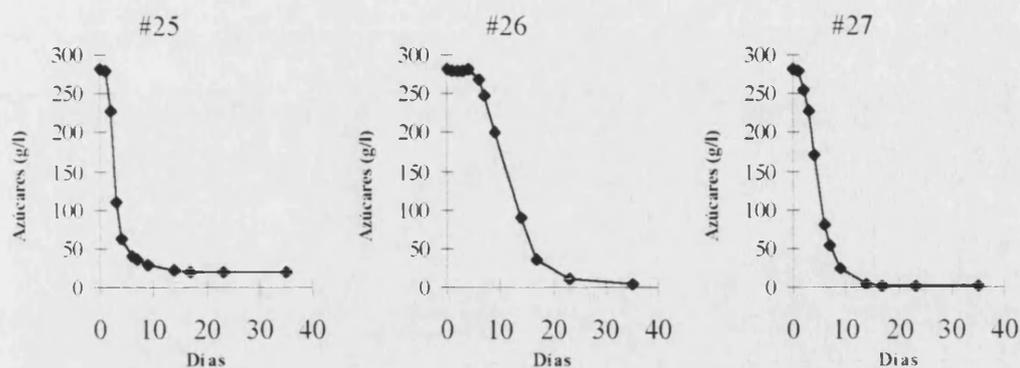


Figura 21. Dinámicas de consumo de azúcar de las 27 microvinificaciones de la experiencia OA27

2.1.1. Influencia de las inoculaciones levaduras

Las inoculaciones con las cepas de levaduras tuvieron efectos significativos sobre la evolución del consumo de azúcares, aunque no se encontraron con respecto al azúcar residual. Así, las medias de azúcar residual para las experiencias según los niveles de inoculación con T73 fueron de 9.5, 10.4 y 8.5 g/l para las muestras no inoculadas e inoculadas con 10^6 y 10^7 cels/ml respectivamente y de 9.6, 9.8 y 8.9 g/l para las muestras no inoculadas e inoculadas con $5 \cdot 10^4$ y 10^6 cels/ml de *K. apiculata* respectivamente.

Sin embargo, en la variabilidad encontrada en el contenido de azúcares en las muestras en día 15 sí que tuvieron un peso importante las inoculaciones con las levaduras. Para la inoculación con ambas cepas se encontraron cantidades de azúcares significativamente más bajas en las experiencias inoculadas que en las no inoculadas (con $p < 0.05$ y $p < 0.01$ para las inoculaciones T73 y *K. apiculata* respectivamente), sin encontrarse diferencias entre las dos concentraciones de inóculo ensayadas. Este efecto se puede observar en la figura 22.

También se observaron influencias importantes de las inoculaciones en las velocidades medias de consumo del 10% (28.2 g/l) y del 50% (141 g/l) del azúcar del mosto, aunque no para la velocidad media de consumo del 90% (253.8 g/l) del azúcar. La inoculación con T73 produjo un aumento significativo de la velocidad de consumo del 10% del azúcar ($p < 0.001$), mientras que la inoculación con *K. apiculata* produjo el efecto contrario, puesto que las

muestras inoculadas con 10^6 cels/ml fermentaron el 10% de los azúcares a una velocidad significativamente inferior ($p < 0.01$). Estos efectos se muestran en la figura 23.

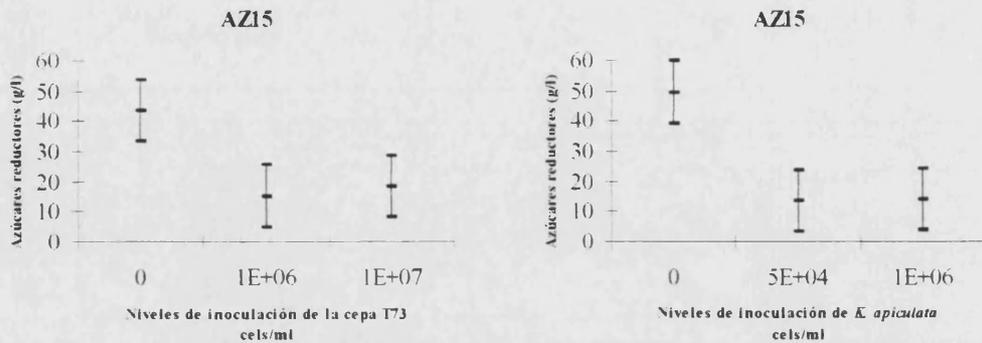


Figura 22. Intervalos LSD para las medias de azúcares reductores en día 15 según los niveles de inoculación con la cepa T73 y *K. apiculata*.

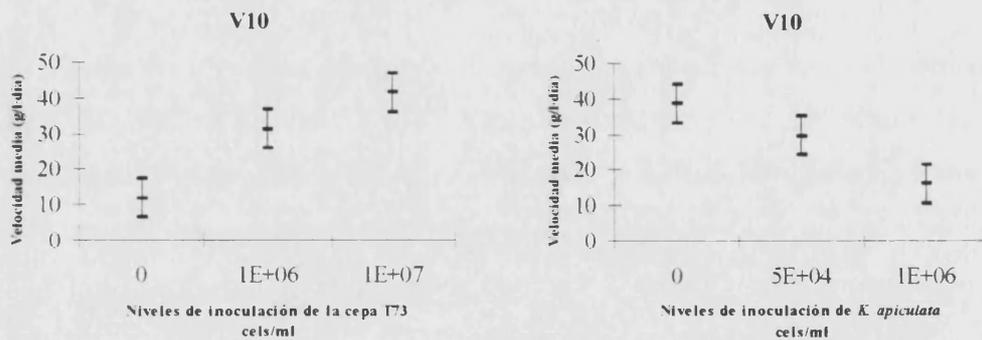


Figura 23. Intervalos LSD de las medias de las velocidades de consumo del 10% de los azúcares según los niveles de inoculación con T73 y *K. apiculata*

La inoculación con las cepas levaduriformes también influyó de manera muy similar en la velocidad media de consumo del 50% del azúcar del mosto. De nuevo la inoculación con T73 tanto con 10^6 como con 10^7 cels/ml produjo velocidades significativamente más elevadas ($p < 0.0001$) y la inoculación con 10^6 cels/ml de *K. apiculata* una velocidad inferior que la no inoculación con esta levadura ($p < 0.05$), aunque con un efecto algo menos marcado que para la velocidad de consumo del 10% del azúcar. En la figura 24 se pueden observar claramente estos efectos.

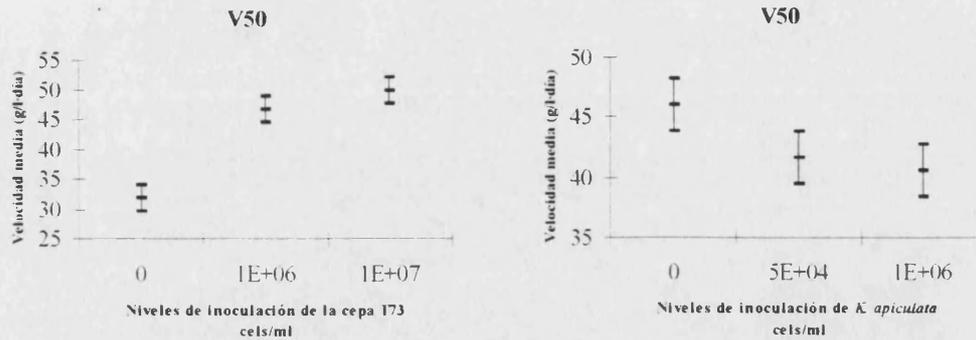


Figura 24. Intervalos LSD para las medias de las velocidades de consumo del 50% de los azúcares según los niveles de inoculación con T73 y K. apiculata

Finalmente, aunque las velocidades medias del consumo del 90% de los azúcares fueron más altas en las experiencias inoculadas con las dos cepas utilizadas, las diferencias no fueron significativas. Así, esta velocidad media fue de $22.2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ para las experiencias no inoculadas con T73, frente a los 31.1 y $26.8 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ de las inoculadas con 10^6 y 10^7 cels/ml respectivamente. Del mismo modo, la velocidad media para las experiencias no inoculadas con *K. apiculata* fue de $23.8 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$, frente a los 27.7 y $28.6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ de las inoculadas con $5\cdot 10^4$ y 10^6 cels/ml respectivamente.

2.1.2 Influencia de la adición de vitaminas y fosfato diamónico

Las adiciones de las vitaminas B1 (tiamina) y C y de fosfato diamónico (DAP) no influyeron significativamente en el contenido en azúcar en día 15 ni en las velocidades medias de consumo del 10, 50 y 90% de los azúcares del mosto. Sin embargo, la adición de DAP propició un contenido en azúcar residual significativamente más elevado. En la figura 25 se representan los intervalos LSD para las medias de azúcares residuales agrupadas según la adición de DAP, donde se puede comprobar que los intervalos para el nivel de no adición y el de 300 mg/l no solapan. La adición de tiamina contribuyó en la dirección opuesta, encontrándose una media significativamente más baja en las microvinificaciones que fueron adicionadas con 2 mg/l ($p < 0.05$). Estos efectos se muestran en la figura 25.

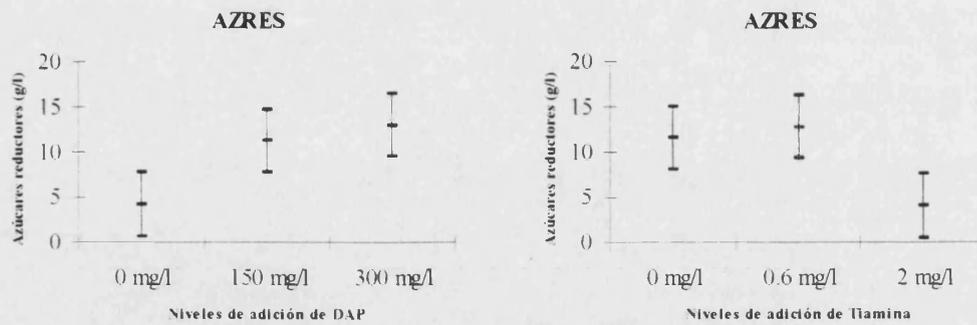


Figura 25. Intervalos LSD para las medias de azúcares residuales según los niveles de adición de DAP y tiamina

2.1.3. Influencia de la oxigenación

La oxigenación del mosto, bien por la adición de oxígeno directamente o por la agitación continua, no tuvo una gran repercusión sobre los parámetros estudiados relacionados con la dinámica de consumo de azúcares. Tan sólo en la velocidad de consumo del 90% del azúcar se observa un influencia significativa de la agitación. Así, en los mostos agitados, esta velocidad fue significativamente superior ($p < 0.05$) como se observa en la figura 26.

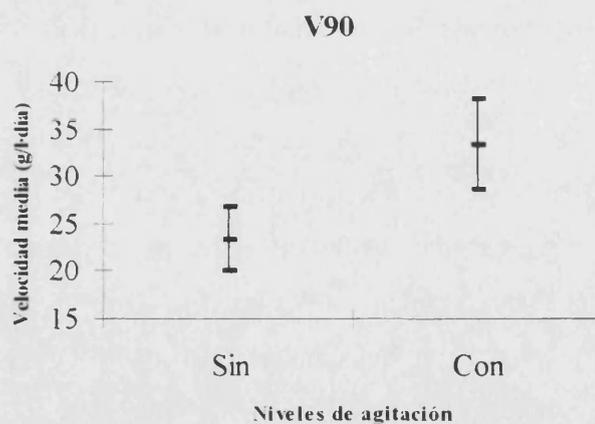


Figura 26. Intervalos LSD para las velocidades medias de consumo del 90% del azúcar según los niveles de agitación

2.1.4. Influencia de la adición de SO_2

La adición de SO_2 tampoco afectó de manera notable a la dinámica de consumo del azúcar del mosto. El único parámetro cinético de entre los estudiados en el que se detectó una influencia significativa de la adición de este compuesto fue la velocidad de consumo del 50% de los azúcares. Así, en las muestras adicionadas con 100 mg/l de sulfuroso, se dieron velocidades medias de consumo más bajas que para la adición de 0 ó 50 mg/l ($p < 0.05$). Esta influencia se puede comprobar en la figura 27. También cabe señalar que el azúcar residual en las muestras adicionadas con 100 mg/l fue de 14.2 g/l de media, frente a los 7.2 y 7.1 g/l de las fueron adicionadas con 0 ó 50 mg/l respectivamente (figura 27). Aunque estas medias no fueron significativamente diferentes ($p = 0.100$), este hecho redonda en la influencia encontrada para la adición de 100 mg/l de sulfuroso sobre la velocidad de consumo del 50% de los azúcares del mosto.

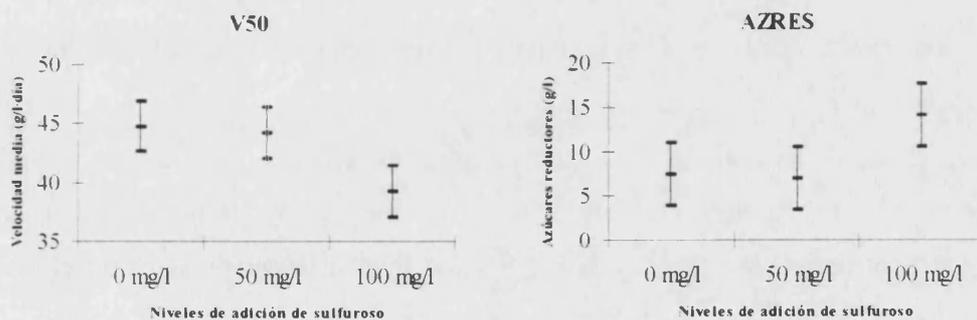


Figura 27. Intervalos LSD de las medias de la velocidad de consumo del 50 % del azúcar y del azúcar residual según el nivel de adición de SO_2

2.1.5. Influencia de la temperatura

La temperatura fue la variable que provocó la mayor parte de la variabilidad en los parámetros estudiados relacionados con el consumo del azúcar en las microvinificaciones. La variación entre sus tres niveles de actuación (15, 25 y 32 °C) provocó diferencias significativas en los cinco parámetros. En el azúcar residual no hubo diferencias entre las fermentaciones

realizadas a 15 y 25 °C, que tuvieron unas medias de 3.3 y 2.9 g/l respectivamente, pero si de estas con las vinificaciones realizadas a 32 ° C, (figura 28) cuya media fue de 22.2 g/l, ($p < 0.001$). Cabe señalar que aquí es dónde adquieren importancia las paradas fermentativas debidas a los 32 °C de temperatura, y es este hecho el único responsable de los valores elevados de azúcar residual. Los valores medios de azúcar residual en las muestras fermentadas a 15 y 32 °C son valores más normales para un vino acabado.

En los azúcares en día 15 de fermentación ya se dejó notar el efecto anteriormente comentado de las paradas fermentativas, pero también se detectó un efecto debido a por las muestras fermentadas a 15 °C, siendo la media de azúcar de las experiencias fermentadas a 25 °C significativamente inferior a la de las experiencias fermentadas a las otras dos temperaturas ($p < 0.01$), tal y como se puede observar en la figura 28.

En la velocidad de consumo del 10 y 50% de los azúcares del mosto, aún no se habían puesto de manifiesto las paradas fermentativas y se detectaron velocidades medias significativamente mayores según el incremento de la temperatura ($p < 0.0001$). Así la velocidad inicial de fermentación, al menos hasta el agotamiento de la mitad del azúcar, estuvo estrechamente relacionada con la temperatura de fermentación y en progresión creciente respecto a ella. En la velocidad de consumo del 90 % de los azúcares, se puso de nuevo de manifiesto el efecto de las paradas fermentativas en las experiencias a 32 °C, observándose un efecto igual al encontrado en el estudio de los azúcares en día 15 de fermentación, donde la velocidad en las experiencias fermentadas a 25 °C fue significativamente superior al resto ($p < 0.001$). Estas medias con los intervalos LSD se representan en la figura 28.

2.1.6. Discusión

La mayor parte de la variabilidad encontrada en los parámetros relacionados con las dinámicas de fermentación fue debida al comportamiento de las muestras fermentadas a 32 °C, debido a los valores elevados de azúcar residual que se encontraron en la mayor parte de ellas. La velocidad de fermentación fue, como era de esperar, significativamente más en las muestras fermentadas a 15 °C, aunque esta temperatura no influyó significativamente sobre el nivel de azúcar residual.

Sobre el azúcar residual se encontraron influencias de la adición de DAP, tiamina, y SO₂. La adición de 2 g/l de tiamina rebajó significativamente el nivel de azúcar residual, por lo

que se puede pensar que influyó positivamente en la degradación del azúcar por parte de las levaduras. Sin embargo, el nivel más elevado de adición de SO_2 fue perjudicial en este sentido, al provocar mayores niveles de azúcar residual, dándonos una idea, de nuevo, de que concentraciones de SO_2 empiezan a ser perjudiciales sobre la evolución del proceso fermentativo.

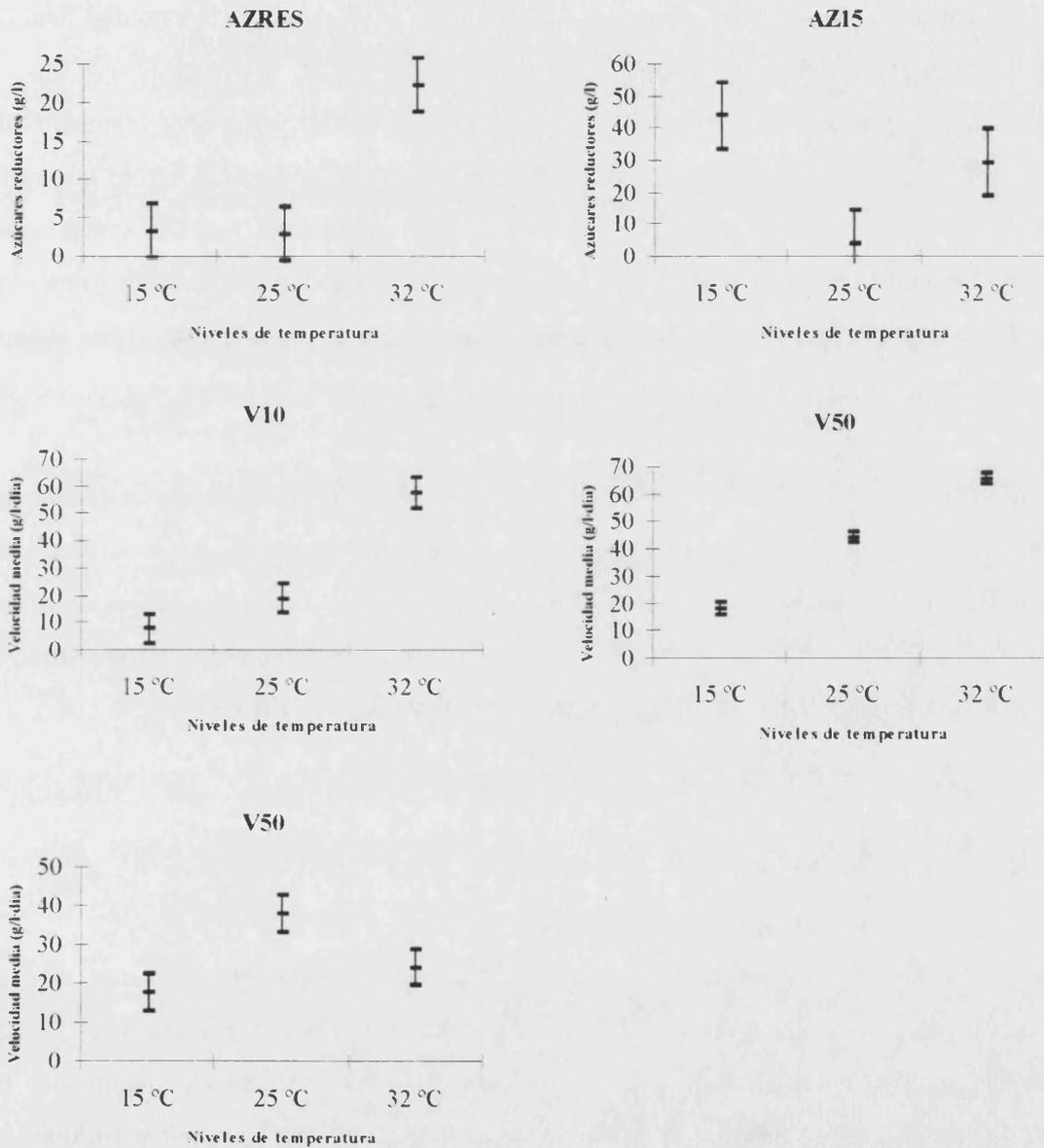


Figura 28. Intervalos LSD de las medias de azúcar residual (AZRES), azúcar en día 15 (AZ15), y velocidades de consumo del 10 (V10), 50 (V50) y 90% (V90) de los azúcares del mosto

La adición de fosfato diamónico también resultó un factor negativo a la hora de rebajar al máximo el azúcar residual de los vinos producidos. Resulta difícil encontrar una justificación a este hecho teniendo en cuenta que su adición se realiza con el objeto de suplementar los mostos con nitrógeno fácilmente asimilable, de forma que las levaduras encuentren menores problemas de crecimiento. Sin embargo, estos resultados nos indican hasta que punto las adiciones de suplementos nutricionales pueden modificar la evolución de las poblaciones microbianas constituyentes del ecosistema vínico, hasta influir, incluso, en la cantidad final de azúcar residual de los vinos.

La inoculación con la cepa T73 aumentó significativamente la velocidad de fermentación al menos hasta el consumo del 50% del azúcar, hallándose un efecto contrario para la inoculación con *K. apiculata*. Sin embargo en día 15 las inoculaciones con ambas cepas colaboraron significativamente a reducir el azúcar, por lo que acabe asignarles a ambas un efecto de aumento global de la velocidad de la fermentación, aunque la inoculación con la cepa T73, puede propiciar un comienzo de la fermentación más rápido, hecho que puede ser deseable en bodega.

La agitación no ha supuesto una causa de aumento en la velocidad de consumo del azúcar en los primeros días de fermentación. Este hecho pone de manifiesto la ausencia de correlación existente entre el aumento de biomasa descrito anteriormente y la velocidad inicial de fermentación, por lo que se confirma que el aumento de biomasa se realiza aprovechando el metabolismo respiratorio de las levaduras, favorecido por la agitación del mosto.

2.2 Experiencia OA16

Los parámetros relacionados con la dinámica de consumo de azúcares que se estudiaron en esta experiencia fueron: el azúcar residual total, la glucosa y fructosa residuales, así como las velocidades medias de consumo del 10, 50 y 95% del azúcar del mosto. Es importante recordar que puesto que la fermentación alcohólica se dió por terminada a día 9, y en ese mismo día se introdujeron las variables de inoculación con la bacteria láctica y modificación del pH, el análisis se realizó referido al esquema de la tabla 5 en la que en realidad existen 8 experiencias por duplicado, con lo que se aumentan considerablemente los grados de

libertad residuales. Los valores de estos parámetros utilizados en el análisis de la varianza se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Valores de diferentes parámetros relacionados con el consumo de azúcar en las ocho microvinificaciones distintas

Muestra	AZD4	AZRES	GLRES	FRRES	V10	V50	V95
A	57.28	1.24	0.00	1.24	0.86	2.55	7.25
B	64.58	1.43	0.00	1.43	1.05	3.05	7.55
C	63.08	2.35	0.02	2.32	0.91	3.10	7.75
D	59.20	1.55	0.00	1.55	1.10	3.00	7.30
E	46.24	3.07	3.04	0.03	0.46	2.30	6.30
F	50.23	2.92	2.90	0.02	0.50	2.60	6.20
G	44.29	2.99	2.97	0.02	0.45	2.20	6.15
H	49.25	2.94	2.92	0.02	0.50	2.60	6.35

AZD4 = Azúcar en día 4 (g/l); AZRES = Azúcar residual (g/l); GLRES = Glucosa residual (g/l); FRRES = Fructosa residual (g/l); V10, 50 y 95 = velocidades de consumo del 10, 50 y 95% del azúcar respectivamente

En la figura 29 se muestran las dinámicas de consumo de azúcar para estas 8 experiencias. El error calculado para los valores de azúcar en las réplicas fue siempre inferior al 5%. Se han dividido en dos gráficas para facilitar el análisis de las mismas, agrupando en cada una de ellas 2 de las 4 microvinificaciones inoculadas con la cepa T73 (E, F, G, H) con 2 de las 4 sin inocular (A, B, C, D). Se puede así observar claramente la mayor velocidad fermentativa de las experiencias inoculadas con la cepa T73, antes de mostrar la confirmación estadística.

2.2.1 Influencia de las inoculaciones con levaduras

El papel de la inoculación con la cepa T73 en la evolución de la dinámica de consumo de azúcares en las fermentaciones fue de gran relevancia, como se pone de manifiesto en la figura 29. Así tanto el nivel de azúcar residual como el de glucosa fue significativamente más elevado en las experiencias inoculadas ($p < 0.0001$ en ambos casos), mientras que el nivel de fructosa, fue inferior ($p < 0.0001$). Por otro lado, las velocidades de consumo del 10, 50 y 95%

de los azúcares fueron significativamente más altas en las muestras inoculadas con T73 ($p < 0.0001, 0.05$ y 0.0001 respectivamente). Estos efectos se muestran en la figura 30.

