

Universitat de València
Departament de Microbiologia

"Estudio de la microflora presente en mostos y vinos
de la D.O. Utiel-Requena".

Memoria para optar al grado de
Doctora en Ciencias Biológicas
presentada por la Licenciada
Isabel Parfo Cubillos.

València, Octubre 1987

Vº Bº

el Director del trabajo

Federico Uruburu Fernández

UMI Number: U607660

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 U607660

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

Ri. 18807061

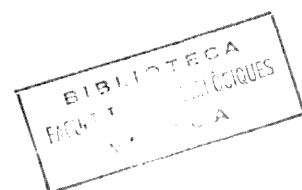
R. 6090

T.D. 264

B

Estudio de la microflora presente en
mostos y vinos de la D.O. Utiel-Requena.

Isabel Pardo Cubillos





Departament de Microbiologia
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FEDERICO URUBURU FERNANDEZ, Director del Departament de Microbiologia de la
Universitat de València,

CERTIFICA: que la Licenciada D^a. ISABEL PARDO CUBILLOS ha realizado en el
Departament de Microbiologia de la Universitat de València el trabajo que
con el título "Estudio de la microflora presente en mostos y vinos de la
D.O. Utiel-Requena" presenta para optar al grado de Doctora en Ciencias
Biológicas.

Y para que así conste firmo el presente certificado en Burjassot a treinta
de octubre de mil novecientos ochenta y siete.

Federico Uruburu Fernández

A Baco.

Finalizado este trabajo, quiero agradecer a todos los que de una forma u otra han colaborado en él con el mismo entusiasmo como si se hubiera tratado del suyo propio.

En primer lugar agradezco a Federico Uruburu la confianza que un día depositó en esta investigación y en la línea de trabajo que surgió de la misma.

A Gonzalo Fernández, a Luis Carlos Espinosa, a M^a Angeles Cámara y a Rafael Michelena por su ayuda en la realización e interpretación de los análisis físico-químicos.

A M^a José Carmona y a José Lorenzo García por su colaboración en los momentos de más intenso trabajo.

A Yolanda Vercher y Antonio García por su generosidad al cederme sus ordenadores, sin los cuales no hubiera podido finalizar esta presentación.

A M^a Angeles Novella, M^a Angeles Cámara y Tomás Huerta por el préstamo de parte del material bibliográfico utilizado en este estudio.

A M^a Dolores García por iniciarme en el conocimiento del trabajo microbiológico.

A Manuel Serra por el asesoramiento estadístico y por su ayuda desinteresada.

A Carmen Serrano y Fernanda Pascual por compartir los buenos y malos ratos que este trabajo ocasionó.

A mis padres y resto de familiares porque han sufrido esta gestación con paciencia y esperanza.

De forma muy especial quiero agradecerle a M^a José García su colaboración y apoyo en la consolidación de nuestro grupo de trabajo, y su amistad. Espero saber corresponderte como te mereces. A Manuel Zúñiga por su constante ayuda sin protestas. A Paloma Belenguer y a Julia Rodrigo en agradecimiento les dejo en herencia las levaduras. Espero que os den muchas

satisfacciones.

A Sergi Ferrer por tantas cosas que si intentase enumerarlas se enfadaría por tener que seguir pulsando teclas.

A la Exma. Diputación Provincial de Valencia y al Ministerio de Educación y Ciencia por la financiación de esta investigación. A la Escuela de Viticultura y Enología de Requena y a la Cooperativa San Pedro de los Corrales de Utiel por permitirme usar sus instalaciones.

CAPITULO I. El entorno del vino.

Página

1.- LA HISTORIA DEL VINO.	1
1.1.- Orígenes de la viticultura y la enología.	1
1.2.- Introducción de la viticultura y vinicultura en la actual comarca valenciana.	5
2.- FACTORES QUE AFECTAN A LA CALIDAD Y PERSONALIDAD DE UN VINO.	11
2.1.- Factores que afectan a la calidad de la materia prima.	12
2.1.1.- Factores permanentes.	12
2.1.1.1.- El suelo.	13
2.1.1.2.- El clima.	14
2.1.1.3.- Los tipos de variedades.	15
2.1.2.- Factores modificables.	16
2.1.2.1.- La fertilización.	16
2.1.2.2.- Los tratamientos.	17
2.1.2.3.- Las labores.	18
2.1.3.- Factores accidentales.	19
2.2.- Factores que influyen en la calidad de un vino durante el procesado de la uva.	22
2.2.1.- Momento y transporte de la uva.	22
2.2.2.- Tipo de maquinaria en bodega.	24
2.2.3.- Tipos de vasijas de fermentación y conservación.	26
2.2.4.- Tipos de tratamientos aplicados a los mostos.	29
2.2.4.1.- Efecto del SO ₂ .	29
2.2.4.2.- Influencia de los tratamientos de clarificación prefermentativa.	31
2.2.4.3.- Influencia de las temperaturas de fermentación.	35
2.2.4.4.- Influencia de los microorganismos que intervienen en la fermentación.	38
2.2.4.5.- Influencia de las operaciones postfermentativas.	40
3.- LA COMARCA UTIEL-REQUENA.	41
3.1.- Orografía y tipos de suelos.	43
3.2.- Climatología.	45
3.3.- Variedades de uva y portainjertos autorizados en esta D.O.	46
3.4.- Las técnicas de vinificación en la D.O. Utiel-Requena.	47
3.4.1.- Vinificación tradicional en tinto.	47
3.4.2.- Vinificación tradicional en blanco.	49
3.4.3.- Las técnicas modernas de vinificación.	50

CAPITULO II. Microbiología de las fermentaciones.

1.- INTRODUCCION.	54
1.1.- Antecedentes históricos del descubrimiento de los microorganismos del vino.	54
1.2.- Ecología de los microorganismos asociados a la uva y a la vinificación.	56
1.3.- Las levaduras.	62
1.3.1.- Formas de reproducción en levaduras.	62
1.3.2.- Levaduras asociadas al proceso de fermentación.	64
1.3.3.- Metabolismo de las levaduras.	66

1.3.3.1.- La fermentación gliceropirúvica y los productos secundarios.	69
1.3.4.- Factores que afectan a la viabilidad de las levaduras y a la fermentación.	72
1.3.4.1.- Influencia de la temperatura.	72
1.3.4.2.- Influencia de la concentración de azúcares.	73
1.3.4.3.- Influencia del etanol.	74
1.3.4.4.- Influencia de las condiciones anaeróbicas y del CO ₂ .	75
1.3.4.5.- Influencia de los taninos.	76
1.3.4.6.- Influencia del pH.	76
1.3.4.7.- Influencia del SO ₂ .	77
1.3.4.8.- Influencia de sustancias inhibitoras presentes de forma natural en el mosto.	78
1.4.- Las bacterias lácticas.	78
1.4.1.- Metabolismo de las bacterias lácticas.	79
1.4.2.- Factores que afectan al crecimiento de las bacterias lácticas.	82
1.5.- Las bacterias acéticas y la oxidación del etanol.	85
1.6.- Objetivos del trabajo.	87
2.- MATERIAL Y METODOS.	89
2.1.- Procedencia de los mostos.	89
2.2.- Descripción de la vinificación de los mostos estudiados. Tratamientos de vinificación	91
2.3.- Toma de muestras.	92
2.4.- Análisis físico-químicos de los mostos.	93
2.4.1.- Medida de la temperatura.	93
2.4.2.- Medida del pH.	94
2.4.3.- Medida de la densidad relativa.	94
2.4.4.- Medida del grado Baumé.	96
2.4.5.- Medida del grado alcohólico.	96
2.4.6.- Medida de los azúcares reductores.	97
2.4.7.- Medida del extracto seco.	99
2.4.8.- Medida del extracto no reductor.	100
2.4.9.- Medida de la cantidad de cenizas.	100
2.4.10.- Medida de la acidez total.	101
2.4.11.- Medida de la acidez volátil.	102
2.4.12.- Medida del anhídrido sulfuroso total y libre.	102
2.4.13.- Medida del contenido en hierro.	103
2.4.14.- Determinación de los compuestos fenólicos totales en los vinos.	104
2.4.15.- Determinación de la intensidad colorante.	105
2.4.16.- Dosificación del contenido en ácidos málico y láctico.	107
2.5.- Medios de cultivo.	108
2.5.1.- Medios de cultivo para hongos filamentosos y levaduras.	108
2.5.2.- Medios de cultivo para bacterias acéticas.	112
2.5.3.- Medios de cultivo para bacterias lácticas.	113
2.6.- Cepas de colección.	119
2.7.- Técnica para el recuento de hongos filamentosos.	119
2.8.- Técnica para el recuento y aislamiento de levaduras.	120
2.9.- Técnica para el recuento de bacterias acéticas.	121

2.10.- Técnica para el recuento y aislamiento de bacterias lácticas.	122
2.11.- Sistemas de conservación de levaduras y bacterias lácticas.	124
2.12.- Técnicas para la identificación de levaduras.	125
2.12.1.- Observación de las características de la reproducción vegetativa.	126
2.12.1.1.- Modo de reproducción vegetativa.	126
2.12.1.2.- Características de las células vegetativas.	126
2.12.2.- Características sexuales.	127
2.12.3.- Caracteres fisiológicos y bioquímicos.	127
2.12.3.1.- Utilización de compuestos de carbono.	127
2.12.3.2.- Asimilación de compuestos nitrogenados.	129
2.12.3.3.- Crecimiento en medio libre de vitaminas y observación de requerimientos vitamínicos.	130
2.12.3.4.- Crecimiento en medio con altas presiones osmóticas.	131
2.12.3.5.- Crecimiento a diversas temperaturas.	131
2.12.3.6.- Producción de ácido acético a partir de glucosa.	132
2.12.3.7.- Formación de compuestos amiloides extracelulares.	132
2.12.3.8.- Resistencia a la cicloheximida.	132
2.13.- Técnicas para la identificación de bacterias lácticas.	133
2.13.1.- Diferenciación en géneros de las cepas de bacterias lácticas.	136
2.13.1.1.- Morfología microscópica y colonial.	136
2.13.1.2.- Carácter homo o heterofermentativo.	136
2.13.2.- Confirmación de la diferenciación en géneros.	138
2.13.2.1.- Naturaleza del isómero del ácido láctico producido a partir de la glucosa.	138
2.13.2.2.- Producción de manitol a partir de fructosa.	139
2.13.2.3.- Prueba de la desaminación de la arginina.	140
2.13.3.- Pruebas para la inclusión de las cepas en especies.	141
2.13.3.1.- Crecimiento a 15°C y a 45°C.	141
2.13.3.2.- Crecimiento a diversos pHs.	142
2.13.3.3.- Actividad de los microorganismos sobre la leche tornasolada-glucosa-extracto de levadura.	142
2.13.3.4.- Crecimiento en presencia de 10% de etanol.	143
2.13.3.5.- Fermentación de carbohidratos.	143
2.13.3.6.- Formación de dextrano a partir de sacarosa.	145
2.13.3.7.- Utilización de los ácidos cítrico y málico.	146
2.13.4.- Otras pruebas de caracterización.	146
3.- RESULTADOS Y DISCUSION.	148
3.1.- Parámetros físico-químicos.	148
3.1.1.- Vinificaciones de uva Bobal en la Cooperativa San Pedro.	148
3.1.2.- Vinificaciones de distintas variedades en la Bodega de la Escuela de Viticultura y Enología.	160
3.2.- Parámetros microbiológicos.	164
3.2.1.- Evolución de la microflora en las vinificaciones de la Cooperativa San Pedro.	166

3.2.2.- Evolución de la microflora en las vinificaciones de la Escuela de Viticultura y Enología.	173
3.2.3.- Consideraciones acerca de la clasificación de levaduras.	178
3.2.4.- Evolución de las levaduras a lo largo de la vinificación.	183
3.2.5.- Consideraciones acerca del aislamiento, clasificación y caracterización de las bacterias lácticas.	203
3.2.6.- Evolución de las especies de bacterias lácticas durante la vinificación.	231

CAPITULO III. La fermentación maloláctica y su control.

1.- INTRODUCCION.	239
1.1.- Métodos de corrección de la acidez de los vinos.	239
1.2.- Fermentación maloláctica.	244
1.2.1.- Ventajas e inconvenientes de la fermentación maloláctica.	246
1.2.2.- Mecanismo de la fermentación maloláctica.	251
1.2.3.- Factores que influyen en la fermentación maloláctica.	255
1.2.4.- Control de la fermentación maloláctica.	260
1.3.- Objetivos del trabajo.	266
2.- MATERIAL Y METODOS.	268
2.1.- Medios de cultivo.	268
2.2.- Clarificación de los vinos.	269
2.3.- Filtración por tierras y filtración esterilizante.	271
2.4.- Actividad degradadora del ácido málico en medio sintético.	271
2.5.- Estandarización de los inóculos.	272
2.6.- Cuantificación de la degradación del ácido málico.	273
2.7.- Desarrollo de la fermentación maloláctica a distintos pHs.	274
2.8.- Desarrollo de la fermentación maloláctica a diversas concentraciones de etanol.	274
2.9.- Desarrollo de la fermentación maloláctica a diversas concentraciones de SO ₂ .	275
2.10.- Desarrollo de la fermentación maloláctica a distintas temperaturas.	276
2.11.- Desarrollo de la fermentación maloláctica a distintas concentraciones de CO ₂ en la atmósfera.	276
2.12.- Ensayo control.	277
2.13.- Observación del crecimiento en vino a distintos pHs.	278
2.14.- Adaptación progresiva de los cultivos al vino y a pHs bajos.	280
3.- RESULTADOS Y DISCUSION.	281
3.1.- Observación de la capacidad de degradación del ácido L-málico y cuantificación de la misma.	281
3.2.- Efecto de diversos parámetros sobre la consecución de la fermentación maloláctica en vino.	288

3.2.1.-	Influencia del pH sobre la fermentación maloláctica.	288
3.2.2.-	Influencia del nivel de SO ₂ sobre la fermentación maloláctica.	295
3.2.3.-	Influencia de distintas concentraciones de etanol en vino sobre la fermentación maloláctica.	301
3.2.4.-	Influencia de distintas temperaturas sobre la fermentación maloláctica.	305
3.2.5.-	Influencia de la concentración de CO ₂ sobre la fermentación maloláctica.	308
3.3.-	Observación del crecimiento de las bacterias en vino.	312
3.3.1.-	Elección del sistema de recuento a emplear.	313
3.3.2.-	Crecimiento de las distintas cepas en vino.	315
3.3.3.-	Efectos de la adaptación progresiva al vino.	319
	<u>CONSIDERACIONES FINALES.</u>	324
	<u>CONCLUSIONES.</u>	337
	<u>BIBLIOGRAFIA.</u>	340

CAPITULO I. El entorno del vino.

1.- LA HISTORIA DEL VINO.

1.1.- ORIGENES DE LA VITICULTURA Y LA ENOLOGIA.

El origen de la vid y del vino en el mundo se pierde en los tiempos de la prehistoria, hasta el punto de que todavía hoy es imposible determinar a ciencia cierta cuál pudo ser su lugar de origen. A menudo se ha citado a la vid como procedente de la zona del Cáucaso y del Turquestán, pero la verdad es que las plantas de las que procede la actual *Vitis vinifera* eran ya frecuentes durante la Era Secundaria tanto en el continente Euroasiático, como en la actual América del Norte e incluso en Africa [256].

Sin embargo, las lianas salvajes del género *Vitis* que prosperaban en la Europa Occidental Meridional durante la Era Terciaria o Cuaternaria, desaparecieron totalmente, hace unos 100000 o 120000 años. En el periodo de máxima glaciación sólo pudieron sobrevivir aquellas asociaciones vegetales de tipo atemperado que vivían en zonas abrigadas, constituyendo estos lugares refugios naturales o hibernaderos. Zonas de estas características no eran posibles ni en los Alpes ni en los Pirineos, tampoco en las montañas de Africa del Norte, pero sí es probable que existiesen en Dalmacia y Albania, en los alrededores situados al sur de los Cárpatos. Se ha podido saber con certeza que la vid, durante la última glaciación, se localizaba en las costas orientales del mar Negro, en Georgia. Cuando la nieve y el hielo se retiraron esta planta se extendió, siempre asociada a

los bosques que le servían de soporte. Pero en Europa esta extensión natural no podía ser muy importante, ya que fuera de la zona del Cáucaso y de la actual Georgia se llega rápidamente a zonas de clima de estepa y de clima mediterráneo, donde la vid no crece si no es con la intervención del hombre. Mientras tanto en la actual América del Norte la situación era diferente: durante el periodo glacial los refugios del bosque atemperado y de sus lianas asociadas se situaron en los montes Apalaches del Sur, y cuando los glaciares se retiraron se instauró el clima actual con veranos húmedos y cálidos semejante a los de Georgia. Aquí las especies boscosas y las lianas parásitas dispusieron de un campo inmenso para expandirse; todavía hoy se encuentran especies de vides americanas en estado natural. Sin embargo, en América no se encontraba la especie *Vitis vinifera*, única especie productora de buenos vinos [66].

Pero la presencia de vides no presupone viticultura y mucho menos elaboración de vinos, ya que tanto el cultivo de la vid como las técnicas de elaboración, requieren un avanzado estado de civilización que sólo muy pocos pueblos en la antigüedad llegaron a alcanzar. El origen de la viticultura, sin ser tampoco muy preciso, parece que se restringe a unos pueblos que habitaron en torno al Cáucaso (Armenia, Georgia, etc.), que es donde se habían preservado estas plantas durante las glaciaciones. Desde aquí el secreto del cultivo de la vid y de la elaboración del vino, se extendió hacia occidente buscando en las riberas del Mediterráneo su afincamiento ideal [256].

A caballo entre la leyenda y la historia, las más remotas civilizaciones coinciden en recabar para ellas el descubrimiento de la vinificación de la uva. Por orden cronológico, el pueblo sumerio, el más antiguo de la baja Mesopotamia, cultivó la vid hace 6000 años. En un viejo texto hindú escrito por el sabio Pulastaya, se habla ya de una posible versión del vino, anterior desde luego a los fenicios y que también pudo

ser conocida por los arios del Asia Central [49]. En Egipto hallamos frecuentes alusiones al cultivo de la vid y a la elaboración del vino en monumentos, pinturas, decoraciones de utensilios, etc. Estos documentos arqueológicos prueban que viticultura y fabricación de vinos eran dos actividades conocidas y practicadas en Egipto desde, por lo menos, la IV Dinastía de Faraones, aproximadamente desde el año 2500 a.C. [256]. En la cuenca del Nilo se utilizaba el método del torniquete para estrujar las uvas: este método consistía en exprimir las uvas metiéndolas en un saco y retorciéndolo por sus extremos. En fecha posterior, en Tebas, se empleó el todavía hoy vigente sistema de estrujar la uva saltando sobre ella en una tina. Por aquel entonces ya existían bodegas de almacenamiento, con vinos que se añejaban mal que bien en vasijas a las que se untaba con betún como preventivo de las enfermedades del vino [49]. Por otra parte los egipcios introdujeron también el etiquetado del mismo.

Existen comentaristas que han achacado el descubrimiento o la inicial elaboración del vino a la raza semita, y Noé es para los judíos el inventor más indiscutible del vino. Los persas fueron los especialistas más remotos en el difícil arte de mezclar vinos, cayendo con frecuencia en la poco recomendable práctica de agregar a un buen vino alguna sustancia de propiedades embriagantes, como es la esencia de nuez vómica [49].

De la misma época que los documentos egipcios datan otros hallazgos de las costas de Asia Menor (Troya), por lo que es de suponer que en torno al año 2000 a.C. se iría extendiendo la viticultura hacia las islas egeas hasta llegar a Grecia, en donde está probado que ya era practicada hacia el año 1700 a. C. [256]. El vino en Grecia hace su aparición como un elemento vital indispensable y como un influyente emblema espiritual. En "La Iliada" y en "La Odisea" abundan las alusiones a sitios y a personas ligados al vino y a su consumo tanto en la guerra como en la paz. Hesíodo nos anticipa en "Los trabajos y los días" ciertas meticulosas apreciaciones sobre las

clases y aprovechamientos del fruto de la vid. El vino, en Grecia, está íntimamente vinculado a la religión, pero con el tiempo las dosis destinadas a los sacrificios religiosos aumentaron ostensiblemente al generalizarse su consumo en la vida diaria. Se cuenta con un importante material referente a la crianza y al uso del vino en Grecia: las vendimias se realizaban con cierto criterio lógico, se cortaba la uva en un grado idóneo de madurez, se pisaba en tinas como lagares, se almacenaba el mosto en odres y se vigilaba y componía su añejamiento. También consta que, para conservar el vino se agregaban sustancias como la brea, la resina, el polvo de mármol, la cal y el agua salada. En algunas otras zonas de Grecia, en Arcadia, se hacían fermentar los mostos y se conservaban cociéndolos al fuego, con lo que el vino adquiriría una consistencia de jarabe [49].

Siguiendo las migraciones de población desde Oriente a Occidente, es presumible que el cultivo de la vid llegara a Italia hacia el año 1000 a.C. de la mano de los etruscos, aunque en Sicilia y en la punta meridional de la península itálica, el origen parece atribuirse más bien a los griegos [256]. Los romanos almacenaban sus vinos en ánforas donde se añejaban unos caldos cada vez mejor elaborados. Lo que todavía no pudieron perfeccionar los romanos fue el método de clarificación de los vinos, ya que antes de servirlos tenían que separar las heces mediante un colador. Sin embargo, fueron muy aficionados a las mezclas en lo que respecta a la adición de esencias aromáticas al vino cocido, como las denominadas "melitites" (vino con miel), "piperatum" (vino con pimienta) o "rosetum" y "myrtites" (vino con rosas y mirtos) [49].

Los romanos, como ya habían hecho fenicios y griegos, propagaron el cultivo de la vid por las tierras conquistadas. Cuando Julio Cesar conquista las Galias, los romanos encuentran los barriles de madera por primera vez, como un invento de las tribus galas. Los celtas utilizaban estos barriles para la cerveza, pero no para el vino. Los romanos se

percataron rápidamente de que estos recipientes eran ideales para el transporte del vino, más capaces y seguros que las clásicas ánforas de la época [329].

1.2.- INTRODUCCION DE LA VITICULTURA Y VINICULTURA EN LA ACTUAL COMARCA VALENCIANA.

Nada se sabe en concreto acerca de la introducción de la vid en la Península Ibérica, aunque todo parece indicar que esto no pudo suceder hasta época muy tardía y que debió tener lugar en Tartessos, por la Bética [256].