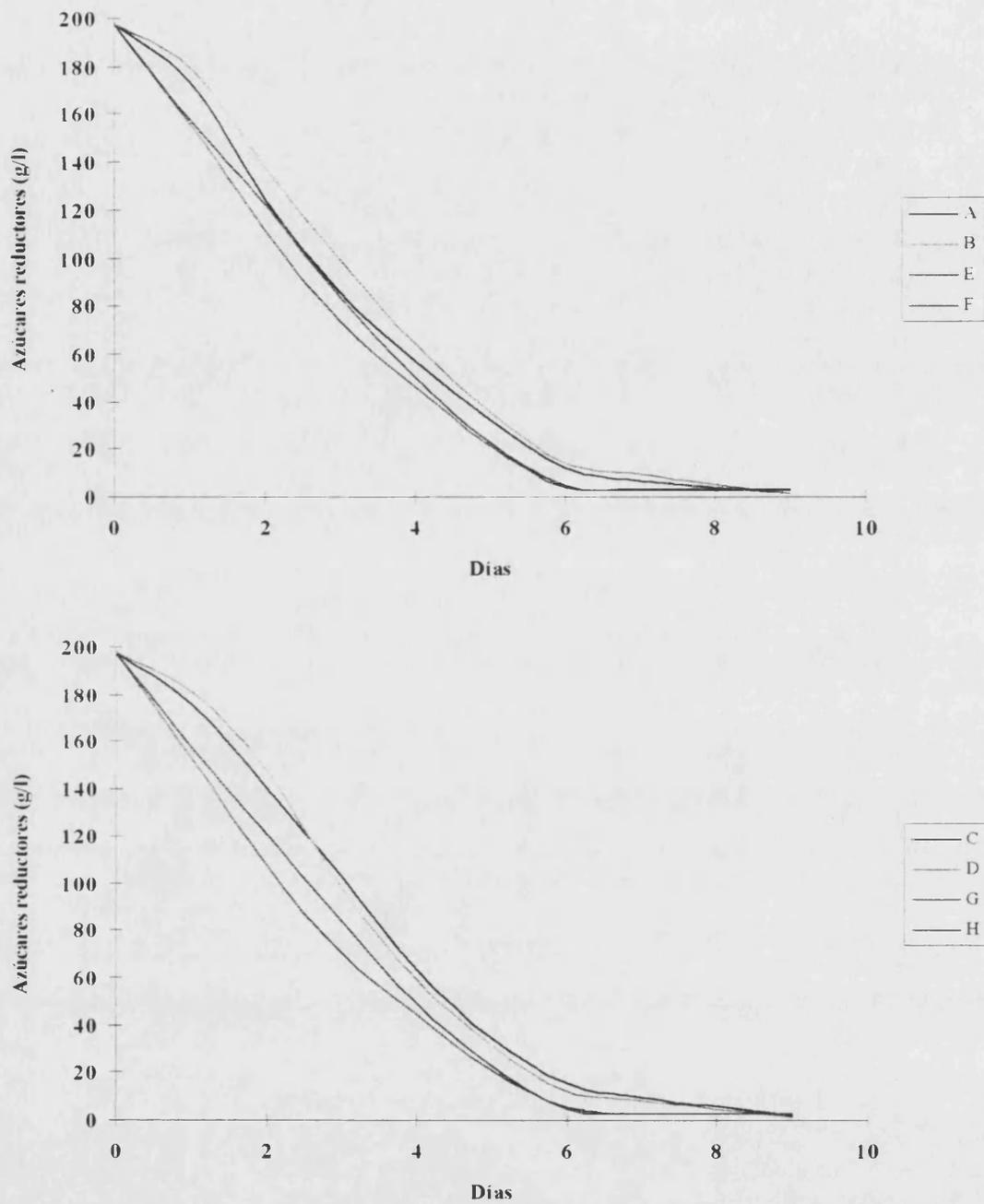


Figura 29. Dinámicas de consumo de azúcar para la experiencia OA16

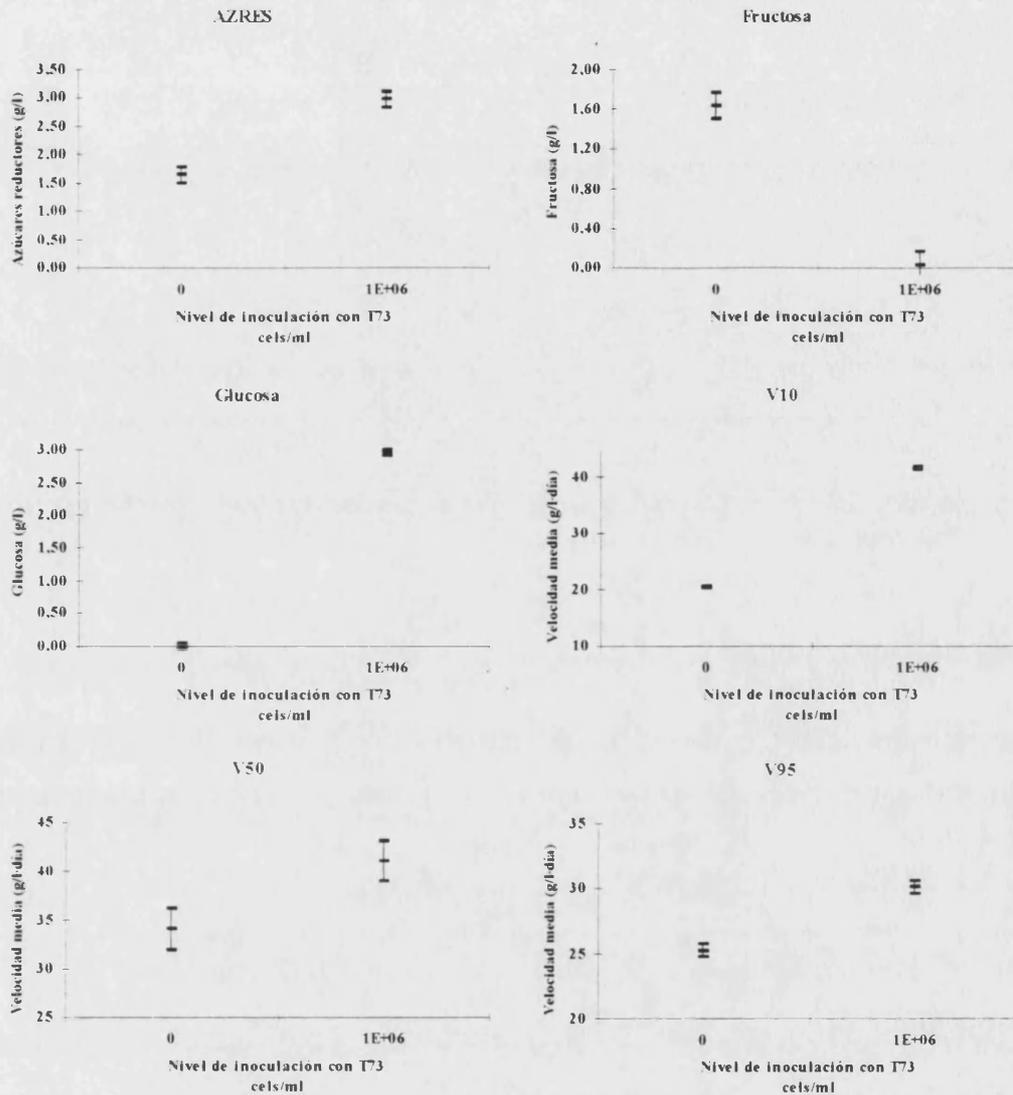


Figura 30. Intervalos LSD para las medias de azúcar residual, glucosa, fructosa y las velocidades medias de consumo del 10, 50 y 95% del azúcar según el nivel de inoculación con la cepa T73

El efecto de la inoculación con *K. apiculata* tuvo menor relevancia. No se encontraron medias de azúcar residual significativamente distintas entre las experiencias según la inoculación con *K. apiculata*, aunque, al igual que para la inoculación con T73, la media de las muestras inoculadas fue superior ($p = 0.0534$). Observando los valores de glucosa y fructosa, se puede comprobar como este efecto es debido fundamentalmente a la mayor cantidad de fructosa residual en las experiencias inoculadas con esta levadura, ya que la cantidad media de glucosa fue de 1.5 g/l tanto en las muestras inoculadas como en las no inoculadas. Estas medias con sus

intervalos LSD se representan en la figura 31. No se encontró influencia significativa de la inoculación con *K. apiculata* sobre las velocidades de consumo del 10, 50 y 95% del azúcar.

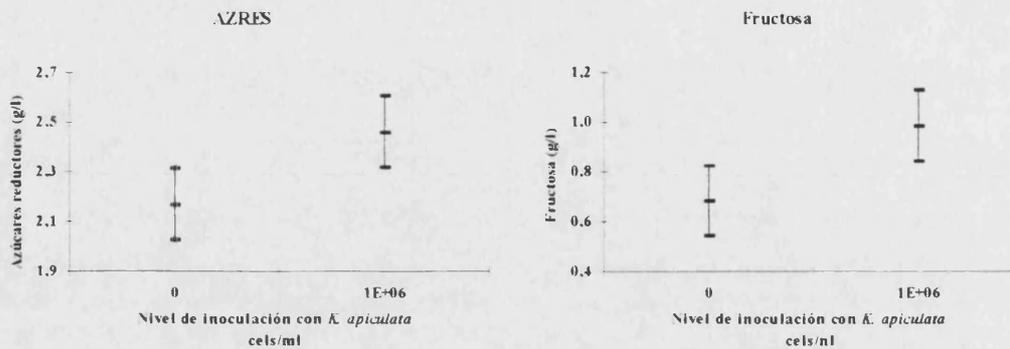


Figura 31. Intervalos LSD para las medias de azúcar residual y fructosa según el nivel de inoculación con *K. apiculata*

El efecto de la interacción entre ambas cepas resultó significativo tanto para el azúcar residual como para la fructosa. Las representaciones de este efecto se muestran en la figura 32. En dicha figura se observa como las experiencias inoculadas con *K. apiculata* pero sin T73 exhibieron una cantidad significativamente menor de fructosa ($p < 0.05$) y de azúcar residual ($p < 0.05$), aunque no tuvo efecto sobre la cantidad de glucosa residual.

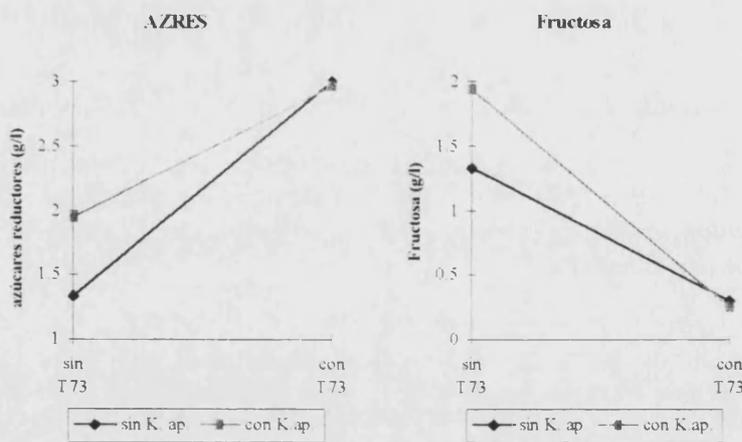


Figura 32. Representación de los niveles de interacción entre las inoculaciones con la cepa T73 y *K. apiculata*

2.2.2 Influencia de la adición de SO_2

La adición de 50 mg/l de SO_2 no tuvo efectos significativos sobre las cantidades residuales de azúcares totales, glucosa o fructosa, aunque si se notó el efecto de su adición sobre la velocidad de fermentación del 10% del azúcar, es decir la velocidad de consumo de los primeros gramos de azúcar. La velocidad media en las muestras sulfitadas fue significativamente inferior ($p < 0.001$). Este hecho también se observó respecto a la velocidad de consumo del 50% del azúcar, aunque ya más atenuado y no alcanzó significación estadística ($p = 0.0592$). Ambos efectos se pueden observar en la figura 33.

No se encontró significativa ninguno de los efectos de las interacciones entre la adición de SO_2 y la inoculación con la cepa T73 o *K. apiculata*.

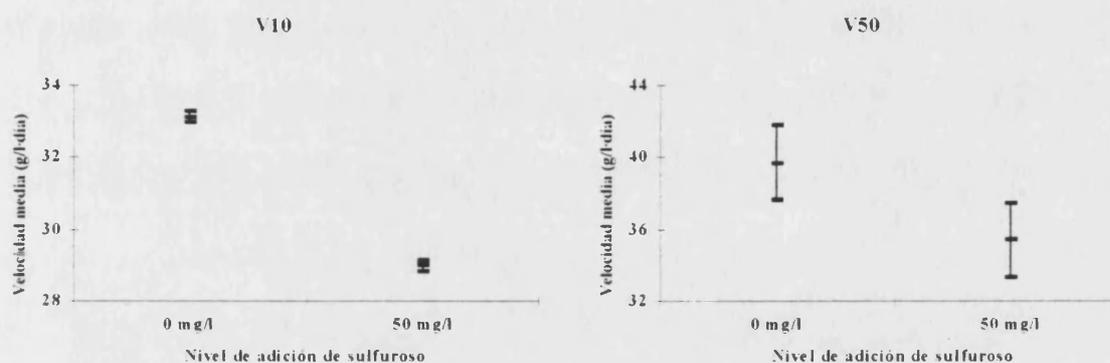


Figura 33. Intervalos LSD de las velocidades medias de consumo del 10 (V10) y 50% (V50) del azúcar

2.2.3. Discusión

La inoculación con la cepa T73 fue la variable que más influyó en la evolución del consumo de azúcar a lo largo de la fermentación alcohólica y sobre el azúcar residual. La cantidad de azúcar residual en las muestras inoculadas fue significativamente más elevada, siendo este azúcar residual fundamentalmente glucosa. Este efecto es en principio poco deseable, aunque los valores de azúcar residual se pueden considerar aceptables para un vino acabado. Esta cantidad de azúcar residual puede suponer un riesgo de cara a la estabilidad

microbiológica de los vinos, aunque también puede ser un factor deseable para una posterior inoculación con una bacteria láctica. La inoculación con *K. apiculata* apenas influyó en la dinámica de consumo del azúcar, aunque, al contrario que la cepa T73, las muestras inoculadas concluyeron la fermentación alcohólica con valores significativamente más elevados de fructosa. Esta diferencia entre ambas levaduras, puede hacer deseable su presencia conjunta en la fermentación, a fin de agotar al máximo los azúcares fermentables, aunque los efectos de *K. apiculata* se vieron atenuados en las muestras que también fueron inoculadas con la cepa T73.

La adición de SO₂ tan sólo condujo a una disminución significativa de la velocidad de fermentación en las etapas iniciales de la misma, sin producir efectos sobre la cantidad de azúcar residual. Este hecho concuerda con el efecto del sulfitado hallado sobre las poblaciones levaduriformes.

3.- COMPOSICIÓN DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL

3.1 Identificación y cuantificación

Se identificaron un total de 59 compuestos pertenecientes a la fracción volátil de los vinos mediante separación por cromatografía de gases de alta resolución. La identificación se realizó mediante la comparación con los tiempos de retención relativos con los de patrones conocidos y comparación de los espectros de masas con los de las librerías NBS y Willey. En la tabla 13 aparecen los 59 compuestos por orden de elución indicando el método de identificación empleado.

Tabla 13. Compuestos identificados en los vinos por orden de elución cromatográfica

Número	Compuesto	rRT	MS	Fr
1	Acetato de etilo	*	*	1.266
2	Acetato de isobutilo	*	*	0.0061
3	1-Propanol	*	*	12.18
4	Butirato de etilo	*	*	
5	Isovaleriato de etilo	*	*	
6	2-Metil-1-propanol	*	*	3.658
7	1,1 Dietoxipentano		*	
8	Acetato de isoamilo	*	*	0.776
9	1-Butanol	*	*	0.521
10	1,3-Dimetil benceno		*	
11	Acetato de amilo	*	*	
12	3-metil-1-butanol	*	*	1.381
13	2-metil-1-butanol	*	*	30.59
14	Caproato de etilo	*	*	0.8779
15	Acetoína	*	*	1.516
16	Isobutirato de isoamilo	*	*	0.7328
17	Lactato de etilo	*	*	2.546
18	1-hexanol	*	*	0.9222
19	trans-3-Hexén-1-ol	*	*	0.8956
20	3-Etoxi-1-propanol		*	
21	cis-3-Hexén-1-ol	*	*	1.002
22	Ácido acético	*	*	47.79
23	Caprilato de etilo	*	*	1.136
24	1-Heptanol	*	*	0.1439
25	Caproato de isoamilo		*	
26	3-Hidroxibutirato de etilo	*	*	1.636
27	2,3-Butanodiol (a)	*	*	21.43
28	Ácido isobutírico	*	*	1.587

29	2,3-Butanodiol (b)	*	*	21.43
30	2,3-Butanodiol (c)	*	*	21.43
31	1,1-Metilpropoxi-2-butanol		*	
32	N-Etilacetamida		*	
33	γ -Butirolactona	*	*	0.641
34	1-metoxi-2-butanol		*	
35	Caprato de etilo	*	*	
36	Ácido isovalérico	*	*	0.825
37	Caprilato de isoamilo		*	
38	Succinato de dietilo	*	*	0.798
39	9-Decenoato de etilo		*	
40	3-Metiltio-1-propanol	*	*	1.509
41	Ácido valérico	*	*	1.324
42	Diacetato de 1,3-propanodiol		*	
43	1-Decanol	*	*	
44	Malato de dietilo	*	*	1.231
45	4-Hidroxibutirato de etilo		*	
46	Acetato de 2-fenetilo	*	*	
47	Ácido hexanoico	*	*	3.133
48	N-Hexilacetamida		*	
49	Laurato de etilo	*	*	
50	Alcohol bencílico	*	*	0.680
51	2-Feniletanol	*	*	0.815
52	Ácido heptanoico		*	
53	Ácido caprílico	*	*	1.171
54	N-acetilglicinato de etilo		*	
55	Ácido cáprico	*	*	1.212
56	Benzoato de 2-fenetilo		*	
57	Ácido 10-undecenoico		*	
58	Ácido monoetilsuccínico		*	
59	Ácido láurico	*	*	1.936

rRT y MS = compuestos identificados por tiempos de retención relativos y espectrometría de masas respectivamente. Fr = factores de respuesta.

Para la cuantificación se partió de disoluciones patrón construidas con concentraciones conocidas de los compuestos puros, se calcularon los factores de respuesta respecto al patrón interno (2-nonanol, tabla 13) y las correspondientes rectas de calibrado (siempre con $r^2 > 0.999$) tal y como se detalla en Material y Métodos. No fue posible disponer de todos los patrones puros de los compuestos identificados, por lo que no todos fueron cuantificados. Aquellos que no fueron cuantificados se analizaron según la relación de su área cromatográfica respecto a la del patrón interno y refiriendo luego dicha relación, en tanto por ciento, a la cantidad del compuesto en la microvinificación #1, tanto para la experiencia OA27 como para

la OA16. Se eligió la muestra #1 por ser la que reproducía las condiciones basales de las variables ensayadas.

3.2. Experiencia OA27

Las concentraciones o valores relativos de los componentes identificados en las 27 microvinificaciones, se muestran en la tabla 14 agrupados según las principales familias químicas. En los siguientes apartados se comentan los resultados más sobresalientes fruto del análisis estadístico de estos datos. La adición de SO₂ tan sólo produjo disminuciones significativas de benzoato de 2-fenetilo ($p < 0.05$), cis-3-hexén-1-ol, ácido valérico ($p < 0.001$) y los alcoholes totales ($p < 0.01$). Estos efectos se estudian en mayor profundidad en la experiencia OA16, donde se pudo observar una mayor influencia del sulfitado sobre la composición de la fracción volátil, también en el sentido de reducir las concentraciones de numerosos de sus componentes.

3.2.1. Influencia de las inoculaciones con levaduras

Debido a la inoculación con T73 se registraron disminuciones significativas en la concentración de acetato de isobutilo ($p < 0.05$), acetato de isoamilo ($p < 0.05$), benzoato de 2-fenetilo ($p < 0.05$), 2-metil-1-propanol ($p = 0.062$), acetaldehído ($p = 0.100$), ácido isobutírico ($p < 0.05$), ácido 10-undecenoico ($p < 0.001$) y 2,3-butanodiol ($p < 0.05$). También fue significativa la disminución producida en la media de alcoholes superiores en valor relativo ($p < 0.05$). Las medias con sus intervalos LSD según los niveles de inoculación se muestran en la figura 34.

La inoculación con *K. apiculata* provocó disminuciones significativas de butirato de etilo ($p = 0.078$), isovalerato de etilo ($p = 0.103$), N-acetilglicinato de etilo ($p < 0.01$), 3-metil-1-propanol ($p < 0.05$), ácido isovalérico ($p < 0.05$) y ácido 10-undecenoico ($p < 0.01$), y aumento de cis-3-hexén-1-ol ($p < 0.05$), y N-etilacetamida ($p < 0.05$). También se detectó un aumento significativo de la suma de los ácidos ($p = 0.073$). Los intervalos LSD para las medias de los compuestos que resultaron con diferencias más significativas tras la inoculación con *K. apiculata* se muestran en la figura 35.

Tabla 14. Concentraciones (mg/l) o valores relativos (*) de los componentes de la fracción volátil de los vinos

Ésteres	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Acetato de etilo	60.22	9.118	31.10	12.67	51.16	8.108	15.69	17.52	22.35	26.95	33.48	7.648	13.84	15.60
Acetato de isobutilo	0.1334	0.0690	0.1748	0.0481	0.1762	0.0974	0.1690	0.0539	0.0655	0.0978	0.0668	0.1211	0.0988	0.0704
Butirato de etilo*	100	15.45	48.00	30.65	71.63	18.30	155.9	21.68	35.41	60.46	21.08	9.303	55.51	12.23
Isovaleriato de etilo*	100	33.47	111.6	44.53	81.03	40.55	64.76	39.81	59.18	269.5	44.11	32.39	68.46	31.63
Acetato de isoamilo	0.2100	0.1516	0.4711	0.0126	1.007	0.1708	0.9678	0.0250	0.2766	0.6014	0.4282	0.2419	0.5786	0.0198
Acetato de amilo*	100	54.69	79.52	66.67	77.89	63.52	153.4	61.25	62.01	115.0	64.76	68.22	57.31	66.69
Caproato de etilo	0.0636	0.0860	0.1712	0.0795	0.0895	0.0698	0.0908	0.0843	0.0626	0.0887	0.0800	0.0921	0.0817	0.0817
Isobutirato de isoamilo	0.0056	0.0141	0.0219	0.0037	0.0179	0.0132	0.0193	0.0121	0.0071	0.0231	0.0114	0.0160	0.0210	0.0038
Lactato de etilo	1.995	7.370	2.237	2.827	1.390	2.360	9.364	2.246	0.9567	3.332	1.038	3.117	4.126	1.911
Caprilato de etilo	0.6886	0.5762	0.8087	0.5600	0.9037	0.4983	0.8478	0.6946	1.4640	0.7316	1.083	0.5201	0.9243	1.205
Caproato de isoamilo*	100	64.97	229.9	134.9	97.27	53.26	546.8	147.7	22.69	319.7	28.86	84.36	109.5	122.5
3-Hidroxibutirato de etilo	0.1076	0.2785	0.1482	0.1277	0.2748	0.2142	0.7717	0.0930	0.2040	0.3048	0.2001	0.3625	0.5289	0.1721
Caprato de etilo*	100	83.74	74.44	42.90	98.86	50.91	52.47	75.88	68.86	51.14	74.57	57.42	56.98	29.18
Caprilato de isoamilo*	100	40.77	119.8	80.62	78.53	39.66	430.6	91.16	19.57	202.8	25.31	64.71	96.73	100.5
Succinato de dietilo	0.1978	0.7893	0.2862	0.1654	0.1105	0.2859	1.9863	0.1790	0.1182	0.2926	0.1250	0.4070	1.0982	0.1992
9-Decenoato de etilo*	100	139.3	192.0	41.55	81.05	120.4	114.7	41.65	395.4	56.35	389.7	272.1	115.0	134.9
Diacetato de 1,3-propanodiol*	100	103.7	121.6	91.53	164.6	87.74	122.8	91.92	90.42	148.9	93.96	110.4	116.3	133.5
Malato de dietilo	0.0790	0.2103	0.3004	0.1100	0.1895	0.1374	0.7621	0.1144	0.0844	0.2363	0.1051	0.2579	0.2873	0.0839
4-Hidroxibutirato de etilo*	100	106.0	130.5	189.3	55.39	118.22	258.6	64.60	55.41	244.3	92.34	200.3	237.5	76.05
Acetato de 2-fenitilo*	100	56.21	118.9	112.9	83.62	71.59	241.0	89.12	29.72	191.3	54.00	49.21	146.8	108.1
Laurato de etilo*	100	120.0	159.2	164.1	96.95	123.7	166.7	146.1	87.40	209.1	79.43	229.5	190.1	160.3
N-Acetilglicinato de etilo*	100	84.93	153.1	64.28	90.55	80.60	237.4	83.81	78.93	194.8	153.7	178.8	213.5	63.53
Benzoato de 2-fenitilo*	100	30.85	17.18	35.85	15.07	6.622	31.03	13.31	40.434	56.52	41.83	12.38	86.84	19.69
Ácido monoetilsuccínico*	100	631.0	219.2	94.7189	142.0	160.2	493.2	214.8	118.9	300.1	102.6	174.6	235.6	267.8
Total ésteres*	100	144.5	155.6	83.86	130.9	93.97	310.3	89.49	92.63	182.4	104.0	137.2	183.8	93.72
Ésteres (cont.)	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
Acetato de etilo	49.23	45.73	10.28	7.080	54.63	24.84	36.67	100.1	32.00	15.78	23.57	51.04	12.56	
Acetato de isobutilo	0.2551	0.1298	0.2495	0.2449	0.1342	0.3702	0.0779	0.0827	0.0650	0.0732	0.0546	0.0751	0.1857	
Butirato de etilo*	70.31	51.05	177.6	13.11	82.60	42.50	12.77	48.58	20.43	27.45	21.20	35.86	45.43	