Por lo que respecta a tierras valencianas, lo más seguro es que el cultivo de la vid y la elaboración del vino no se generalizaran hasta bien entrada la romanización. Los vestigios más antiguos referidos al vino se remontan al siglo VI a. C., pero se trata de ánforas vinarias de origen oriental, que lo único que prueban es que existía un comercio de importación. En la evolución del consumo del vino y del cultivo de la vid en tierras valencianas se pueden establecer tres etapas; la primera abarcaría desde el siglo VI al III a. C. y en ella se inició y difundió el consumo de vino importado por fenicios y griegos que se instalaron en las costas y en las islas mediterráneas. La segunda etapa comprendería los siglos del III al I a. C.; la victoria de Roma sobre Cartago en la segunda Guerra Púnica supuso que, a finales del siglo III a. C., todo el litoral mediterráneo cayese bajo la influencia y el control político y comercial de Roma. De este modo se incrementó el consumo de vinos romanos frente a los griegos y púnicos y además se inició la introducción de las plantaciones de vid en nuestro territorio, gracias a la fundación de ciudades romanas y a

la inmigración de conocedores del cultivo de la vid. La tercera etapa, siglos del I al III d. C. fue el momento en que el cultivo de la vid se generalizó, de tal modo que pasamos de importadores a exportadores de vinos [256].

La actitud de los pueblos bárbaros respecto al cultivo de la vid y a la elaboración del vino es controvertida, hay autores que piensan que vándalos, alanos y suevos cuidaron celosamente las vides que hallaron a su paso por la Península [49], mientras que otros afirman que el carácter ganadero de este pueblo provocó la decadencia de la viticultura difundida por los romanos [256].

En contra de la opinión generalizada de que la invasión árabe en España significó una catástrofe para el cultivo vitícola, dado que el Corán prohíbe beber vino [329], cada vez son más los historiadores que afirman que los árabes dieron un gran impulso a la viticultura española, sacándola del atraso en que había quedado tras la dominación bárbara. La idea de que los árabes cultivaban el viñedo sólo para obtención de fruta fresca y pasas es errónea, los árabes siguieron elaborando y bebiendo vino, dando a dicha actividad un sentido lúdico y epicúreo que contrastaba con el sentido sacro que tenía entre los cristianos [256].

Durante la Reconquista, los cristianos que conquistaron Valencia a los árabes en la primera mitad del siglo XIII se encontraron en herencia con unos viñedos ya establecidos. Este cultivo fue potenciado por los moriscos que permanecieron en el Reino de Valencia [256] y también por los monjes de la época, ya que el vino era un elemento imprescindible para la celebración de la misa; estos monjes cultivaban la vid en los alrededores de los monasterios a fin de cubrir sus necesidades [49, 329]. Durante los siglos XIV y XV el viñedo se mantuvo como un cultivo habitual en todas las comunidades rurales valencianas, tanto en terrenos de secano como de regadío. Las referencias documentales de esta época ponen de manifiesto que

la superficie media que cada población solía reservar para los viñedos era del 10% de la tierra cultivada.

Sólo en los alrededores de poblaciones de cierta entidad, y dado que en ellas se contaba con un mercado urbano, los viñedos llegaban a alcanzar mayor intensidad y tenían un carácter manifiestamente comercial [256].

La Edad Moderna (siglos del XV al XIX) se caracteriza por el cultivo generalizado de la vid en todos los rincones del suelo valenciano, aunque sin sobrepasar las necesidades locales o a lo sumo comarcales. Esta limitación de la producción se debía a dos causas principalmente: las deficiencias de los medios de transporte y la propia legislación vigente, mediante la cual cada pueblo protegía la producción local por medio de prohibiciones o fuertes derechos sobre la introducción de vinos forasteros. La legislación en defensa del vino local era más o menos rígida en función de la cosecha de cada término. Sin embargo, y a pesar de las dificultades mencionadas, existían zonas con producción de vino marcadamente superior al consumo propio; por ejemplo la zona del Maestrazgo en Castellón, Campo de Morvedre, l'Horta de Valencia y el Alto Palancia, junto con Alicante capital, producían el 41% de toda la cosecha vitícola del antiguo Reino de Valencia. Les seguían en importancia el Valle de Albaida, el Bajo Maestrazgo, la Plana de Castellón y el Bajo Segura. De todas las zonas nombradas cinco se localizan en el litoral y dos en el interior; este dato viene a reforzar el carácter marcadamente litoral que en la Edad Moderna seguía teniendo la viticultura, sobre todo en su dimensión comercial ya que el transporte marítimo era el mejor medio de comunicación.

La demanda internacional de aguardiente a finales del siglo XVII se incrementó extraordinariamente por varias razones: el aumento de la navegación comercial donde el aguardiente era bebida obligada de la tripulación; la propagación del consumo de "brandy", tras el éxito obtenido por los primeros aguardientes preparados y envejecidos en las bodegas de

Cognac; y por último, el empleo de aguardiente en el encabezamiento de vinos de alta graduación, la elaboración de ginebras y otras bebidas alcohólicas. En el caso español se sumaba además el creciente consumo de aguardiente en las colonias americanas y el propio consumo interior. A pesar de que Francia ostentaba el liderazgo en la producción de aguardientes y en su comercialización, dirigida sobre todo a Inglaterra y Holanda, las guerras mantenidas contra estos países desde 1668 hasta 1713, potenció la extracción de aguardientes en otros países, entre ellos España.

Aunque la existencia de pequeños alambiques y calderas para destilar el vino era común en todo el territorio valenciano ya en el siglo XVII como solución a los vinos estropeados, las primeras grandes factorías orientadas hacia la exportación no aparecieron hasta la segunda mitad del siglo XVIII. A raíz de la crisis vinícola francesa (1776-1782) creció la demanda de vino y aguardientes comunes españoles. Esta demanda dió lugar a una gran proliferación de fábricas, alambiques y calderas de destilación por todos los rincones valencianos, y a una expansión del cultivo de la vid como no había habido precedentes en siglos anteriores.

El primer tercio del siglo XIX se caracterizó por ser una continuación del siglo XVIII. Sus constantes fueron las mismas: se exportaba más aguardiente que vino, los precios se mantenían inalterables, se seguía plantando viña y la venta de vino dependía en cada pueblo de los ayuntamientos y las tabernas que ellos arrendaban anualmente. Aunque la producción de aguardiente seguía siendo más importante que la de vino, el interés por comercializar este último comenzó a cobrar importancia. El mayor enemigo del vino era su poca duración sin avinagrarse, a causa del atraso técnico con el que se elaboraba. Esto se debía a que los pequeños cosecheros no poseían lagares propios ni vasijas para conservar el vino. Para elaborar el mismo, se valían de prensas y lagares de cosecheros más

adinerados que les fijaban unos días para pisar y prensar la uva, pero sólo les permitían mantener el vino en las cubas de fermentación unas horas; el mosto era retirado a medio fermentar y colocado en botas. Como las botas tampoco solían mantener las condiciones propicias, ya que estaban casi todo el año vacías y no se azufraban, el vino se convertía rápidamente en vinagre y los cosecheros se veían obligados a venderlos a precios muy bajos para el alambique de aguardiente.

En 1834 se promulga el decreto de libertad de vendimia y compraventa de vinos, que desmantela el antiguo régimen gremial vigente hasta entonces. El primer resultado de tales medidas no pudo ser más negativo. Al poder vender directamente todos los cosecheros se estableció una competencia entre ellos; y puesto que la oferta era muy superior a la demanda los precios bajaron hasta límites insospechados.

Sin embargo, a partir de la segunda mitad del siglo XIX dos grandes catástrofes vitícolas produjeron el periodo de máxima prosperidad de la viticultura valenciana, la primera fue el "oidium". Originario de América y observado por vez primera en Inglaterra, se extendió a Francia en 1848; dos años más tarde había penetrado en España por Orense. Los viñedos españoles sufrieron esta enfermedad, aunque con una virulencia mucho menor que los viñedos de países húmedos del resto de Europa. Tras un primer momento de preocupación y pesimismo ante los primeros ataques, se pasó a disfrutar de una verdadera "edad de oro" vinatera. Esta coyuntura provocó un alza inusitada de los precios pagados al agricultor, un incremento extraordinario de las exportaciones de vino, y una multiplicación de las plantaciones de vides. A la postre, cuando Francia e Italia recobraron su producción normal, el excesivo crecimiento de la viticultura valenciana trajo consigo un aguda crisis interna, reflejada en el descenso de los precios y de las exportaciones ante la incapacidad de dar salida comercial al exceso de vino. Los síntomas de la crisis se iniciaron hacia 1864 y

perduraron hasta que los viñedos franceses fueron destruidos por la filoxera, volviendo a resurgir en 1877 la demanda de vinos comunes españoles. La filoxera es un insecto parásito de la vid que puede provocar la muerte de la planta sobre cuyas raíces vive. La vid americana está inmunizada contra dicho parásito, mientras que la europea es fácilmente destruida por el mismo. Desconocida en Europa hasta el año 1865, la filoxera fue introducida accidentalmente por algún cargamento de plantas procedentes de Estados Unidos, y se propagó rápidamente a las vides europeas, arrasando la casi totalidad de los viñedos de este continente entre 1868 y 1900. En España empezó a causar estragos hacia 1880 y al finalizar el siglo sólo se mantenían sanos los viñedos de la Mancha, Murcia y Valencia que, por esta razón, se habían convertido en los principales mercados abastecedores de la gran demanda internacional, especialmente de la francesa. Dado que las vides catalanas habían resultado tan afectadas por la filoxera como las francesas, el comercio francés se dirigió a tierras valencianas a fin de subsanar su déficit. Ausencia de filoxera, fuerte demanda y altos precios dieron lugar a la más intensa oleada de plantaciones que haya conocido jamás el viñedo valenciano.

A partir de 1900 Francia dejó de depender de los vinos españoles, no tanto porque había recuperado buena parte de su producción interna sino porque sustituyó las importaciones de España por las de su colonia argelina. La excesiva plantación de vid y la sobreproducción de vinos llevó a una crisis del sector vitivinícola, que debido a la falta de demanda exterior provocó la caída de los precios del vino. Tal coyuntura, la filoxera tardía, la introducción del cultivo del olivo, almendro y nuevos regadíos, provocaron la desaparición del viñedo valenciano de múltiples rincones en donde antes se cultivaba, para concentrarse en cuatro zonas vinícolas de las que en tres (Requena-Utiel, el Valle de Albaida y el del Vinalopó) adquiere hoy carácter de monocultivo, mientras que en la cuarta

(los piedemontes del Turia) alterna con almendros, frutales y huerta, y se halla en fase marcadamente regresiva, a pesar de las nuevas plantaciones que se hacen de uva de mesa.

2.- FACTORES QUE AFECTAN A LA CALIDAD Y PERSONALIDAD DE UN VINO.

Existen dos concepciones a la hora de definir dónde residen la calidad y la personalidad de un vino: la primera basa estas características exclusivamente en la materia prima, es decir en los viñedos capaces de producir mostos excelentes, en función de la zona en la que se sitúan y de las variedades que sustentan. Sin embargo, un viñedo dado e incluso una vidada no siempre producen el mismo vino, no existe una relación constante y prevista que permita definir el vino por su origen. La otra concepción afirma que calidad y personalidad de un vino comienzan a forjarse en el viñedo, para continuar durante la elaboración de los mostos y posteriormente con el almacenamiento en la cava. Es evidente que la producción del vino comprende dos pasos: la producción de uvas a partir del suelo y la producción de vino a partir de las uvas. La primera es de tipo agrícola y constituye la viticultura. La segunda es de tipo industrial, análoga a cualquier industria agroalimentaria, y constituye la vinicultura. Sin embargo, estos últimos procesos se distinguen de otros procesos industriales en que no son controlados de una forma totalmente absoluta por el hombre.

La calidad del vino no es un valor que se pueda fijar de forma inmutable y además tiene un carácter subjetivo que depende de los consumidores, cuyos gustos difieren en función de su origen y a lo largo de

la historia. Por otro lado, la calidad es aleatoria y la aleatoriedad se halla en la variabilidad de condiciones atmosféricas y sanitarias que afectan al viñedo, del momento de vendimia y de problemas de vinificación o conservación [282].

Una vez definido el origen de la tipicidad y calidad de un vino, podemos afirmar que los factores que influyen en las características finales de un vino son: aquéllas que afectan a la materia prima, la uva, y los que tienen relación con la transformación de esta materia prima hasta su conversión en vino.

2.1.- FACTORES QUE AFECTAN A LA CALIDAD DE LA MATERIA PRIMA.

Entre los factores que van a condicionar las cualidades de la uva se pueden distinguir unos que definiremos como permanentes, ya que no son susceptibles de modificación a corto plazo por el hombre. Otros son de carácter modificable, como es el caso de las labores a las que se somete al viñedo; y por último, hay factores accidentales, que como su nombre indica, pueden producirse ocasionalmente, como las enfermedades o los agentes atmosféricos [130].

2.1.1.- FACTORES PERMANENTES.

Dentro de éstos se encuentran el suelo, el clima y las variedades de uva con que se elabora el vino en cada comarca.

2.1.1.1.- EL SUELO.

La vid es una planta rústica que se adapta y crece en todos los suelos existentes, incluso en terrenos tan pobres que difícilmente podrían soportar otros cultivos. OANCEA *et al.* consideran que los principales factores edáficos que limitan el cultivo de la vid son: una cantidad de arcilla superior al 45%, una conductividad hídrica reducida, un débil drenaje, la preponderancia de montmorillonita en el suelo, y una cantidad elevada de caliza activa [149].

Según CIURANA, no sólo es importante el suelo de cultivo sino también el subsuelo sobre el que éste descansa; esto se debe a que las raíces de la vid se hunden hasta 5 ó 6 m a fin de encontrar la capa más húmeda y más favorable [66]. IONESCU pone en evidencia una correlación positiva entre porosidad del terreno y producción, y una correlación negativa entre esta última y la resistencia del suelo a la penetración. El drenaje también es muy importante, ya que si éste no es bueno el agua se acumula en el subsuelo y pudre las raíces, lo cual repercutirá en la calidad del producto final [149].

La calidad del vino, según HIDALGO y CIURANA, depende de la proporción en que se encuentren los elementos componentes del suelo fértil. Así, la sílice da vinos ligeros y finos; la arcilla les comunica más color, extracto y alcohol; el terreno calcáreo da "bouquet", flexibilidad y juventud; la pizarra, madurez, tanino y fortaleza; el suelo rico en humus da elevadas producciones, pero éstas son pobres en aromas [66, 149].

También el contenido en elementos nutritivos de la tierra de cultivo, natural o modificado por los abonos, tiene una importancia considerable. Así, el nitrógeno, que favorece la vegetación da lugar a vinos pobres en extracto y antocianos, según observaron RIBÉREAU-GAYON y PEYNAUD [281]. El fósforo hace a las plantas más vigorosas; el potasio mejora la función

clorofílica y, como consecuencia, hace que los vinos tengan más potencia y madurez [66]. VERES et al. afirman haber establecido el papel que desempeña la naturaleza del terreno sobre el balance de los ácidos orgánicos, la modificación del quimismo de la planta, y la proporción de iones absorbidos [149].

Otros autores, sin embargo, consideran poco importante el efecto del suelo sobre la calidad de la uva, excepto en el caso en que existan factores fuertemente limitantes para el cultivo de la vid, como los ya expuestos anteriormente [149]. Nosotros pensamos que sí que hay influencia del suelo en las características del producto final, dado que la síntesis de materias que constituyen la uva se realiza gracias a las sustancias nutritivas del suelo que captan las raíces, y además muchas reacciones bioquímicas están catalizadas por determinados elementos que las vides toman del terreno.

2.1.1.2.- EL CLIMA.

La zona de cultivo de la vid se sitúa entre el paralelo 34° de latitud norte y el paralelo 49° de latitud sur, y aunque se pueden cultivar viñas fuera de esta zona, sólo ocurre en pequeñas áreas, encontrándose las uvas más septentrionales en el valle del Rin a 50-51° de latitud norte [130].

La vid es una planta que requiere unos valores climatológicos equilibrados; demasiado calor la ahoga, mucho frío la mata, el exceso de agua la seca. Demasiada altitud no es adecuada, pero vides cultivadas a nivel del mar no dan vinos de calidad. Las viñas más septentrionales dan vinos aromáticos pero ácidos y verdes, las meridionales dan vinos muy alcohólicos y potentes pero faltos de aroma [130]. Sin embargo, la vid es capaz de desarrollarse en hábitats muy diferentes: tanto en llanos como en montaña, en zonas lluviosas o casi desérticas y tanto en países fríos como

en países cálidos [66].

El clima, junto con el terreno, son los factores permanentes más importantes para el cultivo de la vid, ya que condicionan otros factores tanto permanentes como modificables como son el tipo de cepa, tratamientos, labores, fertilización, etc. [130].

2.1.1.3.- LOS TIPOS DE VARIEDADES.

La vid pertenece al género *Vitis* que comprende cuarenta especies, siendo la *Vitis vinifera* la base de la producción de vinos de calidad; otras especies, tales como *Vitis riparia*, *Vitis lambrusca* o *Vitis rupestris*, no se utilizan para la vinificación ya que producen vinos de gustos desagradables.

La especie *V. vinifera* tiene más de 5000 variedades catalogadas, y de éstas sólo 50 presentan interés desde el punto de vista enológico. Según el tipo de suelo, el clima, la situación y las prácticas de cultivo se han ido adaptando ciertas variedades en determinadas regiones o comarcas. Este fenómeno es el que más ha contribuido a la noción de origen genuino de un vino, vinculando la calidad a un área geográfica concreta.

Las variedades se diferencian por el color de sus frutos y la forma de los racimos, de los granos, y de las hojas; también por el tiempo de maduración, por la textura de la pulpa y la composición del jugo. Además, entre las variedades existen diversos grados de susceptibilidad al ataque por insectos o por microorganismos, y por otro lado responden de forma distinta a la poda [3].

Dentro de cada variedad también existen diferencias entre plantas distintas [3]. Esta variabilidad permite la selección y clonación de las mejores a fin de conseguir una mejora en la calidad y rendimientos. La clonación se realiza por reproducción vegetativa de la planta originaria;

de esta forma los descendientes conservan los caracteres de la cepa madre ya que poseen exactamente los mismos genes, así se logran poblaciones homogéneas [330]. Además de buscar la acentuación del carácter varietal y el aumento de la producción, la selección pretende también obtener plantas más resistentes a las enfermedades [3].

La variedad es la responsable última del carácter de un vino. Algunas proporcionan características muy acusadas, mientras que otras son más neutras. Al vinificar este último tipo de variedades se obtienen mostos carentes de ciertos aspectos interesantes; queda, sin embargo, el recurso de vinificar estas uvas junto a otras que aporten las características en que son deficitarias. De esta manera se puede influir sobre las cualidades del vino a obtener [66].

2.1.2.- FACTORES MODIFICABLES.

Dentro de este tipo de factores se hallan aquéllos controlables por el hombre tales como fertilización, los tratamientos plagicidas y las labores. Estas prácticas están encaminadas al aumento de la producción y la calidad de las vides.

2.1.2.1.- LA FERTILIZACION.

Uno de los factores modificables que más influye en la producción y calidad de uva, es la fertilización de la viña. Antes de la plantación de una viña ésta suele recibir un fuerte abonado de tipo orgánico, en general estiércol, aunque modernamente se emplea "compost", que suele ir acompañado de sales minerales de potasio y fósforo, en forma de cloruro de potasio y superfosfato de cal respectivamente. En algunos casos se suele añadir

sulfato de hierro en terrenos ricos en caliza activa para evitar la clorosis. A partir del tercer año de plantación se fertiliza anualmente durante los meses de febrero y marzo con abonos a base de potasio, fósforo y, a veces, antes de la floración se utilizan abonos nitrogenados, como el sulfato amónico.

La frecuencia del abonado da lugar a un incremento de la productividad, que de acuerdo con RIBÉREAU-GAYON *et al.* y GARCIA MAIQUEZ, va unido a la disminución de la calidad [130, 282]. Sin embargo, OUGH y LEE han encontrado una relación positiva entre la adición de fertilizantes nitrogenados a la viña y la concentración de ésteres relacionados con el aroma de los vinos [233].

2.1.2.2.- LOS TRATAMIENTOS.

Los tratamientos, que tienen por finalidad proteger a las viñas de las plagas, se suelen realizar entre Abril y Agosto. A veces, poco antes de la vendimia, en el caso de que se produzca "podredumbre gris" sobre los racimos, se suele tratar a la planta con compuestos orgánicos.

Los tratamientos fitosanitarios comprenden aquéllos que protegen a la planta de enfermedades criptogámicas, como el "mildiu" y el "oidium", y contra los insectos como la mosca de la fruta, el mosquito verde, las polillas, etc. Para prevenir o eliminar el "mildiu" se utilizan productos cúpricos y fungicidas, mientras que contra el "oidium" se emplea el azufre. Los insectos son combatidos con distintos productos insecticidas [130].

Además del efecto patente que los tratamientos tienen sobre el estado sanitario de la uva, y por tanto sobre la calidad del producto final: el vino, hay que tener en cuenta otro efecto que presentan los productos fungicidas sobre la fermentación de los mostos. SAPIS-DOMERCQ [300] y SAPIS-DOMERCQ *et al.* [301, 302, 303] llegan a la conclusión de que ciertos

tratamientos antifúngicos retardan la fermentación y alteran la composición química del vino. El retardo se debe a que estos productos disminuyen el número de células viables de ciertas especies fermentadoras como *Saccharomyces cerevisiae*. Las diferencias en la composición química del producto final se originan porque se alteran las proporciones normales entre distintas especies de levaduras, variando así las cantidades de productos secundarios producidas por las mismas [302, 303]. En algunos casos, y a ciertas dosis, los fungicidas sólo afectan al inicio de la fermentación, otras veces provocan fermentaciones lentas e incompletas, e incluso pueden inhibir totalmente la fermentación. Por el contrario estos autores no han notado efecto de los fungicidas sobre las bacterias lácticas ni sobre las acéticas [300, 301].

A la hora de emplear fungicidas hay que tener en cuenta que las condiciones climáticas previas a la vendimia, van a determinar las concentraciones de residuos fitosanitarios en los mostos de uva, siendo mayores cuando el tiempo es seco [300, 301].

2.1.2.3.- LAS LABORES.