Isovaleriato de etilo*	58.10	72.62	109.2	34.77	92.89	87.56	35.02	65.15	70.95	50.18	52.81	102.1	123.7	
Acetato de isoamilo	1.199	0.7001	1.717	0.0194	0.3532	1.098	0.1214	0.1774	0.0494	0.0722	0.0336	0.5028	0.5020	
Acetato de amilo*	124.3	133.8	125.5	46.43	90.83	161.4	56.07	75.93	84.00	81.31	87.94	155.5	73.84	
Caproato de etilo	0.0906	0.1255	0.0797	0.0538	0.0971	0.1320	0.0528	0.0650	0.0775	0.0754	0.0978	0.0938	0.1016	
Isobutirato de isoamilo	0.0198	0.0189	0.0212	0.0002	0.0263	0.0322	0.0044	0.0083	0.0190	0.0058	0.0105	0.0136	0.0128	
Lactato de etilo	2.022	1.672	3.149	2.0638	5.795	3.714	0.7620	1.215	14.05	3.000	3.379	1.243	1.810	
Caprilato de etilo	1.660	0.8823	1.125	0.3919	1.915	1.169	1.550	1.341	2.000	0.5154	1.240	1.875	1.593	
Caproato de isoamilo*	162.9	29.81	349.2	90.66	82.60	363.8	12.66	45.55	73.47	128.1	165.6	39.46	556.6	
3-Hidroxibutirato de etilo	0.3149	0.2764	0.4706	0.1228	0.4344	0.2407	0.1513	0.1489	0.3428	0.2392	0.1191	0.3646	0.2404	
Caprato de etilo*	28.94	97.30	73.73	74.32	81.84	156.9	51.22	68.98	78.79	46.58	46.69	125.6	63.59	
Caprilato de isoamilo*	139.7	44.47	322.0	68.68	81.70	213.9	12.58	79.81	107.6	99.15	97.16	37.96	365.8	
Succinato de dietilo	0.0573	0.2548	1.026	0.2579	1.076	0.2428	0.1098	0.1836	7.210	0.3849	0.1976	0.1860	0.2901	
9-Decenoato de etilo*	65.04	431.8	76.04	27.27	143.3	79.29	360.4	110.0	145.6	44.99	99.99	428.3	46.32	
Diacetato de 1,3-propanodiol*	136.1	116.4	145.7	128.7	93.68	153.3	69.09	150.0	107.1	189.9	111.9	152.4	261.4	
Malato de dietilo	0.2876	0.0970	0.9403	0.1984	0.1099	0.1108	0.0663	0.0810	0.1387	0.1582	0.0725	0.0967	0.5472	
4-Hidroxibutirato de etilo*	29.74	139.8	189.9	159.6	167.1	98.74	65.51	60.90	138.0	142.2	225.3	76.42	111.3	
Acetato de 2-fenetilo*	111.7	62.08	140.6	89.11	91.44	177.6	39.43	87.32	51.47	95.91	149.3	43.43	218.2	
Laurato de etilo*	124.0	125.3	103.4	250.3	216.0	239.92	94.66	93.09	208.0	246.8	181.2	120.3	144.8	
N-Acetilglicinato de etilo*	134.7	187.9	194.7	72.43	58.56	118.8	81.12	120.5	105.6	107.4	101.0	152.4	129.9	
Benzoato de 2-fenetilo*	34.46	61.18	30.31	13.33	86.74	69.07	9.35	37.00	15.27	21.57	48.61	16.36	25.81	
Ácido monoetilsuccínico*	60.57	113.1	343.7	194.4	285.9	306.2	234.3	181.0	4105	140.08	252.7	169.7	164.1	
Total ésteres*	152.0	142.8	265.5	92.13	178.8	197.2	83.98	98.98	459.6	108.4	113.7	138.1	187.6	
Alcoholes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1-propanol	9.189	4.291	12.51	6.870	22.68	4.711	7.146	8.3456	6.859	10.74	12.48	6.246	7.559	12.59
2-Metil-1-propanol	32.94	17.26	30.52	15.22	40.63	15.73	27.14	13.79	12.78	40.45	20.99	19.39	32.99	15.15
1-Butanol	0.1663	0.1616	0.3217	0.1605	0.1518	0.1733	0.2073	0.2140	0.0862	0.2951	0.1079	0.2178	0.2110	0.2161
3-Metil-1-butanol	126.3	120.8	170.3	77.44	166.2	115.8	128.5	94.96	92.43	200.7	134.9	151.5	147.2	71.22
2-Metil-1-butanol	3.023	1.817	1.944	0.826	1.607	1.504	6.880	0.8807	2.895	1.128	4.042	1.893	6.798	0.7197
1-Hexanol	0.3889	0.3537	0.7134	0.4709	0.4763	0.4530	0.6674	0.6127	0.4874	0.9723	0.6072	0.5720	0.5259	0.5596
trans-3-Hexén-1-ol	0.0262	0.0295	0.0320	0.0307	0.0287	0.0251	0.0345	0.0294	0.0260	0.0374	0.0290	0.0345	0.0329	0.0347
3-Etoxi-1-propanol*	100	29.07	24.69	21.31	320.9	21.22	60.07	25.57	52.13	41.94	50.32	28.63	22.79	180.2
cis-3-Hexén-1-ol	0.0131	0.0150	0.0158	0.0100	0.0095	0.0175	0.0686	0.0250	0.0124	0.0533	0.0148	0.0231	0.0143	0.0982

1-Heptanol	0.0262	0.0302	0.0468	0.0364	0.0293	0.0319	0.0326	0.0348	0.0418	0.0512	0.0396	0.0359	0.0386	0.0267
1,1-Metilproxi-2-propanol*	100	89.75	166.4	60.82	96.52	61.93	394.0	87.86	31.89	236.5	51.65	102.5	89.87	83.43
1-Metoxi-2-butanol*	100	69.19	45.81	24.02	80.08	43.55	54.86	34.92	43.83	30.34	47.52	66.98	56.55	31.45
3-Metiltío-1-propanol	2.062	1.821	0.9432	1.394	1.118	0.4150	0.6925	1.978	0.5395	2.931	0.8307	0.4684	0.6601	0.6576
1-Decanol*	100	122.3	97.84	297.6	86.40	36.93	108.3	105.2	76.50	208.5	88.41	74.41	293.6	68.02
Alcohol bencílico	0.2589	0.4822	0.7470	0.8759	0.3668	0.4364	0.5152	0.7953	0.2931	0.9036	0.3317	0.7510	0.6739	0.6472
2-Feniletanol	50.92	58.84	51.45	27.63	20.87	42.91	52.29	27.68	17.93	45.46	20.93	74.96	49.94	24.04
Total alcoholes*	100	92.84	124.7	101.4	117.7	78.04	157.3	104.3	74.47	169.0	92.65	110.3	126.3	138.2
Alcoholes (cont.)	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
1-propanol	16.65	18.97	5.615	2.136	11.23	12.46	6.276	21.16	4.738	3.836	11.16	12.43	17.70	
2-Metil-1-propanol	107.3	44.45	20.63	4.161	39.21	28.13	12.90	47.86	19.11	8.586	26.93	27.17	45.74	
1-Butanol	0.1738	0.1843	0.1513	0.0846	0.3188	0.3756	0.0746	0.1155	0.2114	0.1258	0.2511	0.1809	0.2419	
3-Metil-1-butanol	154.7	209.8	131.5	30.67	187.6	194.7	80.00	113.6	115.5	70.02	91.43	150.9	126.4	
2-Metil-1-butanol	2.404	6.168	3.925	1.139	7.754	1.467	1.734	0.8620	4.924	2.595	0.7173	7.333	2.926	
1-Hexanol	0.3728	0.8843	0.5517	0.2620	0.6669	1.079	0.4211	0.4199	0.5117	0.3583	0.4623	0.2847	0.5977	
trans-3-Hexén-1-ol	0.0264	0.0368	0.0338	0.0261	0.0341	0.0465	0.0244	0.0238	0.0378	0.0299	0.0334	0.0337	0.0329	
3-Etoxi-1-propanol*	294.2	66.26	40.19	65.11	39.03	38.04	29.36	99.28	43.59	91.82	21.29	140.6	1511	
cis-3-Hexén-1-ol	0.0226	0.0153	0.0144	0.0918	0.0407	0.0138	0.0177	0.0111	0.0760	0.0166	0.0720	0.0093	0.0727	
1-Heptanol	0.0293	0.0442	0.0301	0.0302	0.0482	0.0721	0.0343	0.0304	0.0325	0.0264	0.0347	0.0364	0.0416	
1,1-Metilproxi-2-propanol*	187.4	41.17	324.8	68.42	70.54	237.0	17.38	43.51	57.28	73.99	81.86	60.44	381.4	
1-Metoxi-2-butanol*	26.19	65.85	74.43	47.44	63.76	53.70	24.34	44.16	54.07	32.08	36.10	61.96	44.46	
3-Metiltío-1-propanol	1.149	1.629	0.8375	0.9201	0.4978	2.092	0.8948	1.798	0.4823	1.526	0.5471	2.334	0.9095	
1-Decanol*	106.1	104.7	227.4	46.69	189.0	85.66	27.77	40.54	72.85	74.82	247.0	102.3	37.48	
Alcohol bencílico	0.2603	0.4434	0.3786	1.070	0.4898	1.174	0.3322	0.3794	0.6309	1.191	0.8179	0.5016	0.1795	
2-Feniletanol	37.96	23.09	65.41	48.86	35.85	49.82	23.16	14.58	75.32	57.52	27.27	43.71	54.98	
Total alcoholes*	133.7	128.0	120.4	119.4	142.4	159.5	65.99	90.79	132.0	102.3	134.9	116.1	241.3	
Ácidos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ácido acético	600	187	576	648	355	311	200	598	177	548	209	325	200	381
Ácido isobutírico	1.740	3.193	4.772	1.931	4.281	2.488	2.892	1.563	1.864	3.074	4.199	3.382	3.234	1.672
Ácido isovalérico	0.8710	0.9083	1.038	0.7374	0.9122	0.8886	2.411	0.5682	0.6652	1.642	0.8779	1.514	1.598	0.5474
Ácido valérico	0.1448	0.1486	0.1900	0.1307	0.0870	0.1182	0.1580	0.1792	0.1229	0.1460	0.0933	0.1427	0.1904	0.0980
Ácido hexanoico	1.444	1.932	0.9477	0.9524	1.834	1.669	2.232	0.9093	2.397	1.483	2.535	2.071	1.993	1.502

Ácido heptanoico*	100	93.50	96.78	52.92	25.46	51.48	200.28	37.48	53.93	38.74	50.41	81.32	45.34	66.43
Ácido octanoico	1.241	1.070	0.8695	0.6669	1.535	0.9992	1.351	1.133	2.559	1.676	1.675	0.9641	1.386	2.423
Ácido decanoico	0.8055	0.5447	0.4884	0.2764	0.2914	0.2472	0.4287	0.3579	0.2682	0.8165	0.4023	0.3635	1.137	0.5493
Ácido 10-undecenoico*	100	28.79	18.73	9.96	17.00	19.05	28.07	21.04	4.746	21.60	2.071	25.20	64.50	39.33
Ácido laúrico	1.2886	0.7895	1.096	1.073	0.6148	0.2359	0.7747	0.8168	0.2814	1.553	0.3735	0.3573	0.3419	0.6453
Total ácidos*	100	125.4	290.4	108.3	148.3	98.78	150.5	151.7	115.0	192.3	120.9	113.2	130.2	133.0
Ácidos (cont.)	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
Ácido acético	297	207	210	754	210	758	330	314	304	627	639	321	671	
Ácido isobutírico	3.337	2.798	2.883	1.025	2.241	1.301	1.003	2.349	1.700	1.656	3.966	7.572	4.196	
Ácido isovalérico	0.5231	1.193	2.946	0.5980	1.329	0.8861	0.6612	1.122	1.481	1.331	1.003	1.281	1.118	
Ácido valérico	0.1082	0.1483	0.3040	0.0973	0.1627	0.1779	0.1377	0.1526	0.1251	0.1328	0.1560	0.1952	0.1192	
Ácido hexanoico	1.179	2.992	1.324	0.447	2.387	1.226	2.210	1.172	1.835	0.8829	0.7903	3.440	0.8159	
Ácido heptanoico*	46.10	48.17	33.73	64.17	70.41	94.32	27.17	40.12	76.25	44.56	45.10	90.09	39.96	
Ácido octanoico	1.807	1.884	1.531	0.4959	2.099	1.703	5.004	1.452	2.284	0.3684	0.8756	2.637	0.8042	
Ácido decanoico	0.2076	0.3507	0.3521	0.2602	0.5961	0.5238	0.2962	0.2036	0.9764	0.4088	0.3435	0.7806	0.2263	
Ácido 10-undecenoico*	32.75	7.863	44.79	4.801	69.62	26.41	46.66	12.63	4.225	9.293	25.05	46.41	25.41	
Ácido laúrico	0.9311	0.3092	0.4168	1.251	0.6295	1.375	0.4609	0.5124	0.7532	1.310	0.8548	1.146	1.024	
Total ácidos*	111.7	135.9	151.6	58.49	176.6	169.6	164.0	160.0	190.2	80.88	243.15	225.5	138.6	
Otros	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Acetaldehído	148.0	7.020	45.97	12.05	139.7	148.0	56.33	32.07	545.04	58.22	53.08	148.0	224.5	29.08
1,1-Dietoxipentano*	100	153.7	170.1	26.35	161.0	93.86	363.5	26.92	87.81	207.6	48.50	165.0	184.2	26.15
1,3-Dimetilbenceno*	100	30.38	183.2	48.36	72.16	59.25	47.46	66.11	61.81	300.1	53.78	34.70	112.4	51.58
Acetoína	0.3370	1.018	2.169	2.516	0.8926	0.6396	5.670	2.258	0.3248	2.278	0.3536	1.127	0.7762	0.8359
2,3-Butanodiol (a)	573.9	439.5	1118	580.0	594.8	526.5	306.3	853.1	657.2	841.2	597.1	610.3	674.7	869.8
2,3-Butanodiol (b)	150.0	94.76	210.8	142.9	121.4	87.67	69.56	181.7	130.2	169.4	116.3	108.9	138.5	207.9
2,3-Butanodiol (c)	36.49	37.64	49.34	30.42	31.07	31.78	41.10	32.48	29.27	38.84	25.93	30.57	39.66	38.33
N-Etilacetamida*	100	73.17	166.1	100.7	17.66	77.61	277.2	85.05	85.23	93.55	70.37	85.80	98.78	114.6
γ-Butirolactona	3.769	3.218	2.589	4.431	1.090	1.786	15.66	2.162	2.826	9.158	1.579	2.724	7.002	3.828
N-Hexilacetamida*	100	86.19	93.44	153.6	109.5	170.4	82.65	189.7	122.3	242.7	70.53	105.0	41.44	150.6
Total otros*	100	112.2	195.3	181.2	112.6	121.6	386.8	202.8	106.2	237.1	79.78	151.3	158.5	148.6
Otros (cont.)	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
Acetaldehído	49.62	50.65	134.2	14.43	187.2	177.9	56.78	72.65	9.590	12.44	22.57	49.10	5.230	

1,1-Dietoxipentano*	102.6	200.2	576.4	25.74	127.2	265.5	85.53	196.7	62.43	54.07	51.86	211.5	178.7
1,3-Dimetilbenceno*	128.2	98.63	66.76	43.64	145.6	309.8	38.07	64.71	48.63	61.23	97.26	78.91	55.02
Acetoína	4.111	0.3525	3.582	1.098	0.4551	2.678	0.1884	0.8016	2.442	1.861	1.845	0.2945	10.20
2,3-Butanodiol (a)	897.5	581.2	548.0	337.4	866.3	1351	247.3	455.0	581.6	650.0	1067	653.4	984.2
2,3-Butanodiol (b)	217.7	123.6	114.0	83.80	192.5	263.5	41.13	104.3	120.3	141.7	214.6	121.6	255.8
2,3-Butanodiol (c)	30.79	39.39	34.25	33.54	55.61	43.28	29.02	34.79	44.89	28.59	47.09	29.61	35.31
N-Etilacetamida*	68.25	92.09	113.6	62.45	134.0	68.47	100.5	62.11	383.1	155.3	420.9	76.92	133.3
γ-Butirolactona	0.8987	4.330	8.823	4.769	10.07	4.197	6.322	6.249	17.74	1.905	5.417	3.746	3.083
N-Hexilacetamida*	221.9	138.4	91.90	100.5	42.80	177.7	74.01	80.83	65.82	113.0	114.6	64.33	81.51
Total otros*	218.9	145.0	309.8	112.5	170.3	241.3	104.9	141.9	285.6	172.6	229.0	130.5	421.1

**Compuestos no cuantificados, en tanto por ciento respecto a la muestra #1*

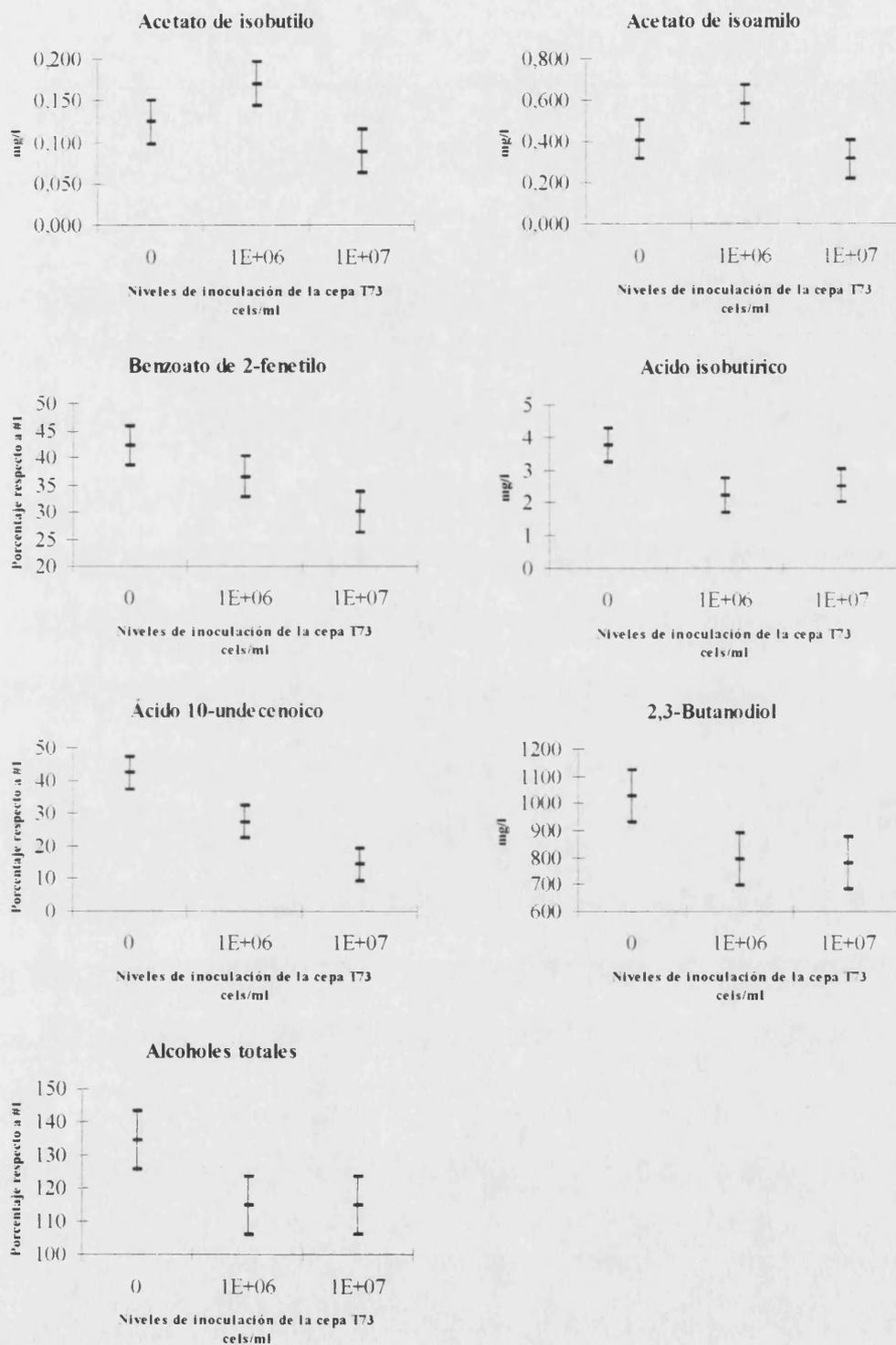


Figura 34. Intervalos LSD para las medias de compuestos de la fracción volátil según el nivel de inoculación con la cepa T73

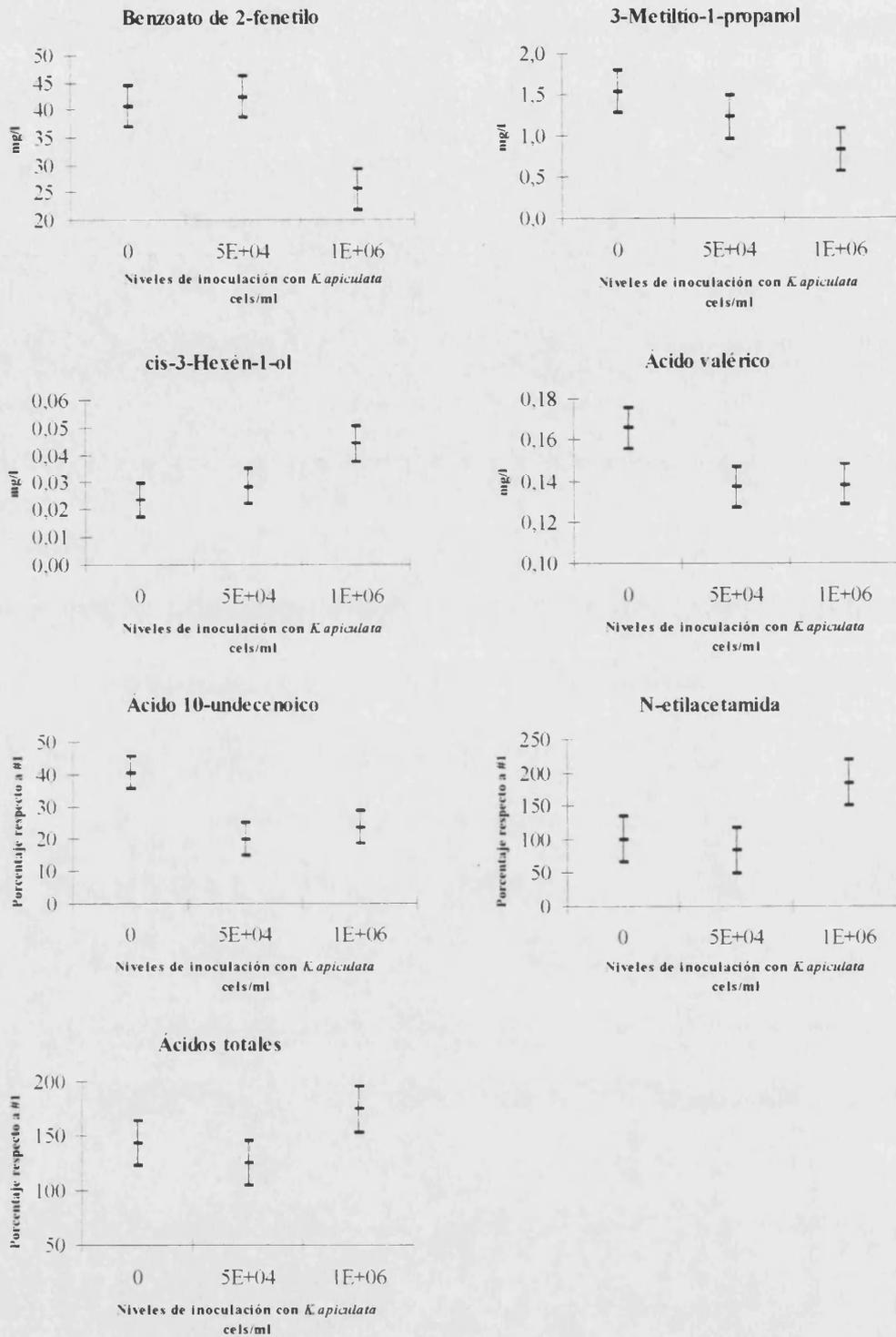


Figura 35. Intervalos LSD para las medias de compuestos de la fracción volátil según el nivel de inoculación con *K. apiculata*

3.2.2. *Influencia de la adición de enzimas pectolíticos*

La adición de un preparado comercial de enzimas pectolíticos, produjo aumentos significativos de algunos componentes de la fracción volátil. Entre ellos son de especial relevancia los aumentos causados en la concentración de acetato de etilo ($p < 0.05$) y ácido acético ($p < 0.01$). Los otros compuestos que registraron aumentos significativos tras la adición del preparado enzimático fueron el caprilato de etilo ($p < 0.001$), diacetato de 1,3-propanodiol ($p < 0.01$), laurato de etilo ($p < 0.05$) y cis-3-hexén-1-ol ($p < 0.05$). También se produjo un aumento significativo del total de alcoholes superiores. ($p < 0.05$) La figura 36 muestra los intervalos LSD para las medias de los compuestos que registraron un efecto significativo para la adición del preparado comercial de enzimas pectolíticos.

3.2.3 *Influencia de la adición de vitaminas y fosfato diamónico.*

Las adiciones de vitaminas B1 y C afectaron significativamente a la concentración final de diversos componentes de los vinos producidos. Los compuestos que sufrieron de forma más significativamente el efecto de la adición de vitamina C fueron el 4-hidroxibutirato de etilo ($p < 0.001$) y el benzoato de 2-fenetilo ($p < 0.01$), que presentaron concentraciones más bajas en los vinos adicionados con la vitamina, mientras que el malato de dietilo aumentó significativamente su concentración tras la adición de la vitamina ($p < 0.01$). Estos resultados más significativos se representan en la figura 37. La influencia de la adición de vitamina C también produjo efectos significativos sobre el caproato de isoamilo, caprilato de isoamilo, cis-3-hexén-1-ol, 1-heptanol, 1,1-metilpropoxi-2-butanol, acetaldehído, ácido valérico, ácido 10-undecenoico, 1,1-dietoxipentano, 1,3-dimetilbenceno y acetoina ($p < 0.05$ para todos ellos), pudiéndose observar las medias y los intervalos LSD para estos compuestos en la tabla 15.

La adición de vitamina B1 (tiamina), también provocó diferencias significativas en las concentraciones de varios de los componentes de la fracción volátil. Especialmente significativas fueron las disminuciones de benzoato de 2-fenetilo ($p < 0.0001$) y 1-decanol ($p < 0.01$) detectadas en los vinos en los que se había añadido tiamina (figura 38). También se detectaron efectos significativos de la adición de esta vitamina sobre el acetato de etilo, butirato de etilo, caprato de etilo, acetato de 2-fenetilo, trans-3-hexén-1-ol, 1-metoxi-2-butanol, ácido acético, ácido valérico, ácido decanoico, ácido 10-undecenoico y

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

γ -butirolactona ($p < 0.05$ para todos ellos). Las medias para estos compuestos según el nivel de adición del tiamina se muestran en la tabla 12 junto con sus intervalos LSD.