Junto con la fertilización, las labores constituyen uno de los factores que más pueden influir sobre la uva. LOPEZ CARRIZOSA [207] resume estas labores en las siguientes: "aserpiado", poda, sarmienta y labores de labranza. El "aserpiado" consiste en la formación de piletas alrededor de las cepas a fin de retener el agua de lluvia. La poda contribuye decisivamente a formar la cepa y regularizar la producción; las vides sufren una primera poda de formación, que en la región valenciana es de tres brazos, y otra anual, que se realiza entre Diciembre y Febrero y de la cual depende un desarrollo correcto de la planta y de los racimos; existe además un tipo de poda en verde que comprende despuntes, aclareo de brotes,

etc., y cuya finalidad es limitar el crecimiento excesivo de los sarmientos y del número de frutos. La sarmienta consiste en la retirada de sarmientos después de la poda. Las labores de labranza tienen como fin favorecer la penetración de las aguas de lluvia, la aireación, la mezcla de abonos con la tierra, la eliminación de vegetación espontánea y la disminución de la evaporación; el laboreo facilita además la penetración de las raíces y las reacciones químicas y bioquímicas de los abonos. La labranza se realiza de forma profunda en invierno (a unos 25 cm) y superficial en verano, para eliminar las grietas que se originan por la sequía; con esto se evita que se pierda mucha humedad por evaporación a través de las mismas [130, 314].

2.1.3.- FACTORES ACCIDENTALES.

Los factores accidentales pueden influir profundamente sobre la calidad y cantidad de la producción vitícola. De entre ellos destacamos los problemas sanitarios de las vides y los accidentes meteorológicos.

Como ya describió OREGLIA, las enfermedades que pueden afectar al viñedo son principalmente la infección de la planta por hongos, tales como *Plasmopara viticola*, *Oidium tuckeri*, *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*. Por otro lado, hay que destacar el ataque a las vides por insectos como los ampelófagos o los ácaros [229].

La *Plasmopara viticola* puede desarrollarse sobre todos los órganos verdes de la vid, hojas, flores y frutos. La importancia del daño depende del órgano al que afecta y del momento del ataque. Cuando el moho se desarrolla sobre las flores o sobre el grano recién cuajado, la pérdida de la producción es total. Si el ataque se produce a las hojas durante la maduración del fruto, se observa defoliación, con la consiguiente detención de la maduración. Si el daño se centra en los frutos en

maduración, éstos pierden agua y se desprenden del raspón. El rendimiento en mosto obtenido a partir de estas uvas es bajo, y su composición anormal: presentan menor cantidad de azúcar, más acidez y mayor concentración en sustancias nitrogenadas y minerales, además están cargados de bacterias lácticas y acéticas [229].

El *Didium tuckeri* ataca todos los órganos de la vid, preferentemente hojas y granos en la última fase de maduración. Si la infección se da en las hojas el resultado es una disminución de la cantidad de azúcar en los frutos, pero si ocurre en los granos da lugar al necrosamiento de las células del hollejo, que se endurece y queda imposibilitado para crecer y a causa de ello el grano revienta. El resultado es una infección de las uvas rotas por levaduras y bacterias, que producen ácido acético, y una concentración de azúcares por evaporación [229].

El *Penicillium expansum* causa una enfermedad denominada "podredumbre verde". Su virulencia está condicionada por la humedad del ambiente, si ésta es elevada en poco tiempo los granos se convierten en una masa pastosa con olor a moho característico. Los mostos resultantes son pobres en azúcar, con gusto amargo a consecuencia de los productos resultantes de la descomposición de los polifenoles, con elevadas concentraciones de manitol, ácido oxálico, ácidos grasos superiores, y sustancias antibióticas que dificultarán la fermentación [229].

La *Botrytis cinerea* puede ser una infección ventajosa o desventajosa según el momento y las condiciones ecológicas en las que se dé. Así, si durante el periodo de premaduración de la uva hay ambiente lluvioso, la *Botrytis* se desarrolla sobre la piel de los frutos destruyéndola. A esta enfermedad se la denomina "podredumbre gris" y provoca una intensa concentración del jugo de uvas. El moho descompone los azúcares, los taninos, polifenoles, sustancias nitrogenadas, y ácidos orgánicos como el tartárico y el málico [310]. La composición de los mostos de uvas

infectadas presenta cantidades elevadas de glicerol, ácido glucónico, ácido oxálico, ácido láctico, dextrano y mucílagos. Los mostos presentan dificultades en la fermentación, ya que *Botrytis* excreta un antibiótico, la botriticina, que afecta a las levaduras [3]. Los vinos resultantes no clarifican espontáneamente, son de difícil conservación y están expuestos a quiebras oxidásicas dada la gran cantidad de tirosinasas y lacasas que produce este moho [229].

El daño que causan los insectos puede ser directo, si atacan al grano maduro como es el caso de *Cochylis* y *Endemis*, o indirecto si atacan otros órganos como las hojas o las raíces, caso de la filoxera. Los ácaros atacan tanto al fruto como a las hojas y provocan un desarrollo anormal de las uvas, dando éstas mostos deficientes en azúcar [229].

Los principales accidentes meteorológicos que pueden afectar a la vid son el granizo y las heladas. El granizo provoca pérdidas de volumen de cosecha y disminuye la calidad de los mostos si cae en el periodo final de maduración, ya que rompe los granos y éstos son invadidos por bacterias, mohos y levaduras que destruyen sus constituyentes con formación de sustancias de olor y sabor desagradable. Las heladas afectan también a la cantidad de uva que se obtiene por hectárea. Si se producen cuando la uva está madurando se paraliza la actividad de la planta, y el mosto resulta deficiente por falta de azúcar, exceso de acidez, y poco color en el caso de uvas tintas. Si se producen cuando la uva ha madurado completamente, las heladas provocan una concentración del mosto y por tanto una sobremaduración de la uva en poco tiempo.

2.2.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD DE UN VINO DURANTE EL PROCESADO DE LA UVA.

Hasta ahora hemos visto qué factores afectan a la calidad de la materia prima; seguidamente vamos a estudiar la manera en que se modifica la calidad en el procesado de la uva.

2.2.1.- MOMENTO Y TRANSPORTE DE LA UVA.

El momento y las condiciones en las que se realiza la vendimia tienen gran influencia sobre la calidad y las características del vino que se obtendrá. Avanzar o retrasar la vendimia una semana puede significar el obtener vinos de características muy diferentes. Esto es explicable si consideramos que en los últimos días de la maduración los procesos bioquímicos y las transformaciones que se producen en el interior de los granos suceden muy deprisa: disminución en la cantidad de ácidos, incremento en la concentración de azúcares, y aumento de materia colorante y aromas [66, 241].

Conocer a ciencia cierta la fecha en la que se ha de realizar la vendimia es difícil, ya que a cada tipo de variedad, en función del clima y del estado sanitario de las plantas, les corresponde un tiempo de recolección.

La fijación de la fecha de vendimia no debe ser empírica; es necesario seguir el proceso de maduración de dos maneras: a largo plazo, basándose en la duración del ciclo vegetativo, y a corto plazo, siguiendo la evolución de la composición de las uvas en el transcurso de la maduración [241]. Sin embargo, hasta hace muy pocos años, la preocupación por este control no existía, ya que tanto el cultivo de la vid como la elaboración del vino

carecían de fundamentos científicos y se realizaban siguiendo pautas tradicionalmente heredadas de padres a hijos. Es con el advenimiento de la Viticultura y la Enología cuando se ha asociado la realización de unas determinadas prácticas con la obtención de unos resultados deseados. No hace mucho tiempo la mayoría de los cosecheros vendimiaban en determinados días sin preguntarse acerca de la idoneidad de la fecha o de la simultaneidad con el resto de viticultores, lo cual llevaba frecuentemente a una sobresaturación en la capacidad de recepción en la bodega o a que los carros o remolques, cargados con uvas vendimiadas, tuviesen que esperar varios días para descargar en bodega. Actualmente este problema se ha subsanado con la planificación por parte del enólogo del volumen de vendimia en relación a la infraestructura de la bodega.

El conocimiento y la observación del proceso de maduración permiten influir sobre las características del vino a obtener, vendimiando con antelación o retraso, según que se busque en un vino acidez y vivacidad o bien cuerpo y potencia [66].

Pero no influye solamente el momento de la vendimia, sino también las condiciones en las que ésta se efectúa. El vino resultante de unas uvas que se han cogido con cuidado, en las que los granos no se estrujan, que llegan a la bodega al poco tiempo de haber sido vendimiados, que no están sucios de barro, ni contienen hojas, ramas ni otras materias extrañas y que no se han recalentado, es muy diferente del que se obtiene a partir de uvas que llegan a la bodega después de un día o más de estar recogidas, que se han transportado en grandes recipientes (por lo cual se han recalentado y roto), que están sucias o podridas o que, simplemente, se han colocado en recipientes sucios o infectados [66]. Una vendimia realizada en malas condiciones da lugar a una serie de fenómenos que disminuyen la calidad del vino: oxidaciones, pérdida de aromas, sabores extraños, incorporación de elementos impropios, etc.

2.2.2.- TIPO DE MAQUINARIA EN BODEGA.

Aunque la obtención de los distintos tipos de vinos va asociada a diferentes tipos de vinificaciones, vamos a estudiar de forma general el efecto que tienen sobre los mostos diversas operaciones de bodega, y las ventajas que ofrecen ciertas prácticas o ciertos tipos de maquinarias sobre otros.

Una de las primeras operaciones que sufren las uvas al llegar a la bodega es el estrujado. Con esta operación se libera el jugo, se hace posible el transporte mediante bombas, se produce la invasión del jugo por las levaduras del hollejo, facilita la maceración por el mayor contacto entre el mosto y la parte sólida, y se aumenta la eficacia del prensado. Entre las desventajas que podemos atribuir a esta operación están el que la aireación, sobre todo en el caso de uvas alteradas, puede oxidar los mostos; además puede provocar una activación muy marcada de la fermentación, principalmente en zonas cálidas. El estrujado ocasiona también un exceso de lías. Existen varios tipos de sistemas de estrujado: unos se basan en la acción de rodillos (cilíndricos, cónicos, de perfiles conjugados, etc.) y otros son centrífugos (de eje horizontal o de eje vertical). Las estrujadoras deben romper los granos de uva pero nunca molerlos a riesgo de dislacerar semillas, que proporcionan sustancias astringentes y aumentan la disolución de taninos.

El despallado consiste en la separación de los granos del raspón antes de que sean estrujados. Los raspones verdes confieren un sabor desagradable al mosto por disolución de taninos, jugos vegetales y posibles pesticidas. En vinos tintos finos es conveniente realizar esta operación, pues en caso contrario se obtienen vinos ásperos, duros e inarmónicos. En

vinos blancos la idoneidad o no del despallado depende de la variedad de uvas, de su grado de madurez y de su elaboración posterior. En general las ventajas que supone el eliminar los raspones son economía del espacio ocupado en bodega, disminución de la astringencia, obtención de mayor grado alcohólico y mayor color debido a que el raspón absorbe etanol y fija materia colorante sobre su superficie. Los inconvenientes de realizarla son que la fermentación puede presentar problemas de realización, ya que el raspón introduce sustancias nitrogenadas y provoca mayor aireación, factores que facilitan el crecimiento de las levaduras. El raspón también actúa facilitando el prensado.