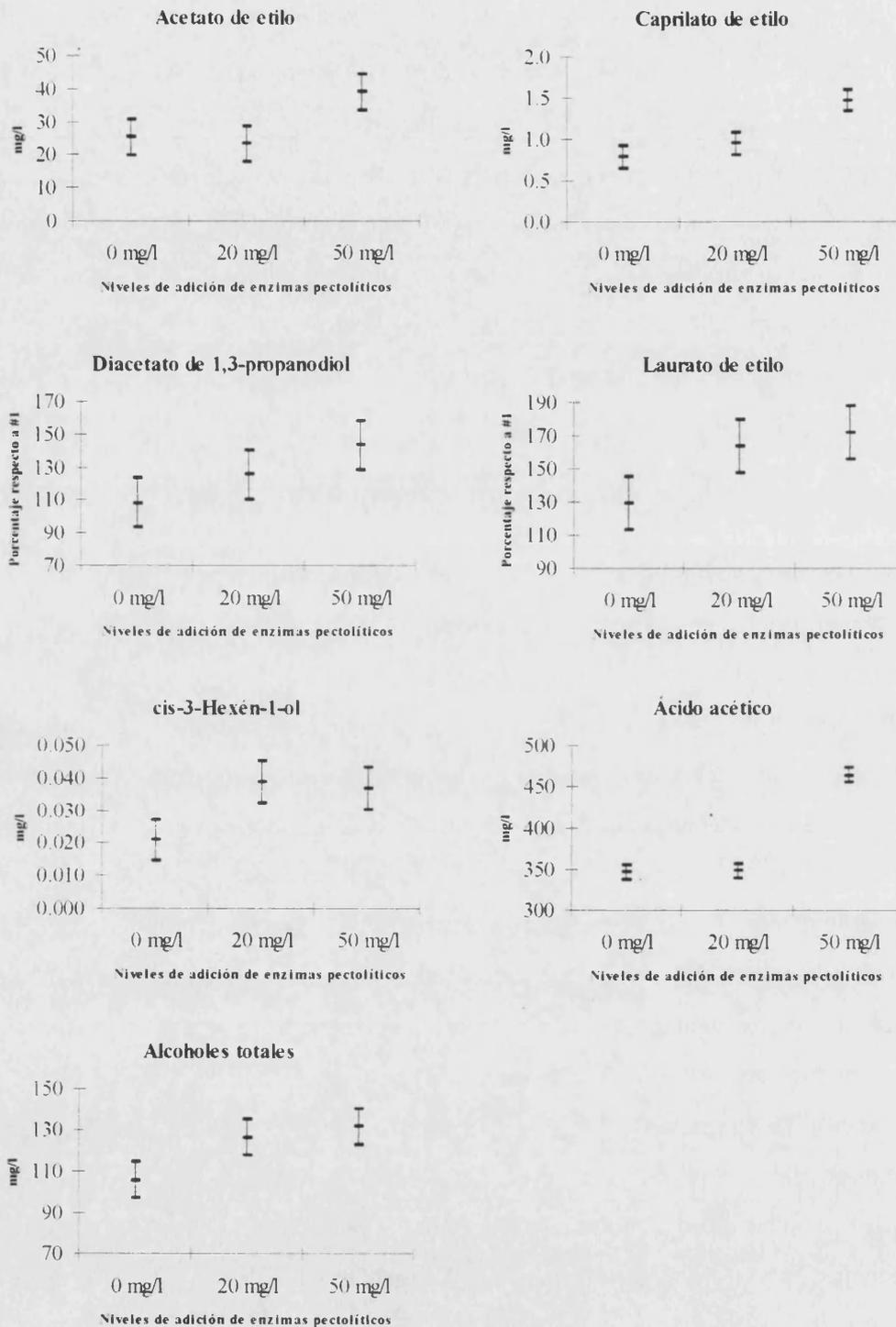


Figura 36. Intervalos LSD para las medias de compuestos de la fracción volátil según el nivel de adición de enzimas pectolíticas

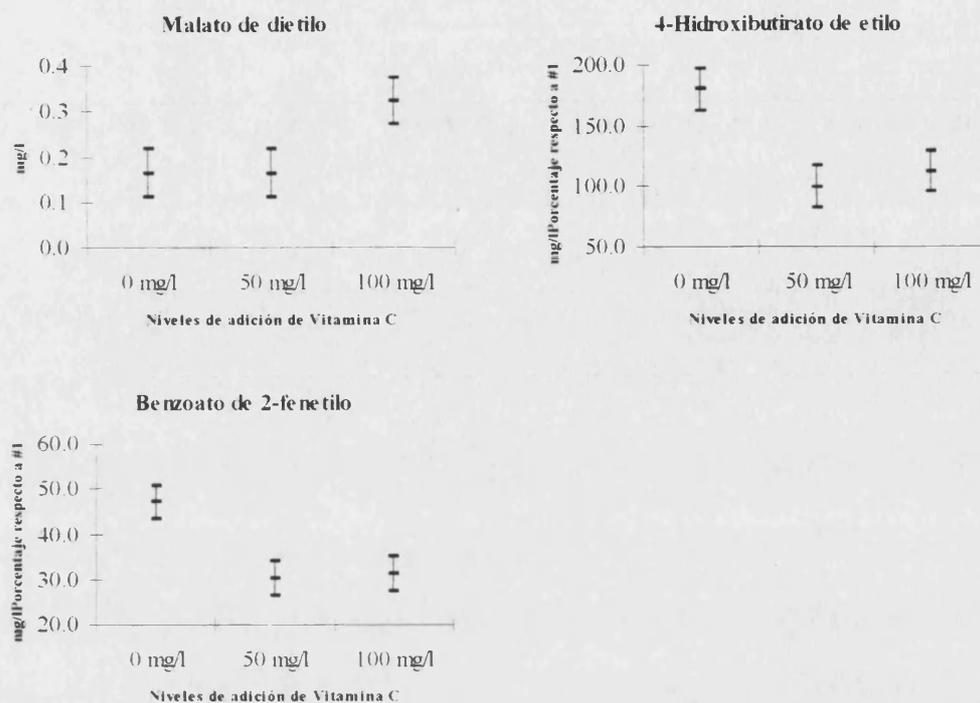


Figura 37. Intervalos LSD para las medias de compuestos de la fracción volátil según los niveles de adición de vitamina C

La adición de fosfato diamónico provocó principalmente un aumento de ácido isobutírico cuando el nivel de adición fue de 150 mg/l ($p < 0.01$), registrándose también efectos significativos de la adición de DAP sobre las concentraciones de caprilato de etilo, benzoato de 2-fenetilo, 1-metoxi-2-butanol, ácido acético, ácido octanoico y ácido 10-undecenoico ($p < 0.05$) tal y como se muestra en la tabla 17.

Tabla 15. Medias e intervalos LSD de distintos componentes de la fracción volátil según los niveles de adición de vitamina C

	Nivel de Adición de Vitamina			LSD
	0 mg/l	50 mg/l	100 mg/l	
Caproato de isoamilo*	143.0	103.1	216.5	± 36.14
Caprilato de isoamilo*	95.72	91.37	164.1	± 26.52
cis-3-Hexén-1-ol	0.0230	0.0307	0.0424	± 0.0064
1-Heptanol	0.0427	0.0313	0.0363	± 0.0042
Acetaldehído	98.01	77.51	49.51	± 22.25

1,1-metilpropoxi-2-butanol*	119.1	83.86	163.5	± 23.28
Ácido valérico	0.1493	0.1270	0.1645	± 0.099
Ácido 10-undecenoico*	37.68	23.19	23.13	± 5.025
1,1-Dietoxipentano*	147.0	100.8	191.4	± 30.28
1,3-Dimetilbenceno*	132.9	71.84	68.40	± 26.00
Acetoína	1.178	1.653	2.847	± 0.6726

*Compuestos no cuantificados, en tanto por ciento respecto a la muestra #1

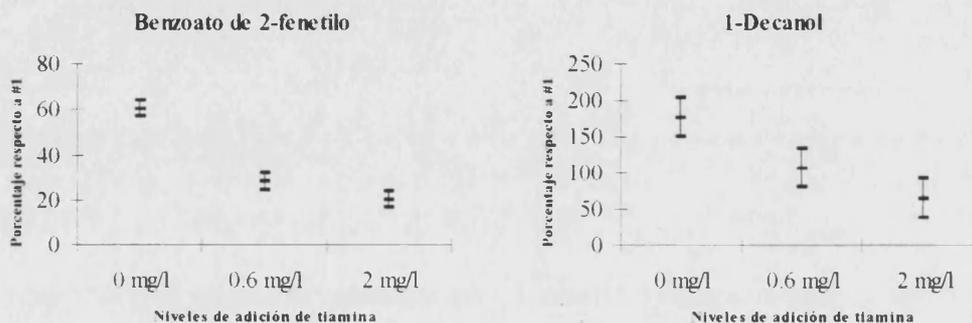


Figura 38. Intervalos LSD para las medias de compuestos de la fracción volátil según los niveles de adición de tiamina

Tabla 16. Medias e intervalos LSD de distintos componentes de la fracción volátil según los niveles de adición de tiamina

	Nivel de Adición de Tiamina			LSD
	0 mg/l	0.6 mg/l	2 mg/l	
Acetato de etilo	39.3	27.2	21.2	± 5.4
Butirato de etilo	67.3	46.5	31.1	± 13.8
Caprato de etilo	66.5	88.6	57.4	± 11.6
Acetato de 2-fenilo*	131.4	89.4	91.5	± 14.7
trans-3-Hexén-1-ol	0.0322	0.0337	0.0286	± 0.002
1-Metoxi-2-butanol*	52.8	56.4	41.6	± 5.70
Ácido acético	336	369	452	± 8.8
Ácido valérico	0.154	0.157	0.130	± 0.01
Ácido decanoico	0.551	0.531	0.307	± 0.101
Ácido 10-undecenoico*	37.7	20.0	23.6	± 5.0
γ-butirolactona	7.34	5.15	2.99	± 1.61

*Compuestos no cuantificados, en tanto por ciento respecto a la muestra #1

3.2.4 Influencia de la oxigenación

La agitación del mosto durante el proceso fermentativo fue muy influyente en las concentraciones de muchos de los compuestos de la fracción volátil, y en casi todos los casos, los vinos producidos con agitación tuvieron una mayor cantidad de los compuestos. Así, hubo un aumento significativo de acetato de isoamilo, caproato de isoamilo, caprilato de isoamilo, malato de dietilo, acetato de 2-fenetilo, 1,1-metilpropoxi-2-butanol, 1,1-dietoxipentano, todos ellos con $p < 0.0001$ (figura 39); acetato de isobutilo, butirato de etilo, 2-metil-1-propanol, acetoina y los alcoholes totales relativos con $p < 0.001$; isovaleriato de etilo, isobutirato de isoamilo, diacetato de 1,3-propanodiol, N-acetilglicinato de etilo, 1-propanol, 1-pentanol y 1,3-dimetilbenceno con $p < 0.01$; y acetato de etilo, acetato de amilo, caproato de etilo, 1-butanol, 3-metil-1-butanol, 1-hexanol, ácido acético, ácido isovalérico, ácido valérico, y 2,3-butanodiol con $p < 0.05$ (tabla 18).

Tabla 17. Medias e intervalos LSD de distintos componentes de la fracción volátil según los niveles de adición de DAP.

	Nivel de Adición de DAP			LSD
	0 mg/l	150 mg/l	300 mg/l	
Caprilato de etilo	0.93	1.00	1.27	± 0.14
Benzoato de 2-fenetilo*	36.3	28.8	43.4	± 3.8
1-Metoxi-2-butanol*	59.2	48.3	43.3	± 5.7
Ácido isobutírico	2.457	3.899	2.123	± 0.5136
Ácido acético	360	447	350	± 8.8
Ácido octanoico	1.24	1.31	2.16	± 0.31
Ácido 10-undecenoico*	25.7	21.3	37.0	± 5.0

*Compuestos no cuantificados, en tanto por ciento respecto a la muestra = 1

La adición de oxígeno directamente al mosto antes del comienzo de la fermentación, no fue tan influyente, registrándose un aumento significativo ($p < 0.05$) de cis-3-hexénol y 1-metoxi-2-butanol en las muestras oxigenadas y una disminución de acetato de isoamilo, 1-propanol y 2-metil-1-propanol ($p < 0.05$).

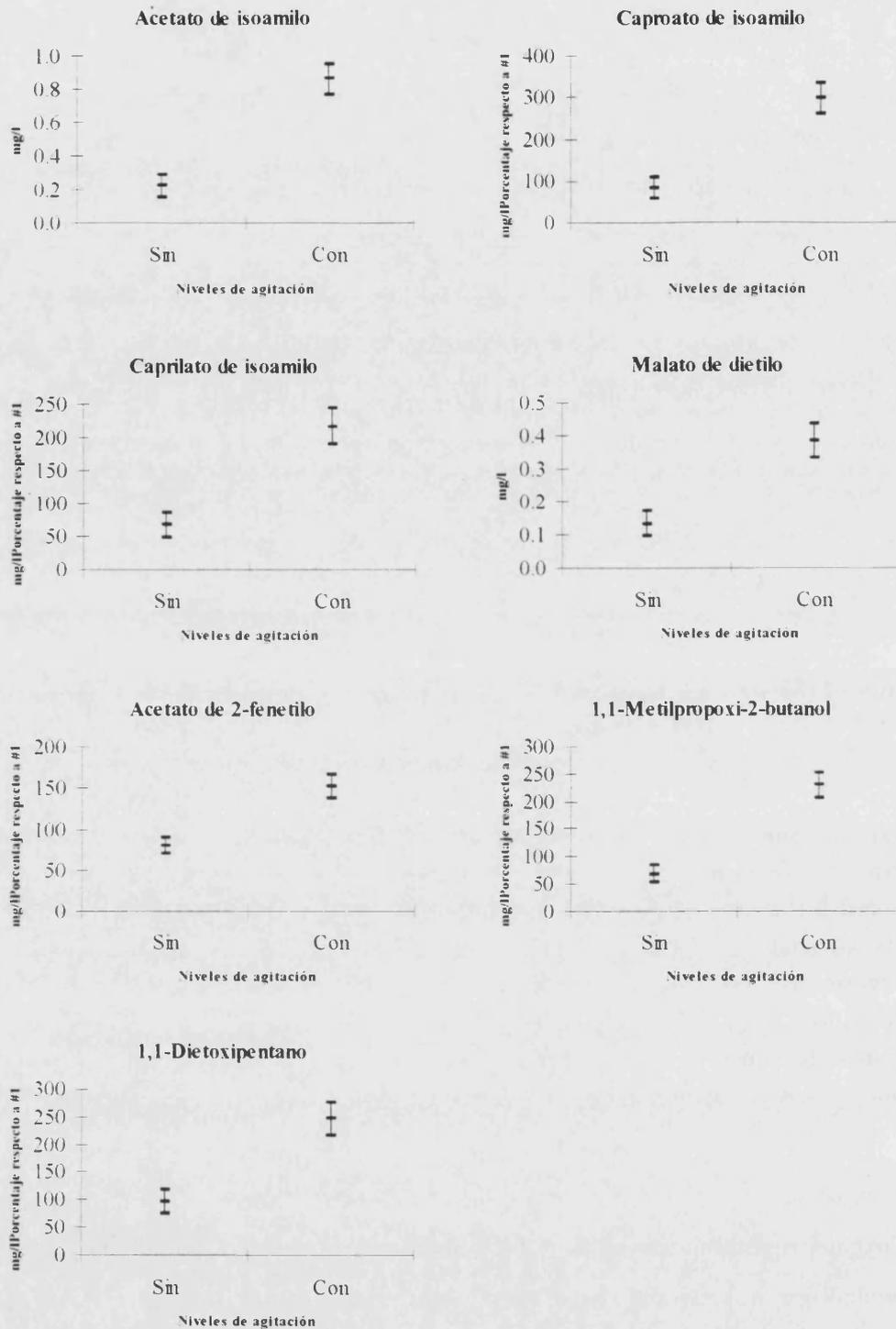


Figura 39. Intervalos LSD para las medias de compuestos de la fracción volátil según el nivel de agitación

Tabla 18. Medias e intervalos LSD de distintos componentes de la fracción volátil según el nivel de agitación

	Nivel de Agitación		LSD
	Sin	Con	
Acetato de etilo	25.9	35.8	± 3.8 / ± 5.4
Acetato de isobutilo	0.093	0.196	± 0.019 / ± 0.027
Butirato de etilo	32.5	80.0	± 9.74 / 13.77
Isovalerato de etilo	55.9	107.8	± 12.6 / ± 17.9
Acetato de amilo*	77.8	109.6	± 9.96 / ± 14.1
Caproato de etilo	0.081	0.101	± 0.007 / ± 0.010
Isobutirato de isoamilo*	0.012	0.020	± 0.002 / ± 0.003
Diacetato de 1,3-propanodiol*	110	156	± 10.5 / ± 14.9
N-Acetilglicinato de etilo*	109	153	± 12.5 / ± 17.7
1-Propanol	8.33	14.07	± 1.38 / ± 1.95
2-Metil-1-propanol	21.04	43.15	± 4.33 / ± 6.13
1-Butanol	0.175	0.226	± 0.020 / ± 0.029
3-Metil-1-butanol	115	154	± 13.11 / ± 18.55
1-Pentanol	1.16	2.15	± 0.205 / ± 0.290
1-Hexanol	0.494	0.650	± 0.059 / ± 0.084
Ácido acético	0.360	0.437	± 0.027 / ± 0.039
Ácido isovalérico	1.00	1.40	± 0.14 / ± 0.20
Ácido valérico	0.140	0.160	± 0.007 / ± 0.010
1,3-Dimetilbenceno*	68.3	136	± 18.4 / ± 26.0
Acetoína	1.04	3.60	± 0.48 / ± 0.67
2,3-Butanodiol	800	995	± 67 / ± 96
Alcoholes totales*	109	146	± 6.2 / ± 8.8

*Compuestos no cuantificados, en tanto por ciento respecto a la muestra #1

3.2.5. Influencia de la temperatura

La temperatura de fermentación fue una variable muy influyente en las concentraciones de los componentes de la fracción volátil detectados en los vinos. Sobre el acetato de etilo, acetato de isoamilo, caprilato de etilo, 9-decenoato de etilo, 2-metil-1-butanol, 1-metoxi-2-butanol, ácido hexanoico, ácido octanoico y ácido 10-undecenoico, se registraron disminuciones significativas debidas al aumento de la temperatura; sobre el caproato de isoamilo, caprilato de isoamilo, 4-hidroxibutirato de etilo, acetato de 2-fenetilo, laurato de etilo, 1-butanol, trans-3-hexén-1-ol, cis-3-hexén-1-ol, alcohol bencílico, ácido acético, ácido valérico, ácido láurico, 1,3-dimetilbenceno, acetoína, 2,3-butanodiol, N-hexilacetamida y los

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

alcoholes totales se registraron aumentos significativos según aumentaba el nivel de temperatura; sobre el lactato de etilo, 3-hidroxi butirato de etilo, succinato de dietilo, malato de dietilo, 1,1-metilproxi-2-butanol, 3-metilíto-1-propanol, 2-feniletanol, ácido isovalérico, 1,1-dietoxipentano, γ -butirolactona, y los ésteres totales se registró un aumento significativo especialmente en las muestras fermentadas a 25 °C. Estos resultados se representan en la figura 40 para los compuestos sobre los que el efecto de la temperatura fue más significativo ($p < 0.001$ y $p < 0.0001$) y en la tabla 19 para el resto de componentes.

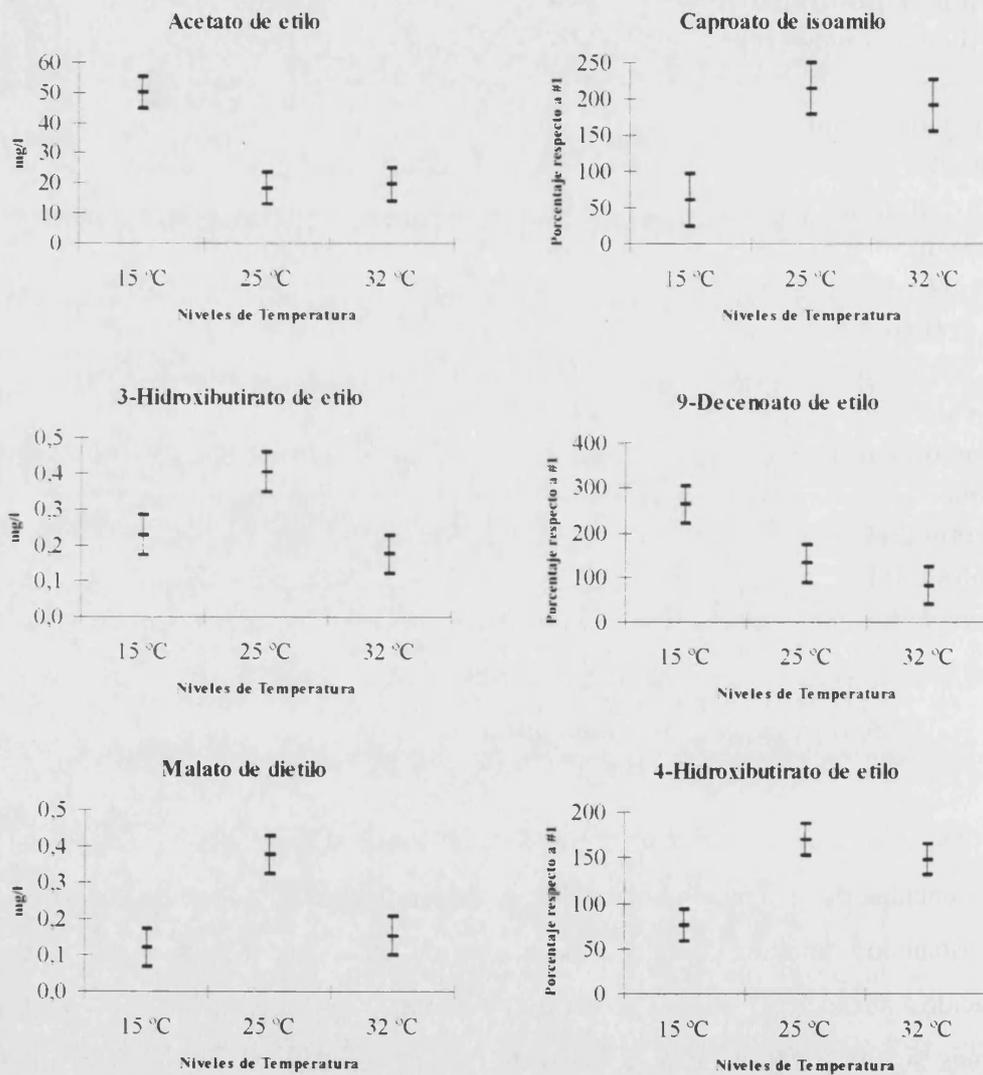


Figura 40. (sigue)

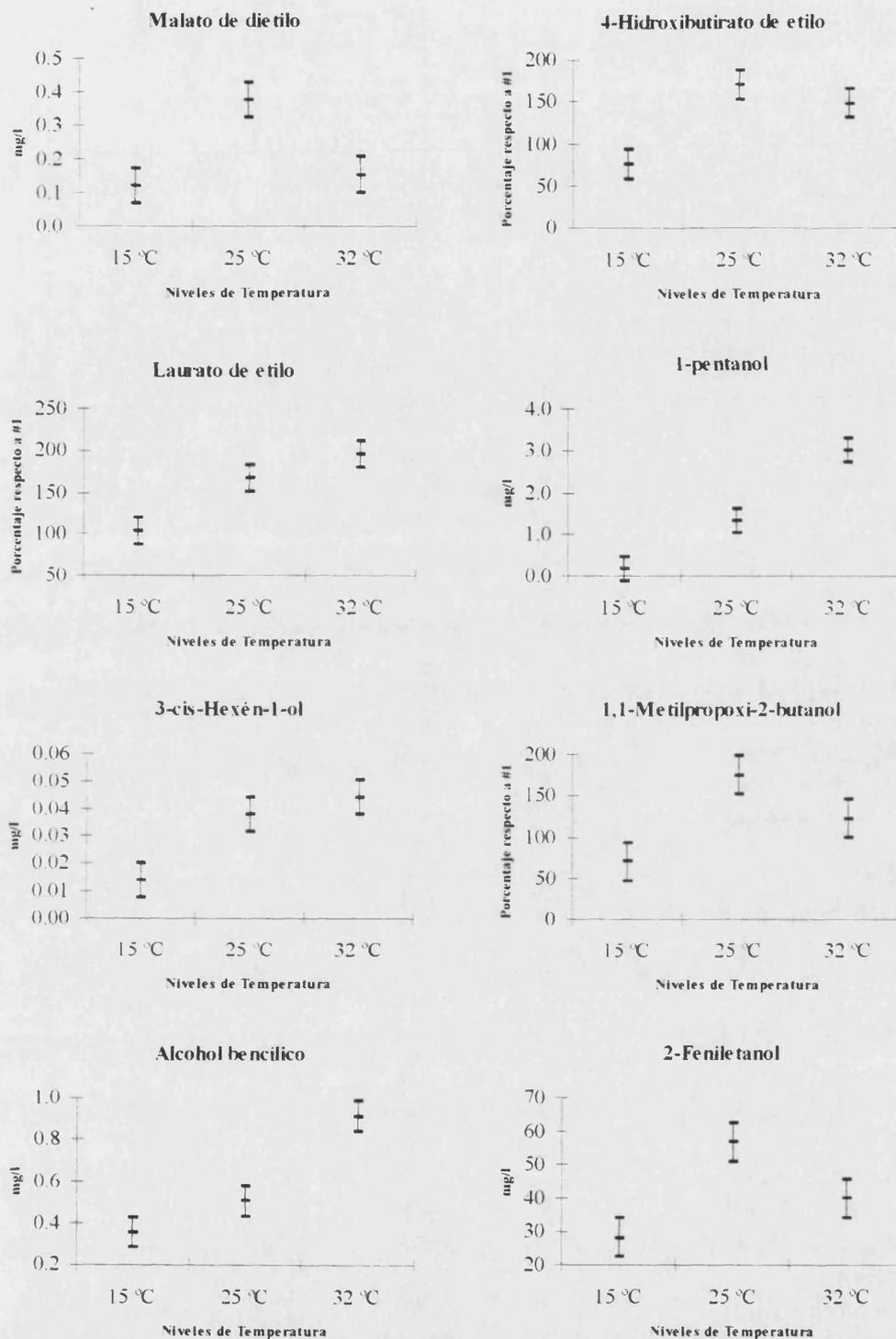


Figura 40 (sigue)

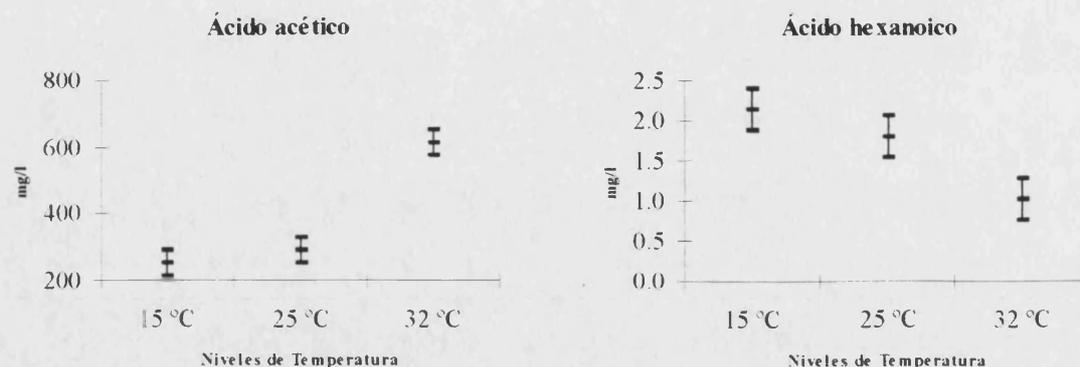


Figura 40. Intervalos LSD para las medias de los compuestos volátiles según la temperatura de fermentación

Tabla 19. Medias e intervalos LSD de distintos componentes de la fracción volátil según los niveles de temperatura

	Nivel de Temperatura			LSD
	15 °C	25 °C	32 °C	
Acetato de isoamilo	0.514	0.526	0.262	± 0.093
Lactato de etilo	1.366	5.683	2.746	± 1.095
Caprilato de etilo	1.272	1.111	0.813	± 0.135
Caprilato de isoamilo*	59.7	172.2	119.3	± 26.5
Succinato de dietilo	0.149	1.574	0.245	± 0.610
Acetato de 2-fenetilo*	67.9	118.5	125.8	± 14.7
1-Butanol	0.138	0.211	0.227	± 0.029
2-Metil-1-butanol	3.34	4.27	1.27	± 0.93
trans-3-Hexén-1-ol	0.028	0.033	0.033	± 0.002
1-Metoxi-2-butanol*	54.9	58.6	37.3	± 5.7
3-Metiltio-1-propanol	1.373	0.754	1.443	± 0.259
Ácido isovalérico	0.901	1.577	0.928	± 0.196
Ácido valérico	0.132	0.163	0.145	± 0.010
Ácido octanoico	2.199	1.388	1.135	± 0.311
Ácido 10-undecenoico*	30.0	34.4	19.6	± 5.0
Ácido laúrico	0.658	0.591	1.108	± 0.147
1,1-Dietoxipentano*	133	212	95	± 30
1,3-Dimetilbenceno*	77.4	66.7	129.0	± 26.0
Acetoína	0.851	2.878	1.949	± 0.673
2,3-Butanodiol	741	785	1069	± 96
γ-butirolactona	3.42	7.79	4.27	± 1.61
N-Hexilacetamida*	109	85.3	148	± 19.7
Ésteres totales*	116	218	124	± 32.6
Alcoholes totales*	102	133	128	± 8.8

*Compuestos no cuantificados, en tanto por ciento respecto a la muestra #1

3.2.6 Discusión

Los factores que más influencia tuvieron sobre los componentes de la fracción volátil fueron la temperatura de fermentación y la agitación del mosto durante el proceso fermentativo. Se detectaron diferencias significativas en las concentraciones de 36 compuestos debidas a los distintos niveles de temperatura ensayados. La temperatura, además de influir en la velocidad de crecimiento de las levaduras y en la ecología de la fermentación, afecta a las actividades bioquímicas de las levaduras y la producción de metabolitos secundarios (Parrish y Carroll, 1987). Por otra parte, las temperaturas de fermentación más elevadas facilitan la evaporación del etanol y de los componentes más volátiles. Las diferencias de concentración de los componentes en las 27 microvinificaciones deben deberse, por tanto, a la contribución de todas estas causas. Así, algunos compuestos aparecieron en mayor concentración en las fermentaciones realizadas a 15 °C. Otros compuestos se encontraron en mayor cantidad en las muestras fermentadas a 25 ó 32 °C. A pesar de encontrar compuestos cuya mayor concentración se produjo a cualquiera de los tres temperaturas de fermentación, las muestras fermentadas a 25 °C fueron las que en general mantuvieron concentraciones más elevadas de componentes de la fracción volátil. Este hecho se ve respaldado por la mayor cantidad total de ésteres y alcoholes encontrada en las muestras fermentadas a esta temperatura. Resulta importante indicar la mayor concentración de ácido acético de las muestras fermentadas a 32 °C, pudiendo deberse este hecho a las paradas fermentativas ya mencionadas en apartados anteriores, que pueden provocar un aumento del picado acético de los vinos. Por todas estas razones la temperatura es un factor muy influyente en la riqueza final de las fracciones volátiles de los vinos pudiéndose aconsejar las temperaturas entre los 15 y 25 °C como las más idóneas para obtener vinos cuyas fracciones aromáticas sean mas ricas desde el punto de vista de la calidad organoléptica.

La agitación tuvo también una gran influencia sobre las concentraciones de los componentes de la fracción volátil de los vinos. Sin embargo, esta influencia fue siempre en el mismo sentido. Se encontraron diferencias significativas en 28 compuestos debidas a la agitación de los mostos y estas diferencias siempre apuntaron hacia un aumento de la concentración de los compuestos en los vinos que fermentaron en agitación. La agitación debe ser pues, un factor que facilite las reacciones químicas y metabólicas encargadas de producir la mayor parte de los componentes de la fracción volátil. El aumento de biomasa descrito en

apartados anteriores debido a la agitación, también podría explicar estos aumentos en las concentraciones de compuestos de la fracción volátil, indicando además compuestos que se producirían de forma más activa durante el metabolismo respiratorio de la levadura.

Las inoculaciones con la cepa T73 o *K. apiculata* no provocaron en general grandes variaciones en los componentes de la fracción volátil de los vinos producidos. En los vinos que fueron inoculados con la cepa T73 se encontró una significativa menor cantidad de alcoholes superiores y de 2,3-butanodiol y en los inoculados con 10^6 cels/ml de *K. apiculata* un aumento de los ácidos grasos totales.

La adición de enzimas pectolíticos tuvo un efecto estimulante en la producción de alcoholes, aunque también aumentó significativamente la acidez volátil al incrementar tanto los niveles de ácido acético como de acetato de etilo cuando la adición fue de 50 mg/l. La adición de 20 mg/l del preparado enzimático no produjo este aumento de la acidez volátil y sí los aumentos en ciertos componentes de la fracción volátil por lo que se puede considerar esta adición, como de efectos beneficiosos sobre la fracción volátil de los vinos.

La adición de vitamina C también tuvo influencia sobre numerosos componentes de la fracción volátil. Sin duda su carácter antioxidante puede tener importancia en la consecución de determinadas reacciones químicas en el mosto en fermentación, modificando por tanto las concentraciones de algunos de los metabolitos producidos o directamente su tasa de producción. Es digno de mención que en los vinos que tuvieron adición de vitamina C se produjo una mayor concentración de malato de dietilo, por lo que contribuyó a rebajar la cantidad de ácido málico, así como de ésteres de isoamilo y acetoína, compuestos considerados de efectos beneficiosos sobre el aroma. También se produjo una rebaja en el nivel de acetaldehído debido a la adición de esta vitamina por lo que se puede considerar en general que tuvo efectos beneficiosos sobre los vinos producidos.

Los vinos que fueron adicionados con tiamina registraron disminuciones significativas de 13 componentes de la fracción volátil y un aumento significativo de ácido acético, aunque rebajó la tasa de acetato de etilo. Esta rebaja en la concentración de algunos componentes puede ser beneficiosa en los casos del acetato de etilo o el ácido valérico aunque no para otros ésteres etílicos o el acetato de 2-fenetilo. Por tanto no se puede asumir que esta vitamina tenga un efecto beneficioso o perjudicial global sobre la calidad de la fracción volátil de los vinos. Igualmente, la adición de DAP tuvo efectos significativos en pocos componentes de la fracción volátil y cuando se produjeron resultan difíciles de explicar o de valorar cualitativamente.

3.3. Experiencia OA16

Las concentraciones o valores relativos de los componentes identificados en las 16 microvinificaciones, se muestran en la tabla 20 agrupados según las principales familias químicas. En los siguientes apartados se comentan los resultados más sobresalientes fruto del análisis estadístico de estos datos.

3.3.1. Influencia de las inoculaciones con levaduras

La inoculación con la cepa T73 fue un factor de gran influencia en numerosos componentes de la fracción volátil. Las muestras que fueron inoculadas con esta levadura, presentaron cantidades significativamente más bajas de acetato de etilo, 1-decanol, ácido acético, y ácido hexanoico ($p < 0.001$); de lactato de etilo, caprilato de etilo, diacetato de 1,3-propanodiol, cis-3-hexén-1-ol, ácido isobutírico, ácido octanoico y las cantidades totales relativas de ésteres y alcoholes ($p < 0.01$); y de acetato de isoamilo, acetato de amilo, 9-decenoato de etilo, laurato de etilo, ácido monoetilsuccínico, trans-3-hexén-1-ol, ácido valérico 2,3-butanodiol y la cantidad total relativa de ácidos grasos ($p < 0.05$). Por otra parte, sólo se registraron aumentos significativos de 3-hidroxibutirato de etilo ($p < 0.001$) y malato de dietilo ($p < 0.05$). Los resultados más significativos se representan en la figura 41, mostrándose el resto en la tabla 21.

La inoculación con la cepa de *K. apiculata* fue menos influyente. Así, las muestras inoculadas con esta levaduras presentaron cantidades inferiores de ácido hexanoico ($p < 0.001$) y de 9-decenoato de etilo, laurato de etilo, 3-metil-1-propanol, γ -butirolactona y alcoholes totales relativos ($p < 0.05$) y cantidades más elevadas de acetaldehído ($p < 0.05$) y ácido acético ($p < 0.01$). Estos resultados se muestran en la figura 42.

También se encontró influyente el efecto de la interacción entre las inoculaciones con ambas cepas sobre las concentraciones de butirato de etilo, 9-decenoato de etilo, alcohol bencílico, 2-feniletanol, acetaldehído, ácido acético, ácido hexanoico, ácido octanoico y ácido 10-undecenoico ($p < 0.01$). El efecto de esta interacción entre las inoculaciones sobre los compuestos mencionados, se puede observar en la figura 43.

Tabla 20. Concentraciones (mg/l) o valores relativos (*) de los componentes de la fracción volátil de los vinos

Ésteres	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Acetato de etilo	82.62	44.77	130.7	25.73	199.7	29.20	121.5	70.23	29.93	23.00	43.40	36.77	74.05	41.05	23.79	18.70
Acetato de isobutilo	0.1421	0.0944	0.1568	0.0937	0.1008	0.0769	0.0950	0.1550	0.0808	0.0649	0.1251	0.1290	0.1088	0.1257	0.1104	0.0894
Butirato de etilo*	100	67.98	134.80	97.54	179.10	89.84	52.49	183.19	109.50	97.94	146.91	242.03	96.97	90.98	49.86	43.85
Isovalerato de etilo*	100	43.12	39.39	39.55	43.39	36.90	59.70	29.53	35.93	38.12	38.95	37.37	69.36	45.28	29.84	62.79
Acetato de isoamilo	0.5093	0.3320	0.7295	0.3777	0.8264	0.6425	0.4272	0.4606	0.4582	0.3484	0.2521	0.3200	0.6870	0.4458	0.0871	0.2144
Acetato de amilo*	100	78.74	233.8	120.6	85.30	81.53	87.64	86.25	48.79	50.85	48.68	95.63	84.12	59.86	62.07	81.30
Caproato de etilo	0.0891	0.0572	0.1101	0.0555	0.0728	0.0682	0.0589	0.0866	0.0761	0.0771	0.0936	0.0806	0.0976	0.0959	0.0463	0.0700
Isobutirato de isoamilo	0.0124	0.0165	0.0277	0.0177	0.0115	0.0186	0.0087	0.0171	0.0171	0.0128	0.0152	0.0203	0.0248	0.0182	0.0073	0.0102
Lactato de etilo	13.83	1.861	42.50	14.14	24.15	3.264	28.03	15.08	8.104	3.577	24.34	14.12	10.79	2.460	7.188	10.11
Caprilato de etilo	1.421	1.343	2.869	1.910	2.339	1.499	1.638	2.004	1.286	1.161	1.583	1.612	1.698	1.395	1.202	1.201
Caproato de isoamilo*	100	115.7	305.2	146.1	189.2	249.7	195.1	137.2	238.5	269.1	168.6	186.9	303.8	202.9	70.48	58.16
3-Hidroxibutirato de etilo	0.1915	0.2417	0.3625	0.3653	0.3104	0.2339	0.1770	0.3284	0.3445	0.4492	0.4472	0.4674	0.4145	0.4253	0.2604	0.4843
Caprato de etilo*	100	151.8	76.21	120.1	171.8	158.9	54.89	56.96	178.8	114.2	60.01	118.3	233.9	136.7	181.7	89.31
Caprilato de isoamilo*	100	118.0	150.4	199.2	123.0	169.3	104.2	98.85	178.3	216.2	107.1	116.3	220.3	121.5	82.69	88.04
Succinato de dietilo	0.1307	0.0938	1.3289	0.1733	0.8940	0.1082	2.1827	0.0973	0.2085	0.1473	0.6539	0.2044	0.3849	0.2119	0.7562	0.1243
9-Decenoato de etilo*	100	232.3	198.5	316.2	152.7	123.1	132.0	194.0	132.3	136.1	132.2	187.1	169.7	152.2	194.9	120.1
Diacetato de 1,3-propanodiol*	100	110.3	286.9	181.4	165.5	160.2	158.4	138.8	146.1	113.9	148.8	82.73	144.5	89.16	95.46	77.71
Malato de dietilo	0.0988	0.0778	0.0835	0.0750	0.0916	0.0971	0.0724	0.0656	0.1093	0.1460	0.0658	0.0587	0.0967	0.1441	0.0714	0.0896
4-Hidroxibutirato de etilo*	100	63.01	118.8	79.95	38.32	87.69	43.51	28.13	105.2	97.16	75.70	40.38	81.72	128.0	52.68	92.67
Acetato de 2-fenetilo*	100	115.7	264.5	183.8	99.49	72.55	112.3	119.0	91.47	90.98	111.7	121.0	120.8 ^c	92.32	117.6	130.4
Laurato de etilo*	100	78.76	156.4	134.9	81.96	92.32	105.2	89.53	83.40	92.09	111.6	86.41	97.32	83.85	102.3	99.32
N-Acetilglicinato de etilo*	100	166.3	107.8	243.1	173.6	169.3	77.42	150.2	145.3	136.6	130.4	152.5	158.4	163.5	124.3	111.7
Benzoato de 2-fenetilo*	100	193.3	550.0	1422	388.9	95.28	360.8	2257	109.1	123.3	740.8	1768	224.4	77.36	1183	664.6
Ácido monoetilsuccínico*	100	67.15	532.6	135.9	697.4	109.7	1001	78.04	102.4	92.86	203.1	79.95	207.2	88.89	305.1	76.77
Total ésteres*	100	98.73	238.0	184.7	188.2	107.1	213.8	197.0	112.9	108.5	155.4	185.1	151.2	110.8	158.8	111.7
Alcoholes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1-propanol	12.23	7.903	23.63	2.576	6.819	4.221	6.912	11.65	8.651	6.179	9.785	5.755	11.410	8.815	5.066	3.260
2-Metil-1-propanol	45.32	37.71	77.41	22.26	29.25	34.30	27.50	59.31	32.27	31.44	35.32	30.51	37.17	39.86	15.12	15.03
1-Butanol	0.1246	0.0946	0.1957	0.0645	0.1017	0.0701	0.0977	0.1354	0.0745	0.0732	0.0856	0.0719	0.1087	0.1236	0.0550	0.0566

3-Metil-1-butanol	175.1	175.2	277.7	147.4	132.7	177.1	127.5	215.9	185.5	152.8	229.3	236.2	219.9	213.4	87.67	120.6
2-Metil-1-butanol	4,971	5,357	11.54	6.488	5,557	4,544	4,846	7,777	5,653	3,599	9,813	8,187	7,952	6,059	3,152	4,188
1-Hexanol	1,436	1,300	2,081	1,562	1,369	1,111	1,364	1,395	1,053	0,899	1,392	1,478	1,651	1,366	0,8729	1,171
trans-3-Hexén-1-ol	0,0614	0,0486	0,0720	0,0625	0,0667	0,0498	0,0678	0,0588	0,0511	0,0483	0,0645	0,0662	0,0574	0,0561	0,0535	0,0560
3-Etoxi-1-propanol*	100	21.07	291.8	31.38	136.3	37.77	131.1	22.45	73.74	8.81	87.74	7,783	59.79	7,487	25.86	6,391
cis-3-Hexén-1-ol	0,0379	0,0365	0,0702	0,0462	0,0468	0,0382	0,0469	0,0372	0,0395	0,0260	0,0414	0,0367	0,0383	0,0368	0,0248	0,0281
1-Heptanol	0,0333	0,0289	0,0490	0,0378	0,0320	0,0305	0,0297	0,0354	0,0293	0,0300	0,0336	0,0322	0,0335	0,0330	0,0271	0,0284
1,1-Metilproxi-2-propanol*	100	105.3	255.1	162.3	188.4	171.4	148.6	109.8	217.2	226.7	154.1	141.5	208.0	175.9	117.6	87,13
1-Metoxi-2-butanol*	100	194,6	86,25	101,1	238,2	273,6	44,79	63,23	215,3	206,4	64,63	171,3	179,1	174,1	116,9	165,1
3-Metil-1-propanol	1,073	2,567	2,696	3,545	1,310	2,865	1,256	2,640	1,835	2,823	1,918	2,398	1,812	2,174	1,397	1,933
1-Decanol*	100	385.0	573.3	778.6	404.5	520.1	226.0	551.2	107.6	153.4	270.8	332.3	193.4	90.17	218.1	200.3
Alcohol bencílico	0,2612	0,2780	0,3220	0,4221	0,1942	0,2765	0,1595	0,2516	0,2376	0,2374	0,2304	0,2061	0,2828	0,2639	0,2739	0,2545
2-Feniletanol	65,89	48,87	74,95	73,14	37,23	52,70	40,72	47,57	40,58	52,45	51,35	51,55	46,81	61,74	54,70	62,28
Total alcoholes*	100	119.4	200.1	153.7	127.1	135.3	98.40	135.8	106.7	104.2	118.1	119.3	121.7	108.2	82.74	88.84
Ácidos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Ácido acético																
Ácido isobutírico	2,766	2,669	5,521	3,248	2,776	4,324	2,856	3,446	2,606	2,618	2,619	2,348	2,932	2,529	1,101	1,501
Ácido isovalérico	0,8718	0,9068	2,001	1,411	0,7811	1,283	0,7706	1,456	1,196	1,519	1,659	1,249	1,061	1,079	0,7767	1,276
Ácido valérico	0,1929	0,1120	0,6740	0,3978	0,8791	0,1149	1,3218	0,1952	0,1997	0,1211	0,3782	0,2192	0,2061	0,1056	0,2939	0,3091
Ácido hexanoico	4,262	3,897	5,665	6,023	2,972	2,918	3,103	3,256	2,673	2,661	3,447	2,892	3,750	3,492	3,697	3,212
Ácido heptanoico*	100	117,1	86,22	245,3	243,3	167,8	180,5	123,1	157,3	126,3	142,2	152,3	92,66	114,1	155,6	446,0
Ácido octanoico	2,876	2,500	2,977	4,063	2,062	2,036	2,016	2,159	1,559	1,399	1,765	1,602	2,362	1,992	2,167	2,018
Ácido decanoico	1,1237	0,9301	0,9103	1,5977	0,7743	0,8228	0,9261	0,7404	0,7125	0,8946	0,7494	0,7219	1,1696	1,0191	1,0930	1,0564
Ácido 10-undecenoico*	100	126,5	142,5	184,7	139,0	94,6	108,2	125,5	67,0	101,6	107,9	114,1	122,1	134,5	108,2	212,8
Ácido laúrico	0,1353	0,2631	0,7895	0,3037	0,2196	0,2942	0,2160	0,4966	0,1178	0,3372	0,3958	0,3761	0,2772	0,4386	0,3546	0,4366
Total ácidos*	100	95,04	213,7	150,9	153,0	110,7	165,8	125,3	82,79	102,7	127,0	110,3	108,8	108,6	104,6	157,2
Otros	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Acetaldehído																
1,1-Dietoxipentano*	100	50,57	68,98	44,08	45,32	35,14	69,28	65,91	38,55	62,33	51,97	35,27	55,05	57,08	30,13	71,21
1,3-Dimetilbenceno*	100	99,68	186,7	170,0	88,79	144,3	103,3	202,2	137,3	101,6	100,8	207,7	136,5	91,73	107,6	108,5
Acetoína	1,859	0,2980	0,9541	0,2392	5,789	0,4766	0,5802	0,6270	0,7330	0,5720	0,2798	0,1936	1,165	0,5572	0,1811	0,1829
2,3-Butanodiol (a)	125,1	75,94	472,8	176,1	282,2	161,7	292,9	204,4	185,5	106,8	184,8	81,92	283,6	170,3	45,19	79,54

2,3 Butanodiol (b)	47.45	31.98	163.9	76.60	88.51	56.52	100.1	74.46	58.02	37.93	73.55	43.63	68.59	54.52	42.05	42.62
2,3-Butanodiol (c)	27.94	34.75	33.06	40.47	30.14	32.60	30.25	33.52	34.79	34.61	32.78	34.12	39.86	34.35	42.89	30.84
N-Etilacetamida*	100	121.7	267.4	173.3	185.3	89.59	134.8	133.7	107.7	107.6	164.1	91.55	138.7	157.9	150.7	176.6
γ-Butirolactona	1.533	1.539	2.452	2.838	1.275	1.658	1.464	2.686	1.488	1.932	2.617	3.194	2.203	1.704	2.158	1.897
N-Hexilacetamida*	100	154.7	196.5	238.9	152.2	141.8	155.3	138.9	167.1	132.9	191.5	130.7	175.7	91.43	142.0	110.2
Total	100	88.26	198.0	197.4	144.7	102.4	122.0	129.4	115.4	101.6	135.5	112.6	146.8	104.8	98.26	95.79

**Compuestos no cuantificados, en tanto por ciento respecto a la muestra #1*

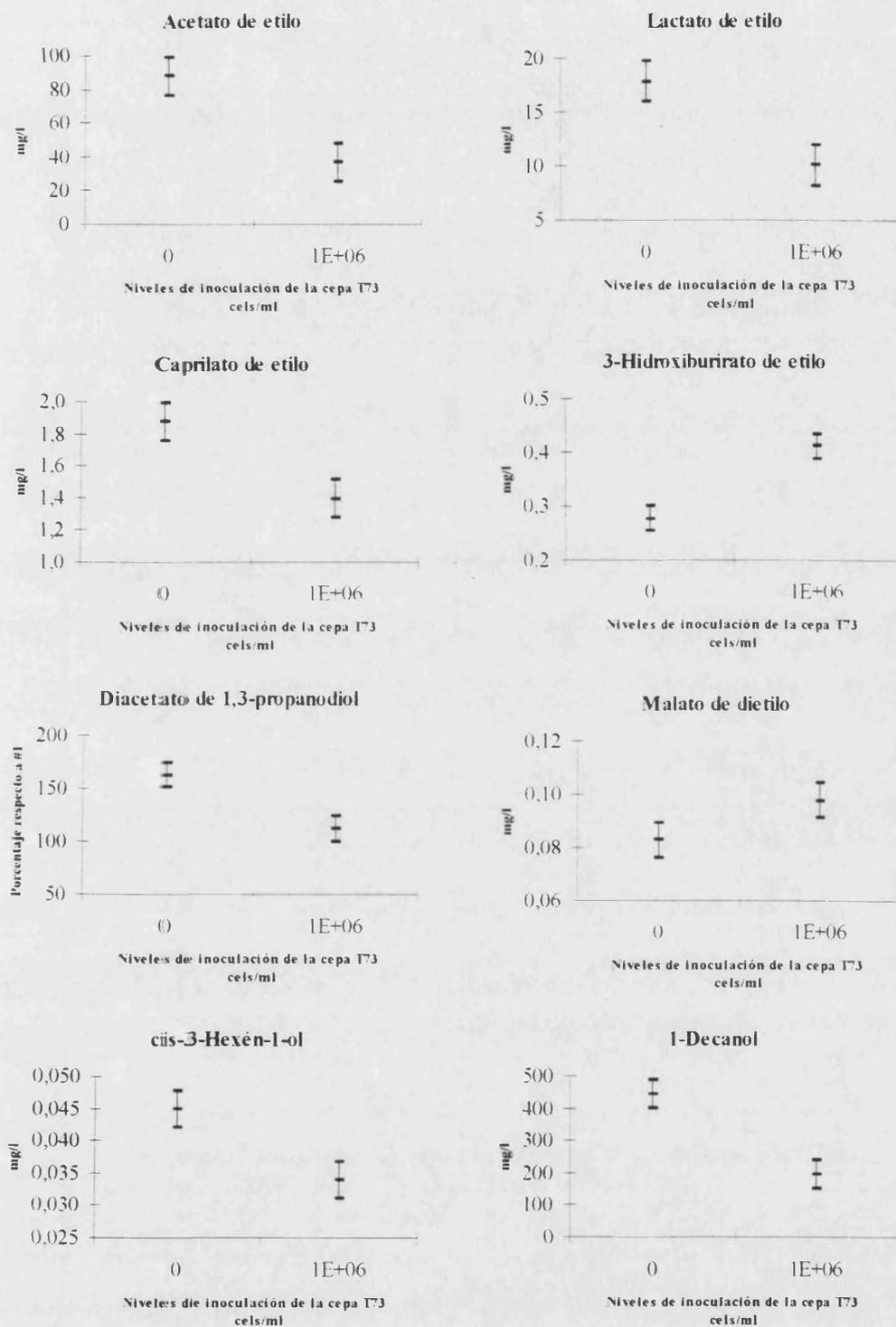


Figura 41. (sigue)

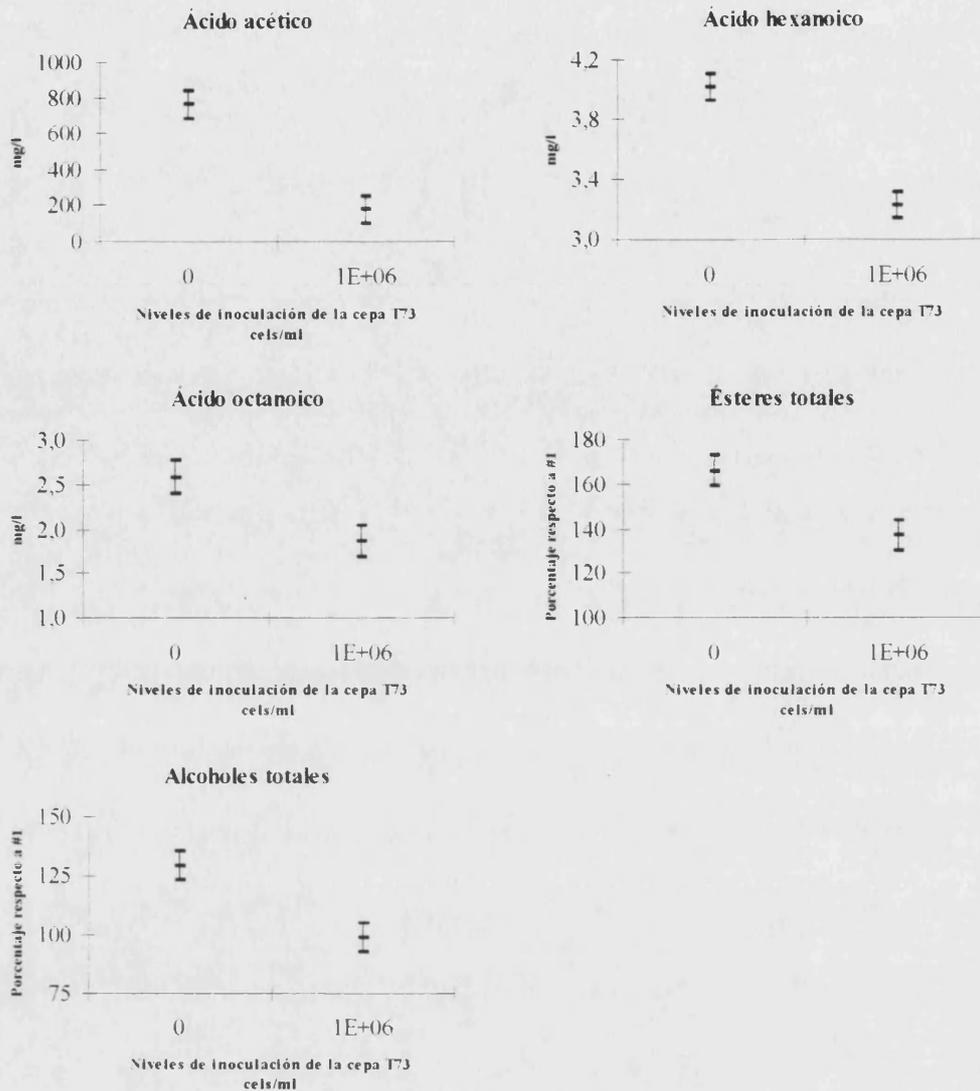


Figura 41. Intervalos LSD para las medias de compuestos de la fracción volátil según el nivel de inoculación con la cepa T73

3.3.2 Influencia de la inoculación con *Leuconostoc oenos*.

La inoculación con al cepa M42 de *L. oenos* provocó un aumento significativo en las concentraciones de lactato de etilo, benzoato de 2-fenetilo, trans-3-hexén-1-ol, ácido hexanoico, γ -butirolactona y ésteres totales relativos ($p < 0.001$); de 9-decenoato de etilo, laurato de etilo, y ácidos totales relativos ($p < 0.01$) y de succinato de dietilo, acetato de 2-fenetilo, ácido 10-undecenoico, ácido láurico y 1,3-dimetilbenceno ($p < 0.05$). Por otra parte,

su inoculación, al final de la fermentación alcohólica, provocó una menor concentración de malato de dietilo y 1-metoxi-2-butanol ($p < 0.001$); caprato de etilo, y 1-decanol ($p < 0.01$) y de acetato de isoamilo, caproato de isoamilo y caprilato de isoamilo ($p < 0.05$). Los resultados más significativos de la influencia de la inoculación con esta cepa de bacteria láctica se muestran en la figura 44, el resto se pueden observar en la tabla 22.