Otro tipo de maquinaria que interviene constantemente en la elaboración de los vinos son las bombas. Existen diversos tipos de ellas y las más adecuadas son las que trabajan lentamente, provocan poco enturbiamiento, y transportan cuidadosamente la uva estrujada: por ejemplo las bombas de émbolo de percusión.

El escurrido es una operación indispensable en la elaboración de vinos blancos. Consiste en separar rápidamente el máximo de jugo liberado en el estrujado, del resto de partes sólidas. Los requisitos que se exigen a un extractor de jugo son: rapidez de carga, velocidad elevada en el proceso, obtención de mostos claros y poco contacto del mosto y la uva con el aire. La ventaja que presenta el escurrido es que el prensado se realiza sobre volúmenes menores, con lo cual se ahorra tiempo y espacio. La desventaja radica en la excesiva aireación del zumo.

El prensado de las uvas estrujadas y escurridas en el caso de la vinificación en blanco, o de la pasta obtenida tras la maceración en la vinificación en tinto, consiste en la separación del líquido de los componentes sólidos de la uva. Las prensas pueden ser de tipo continuo o discontinuo, y dentro de estas últimas las hay horizontales de husillo, neumáticas, hidráulicas, etc. A continuación citamos las ventajas de unos

sistemas sobre otros aplicándolo a la vinificación en blanco, dado que los mostos blancos son más susceptibles a la alteración que los vinos de pasta en la elaboración de tintos. El proceso de prensado debe ser rápido, garantizar una alta eficacia y provocar un efecto lo menos negativo posible sobre el mosto en lo que se refiere a enturbiamiento y cesión de sustancias tánicas. Las prensas continuas son de alto rendimiento, realizan una extracción rápida del mosto y requieren poca mano de obra, pero a consecuencia del prensado violento que realizan trituran los orujos aumentando los taninos del mosto. Dentro de las discontinuas tenemos las de tipo vertical. Estas han sido utilizadas desde tiempos inmemoriales, pero las presiones que ejercían estos antiguos aparatos producían bajos rendimientos. A partir del siglo XIX se le acopla un dispositivo hidráulico que ejerce presión. Las ventajas de esta prensa son que la fuerza que ejerce no dislacera los orujos, que exprime eficazmente uvas podridas o enteras, y que el mosto obtenido no presenta demasiadas heces. El inconveniente es que el espesor de orujos generado es muy grande y obliga a emplear presiones muy fuertes. La prensa hidráulica vertical fue relegada con el desarrollo de las prensas horizontales a partir de 1955, ya que éstas son más rápidas y requieren menos trabajo. Pero desde el punto de vista de la calidad y composición del mosto, se debe admitir que los caldos obtenidos con la prensa horizontal son más turbios y requieren una posterior clarificación.

2.2.3.- TIPOS DE VASIJAS DE FERMENTACION Y CONSERVACION.

La influencia que puedan tener los tanques de fermentación y conservación sobre la calidad final de los vinos puede ser de tipo físico (influencia sobre las temperaturas de fermentación), de tipo químico

(cesión de materiales desde los recipientes al mosto en fermentación), o de tipo sanitario (facilidad de limpieza y por tanto de prevención de enfermedades del vino). Los tanques pueden ser de madera, de cemento, de fibra de vidrio y resinas, de acero común y de acero inoxidable. Estas grandes cubas pueden ser aéreas o no, y su disposición en bodega también va a tener influencia sobre la fermentación al condicionar la difusión del calor desde los tanques al exterior.

Los recipientes de madera para la fermentación están cayendo en desuso; sin embargo es en barriles de este material donde se realiza la crianza y añejamiento de los vinos. La ventaja de este tipo de recipientes es que cede al vino suaves aromas de madera, y acelera su envejecimiento dado que las paredes de los barriles o toneles son permeables al oxígeno y por tanto favorecen los procesos oxidativos. Los inconvenientes son la dificultad de su limpieza, su aislamiento térmico del exterior, y su falta de estanqueidad si han permanecido algún tiempo sin líquido y no se tiene la precaución de "hincharlos" con agua, a fin de que la madera la absorba y ajuste todas sus duelas.

Los tanques de fermentación más extendidos son los de cemento armado. Presentan muchas ventajas sobre las vasijas de madera: son menos costosos y de conservación y limpieza más fácil, aprovechan mejor el espacio en bodega, y no presentan dificultades de superposición o adosamiento. Son recipientes herméticos impermeables al oxígeno (por ello no son útiles para el envejecimiento), y no permiten mermas por evaporación. Entre las desventajas que presentan las bodegas con depósitos de cemento, se encuentran las altas temperaturas de fermentación que se alcanzan; ésto se debe a la disposición adosada, a la naturaleza aislante, y al grosor de las paredes de los mismos. Otros aspectos negativos de este tipo de depósito son la alcalinidad inicial de sus superficies, y la cesión al vino de calcio y hierro si las paredes no están revestidas adecuadamente con

parafinas, plásticos sintéticos, resinas epoxi, etc. Desde el punto de vista sanitario, si la bodega es húmeda las paredes de los depósitos vacíos se enmohecen, y ésto causa alteraciones posteriores en los mostos que allí se vinifiquen.

Las vasijas a base de fibras de vidrio y resinas de poliéster se utilizan para la conservación más que para la fermentación. Las características principales de estos recipientes son buena resistencia físico-mecánica, unida a una cierta elasticidad y poco peso. Como inconvenientes muestran una tendencia a la deformación con el tiempo, y producen una cierta alteración química del vino contenido por incorporación de uno de los elementos que entran en su composición: el monómero de estireno, que da olor y gusto a plástico [229].

Las cualidades que presentan los depósitos de fermentación de acero inoxidable son: gran resistencia mecánica, estanqueidad perfecta y gran facilidad de limpieza, desinfección y esterilización. Por otro lado las paredes metálicas son susceptibles de transmitir calor, lo cual es interesante para rebajar las altas temperaturas de fermentación. A pesar de que la opinión generalizada destaca la inalterabilidad de este material y su carácter inerte, OREGLIA revisando los trabajos de varios autores nos advierte sobre los peligros de los tanques de acero inoxidable para permanencias prolongadas del vino, ya que la corrosión que puede sufrir este metal por parte del vino u otras causas ajenas a él, como por ejemplo el anhídrido sulfuroso que se añade, provoca el enriquecimiento en metales indeseables; por otro lado el vino puede canalizar fenómenos de corrosión galvánica, etc. [229].

2.2.4.- TIPOS DE TRATAMIENTOS APLICADOS A LOS MOSTOS.

El tratamiento más generalizado que se efectúa en la elaboración de los vinos es el sulfitado; sin embargo otros procesos tales como la adición de enzimas pectolíticos, el control de temperatura, la clarificación y la estabilización también afectan las cualidades del producto final.

2.2.4.1.- EFECTO DEL SO₂.

El uso del SO₂ como desinfectante de recipientes vinarios date de muy antiguo, pero el primero que lo utilizó en la vinificación fue CZEPPÉL en 1890 [229]. Los franceses MARTINAND y ANDREU a fines del siglo pasado demostraron las ventajas de su empleo en la elaboración de los vinos [229] y BOUFFARD, ya en nuestro siglo, lo utilizó esencialmente para evitar la "quiebra oxidásica" [283]. El SO₂ se suele emplear inmediatamente después del prensado de las uvas destinadas a vinificación en blanco, tras el estrujado de uvas tintas, y una vez finalizada la fermentación alcohólica o la fermentación maloláctica para estabilizar los vinos. El sulfuroso puede añadirse al mosto en forma de gas, metabisulfito potásico, o también quemando en el interior de los recipientes una mecha de azufre. En los vinos el anhídrido sulfuroso se encuentra en dos estados: libre o formando combinaciones más o menos estables con compuestos orgánicos como aldehidos o cetonas. Desde el punto de vista antiséptico y antioxidante sólo presenta actividad el sulfuroso libre [241]. Las ventajas tecnológicas del empleo del SO₂ son:

1- **Selección de la microflora** de la uva, al actuar más intensamente sobre unas especies que sobre otras. Inhibe en mayor grado a las bacterias que a las levaduras, y entre estas últimas más a las apiculadas que a las pertenecientes al género *Saccharomyces* [43, 271, 275, 283, 306]. De esta

forma se consigue una fermentación más pura, regular y completa [229].

2- **Acción solubilizante y acidificante** del SO_2 . En el caso de la vinificación en tinto se admite que el sulfitaje favorece la disolución de sustancias minerales, de ácidos orgánicos, y sobre todo de compuestos fenólicos que constituyen la materia colorante de los vinos tintos (antocianos y taninos). La acción solubilizante se debe a que el SO_2 destruye las células del hollejo que ceden así fácilmente sus componentes solubles [283]. La acción acidificante se debe en principio al carácter ácido del SO_2 en combinación con el agua, y además a la formación de sales del ácido sulfuroso con los cationes de las sales tartáricas y málicas, liberándose así los ácidos tartárico y málico. Por ello los vinos tintos sulfitados resultan más ricos en acidez fija, extracto y sustancias minerales que los no sulfitados [229, 271, 306].

3- **Acción defecante o clarificante**. Esta se debe a dos causas: una es que la función antiséptica del SO_2 al retardar la fermentación evita la producción de corrientes en el interior del líquido, lo cual permite que las partículas, de densidad más alta que el mosto, caigan al fondo. La otra razón hay que buscarla en su poder coagulante, por el cual resultan insolubilizadas algunas partículas en estado coloidal. La dosis que se emplee debe ser tal que retarde el inicio de la fermentación, de lo contrario no se producirá una clarificación adecuada [229].

4- **Acción antioxidante**. En los mostos y vinos hay dos tipos de oxidaciones: la oxidación enzimática y la oxidación química. La primera se realiza con la intervención de enzimas oxidantes presentes de forma natural en el jugo de uva (tirosinasa, lacasa, peroxidasa, etc.), y los mostos son mucho más susceptibles a ellas que los vinos. Los enzimas oxidásicos catalizan la oxidación de determinadas sustancias especialmente las fenólicas, con la consiguiente alteración de los caracteres organolépticos: color, sabor y olor. El anhídrido sulfuroso destruye o bloquea la actividad de las

oxidasas y además reduce los compuestos oxidados. Por otro lado, el SO_2 actúa contra la oxidación por vía química dado su carácter reductor: utiliza el oxígeno oxidándose a ácido sulfúrico [229]. De esta manera impide el pardeamiento y la maderización de los vinos [240].

5- **Acción mejoradora del sabor y aroma.** RIBÉREAU-GAYON et al. [283] afirman que el sulfitaje supone una mejora del gusto de los vinos, sobre todo en el caso de vendimias podridas o de variedades mediocres; atenúa además el gusto a moho. Por otra parte, conserva ciertos aromas de los vinos nuevos [283]. Al bloquear el acetaldehído, mejora la degustación y preserva la frescura y el aroma; también elimina la fatiga, el oreo y el pasajero carácter oxidativo de un vino [240]. DAUDT y OUGH también han informado de la influencia que tienen diferentes concentraciones de SO_2 sobre la síntesis de ésteres aromáticos por levaduras [87].

Sin embargo, también el empleo de SO_2 tiene ciertas desventajas de índole técnica, como son el retardo del añejamiento que ocasiona su carácter antioxidante, la inhibición de la posible fermentación maloláctica, o el aumento del riesgo de la "quiebra cuprosa" [229]. En ciertas condiciones, como son fermentación anaeróbica estricta y prolongado contacto con sedimentos de levaduras, hay formación a partir del SO_2 añadido de SH_2 y mercaptanos, cuyos olores desagradables pueden ser muy persistentes [283].