Tabla 21. Medias e intervalos LSD de distintos componentes de la fracción volátil según los niveles de inoculación con la cepa T73

	Nivel inoculación T73		LSD
	0 cels/ml	10 ⁶ cels/ml	
Acetato de isoamilo	0.5381	0.3516	± 0.0639
Acetato de amilo*	109.2	66.41	± 19.88
9-Decenoato de etilo*	181.1	153.1	± 8.811
Laurato de etilo	104.9	94.54	± 4.163
Ácido monoetilsuccínico*	340.2	144.5	± 77.15
trans-3-Hexén-1-ol	0.0610	0.0566	± 0.0015
Ácido valérico	0.4860	0.2291	± 0.1149
2,3-Butanodiol	336.7	230.3	± 33.21
Ácidos totales*	139.3	112.8	8.771

*Compuestos no cuantificados, en tanto por ciento respecto a la muestra =1

La interacción entre las inoculaciones con la cepa T73 de *Sacch. cerevisiae* y M42 de *L. oenos* fue significativa especialmente para el caproato de isoamilo, caprilato de isoamilo, 1-pentanol, 1,1-metilpropoxi-2-butanol, ácido hexanoico, 2,3-butanodiol y los ésteres y alcoholes totales relativos. Los efectos de estas interacciones se muestran en la figura 45. Por otro lado, la interacción entre la inoculación con *K. apiculata* y *L. oenos* fue especialmente significativa para las concentraciones de butirato de etilo, isobutirato de isoamilo, caprilato de etilo, caproato de isoamilo, trans-3-hexén-1-ol, cis-3-hexén-1-ol, 1-decanol, ácido hexanoico, 2,3-butanodiol y los ésteres y alcoholes totales relativos. Estos efectos se muestran en la figura 46.

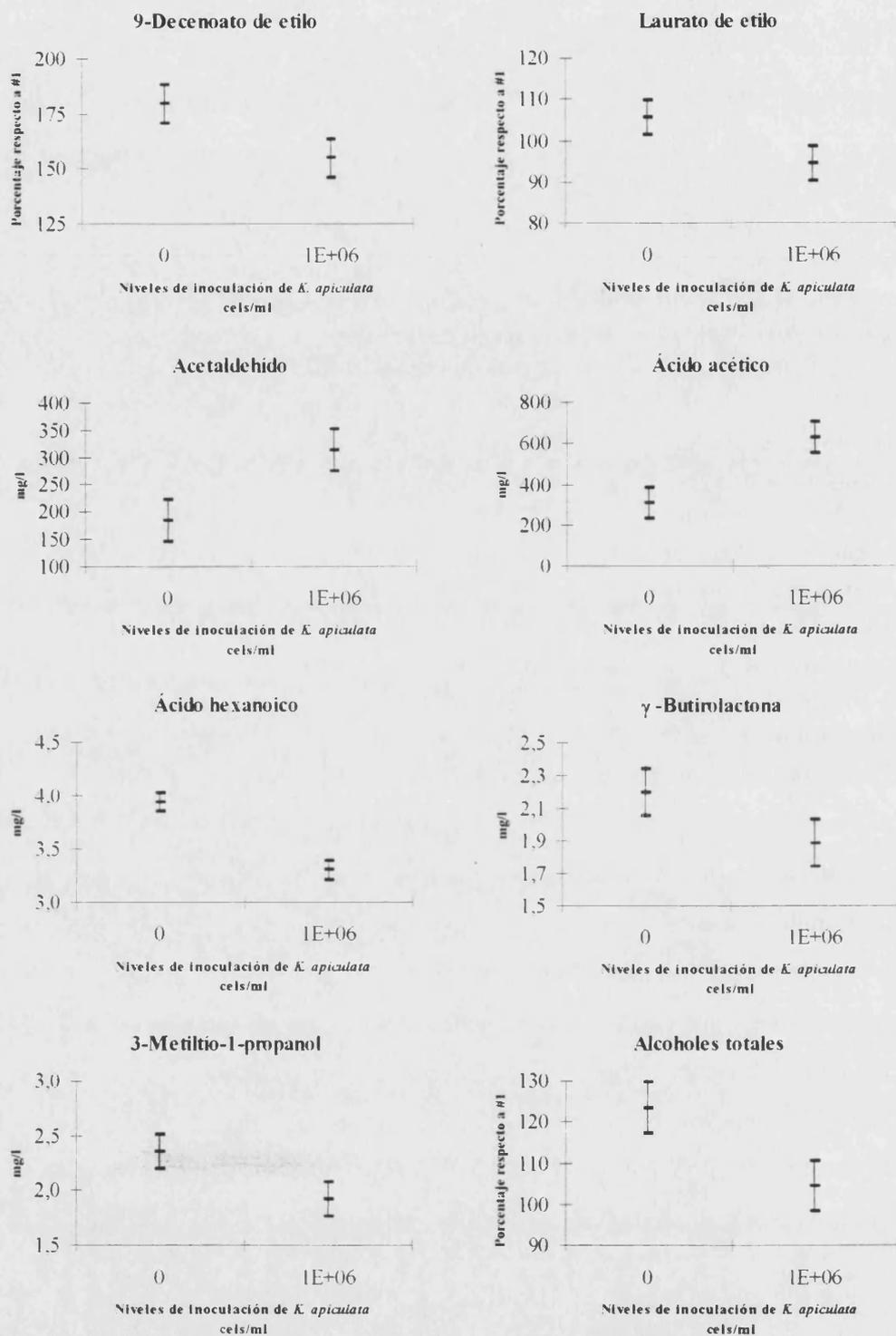


Figura 42. Intervalos LSD para las medias de compuestos de la fracción volátil según los niveles de inoculación con *K. apiculata*

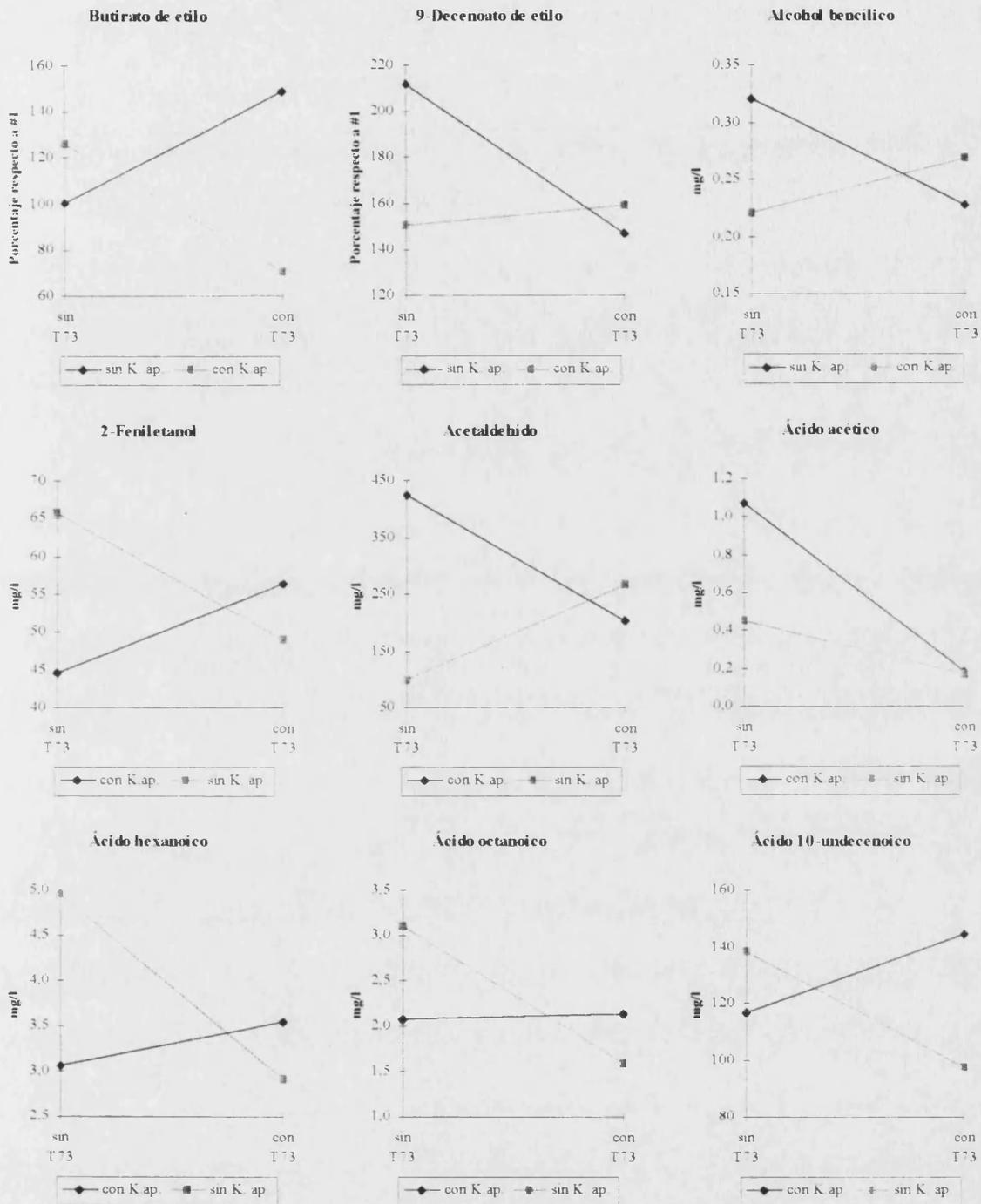


Figura 43. Representación de los niveles de interacción entre las inoculaciones con la cepa T73 y *K. apiculata*.

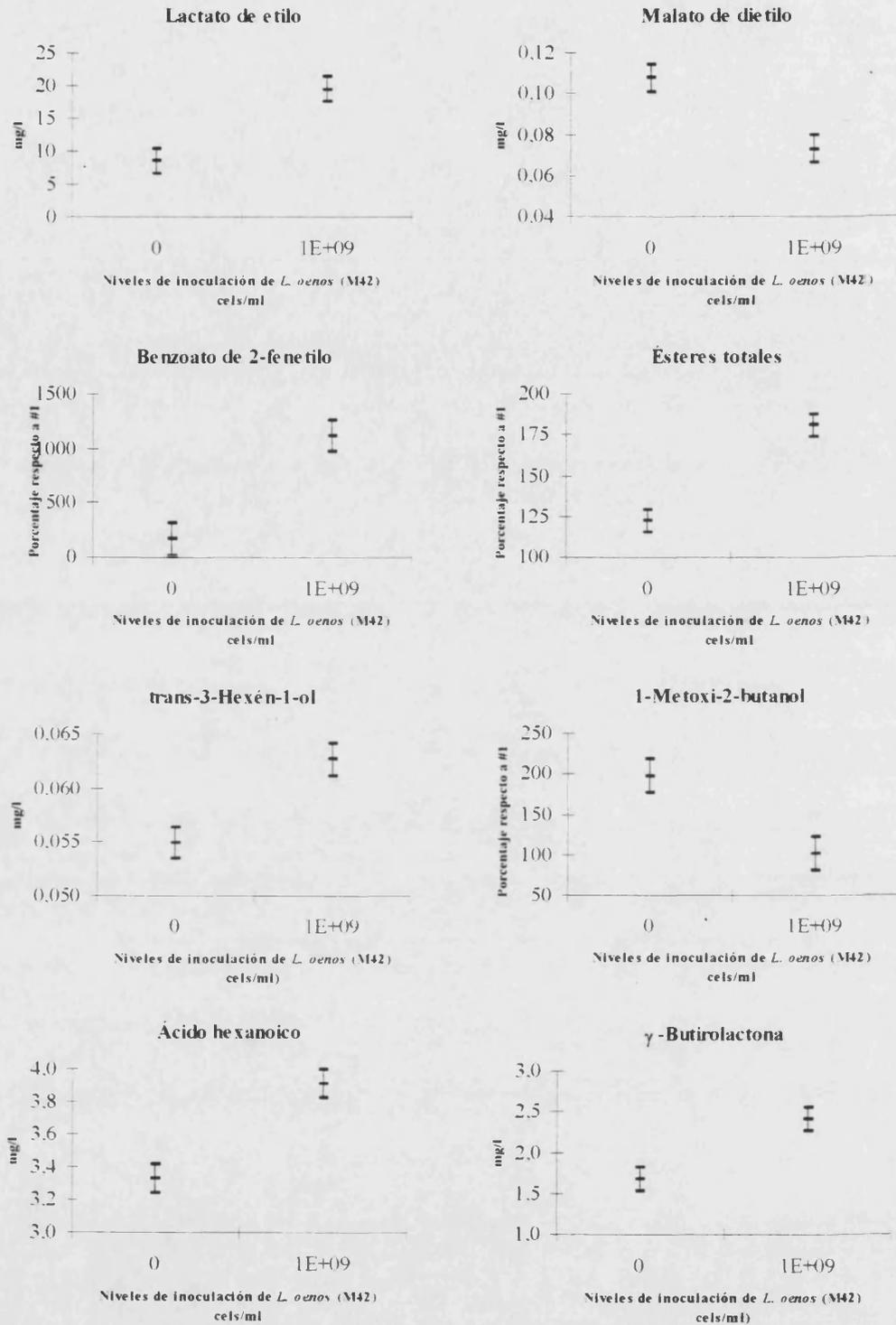


Figura 44. Intervalos LSD para las medias de compuestos de la fracción volátil según los niveles de inoculación con *Leuconostoc oenos* cepa M42

Tabla 22. Medias e intervalos LSD para distintos componentes de la fracción volátil según los niveles de inoculación con *L. oenos* cepa M42

	Nivel inoculación con <i>L. oenos</i> (M42)		LSD
	0 ufc/ml	10 ⁹ ufc/ml	
Caprato de etilo*	155.8	94.7	± 16.32
Acetato de isoamilo*	0.5312	0.3586	± 0.0639
Caproato de isoamilo*	208.6	158.5	± 18.00
Caprilato de isoamilo*	155.8	118.3	± 14.28
Succinato de dietilo	0.2724	0.6901	± 0.1616
9-Decenoato de etilo*	149.8	184.3	± 8.811
Laurato de etilo*	88.71	110.7	± 4.163
Acetato de 2-fenetilo*	97.90	145.0	± 16.65
1-Decanol*	244.3	393.8	± 45.53
Ácido 10-undecenoico*	110.7	138.0	± 11.78
Ácido láurico	0.2604	0.4211	± 0.0755
1,3-Dimetilbenceno*	112.5	148.3	± 16.98
Ácidos totales*	107.7	144.3	8.771

*Compuestos no cuantificados, en tanto por ciento respecto a la muestra = 1

3.3.3. Influencia de la adición de SO₂ y la modificación del pH

La adición de anhídrido sulfuroso también fue un factor sumamente influyente en las concentraciones finales que alcanzaron muchos de los compuestos de las fracciones volátiles de los 16 vinos. Así, las muestras que fueron previamente adicionadas con 50 mg/l de SO₂, presentaron cantidades significativamente inferiores de acetato de etilo, lactato de etilo y ácido acético ($p < 0.001$); de succinato de dietilo, ácido monoetilsuccínico, trans-3-hexén-1-ol, 3-Etotoxi-1-propanol, acetaldehído, 2,3-butanodiol, y de ésteres totales relativos ($p < 0.01$); y de diacetato de 1,3-propanodiol, laurato de etilo, cis-3-hexén-1-ol y ácido valérico ($p < 0.05$). Por otro lado se encontraron cantidades significativamente superiores de 3-hidroxibutirato de etilo, 9-decenoato de etilo, N-acetilglicinato de etilo, benzoato de 2-fenetilo y 1-decanol ($p < 0.05$).

Debido a la modificación del pH, al finalizar la fermentación alcohólica y momentos antes de la inoculación con la bacteria láctica, no produjeron excesivos efectos sobre los componentes de la fracción volátil de los vinos. Tan sólo se encontró una mayor cantidad de butirato de etilo, 9-decenoato de etilo, benzoato de 2-fenetilo, y de ésteres totales en los vinos

a pH 3.5 ($p < 0.05$) y una mayor cantidad de isovalerato de etilo, y ácido decanoico en los vinos a pH 3.2. No se encontraron efectos significativos de la interacción del pH con ninguna de las otras variables.

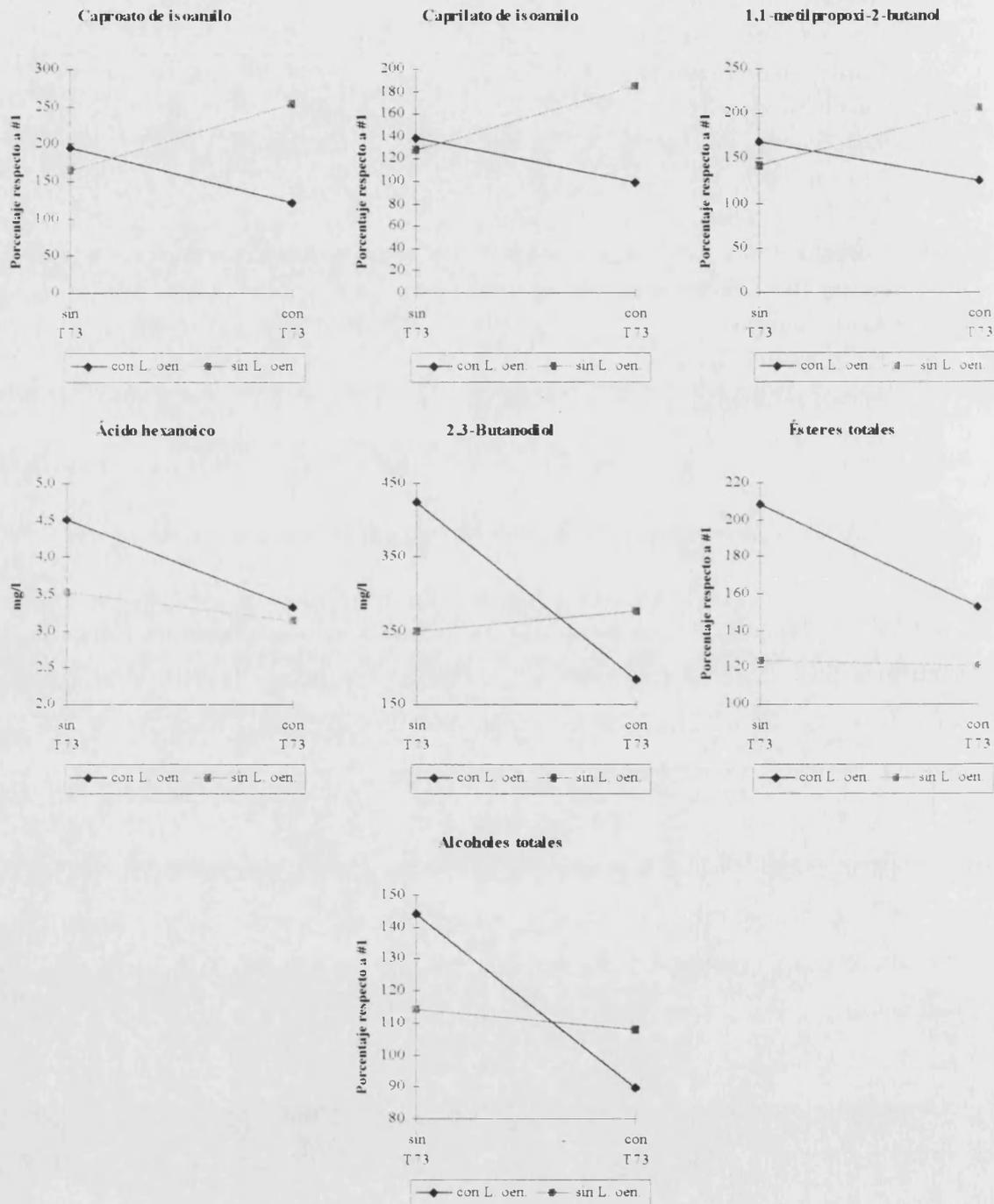


Figura 45. Representación de los niveles de interacción entre las inoculaciones con la cepa T73 y *L. oenos* cepa M42

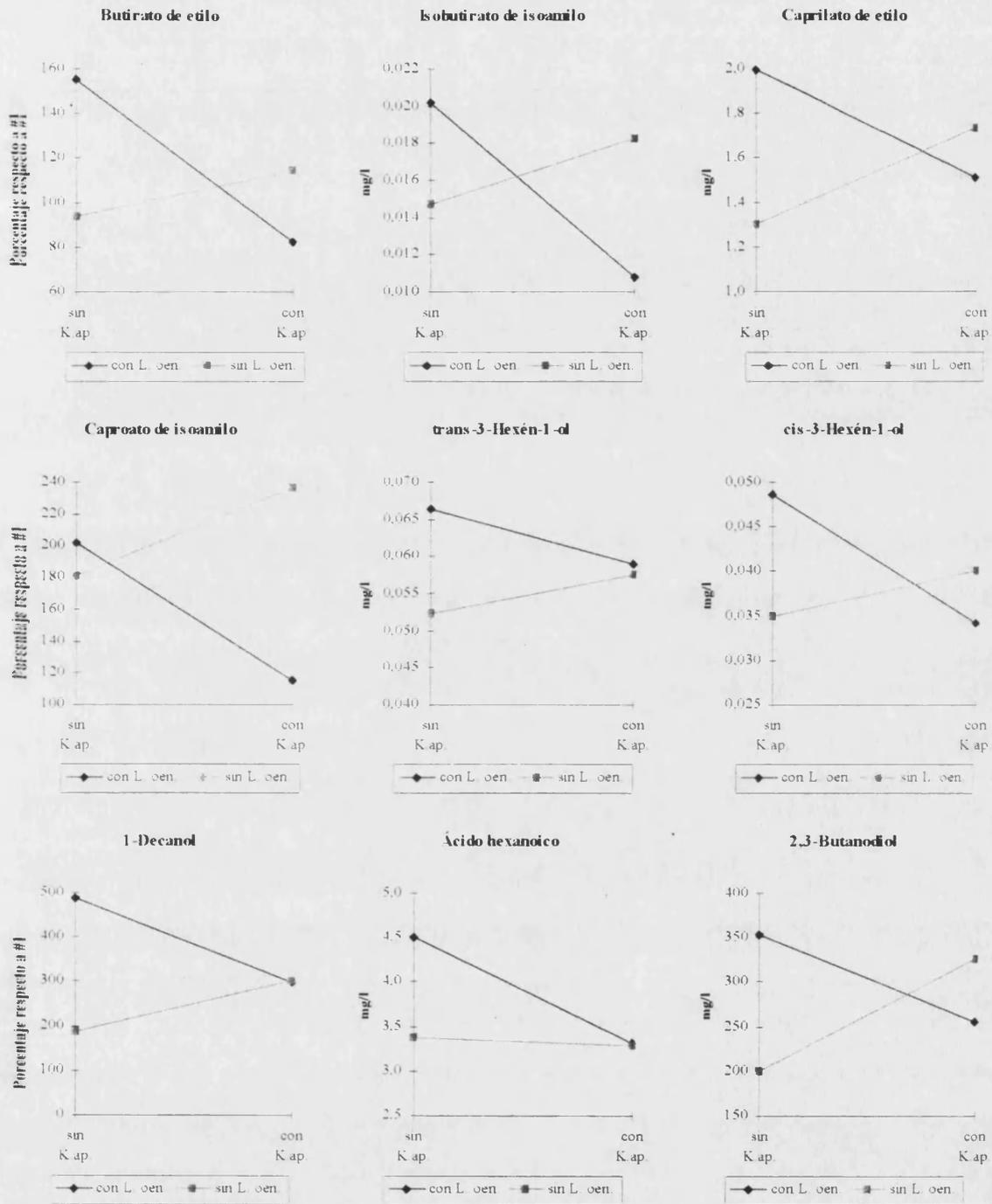


Figura 45. (Sigue)

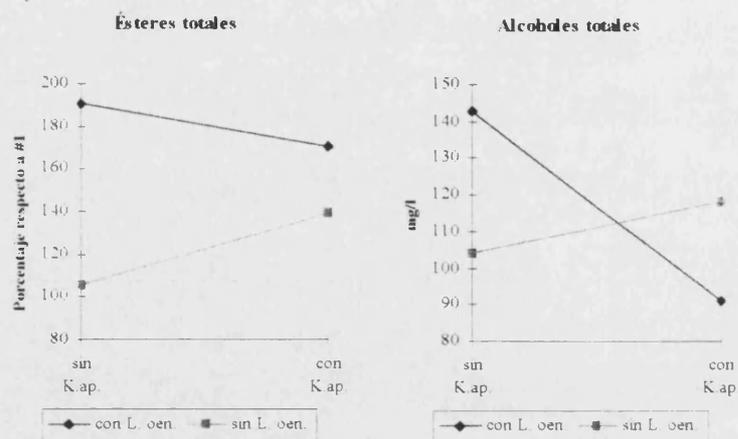


Figura 46. Representación de los niveles de interacción entre las inoculaciones con la cepa T73 y *L. oenos* cepa M42

El efecto de la interacción entre la adición de sulfuroso y la inoculación con la cepa T73, fue significativo para la concentración de acetato de etilo, lactato de etilo, 9-decenoato de etilo, trans-3-hexén-1-ol y ácido acético. Así mismo, el efecto de la interacción entre la adición de SO₂ y la inoculación con *K. apiculata* fue significativo para la concentración de 9-decenoato de etilo y acetaldehído. Estos efectos se muestran en las figuras 48 y 49.

3.3.4. Discusión

La experiencia OA16, por ser a temperatura constante y sin agitación de los mostos, carecía de las dos principales fuentes de variabilidad encontradas en la experiencia anterior, por lo tanto, resultaba idónea para estudiar, con mayor precisión, el papel de las variables microbiológicas sobre la composición de la fracción volátil de los vinos. Así, se ha podido comprobar como algunos de los efectos de la inoculación con la cepa T73 de *Sacch. cerevisiae*, se reafirman en esta experiencia. Esta influencia fue en el sentido de rebajar la coconcentración de gran número de componentes de la fracción volátil y también, de forma significativa, los alcoholes y ésteres totales en valor relativo. Entre los compuestos que presentaron una disminución en su concentración tras la inoculación con la cepa T73, se encontraban el acetato de etilo y el acético. Ambas disminuciones fueron muy significativas ya que y de gran relevancia sobre la calidad del vino, ya que los vinos que no fueron inoculados presentaron cantidades excesivamente elevadas de ambos compuestos.

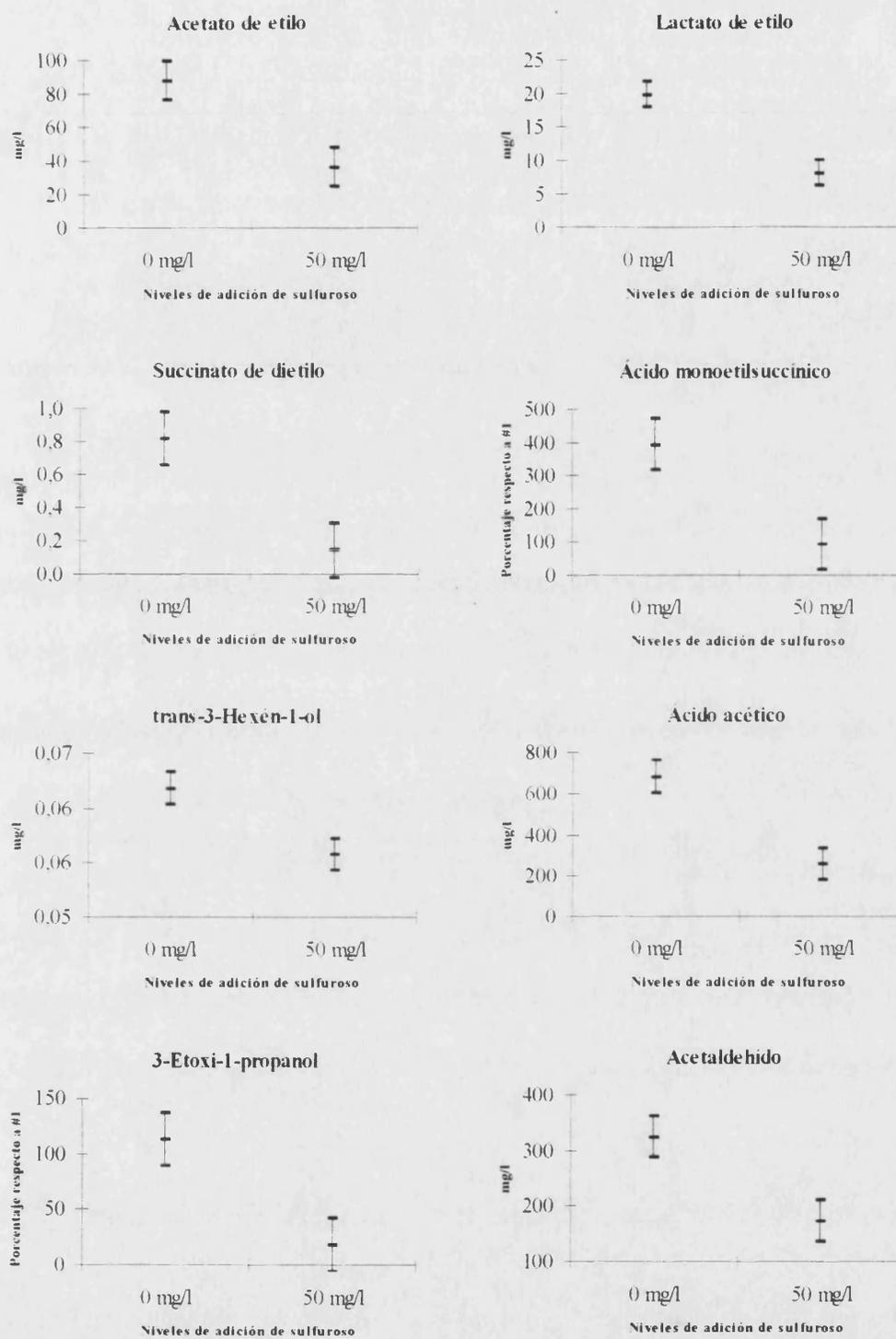


Figura 47. (sigue)

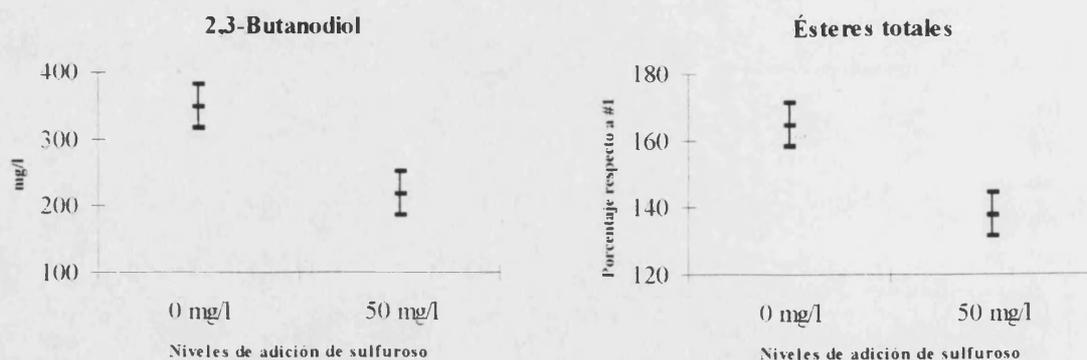


Figura 47. Intervalos LSD para las medias de compuestos de la fracción volátil según los niveles de adición de SO₂

Por tanto, cabe asignarle a la inoculación con T73 una clara influencia sobre la disminución del perfil aromático de los vinos obtenidos, aunque se justificaría ampliamente su empleo por la menor concentración de ácido acético, acetato de etilo y los ácidos valérico, hexanoico y octanoico que se hallaron en los vinos inoculados.

Tabla 23. Medias e intervalos LSD de distintos componentes de la fracción volátil según los niveles de adición de SO₂

	Nivel adición de SO ₂		
	0 mg/l	50 mg/l	LSD
3-Hidroxibutirato de etilo	0.3135	0.3744	± 0.0233
9-Decenoato de etilo*	151.5	182.6	± 8.812
Diacetato de 1,3-propanodiol*	155.7	119.3	± 11.97
Laurato de etilo*	104.8	94.6	± 4.163
N-Acetilglicinato de etilo*	127.1	161.6	± 14.14
Benzoato de 2-fenetilo*	457.2	825.2	± 147.7
cis-3-Hexén-1-ol	0.0432	0.0357	± 0.0029
1-Decanol*	261.7	376.3	± 45.53
Ácido valérico	0.5182	0.1969	± 0.1149

*Compuestos no cuantificados, en tanto por ciento respecto a la muestra #1

La inoculación con la cepa de *K. apiculata* no produjo un aumento significativo de compuestos de la fracción volátil tal y como era de esperar según resultados anteriores en fermentaciones realizadas sobre mosto estéril (Gil *et.al.*, 1996). Así, se produjo un aumento significativo de acetaldehído y ácido acético hasta valores que hacen peligrar la calidad de los vinos obtenidos y un rebaja en la concentración de algunos ésteres y de los alcoholes

superiores relativos. Tan sólo la menor concentración de ácido hexanoico y 3-metil-1-propanol pueden considerarse como efectos beneficiosos de la inoculación con *K. apiculata*, dándole por tanto, en esta experiencia un papel global negativo para la calidad de los vinos producidos.

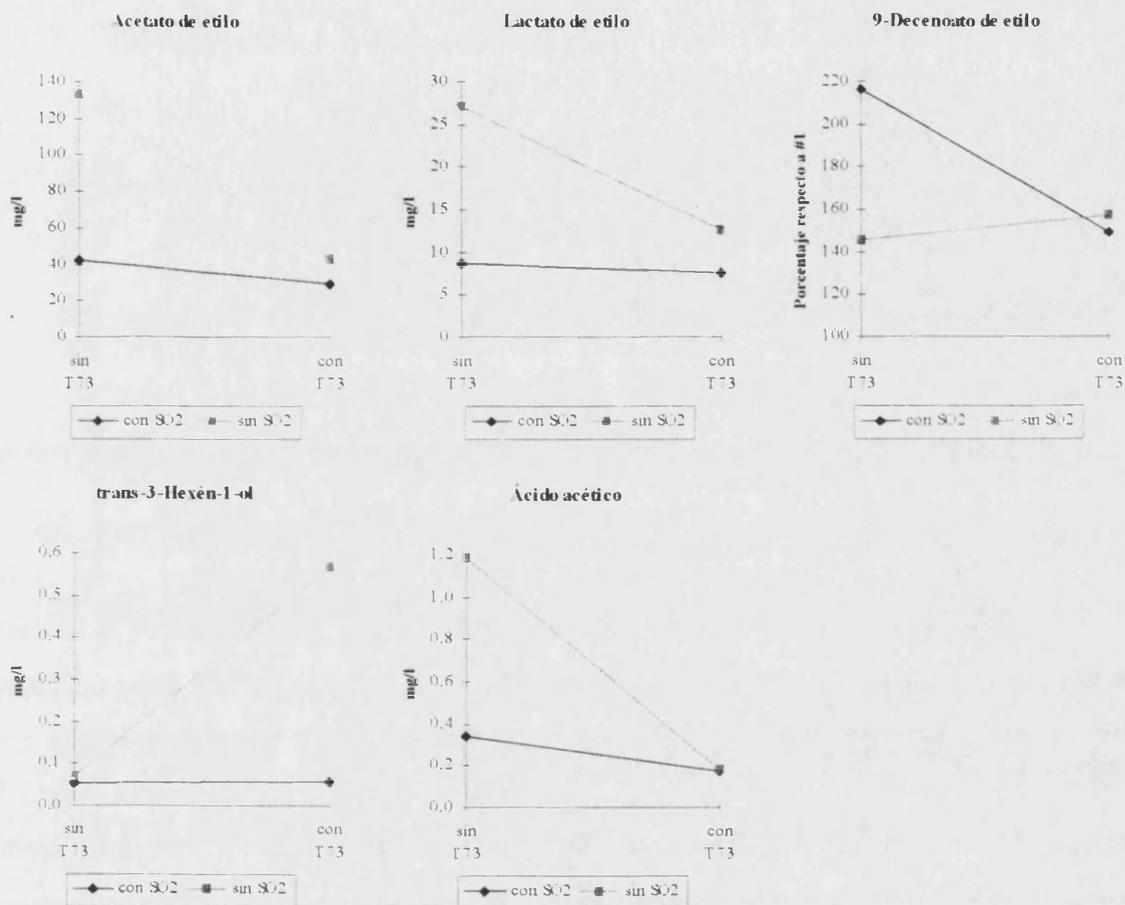


Figura 48. Representación de los niveles de interacción entre la inoculación con la cepa T73 y la adición de SO₂

Se ha demostrado, en otras ocasiones, que esta cepa de *K. apiculata* puede influir positivamente en el aumento de la fracción volátil de los vinos (Gil *et al.*, 1996) aunque, no cabe duda que su inoculación siempre puede resultar problemática debido a problemas en su implantación y a su mayor capacidad de aumento de la acidez volátil. A partir del estudio de las interacciones entre las inoculaciones con las cepas de alto y bajo poder fermentativo, se puede deducir que los aumentos de ácido acético y acetaldehído debido a la inoculación con *K. apiculata*, no se producen cuando también existe inoculación con la cepa T73. Es necesario por tanto alcanzar un mayor conocimiento acerca de la conveniencia de la inoculación con

cepas debajo poder fermentativo en función de la población autóctona de los mostos, y de la inoculación de los mismos con cepas seleccionadas de alto poder fermentativo, así como el momento idóneo para la inoculación de ambas.

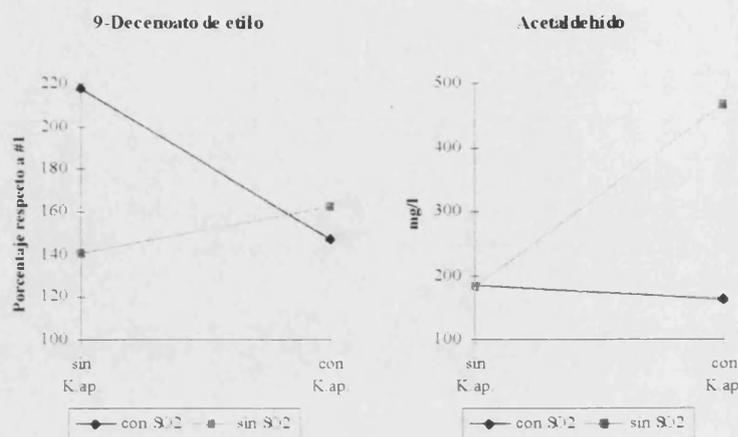


Figura 49. Representación de los niveles de interacción entre la inoculación con *K. apiculata* y la adición de SO₂

La inoculación de *L. oenos* cepa M42, si produjo un aumento global de los ésteres relativos, aunque se produjeron disminuciones de caprato de etilo, y de los ésteres de isoamilo, además de un aumento de los ácidos. Por todo ello, la inoculación de una cepa láctica con objeto de degradar el ácido málico de los vinos, puede aportar características deseables a los vinos al aumentar los ésteres en su conjunto, aunque podrían tener suma importancia las disminuciones ocasionadas en los ésteres de isoamilo, que confieren a los vinos aromas agradables. Estas disminuciones de ésteres de isoamilo fueron especialmente acusadas en los vinos que habían sido inoculados con la cepa T73 y las cantidades globales de ésteres, alcoholes relativos y 2,3-butanodiol fueron más altas en las muestras inoculadas con la bacteria láctica pero sin la cepa T73, por lo que cabe asignar un papel muy importante a la relación entre la inoculación de los mostos con levadura seleccionada y la posterior inoculación con cepas de bacterias lácticas. También se encontró una gran relación entre las inoculaciones con *K. apiculata* y la cepa láctica M42. Los vinos inoculados con *K. apiculata* y con *L. oenos* produjeron cantidades significativamente más bajas de varios compuestos tales como 2,3-butanodiol, caproato de isoamilo, isobutirato de isoamilo, caprilato de etilo o los alcoholes y ésteres totales. Todos estos compuestos se encontraron en mayor concentración en las muestras que habían sido inoculadas sólo con la cepa M42. Esto indica que las modificaciones causadas

en el medio por la inoculación con *K. apiculata* provoca cambios notables en la producción de compoenetes de la fracción volátil por parte de las bacterias lácticas.

El sulfitado de los mostos tuvo una mayor influencia sobre los componentes de la fracción volátil que en la experiencia OA27. El sulfitao tendió a disminuir las concentraciones de acetato de etilo, ácido acético y acetaldehído, por lo que se le puede atribuir un papel beneficioso de control sobre la microbiota del mosto, aunque también se dió una disminución de los ésteres totales y de 2,3-butanodiol. La interacción entre la adición de SO₂ y la inoculación con la cepa T73 fue importante, ya que las muestras no sulfitadas y no incouladas con esta cepa, sufrieron importantes aumentos en la concentración de acetato de etilo y ácido acético. Sin embargo cuando existió inoculación y/o adición de sulfuroso, las concentraciones de estos compuestos permaecieron bajas. Del mismo modo la adición de SO₂ y la inoculación con *K. apiculata* provocó concentraciones elevadas de acetaldehído, no encontrándose este aumento cuando no se realizó ni inoculación con esta levadura ni sulfitado y cuando se realizó la inoculación en los mostos que fueron adicionados con SO₂.

1. Temperatura de fermentación

La temperatura de fermentación fue un factor muy influyente en el crecimiento de las levaduras y en la velocidad de la fermentación. El valor más elevado fue causa de paradas fermentativas y el valor más bajo provocó que las velocidades de crecimiento de las levaduras y fermentación fueran más lentas.

Fue la variable que influyó significativamente en más componentes de la fracción volátil, quedando en evidencia que la temperatura de 15° C no produjo, en general, concentraciones más elevadas de los compuestos, siendo la temperatura de 25 °C la más adecuada tanto para la mejora de la fracción volátil como para la velocidad de fermentación.

2. Agitación y oxigenación

La oxigenación de los mostos no produjo grandes variaciones sobre los parámetros fermentativos estudiados ni sobre la fracción volátil. Sin embargo, la agitación provocó un mayor crecimiento de las levaduras en las primeras fases de la fermentación que este mayor crecimiento se reflejara en una mayor velocidad de fermentación, por lo que se pone de manifiesto que la aireación incrementa la fase aerobia y el aumento de biomasa. Estos efectos se reflejaron en una mayor concentración de gran parte de compuestos de la fracción volátil en los vinos que fermentaron con agitación.

3. Inoculación con levadura seleccionada y con levadura de bajo poder fermentativo

Los mostos inoculados con ambos tipos de levaduras concluyeron la fermentación con un menor número de levaduras viables, dejando de manifiesto la gran influencia ecológica de las inoculaciones. La levadura seleccionada T73 produjo fermentaciones más rápidas en las dos experiencias realizadas, mientras que la inoculación con levadura apiculada tan sólo en una de ellas, en la que se aclimató mejor. Existió una clara interacción entre ambas levaduras tanto en cuanto a su influencia en el crecimiento de las poblaciones, en los azúcares residuales y en la producción de numerosos compuestos volátiles. La levadura seleccionada provocó una mayor cantidad de azúcar residual en una de las experiencias y una menor concentración de números componentes de la fracción volátil, aunque su empleo rebajó muy significativamente las

cantidades de acetato de etilo, y ácido acético. La inoculación con *K. apiculata* no produjo un notable enriquecimiento de la fracción volátil de los vinos.

4. Adición de vitaminas y fosfato diamónico

Las adiciones de estos suplementos a los mostos no influyeron notablemente en el crecimiento de las levaduras ni en la rapidez del proceso fermentativo por lo que, los mostos empleados no presentaron problemas de carencia de estos factores nutricionales. La adición de vitamina C tuvo provocó una mayor riqueza aromática de los vinos y rebajó el nivel de acetaldehído, por lo que se le puede otorgar un papel beneficioso. Las adiciones de tiamina y fosfato diamónico influyen en la concentración de algunos componentes de la fracción volátil, pero no tuvieron un efecto global sobre la calidad del vino.

5. Adición de SO₂

La adición de SO₂ produjo efectos significativos sobre el crecimiento de las levaduras y sobre la velocidad de la fermentación cuando se empleó una concentración de 100 mg/l y no para 50 mg/l. En una de las experiencias tuvo una notable influencia en numerosos componentes de la fracción volátil y reduciendo significativamente el acetato de etilo, ácido acético y acetaldehído. Las interacciones del SO₂ con las levaduras inoculadas fueron significativas para la reducción de estos compuestos.

6. Inoculación de *L. oenos*

La inoculación de *L. oenos* al final de la fermentación alcohólica, provocó un aumento de numerosos compuestos de la fracción volátil de los vinos y en concreto de los ésteres y de los ácidos. Se dieron interacciones significativas entre las inoculaciones con las levaduras y *L. oenos*, produciéndose en general una mayor concentración de ésteres y alcoholes en los vinos que siendo inoculados con *L. oenos*, no lo habían sido previamente con la levadura seleccionada T73 o *K. apiculata*.

7. Cónclusión general

Mediante la aplicación de diseños de experimentos basados en matrices ortogonales, se ha podido evaluar los efectos de múltiples variables enológicas sobre el proceso de vinificación y sobre la fracción volátil de los vinos. Los resultados obtenidos nos indican que este tipo de técnicas, de fácil aplicación y análisis, son apropiadas para realizar estudios más concretos en bodega con la finalidad de reducir al máximo la influencia del azar en los procesos de vinificación y conocer el verdadero papel de las manipulaciones y tratamientos que actualmente se realizan. Estos análisis nos permitirán conocer la importancia de las variables introducidas, que niveles de actuación para esas variables son los óptimos y predecir las características del producto acabado para los niveles ensayados.

BIBLIOGRAFÍA

- AMIERINE, M.A. (1985). Winemaking. In *World Debt to Pasteur*, edited by H. Koprowski and S.A. Plotin, pp. 67-81, New York: Alan R. Liss Incorporated.
- AMIERINE, M.A., Berg, P., Kunkee, R.E., Ough, C.S., Singleton, V.L. y Webb, A.D. (1980), *The technology of winemaking* 4th Ed. Westport. Connecticut: AVI Publishing Company.
- ÄYRÄPÄÄ, T. (1971) On the formation of higher alcohols by yeasts and its dependence on nitrogenous nutrients. *Kem. Tidskr.* **83**, 79-90.
- BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. (1983), *Yeast: characteristics and identification*. Cambridge University Press, New York.
- BARNETT, J.A.; (1972). Yeast counts on grapes of Bordeaux wines. *Arch. Mikrobiol.* **68**, 71-836.
- BEECH, F.W. AND THOMAS, S. (1985). Action microbienne de l'anhydride sulfureux. *Bulletin de l'Office International du Vin*, **58**, 564-581.
- BELIN, J.M. (1972). Study of the distribution of yeast on the surface of grapes. *Vitis* **11**, 135-145.
- BELIN, J.M. (1981). Thèse d'Etat, Université de Dijon.
- Bely, M., Sablayrolles, J.M. and Barre, P. (1990). Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**, 319-324.
- BENDA, I. (1982). Wine and Brandy. En *Prescott and Dunns Industrial Microbiology* 4th Ed. Edited by G. Reed, pp. 293-402. Westport: AVI Publishing Company
- BERGEY, S. MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY (1989). Hensyl, W.R. (Ed.). Williams & Wilkins. Baltimore.
- BERTRAND, A (1971) Utilisation de la démixtion pour le dosage de quelques substances volatiles du vin par chromatographie gazeuse. *Chim. Anal.* **53**, 577-583.
- BERTRAND, A. (1968) Application of liquid gas chromatography to the determination of volatile constituents of wine. *Conn. Vigne Vin* **2**, 179-270.
- BERTRAND, A. (1975) Recherches sur l'analyse des vins par chromatographie en phase gazeuse. Thèse Doct. Sciences, Bordeaux
- BERTUCCIOLI, M.; MONTEDORO, G. (1974) Concentration of the headspace volatiles above wine for direct chromatography analysis. *J.Sci.Food Agric.* **25**, 675-687.
- BEVAN, E.A.; MAKOWER, M. (1963). The physiological basis of the killer character in yeast. In: S.J. Geerts (Ed.). *Genetics today XIth Int. Congr. Genet. Vol 1.* p 202-203. Pergamon Press, Oxford.

BOISON, J.O.K.; TOMLINSON, R.H. (1990). New sensitive method for the examination of the volatile flavor fraction of Cabernet Sauvignon wines. *J. Chromatography*. **522**, 315-327.

BOUIX, M.; LEVEAU, J.Y.; CUINIER, C. (1981). Applications de l'électrophorese des fractions exocellulaires de levures au controle de l'efficacite d'un levurage en vinification. p 87-92. In: G.G. Stewart and I. Rusell (eds.). *Current developments in yeast research*. Pergamon Press. Toronto.

BRAUN, R.D. (1987). Gas Chromatography. p. 890-931. In: Karen S. Misler (ed.) *Introduction to instrumental analysis*. McGraw-Hill, Inc. New York.

BUREAU, G.; BRUN, O.; VIGUES, A.; MAUJIAN, A.; VESELLE, G.; FEUILLAT, M. (1982). Etude d'une microflore levurienne champenoise. *Com.Vigne Vin* **16**, 15-32.

CABEZUDO, M.D. (1982). El análisis sensorial de los vinos. En: C. Llaguno (ed.). *Enología: Temas actuales*. Asociación Nacional de Químicos de España. Madrid.

CANTARELLI, C. (1958). The increase of the fermentation speed in wine making. *Rev. Ferm. Indust. Alimnet.* **13**, 59-71.