2.2.4.2.- INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS DE CLARIFICACION PREFERMENTATIVA.

La preclarificación es una práctica que se realiza en la elaboración de vinos blancos, y puede elevar notablemente la calidad de éstos. Se practica cuando se quiere obtener vinos más elegantes, puros, cromáticos, armónicos y pobres en taninos. Si los mostos turbios, una vez salidos de la prensa, se someten a bajas temperaturas o a la acción del SO_2 , se produce

una clarificación espontánea. La turbidez del mosto se debe a [331]:

- 1- **Impurezas:** partículas de tierra, restos de pesticidas, etc.
- 2- **Restos de tejidos celulares** de la uva, que se hallan en mayor o menor proporción según el tipo de prensado al que han sido sometidos los frutos.
- 3- **Cristales de sales** como el hidrogenotartrato (bitartrato) potásico.
- 4- **Microorganismos.**
- 5- **Precipitados o coágulos** más o menos gruesos, como los que se producen en la descomposición de la pectina y en la oxidación de mostos.

La sedimentación de las partículas que provocan la turbidez depende por una parte de su peso, y por otra de la resistencia que ofrece la viscosidad del mosto al desplazamiento o caída de las mismas hacia el fondo de la vasija. La velocidad de la clarificación espontánea del vino depende sobre todo de su riqueza en coloides protectores, ya que éstos se oponen a la floculación y a la aglomeración de las partículas en suspensión, y por tanto a su sedimentación. Por otro lado estos coloides protectores acrecientan la viscosidad del medio, impidiendo de esta manera la clarificación. No obstante, determinados procesos enzimáticos que se producen en el seno del mosto contribuyen a su clarificación espontánea al degradar los coloides protectores.

Los coloides generalmente presentes en el vino son proteínas, sustancias pécticas, polisacáridos (gomas, mucílagos, dextrano, etc.), polifenoles polimerizados, micelas cristalinas de hidrogenotartrato potásico y tartrato de calcio, etc. [229].

La clarificación natural del mosto puede ser ayudada artificialmente mediante centrifugación y adición de ciertas sustancias de naturaleza enzimática o coloidal que solubilizan ciertas sustancias, o que adsorben y arrastran partículas suspendidas en el mosto, con lo cual éste resulta limpio [229].

Las distintas variantes que se emplean para la clarificación artificial de los mostos son [331]:

1- **Aceleración de la preclarificación por eliminación de sustancias pécticas.** Las sustancias pécticas están constituidas por largas cadenas lineales de ácido galacturónico cuyos grupos ácidos están en parte esterificados con un residuo metílico. Son sustancias de elevado peso molecular que se pueden encontrar como protopectinas (complejos insolubles que por hidrólisis ácida dan pectinas solubles), ácidos pécticos (polímeros de ácido galacturónico sin esterificar y solubles), o pectinas (ácido poligalacturónico esterificado total o parcialmente con residuos metílicos y solubles). Estos compuestos confieren al mosto una viscosidad que es proporcional a la longitud del polímero y al grado de esterificación metílica. A mayor cantidad de sustancias pécticas, mayor dificultad de clarificación [331]. Los enzimas pectolíticos son enzimas hidrolíticos o liasas cuya actividad consiste en último extremo en romper las largas cadenas de ácido galacturónico, eliminando en parte la viscosidad del mosto asociada a la presencia de sustancias pécticas. Estos enzimas pectolíticos se hallan de forma natural en los mostos, pero a veces o están en baja concentración o han sido destruidos por los tratamientos de vinificación. En estos casos puede acudir al empleo de enzimas pectolíticos exógenos que aceleran el proceso de clarificación.

2- **Eliminación de sustancias de naturaleza proteica.** Las proteínas de alto y bajo peso molecular que se hallan en los mostos pueden combinarse con taninos y metales pesados dando enturbiamientos. La eliminación de proteínas puede realizarse mediante enzimas proteolíticos (que están de forma natural en el jugo de uva) o mediante la acción de clarificantes, como la bentonita. La adición exógena de enzimas en este caso no es muy eficaz, ya que exigen temperaturas relativamente elevadas y requieren un pH netamente superior al que se encuentra en los vinos [229]. La bentonita es

un tipo de arcilla rica en silicio que al colocarse en suspensión acuosa forma micelas electronegativas muy pequeñas, capaces de adsorber sobre su superficie proteínas y otras partículas cargadas positivamente. Es capaz de eliminar tanto los prótidos naturales como los prótidos añadidos o los clarificantes en demasiada concentración (p.e. gelatina); por otra parte es capaz de adsorber las polifenoloxidasas, contribuyendo a evitar la quiebra oxidásica. También hace al mosto menos sensible a la quiebra cuprosa, dado que al eliminar proteínas impide la unión del cobre a éstas, evitando el enturbiamiento por este motivo [229]. Las acciones de la bentonita son mucho más extensas de las aquí nombradas, pero no es objeto de esta introducción el desarrollar ampliamente sus características, así como las de otros clarificantes. Para una información exhaustiva consultar los trabajos de OREGLIA [229].

El valor de los tratamientos de preclarificación estriba en un aumento de la calidad de los vinos, debido a la eliminación de sustancias que le conferían un sabor no deseado, obteniéndose así vinos más puros con menor cantidad de oxidasas. Desde el punto de vista microbiológico influyen eliminando carga microbiana, con lo cual las fermentaciones son menos tumultuosas. Y por último esta preclarificación disminuye la cantidad de sedimentos a eliminar en el primer trasiego [331]. Los vinos que han sufrido una preclarificación demasiado intensa fermentan mal; por ello se prefiere un grado de clarificación moderado [331].

BERTRAND *et al.* estudiaron el efecto que la preclarificación tenía sobre el contenido en sustancias volátiles de vinos y licores [33]. Tras someter los mostos a diversos tratamientos de preclarificación (con SO_2 , con enzimas pectolíticos, o mediante baja temperatura), llegan a la conclusión de que la preclarificación incide favorablemente sobre la calidad de los vinos. Esto se debe a que disminuye la cantidad de aquellos alcoholes superiores de olor más desagradable, mientras que se incrementa

la concentración de ésteres, que con sus olores florales o afrutados participan en gran parte en el aroma de los vinos blancos [33]. Posteriormente BERTRAND y MIELE confirmaron la influencia de la preclarificación en la composición química de los mostos [34]. Tras realizar la preclarificación de mostos de Cabernet-Sauvignon mediante centrifugación o filtración, observaron que la cantidad de ácidos grasos que quedaba en el mosto tras estos tratamientos era muy inferior al que permanecía en los mostos no preclarificados. Esta observación es importante desde el punto de vista de la influencia que tienen estos compuestos, o mejor los lípidos de los que forman parte, en la síntesis de ésteres por parte de las levaduras [34] y en la formación de componentes del aroma generados por acción de enzimas propios del mosto, como la lipooxigenasa, aldehído-liasa, y la alcohol-deshidrogenasa [74].

2.2.4.3.- INFLUENCIA DE LAS TEMPERATURAS DE FERMENTACION.

La temperatura interviene de diferentes maneras sobre el proceso de la fermentación y evidentemente sobre el vino obtenido. En principio la temperatura tiene influencia sobre la actividad de los microorganismos responsables de la fermentación. Por otro lado, la temperatura influye en la intensidad de la disolución de compuestos fenólicos en vinificación en tinto. Las bajas temperaturas influyen en la retención de aromas y en el contenido en alcohol, en el mantenimiento de un menor grado de oxidación, y en una mayor estabilización de las sales hidrogenotartáricas [283].

Se podría estimar que las temperaturas óptimas de fermentación son [283]:

1- Para vinificación de tintos: de 25 a 30°C. En la elaboración de vinos tintos jóvenes se prefieren las temperaturas más bajas a fin de conservar los aromas. Por contra para los vinos destinados a envejecimiento, que

deben poseer bastantes taninos a partir de hollejos y orujos, se prefiere una temperatura de elaboración más alta.

2- **Para vinificación de blancos o rosados:** de 18 a 20°C. Una temperatura de fermentación relativamente baja es una condición indispensable para la elaboración de vinos blancos aromáticos.

La facilidad de realizar fermentaciones a temperatura controlada es mucho mayor en mostos blancos o rosados que en mostos tintos, ya que en estos últimos la existencia de un sombrero formado por hollejos y orujos en maceración constituye un aislante térmico, e impide la difusión de la refrigeración a toda la masa en fermentación.

La refrigeración tiene como fin eliminar los excesos de temperatura generados por el calor con que las uvas llegan a bodega, y por la reacción exotérmica que constituye la transformación de azúcar en alcohol.

Las ventajas que suponen las fermentaciones a baja temperatura respecto a los microorganismos son las siguientes: las levaduras fermentan más lenta y uniformemente, con lo cual se evita el agotamiento y la pérdida de viabilidad causantes de los paros en la fermentación. Por otra parte, en condiciones de elevada temperatura, las levaduras pueden excretar sustancias tóxicas que obstaculizan los reinicios de fermentación, aún en el caso de que se reinocule con mosto fresco. Además a temperaturas más bajas el efecto nocivo que el alcohol tiene sobre las levaduras es menos intenso, con lo cual su ciclo vital y su capacidad fermentativa se prolongan más en el tiempo. Las levaduras sometidas a condiciones de bajas temperaturas producen menor cantidad de acetaldehído, por lo que se requieren dosis más pequeñas de SO_2 (dada la mayor proporción de SO_2 libre) para controlar el proceso. Las bajas temperaturas también obstaculizan la realización de la fermentación maloláctica o maloalcohólica, poco interesante en caso de vinos poco ácidos, y también el desarrollo de bacterias causantes de enfermedades del vino [95].

Desde el punto de vista químico, las bajas temperaturas impiden la evaporación del alcohol producido, pudiéndose ganar unas décimas en la graduación del vino; evitan también la salida de los compuestos más volátiles del aroma, confiriendo a los vinos más finura y un perfume afrutado más intenso, características de juventud que persisten en el tiempo. Por otro lado el SO_2 se evapora en menor cantidad, lo cual también permite la utilización de dosis menores de esta sustancia. La oxidación de los mostos es menor, a pesar de que a bajas temperaturas aumenta la disolución del O_2 , porque a temperaturas bajas las reacciones químicas se hacen más lentas [95].

Como contrapartida, las temperaturas de fermentación bajas disminuyen el contenido en glicerina y la intensidad de la coagulación de sustancias nitrogenadas, con lo cual hay menor producción de heces o fangos [95]. BISSON *et al.* confirman la mejora organoléptica de los vinos blancos obtenidos a bajas temperaturas frente a los mismos fermentados a 30°C [37]. Se observó, no obstante, una ligera preferencia por los que habían sido fermentados a 13°C en vez de a 7°C .

En 1983 POULARD *et al.* llevaron a cabo un trabajo a fin de establecer la temperatura más adecuada para la vinificación de vinos blancos secos. Realizaron fermentaciones sobre dos tipos de mostos blancos a $12-14^\circ\text{C}$, $18-20^\circ\text{C}$ y $26-28^\circ\text{C}$, llegando a las mismas conclusiones que ya hemos establecido antes: es decir, a mayor temperatura velocidad de fermentación más rápida, fenómenos de agotamiento de levaduras al final de la fermentación, menor grado alcohólico, mayor proporción de SO_2 combinado, y menores cantidades de ésteres y alcoholes superiores [259].