CASTELLI, T. (1948). I lieviti della fermentazione vinaria nelle regione Pugliese. *Ric. Sci.* **18**, 66-94,

CASTELLI, T. (1952). Considérations sur les relations entre climat et agents de la fermentación vinarie. *Rev. Ferm. Ind. Alim.* **7**, 35-42.

CASTELLI, T. (1955). Yeast of wine fermentations from various regions in Italy. *Am J. Enol. Vitic.* **6**, 18-20.

CASTELLI, T. (1973). L'ecologie des levures. Colloque International d'Oenologie. *Arc-en-Senans. Vignes Vin mai*, 19-25.

CIOLFI, C.; CASTINO, M.; DI STEFANO, R. (1985). Studio sulla risposta metabolica di lieviti di specie diverse fermentanti un unico mosto a temperatura comprese fra 10 e 40 °C. *Nota I. Riv. Vitic. Enol.* **9**, 447-470.

COMELLAS, L.; GASSIOT, M.; QUINTANA, M.; SULLE, R. (1988) Comparación entre las técnicas de extracción con disolventes y concentración en polimeros porosos aplicadas al estudio de la fracción volátil de los vinos. *Afinidad* **45**, 305-309.

CORDONNIER, R. (1971) The aroma of wine and brandy. *Bull.OIV* **490**, 1128-1148.

CORDONNIER, R.; BAYONOVE, C. (1981) Etude de la phase prefermentaire de la vinification: extraction et formation de certains composes de l'arome; cas des terpenols, des aldehydes et des alcohols en C₆. *Com.Vigne Vin* **15**, 269-286.

CRAIG, J.T. (1988) A comparison of the headspace volatiles of kiwifruit wine with those of wine of *Vitis vinifera* variety Müller-Thurgau. *Am.J.Enol.Vitic.* **39**, 321-324.

CUINIER, C. (1983) Reflexions sur le levurage en oenologie. *Vigne Vin* **322**, 12-18.

- CUINIER, P. (1976) La microflora des sols du vignoble. *Rev. Fr. Oenol.* **102**, 42-49.
- CUINIER, P.; BOUIX, N.; LEVAN, J. (1981) Méthode d'étude de l'origine des levures en oenologie. Identification des espèces et différentiation des clones. *Vignes Vin* **302**, 37.
- DAVIS, C.R., SILVEIRA, N.F.A. Y FLEET, G.H. (1985). Occurrence and properties of bacteriophages of *Leuconostoc oenos* in Australian wines. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 872-876.
- DOMERCQ, S. (1956). Thèse Docteur-Ingenieur, Université de Bordeaux.
- DRAWERT, F.; SCHREIER, P.; SCHREUER, W. (1974) Gaschromatographisch-massenspektrometrische untersuchung flüchtiger inhaltsstoffe des weines. III. Säuren des weinaromas. *Z.Lebensm.Unters.Forsch.* **155**, 342-346.
- DUBOURDIEU, D.; SOKOL, A.; ZUCCA, J.; THALOUARN, P.; DATTEE, A.; AIGLE, M. (1987). Identification des souches de levures isolées de vins par l'analyse de leur ADN mitochondrial. *Conn. Vigne Vin*, **21**, 267-278.
- DUBOURDIEU, D.; VILLETAZ, J.C.; DESPLANQUES, C.; RIBERAU-GAYON, P. (1981) Dégradation enzymatique du glucane de *Botrytis cinerea*. Application à l'amélioration de la clarification des vins issus de raisin pourris *Conn.Vigne Vin* **15**, 161-177.
- DUCLAUX, E. (1901). Traité de Microbiologie. Tome IV. Ed. Dunod. Paris.
- ETIEVANT, P.X.; BAYONOVE, C.L. (1983) Aroma components of pomaces and wine from the variety Muscat of Fontignan. *J.Sci.Food Agric.* **34**, 393-403.
- FARRIS, G.A.; FORTELEONI, M.; RUGGIU, M.; DEIANA, P. (1988) La microflora blastomicetica delle uve colpite da marciume acido. *Vine Italia* **3**, 7-14.
- FERRE, L. (1958). Traité d'Oenologie Bourguignonne. INAO Edition, Paris.
- FLEET, G.H. Y HEARD, G.M. (1993). Yeasts- Growth during fermentation. In: *Wine Microbiology and biotechnology*. pp. 27-54. Harwood Academic Publishers. Ed. Fleet G.H. Chur.
- FLEET, G.H., LAFON-LAFOURCADE, S. Y RIBÉREAU-GAYON, P. (1984). Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1034-1038.
- FLEET, G.H.; LAFON-LAFOURCADE, S.; RIBERAU-GAYON, P. (1984) Evolution of yeast and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 1034-1038.
- FLORENZANO, G. (1949). La microflora blastomiceta dei mosti e dei vini di alcune zone Toscane. *Ann. Sper. Agrar.* **3**, 887-918.
- GAETANO, C. (1988). Lieviti produttori di SO₂. *Vini d'Italia*. **30**(1), 23-26.

GAO, C. Y FLEET, G.H. (1988). The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts. *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera apiculata* and *Candida stellata*. *J. Appl. Bacteriol.*, **65**, 405-410.

GASSIOT, M.; COMELLAS, C.; AUGENET A.L. (1982). Aplicación de la cromatografía de gases a la caracterización de vinos. *Afinidad* **38**, 189-196.

GOTO, S.; KITANO, K. SHINOHARA, T. (1992). Utilization of KHR killer as genetic marker for purity test of starter yeast during fermentation of grape musts. *J. ferment. Bioeng.* **73**, 70-72.

GUICHARD, E.A.; DUCRUET, V.J. (1984) Quantitative study of volatiles in a model system by a headspace technique. *J.Agric.Food Chem.* **32**, 838-840.

HADJINICOLAU, D. (1981). Incidence des opérations préfermentaires sur la fermentescibilité de moûts et les caractères organoleptiques des vins blancs secs. Thèse 3ème cycle. Université de Bordeaux.

HEARD, M.G.; FLEET, H.G. (1985). Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 727-728.

HEARD, G.M., FLEET, G.H. (1986). Occurrence and growth of yeasts species during the fermentation of some Australian wines. *Food Technol. Austral.*, **38**, 22-25.

HINZE, H. Y HOLZER, H (1986). Analysis of the energy metabolism after incubation of *Saccharomyces cerevisiae* with sulfite or nitrite. *Archives of Microbiology*, **145**, 27-31.

HINZE, H. Y HOLZER, H. (1985). Accumulation of nitrite and sulfite in yeast cells and synergistic depletion of the intracellular ATP-content. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, **180**, 117-120.

HOUTMAN, A.C.; MARAIS, J.; DU PLESSIS, C.S. (1980). Factors affecting the reproducibility of fermentation of grape juice and of the aroma composition of wine. I. Grape maturity, sugar, inoculum concentration, aeration, juice turbidity and ergosterol. *Vitis*, **19**, 37-54.

HOUTMAN, A.D.; MARAIS, J.; DU PLESSIS, (1980) The possibilities of applying present day knowledge of wine aroma components. Influence of several juice factors on fermentation rate and ester production during fermentation. *S.Afr.J.Enol.Vitic.* **1**, 27-33.

INGLEDEW, W.M. Y KUNKEE, R.E. (1985). Factors influencing sluggish fermentation of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**, 65-76.

INGRAM, M. (1948). The germicidal effects of free and combined SO₂. *J. Soc. Chem. Ind.*, **67**, 18-21.

JOSLYN, M.A. Y BRAVERMAN, J.B.S. (1954). The chemistry and technology of the pretreatment and preservation of fruit and vegetable products with SO₂ and sulfites. *Advances in Food Research*, **5**, 97-160.

- KILLIAN, R.E. Y OUGH, C.S. (1979) Fermentation esters- formation and retention as affected by fermentation temperature. *Am. J. Enol. Vitic.*, **30**, 301-305.
- KING, A.D., PONTING, J.D., SANSHUCK, D.W., JACKSON, R., MIHARA, K. (1981). Factors affecting death of yeasts by sulfur dioxide. *J. Food Prot.* **44**(2), 92-97.
- KREGER VAN RIJ, N.J.N. (1984) The yeasts: a taxonomic study. Elsevier Science Publisher, B.V. Amsterdam.
- KUNKEE, R.E. (1984). Selection and modification of yeasts and lactic acid bacteria for wine fermentation. *Food Microbiol.*, **1**, 315-332.
- KUNKEE, R.E.; AMERINE, M.A. (1970) Yeast in winemaking, In A. H. Rose and J.S. Harrison (ed.). *The yeast: yeast technology*. Academic Press, Inc. (London). Ltd., London.
- KUNKEE, R.E.; GOSWELL, R. (1977) Table wines. In *Economic microbiology*, vol. I. A.H. Rose (Ed.). Academic Press, London.
- LAFON-LAFORCADE, S. (1983). Wine and brandy. In: H.J. Rehm and G. Reed (eds.), *Biotechnology*, Vol 5. Verlag Chemie, Weinheim.
- LAFON-LAFORCADE, S.; LUCMARET, V.; JOYEUX, A.; RIBÉREAU-GAYON, P (1981) Utilisation des levains mixtes dans l'elaboration de vins de poirriture noble en vue de réduire l'acidité volatile CR Acad.Agric. **67**, 616-622.
- LAFON-LAFORCADE, S.; RIBÉREAU-GAYON, P. (1984). Developments in the microbiology of wine production. p. 1-45. In: M.E. Bushell (ed.), *Progress in industrial microbiology*. vol 19. Modern applications of tradicional biotechnologies. Elsevier Publishing Co. Oxford.
- LEHTONEN, M. ; SUOMALAINEN, L. (1977) Rum. In *Economic Microbiology*. Vol I. *Alcoholic beverages*. A.H. Rose (Ed.) Academic Press, New York.
- LODDER, J. (1970) The yeasts: a taxonomic study. Horth Holland Publishing Co., Amsterdam.
- LONGO, E.; CANSADO, J.; AGRELO, D.; VILLA, T.G. (1991) Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from Northwest Spain. *Am. J. Enol. Vitic.* **42**, 141-144.
- LONGO, E.; VELÁZQUEZ, J.B.; SIEIRO, C.; CANSADO, J.; CALO, P.; VILLA, T.G. (1992) Production of higher alcohols, ethyl acetate, acetaldehyde and other compounds by 14 *Saccharomyces cerevisiae* wine strains isolated from the same region (Salnés, N.W. Spain). *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 539-541.
- LUCMARET, V. (1980). Thèse de 3ème Cycle, Université de Bordeaux II.
- MARAIS, J. (1988a). Effect of skin-contact time and temperatures on juice and wine composition and wine quality. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **9**, 22-30.

MARAIS, J. (1988b). Terpenes in grape juice and wine: effect of heat treatment and skin contact. In: *Proceedings of the 5th. International Flavor Conference*, Porto Karras, Chalkidiki, Greece. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.

MARCUS GOMES, J.V. (1969) Empleo de levaduras seleccionadas em vinificacao. *Anais Inst. Vinho Porto* **23**, 41-70.

MARTINEZ, J.; TOLEDANO, F.; MILLÁN, C.; ORTEGA, J.M. (1990). Development of alcoholic fermentation in non-sterile musts from "Pedro Ximénez" grapes inoculated with pure cultures of selected yeast. *Food Microbiology*, **7**, 217-225.

MARTINI, A.; FEDERICHI, F.; ROSINI, G. (1980) A new approach to the study of yeast ecology of natural substrates. *Can. J. Microbiol.* **26**, 856-859.

MATEO, J.J.; GIL, J.V.; CAMPOS, E.; JIMENEZ, M.; HUERTA, T.; PASTOR, A. (1990). Análisis de la fracción volátil en vinos de la variedad *Monastrell*. Puesta a punto del método. *Sem. Vitiv.* **2313/14**, 5713-5721.

MATEO, J.J.; JIMENEZ, M.; HUERTA, T.; PASTOR, A. (1991). Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to the aroma of wine. *Int. J. Food Microbiol.* **14**, 153-160.

MATEO, J.J.; JIMENEZ, M.; HUERTA, T.; PASTOR, A. (1992). Comparison of volatiles produced by four *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from *Monastrell* musts. *Am. J. Enol. Vitic.* **43**, 206-209.

MAUGENET, J. (1981). Les levures a caractere aromatique. *Rev. Franc. Oenol.* **5**, 157-184.

MESIAS, J.L.; OUGH, C.S. (1985) Comparación de sistemas de extracción de componentes volátiles de uvas en soluciones modelo. *Sem. Vitiv.* **2010**, 519-523.

MESTRE ARTIGAS, C.; MESTRE JANÉ, A. (1946). Fermentaciones compartidas con diferentes levaduras. Min. Agric. Inst. Nac. Inves. Agron. Estación Viticultura y Enología. Villafranca del Panadés. **68**, 1-28.

MINÁRIK, E.; JUNGOVA, O.; EMERIAMD, M. (1978). Fructophilic yeast and their effect on naturally sweet wines. *Weinn-Wiss.* **33**, 42-47.

MINARIK, E.; RIGALA, P. (1975) The selective action of fungicides on the microflora of grape berries. *Mitt.Rebe.Wein Ser.A (Klosterneuburg)* **25**, 187-204.

MONK, P.R. (1982). Effect of nitrogen and vitamin supplementation on yeast growth and rate of fermentation of Rhine Riesling grape juice. *Food Technology in Australia*, **34**, 328-332.

MONK, P.R. Y COSTELLO, P.J. (1984). Effect of ammonium phosphate and vitamin mixtures on yeast growth in preserved grape juice. *Food Technology in Australia*, **36**, 25-28.

- MOORE, K.J.; JOHNSON, M.G.; MORRIS, J.R. (1988) Indigenous yeast microflora on Arkansas White Riesling (*Vitis vinifera*) grapes and in model must systems. *J. Food Sci.* **53**, 1725-1728.
- MORA J.J.; MULET, A. (1991) Effects of some treatments of grape juice on the population and growth of yeast species during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* **42**, 133-136.
- MORA, J.J.; BARBAS, I.; RAMIS, B.; MULET, A. (1988) Yeast microflora associated with some Majorcan musts and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **39**, 344-346.
- MULLER, C.J.; KEPNER, R.E.; WEBB, A.D. (1973) Lactones in wines: a review. *Am.J.Enol.Vitic.* **24**, 5-9.
- MÜLLER-THURGAU, H. (1905-1907). *Hendbuch der Technischen mycologie*. IV (B), 238.
- NOBLE, A.C. (1988). Analysis of wine sensory properties. In: *Modern methods of plant analysis*. New Series Vol. 6. Wine Analysis. H.F. Lisnkens and J.F. Jackson (Eds.). 9-28. Springu-Verlay, Berlin.
- NORDSTROM, K. (1964) Studies on the formation of volatile esters in the fermentation with brewer's yeasts. *Sven.Kem.Tidskr.* **76**, 1-34.
- OLLIVIER, CH. (1987). *Recherches su la vinification des vins blancs secs. Diplôme d'études et de recherches*, Université de Bordeaux II. France.
- ORTEGA, J.; MARTIN, I.; MARTIN, A. (1987) Utilización de polímeros porosos en el análisis de compuestos volátiles de vinos. *Anal.Bromatol.* **34**, 147-160.
- OUGH, C.S. Y CROWELL, E.A. (1979). Pectic-enzyme treatment of white grapes: temperature variety and skin-contact time factors. *Am. J. Enol. Vitic.* **30**, 22-27
- OUGH, C.S., DAVENPORT, M., Y JOSEPH, K. (1989). Effects of certain vitamins on growth and fermentation rate of several commercial active yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.*, **40**, 208-213
- PARK, Y.M. (1974). *Contribution à l'étude des levures de Cognac*. Thésis, Université of Bordeaux II.
- PARONETTO, L Y PARONETTO, L. (1986). Codice Internazionale delle pratiche enologiche (O.I.V): Parte II. Pratiche e trattamenti enologici. En: *Ausiliari chimici e biologici in enologia*. pp. 70-100 INTEC Ed. Verona.
- PARRISH, M.E.; CARROLL, D.E. (1985) Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.* **36**, 165-169.
- PASTEUR, L. (1866) *Etudes sur le vin*. 1ª Ed. Masson, Paris

PÉREZ-GONZÁLEZ, J.A., GONZÁLEZ, R., QUEROL, A., SENDRA, J., RAMÓN, D. (1993). Construction of a recombinant wine yeast strain expressing β -(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification process. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(9), 2801-2806.

PEYNAUD, E. (1984). La cata y composición del vino. En: *Enología práctica, conocimiento y elaboración del vino*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

PEYNAUD, E.; DOMERCQ, S. (1953). The yeast of the Gironde. *Ann. Inst. Natl. Rech. Agron.* **4**, 265-300.

PEYNAUD, E.; DOMERQ, S. (1953) Etude des levures de la Gironde. *Ann. Technol. Agric.* **4**, 265-300.

PEYNAUD, E.; DOMERQ, S. (1955) Study of the microflora of the musts and wines of Bourdeaux. *CR Acad. Agric.* **41**, 103-106.

PEYNAUD, E.; RIBEREAU-GAYON, J. (1947) Sur les divers de fermentation alcoolique détermiés par diverses races de levures elliptiques. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **224**, 1388-1390.

QUEROL, A.; BARRIO, E.; HUERTA, T.; RAMÓN, D. (1992b). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2948-2953.

QUEROL, A.; HUERTA, T.; BARRIO, E.; RAMÓN, D. (1992a). Strain for use as dry yeast in fermentation of Alicante wine: selection and DNA patterns. *J. Food. Sci.* **57**, 183-185.

QUEROL, A.; JIMENEZ, M.; HUERTA, T. (1990). Microbiological and enological parameters during fermentation of musts from poor and normal grape harversts in the region of Alicante (Spain). *J. Food Sci.* **55**, 1603-1606.

RADLER, F. (1975), The metabolism of organic acids by lactic acid bacteria. In: *Lactic acid bacteria in beverages and food*. J.G. Carr, C.V. Cuitting and G.C. Whitting, eds. Academic Press, London.

RAIMON, D. (1981) Rapport Stage à la Faculté des Sciences, Reims.

RAMEY, D.; GÜNTERT, M.; RIETH, W. (1986). Effects of skin contact temperature on Chardonay must and wine composition. *Am. J. Enol. Vitic.* **37**, 99-106.

RANKINE, (1967) Formation of higher alcohols by wine yeasts and relationship to taste threshlod. *J.Sci.Food Agric.* **18**, 583-589.

RANKINE, B.C. (1968) The importance of yeasts in the determining the composition and quality of wines. *Vitis* **7**, 22-49.

RANKINE, B.C.; LLOYD, B. (1963) Quantitative assessment of dominance of added yeast in wine fermentations. *J. Sci. Food Agric.* **14**, 793-798.

- RAPP, A.; HASTRICH, H. (1976) Gaschromatographische untersuchungen über die aromastoffe von wienbeeren. II. Möglichkeiten der sortencharakterisierung. *Vitis* **15**, 183-187.
- REED, G. (1982). In: Prescott and Dunn's Industrial Microbiology, 4th. edn (Ed. Reed, G.) pp. 331.337. Westport CN. AVI Publishing Co.
- REED, G.; NAGODAWITHANA, T.W. (1988) Technology of yeast usage in winemaking. *Am. J. Enol. Vitic.* **39**, 83.
- RENAUD, J. (1940) La microflore des levures du vin. Son role dans la vinification. *Ann.Ferment.* **5**, 410-417.
- RIBEREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E. (1960). Treatise on Oenology. Vol I. Ripening of grapes, Alcoholic fermentation, Vinification. Libraire Polytechnique Ch. Béranger. Paris.
- RIBEREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E.; SUDRAUD, P.; RIBEREAU-GAYON, P. (1972-1977) *Sciences et techniques du vin*. Vol 1-4. Ed. Dunod, Paris.
- RIBEREAU-GAYON, P. (1985) New developments in wine microbiology. *Am. J. Enol. Vitic.* **36**, 1-10.
- RIBEREAU-GAYON, P.; BOIDRON, J.N.; TERRIER, A. (1975) Aroma of Muscat grape varieties. *J.Agric.Food Chem.* **23**, 1042-1047.
- ROSE, A.H. AND PILKINGTON, B.J. (1989). Sulphite. In *Mechanism of Action of Food Preservation Procedures*, edited by G.W. Gould, pp. 201-216. London. Elsevier.
- ROSET, M. ; MARGULIS, H.; BORGES, F. (1971). Sur quelques levures dites "sauvages" et les substances volatiles qu'elles produisent dans un just de raisin. *Ind. Aliment. Agric.* **88**, 647-653.
- ROSINI, G.; FEDERICHI, F.; MARTINI, A. (1982) Yeast flora of grape berries during ripening. *Microbiol. Ecol.* **8**, 83-89.
- SABLAYROLLES, J.M. Y BARRE, P. (1989). Automated control of the temperature during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Sciences des Aliments*, **9** 239-251.
- SAENKO, N.F. (1946). *Vinodelie i Vinogradarstvo. SSSR.* **6**, 12.
- SALMON, J.M. (1989). Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck enological fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 953-958.
- SAPIS-DOMERQ, S. (1979) Nouvelles études de la microflore de vinification. *Connaiss. Vigne Vin.* **4**, 45-61.
- SAPIS-DOMERQ, S.; GUITTARD, A. (1976) Study of the yeast microflore of Rousillon. *Conn.Vigne Vin* **10**, 1-21.
- SCHOPFFER, J.F. (1973). Coll. Intern. Oenologie. Arc et Senans, Vignes et Vins, n° spécial.

SCHREIER, P. (1979). Flavor composition of wines: a review. *CRC Crit. Rev. Food Sci Nutr.* **12**, 59-111.

SCHREIER, P.; DRAWERT, F. (1974) Gaschromatographisch-massenspektrometrische untersuchug flüchtiger inhaltsstoffe des weines. *V. Chem.Mikrobiol.Technol.Lebensm.* **3**, 154-160.

SHIMIZU, K.; ADACHI, T.; KITANO, K.; SHIMAZAKI, T.; TOTSUKA, A.; HARA, S.; DITTRICH, H.H. (1985). Killer properties of wine yeast and characterization of killer wine yeasts. *J. Ferment. Technol.* **63**, 421-429.

SINGH, R.; KUNKEE, R.E. (1976) Alcohol dehydrogenase activities of wine yeasts in relation to higher alcohol formation. *Appl.Microbiol.* **96**, 329-339.

SINGLETON, V.L.; SIEBERHAGEN, H.A.; de WET, P.; van WYK, C.J. (1975). Composition and sensory qualities of wines prepared from white grapes by fermentation with and without grape solids. *Am. J. Enol. Vitic.* **26**, 62-69.

SOUFLEROS, E.; BERTRAND, A. (1979). Role de la "souche de levures" dans la production de substances volatiles au cours de la fermentation de jus du raisin. *Conn. Vigne Vin* **13**, 181-198.

SPONHOLZ, W.R.; DITTRICH, H.H. (1974) The formation of fermentation by-products wich bind SO₂ of higher alcohols and esters by pure culture yeast and by enologically important "wild" yeast. *Wein Wiss* **29**, 301-314.

SUAREZ, J.A.; IÑIGO, B. (1990) Microbiología enológica: fundamentos de vinificación. Ediciones Mundi Prensa, Madrid.

SUDRAUD, P., CHAUVET, S., (1985). Activité antilevure de l'anhydride sulfureux moleculaire. *Conn. Vigne Vin*, **19**(1), 31-40.

SUOMALAINEN, H.; NYKÄNEN, L. (1966) The aroma components produced by yeasts in nitrogen-free sugar solution. *J.INst.Brew.* **72**, 469-471.

TARANTOLA, C. (1946). Nuovo contributo allo studio dei lieviti apiculati. *Ann. Accad. Agric. Turino.* **88**, 115-153.

USSEGLIO TOMASSET, L.; DI STEFANO, R. (1980). Profilo aromatico del Moscato bianco del Piemonte. *Riv. Vitic. Enol.* **33**, 3-13.

USSEGLIO-TOMASSET, L., CIOLFI, G., PAGLIARA, A. (1981). Estimating sulfur dioxide resistance of yeasts, I: the delaying action on fermentation start. *Vini d'Italia*, **4**, 78-91.

USSEGLIO-TOMASSET, L. (1967) The volatile acids (homologous of acetic acid) in fermentation with various yeast species. *Atti.Acad.Ital.Vite Vino, Siena* **19**, 165-183.

USSEGLIO-TOMASSET, L. (1971) Ethyl acetate and the higher alcohols in wine. *Riv. Vitic.Enol.* **24**, 236-276. 303.

-
- VAN VUUREN, H.J.J.; JACOBS, C.J. (1992). Killer yeast in the wine industry: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* **43**, 119-128.
- VOLLBRECHT, D.; RADLER, F (1973) Formation of higher alcohols by amino acid deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* . I. The decomposition of amino acids to higher alcohols. *Arch.Mikrobiol.* **94**, 351-358.
- WAGENER, W.W.D.; WAGENER, G.W.W. (1968). The influence of ester and fusel alcohol content upon the quality of dry white wines. *S. Afr. J. Agric. Sci.* **11**, 469-476.
- WEBB, A.D. (1967) Some aroma compounds produced by vinous fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **9**, 305-319.
- WEBB, A.D.; KEPNER, R.E. (1961) Fusel oil analysis by means of gas liquid partition chromatography. *Am.J.Enol.Vitic.* **12**, 51-59.
- WEBB, A.D.; KEPNER, R.E.; MAGGIORA, L. (1966). Some volatile components of flor sherry of spanish origin. Neutral substances. *Am. J. Enol. Vitic.* **18**, 252-256.
- WEBB, A.D.; MULLER, C.J. (1972) Volatile aroma components of wines and other fermented beverages. In *Advances in Applied Microbiology*, vol 14. Perlman, D. (Ed.), Academic Press, New York.
- WILLIAMS, A.A. (1978). Interpretation of the sensory significance of chemical data in flavour research. Part 1. Methods based on evaluating sensory properties of separated fractions and individual compounds. *Int. Flavor and Food Additives.* **9**, 80-85.
- WOODS, D.R.; BEVAN, E.A. (1968). Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* **51**, 115-126.
- ZEEMAN, W.; SNYMAN, J.P.; VAN WYK, C.J. (1982). The influence of yeast strain and malolactic fermentation on some volatile bouquet substances and on quality of table wines. In: *Proceedings of the Grape and Wine Centennial Symposium*. pp. 79-90. University of California Press, Davis.

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de
D. Jose Vicente Gil Ponce

la calificación de apto cum laude por unanimidad

Valencia, a 7 de Julio de 1997

El Secretario,

El Presidente