Sin embargo, COTTRELL y McLELLAN limitan el efecto favorecedor de las bajas temperaturas de fermentación. Llegan a la conclusión de que la influencia de éstas en los aromas es notable en el caso de mostos procedentes de variedades con importante carácter frutal o floral, pero no

ocurre ésto con variedades de características menos definidas [73].

2.2.4.4.- INFLUENCIA DE LOS MICROORGANISMOS QUE INTERVIENEN EN LA FERMENTACION.

Es evidente la influencia que ejercen los microorganismos sobre la calidad del vino, ya que éstos son los responsables de las transformaciones que convierten el mosto en vino. Las levaduras son los microorganismos más importantes en la fermentación de los mostos, pero no son los únicos que actúan: mohos, bacterias lácticas y acéticas también pueden intervenir.

Estos microorganismos son responsables tanto de la obtención de un gran vino, como del desencadenamiento de un gran número de enfermedades del mismo. El éxito de la vinificación está siempre subordinado a un perfecto conocimiento de los microorganismos y de sus actividades, así como de su razonable utilización.

La influencia de las distintas cepas de levaduras en las características de un vino viene ilustrada por esta cita de PASTEUR: "El vino común, su gusto, sus cualidades dependen, en gran parte, de la naturaleza específica de las levaduras que se desarrollan durante la fermentación. Se puede pensar que si se somete el mismo mosto a la acción de distintas levaduras, se obtendrían vinos distintos" [283].

La fermentación de los mostos no es una fermentación por un sólo microorganismo, aunque últimamente la práctica de la inoculación de cepas puras seleccionadas es frecuente en algunos países. Según RIBÉREAU-GAYON et al. sólo se han conseguido buenos resultados con cepas puras en el caso de vinos corrientes o de calidad media, e incluso en estos casos los aromas secundarios se perdían al cabo de unos meses de conservación [283]. Por otro lado, hay autores que piensan que una fermentación espontánea con levaduras salvajes hace que el aroma de los vinos resulte más complejo, más

redondo [31]. Esto es debido a que levaduras poco alcohológenas como *Kloeckera* sintetizan mayor cantidad de compuestos aromáticos, que dotan al vino de un carácter más afrutado que en el caso de las fermentaciones puras con *Saccharomyces*.

Tampoco hemos de olvidar ciertas características negativas que el metabolismo microbiano puede conferir al vino, por ejemplo la producción de altos niveles de SH_2 , mercaptanos y ácido acético.

RANKINE nos habla de que las diferencias en la composición de vinos producidos por distintas levaduras son más de carácter cuantitativo que cualitativo [274]. En este sentido, DAUDT y OUGH en 1973 muestran que la síntesis de ésteres volátiles es función de las cepas empleadas, aunque todas producían en alguna cantidad [87].

En el caso de las bacterias lácticas, uno de los aspectos que más nos interesa de ellas, en cuanto a determinantes del carácter de un vino, es la fermentación maloláctica. La transformación del ácido málico en láctico supone una mejora, desde el punto de vista gustativo, en los vinos ácidos, ya que el vino pierde su sabor acerbo y duro y se vuelve suave. Como consecuencia de esta disminución de la acidez, el color se hace menos intenso y los aromas también se modifican, perdiendo frutalidad y enriqueciéndose en matices y vinosidad. La fermentación maloláctica es aconsejable sobre todo en vinos tintos ácidos y no tanto en blancos o rosados, aunque hay gran controversia a la hora de evaluar el interés de esta transformación [240]. Las bacterias lácticas pueden determinar enfermedades en el vino si atacan a los azúcares, al ácido cítrico, al tartárico o al glicerol [175].

Las bacterias acéticas tienen un papel indiscutiblemente negativo en el vino: transforman el etanol en ácido acético, dando lugar al vinagre.

Por último, los hongos filamentosos en el mosto pueden dar lugar a sustancias tóxicas o a malos sabores (p.e. gusto a moho) y a oxidaciones

debido a enzimas que éstos producen: lacasa, tirosinasa, etc.

2.2.4.5.- INFLUENCIA DE LAS OPERACIONES POSTFERMENTATIVAS.

Los métodos de clarificación que hemos estudiado en el Apartado de tratamientos prefermentativos, en el caso de vinos tintos o rosados e incluso en los blancos se aplican también tras la fermentación.

Después de la fermentación el vino contiene en suspensión microorganismos, restos de células vegetales, y partículas coloides. Este vino es turbio y en reposo y por la acción de la fuerza de la gravedad se clarifica de forma espontánea. La rapidez de esta clarificación se debe a su riqueza en coloides protectores, como ya hemos indicado anteriormente. No es extraño que algunos vinos permanezcan turbios durante meses. La necesidad de comercializar pronto los vinos obliga a emplear sistemas artificiales de clarificación. De los principales clarificantes ya hemos hablado en el Apartado de tratamientos de fermentación, así como de su influencia sobre el vino. Sin embargo, de las técnicas de centrifugación o filtración como métodos de clarificación, empleados únicamente tras la fermentación, no hemos hablado hasta ahora.

La centrifugación tiene como fin clarificar de forma acelerada los vinos y provocar una decantación rápida. La centrifugación elimina eficazmente el 99.8% de levaduras de un vino joven, pero es menos eficaz cuando se trata de partículas más pequeñas, con lo cual no llega a proporcionar el abrillantado de la filtración [240].

La filtración es un proceso físico según el cual el vino pasa a través de una capa filtrante con poros muy finos, donde quedan retenidas las partículas de diámetro mayor al del poro. Los filtros son de diversa composición: de fibra de celulosa, de fibras de amianto, de tierras de foraminíferos, sílice fósil, etc. También pueden ser de tipo adsorbente o

tamizados, y pueden tener diversas finalidades: filtración de sustancias inertes o de microorganismos (filtración esterilizante). El efecto que el filtrado tiene sobre los caracteres organolépticos de un vino es mínimo debido a que es una acción de tipo mecánico, pero dado que el filtrado exige desplazamientos y bombeos la oxigenación que éstos conllevan puede dañar al vino. Por otra parte es necesario insistir sobre los sabores a tierra, a papel, y a tela que con frecuencia comunican los materiales filtrantes de mala calidad [240].

Por último, y tras la clarificación, el vino debe estabilizarse para evitar enturbiamiento durante su conservación, así como la acción no deseada por parte de los microorganismos que podrían alterar las cualidades del producto obtenido. Estabilizar un vino no es fijarlo en el estado en que se encuentre, sino impedir los posibles accidentes de su conservación. Hay que preservar al vino dentro de unos límites de conservación en lo que respecta a la aireación, a la exposición a la luz, a las temperaturas bajas o altas, etc. Precisamente cuando el vino se estabiliza es cuando su evolución gustativa es más normal y más favorable. La estabilización se consigue a base de tratamientos físicos (calentamiento o refrigeración) y químicos (adición de ácidos, fitatos de calcio, ferricianuro potásico, etc.) [240].

3.- LA COMARCA UTIEL-REQUENA.

El viñedo de Utiel-Requena es actualmente el más extenso, compacto y homogéneo de todos los valencianos, así como el mayor productor de vinos tintos de España. Su formación histórica como viñedo de masa es

relativamente reciente, del siglo XIX, y a pesar de su hegemonía sobre el resto de las zonas vitivinícolas sigue una dinámica de expansión que las sobrepasa largamente [256].

Esta comarca, demasiado alejada de los grandes centros de consumo y con muy deficientes vías de comunicación en el pasado, no proyectó su producción vitícola hacia la comercialización intercomarcal. Hasta comienzos del siglo XIX la viticultura requenense apenas sí pudo superar el nivel de autoabastecimiento, lo cual no significa que el cultivo de la vid no fuera práctica común desde el siglo XIII. Hasta mediados del siglo XVIII la situación se mantiene más o menos inalterable: viñedos poco extensos, localizados alrededor de la población y pertenecientes a pequeños propietarios. Los mayores cosecheros, a tono con sus necesidades, eran los conventos y clero parroquial. En la segunda mitad del siglo XVIII, y con motivo de la fabricación de aguardientes, es cuando la viticultura comienza a hacerse más comercial. Durante la primera mitad del XIX se aceleró el ritmo de las nuevas plantaciones por parte de los vecinos de Utiel que habían abierto mercado en la serranía de Cuenca. Dado que el vecino Reino de Valencia (entonces la comarca Utiel-Requena estaba bajo jurisdicción castellana) era excedentario en vinos y no precisaba comprar fuera, habría que esperar a la crisis del *Didium* sobre los viñedos franceses (1852-1862) para que la demanda exterior de vinos alcanzara a esta comarca. A partir de 1854 los compradores foráneos descubrieron en los vinos de esta zona el complemento ideal para dar color y fuerza a los suyos, sin quitarles por ello su sabor, ya que el vino de Bobal, variedad comarcal predominante, es de sabor neutro. Desde 1850 a 1890 se plantaron más de 15000 Ha de viñedo en toda la comarca. Hasta 1912 se vería libre de los ataques de la filoxera; la propagación de esta enfermedad fue relativamente lenta y permitió a los viticultores ir sustituyendo progresivamente los pies europeos por los americanos, sin que llegase a apreciarse una disminución

en la superficie vitícola. La tendencia hacia el monocultivo de la vid obedece a la mayor rentabilidad de ésta frente al cereal, única alternativa posible en esta zona, y al intento de economizar en maquinaria y utillaje de laboreo [256].

El ámbito geográfico de esta Denominación de Origen (D.O.) se encuentra situado en la parte oeste de la provincia de Valencia, teniendo como límites naturales las sierras de Utiel y Tejo al nordeste, y el curso del río Cabriel al sur y suroeste, estando surcada diagonalmente hacia el sureste por el río Magro. La superficie de viñedo con D.O. es de 48354 Ha [225].

3.1.- OROGRAFIA Y TIPOS DE SUELOS.

La zona vitícola Utiel-Requena es una meseta o plataforma descendente en sentido norte-sur y oeste-este. La altitud va desde los 1100 metros, en el municipio de Sinarcas, hasta unos 450 metros en la parte más al sur del de Requena. No existen macizos montañosos de gran entidad [225]. La barrera montañosa que cierra esta meseta por el norte alcanza alturas superiores a los 1200 metros, tanto en la Sierra de Utiel como en la del Tejo; ambas constituyen parte de la misma alineación montañosa de origen y orientación ibéricas, en donde dominan las rocas jurásicas y cretácicas. La misma orientación presentan las sierras de la Bicuerca y del Moluengo en la parte occidental de la meseta, mientras que ésta queda cerrada por el este por las sierras de Malacara y Martés. El flanco meridional y parte del occidental se hallan delimitados por el gigantesco arco del valle del río Cabriel, cuya erosión y la de sus afluentes ha hecho que el relieve de esta zona sea muy accidentado [256].

En el centro de esta orla montañosa se hallan las tierras de cultivo asentadas sobre dos tipos de roca madre: la mitad sur de la comarca (Requena y Venta del Moro) está situada sobre arcillas y margas del Mioceno, interrumpidas al sur-este de Requena por manchas de caliza y margas arenosas del Cretácico inferior, y unas lenguas del Cuaternario en las terrazas del Magro y Cabriel. Por su lado, la parte más al norte de los municipios anteriormente citados y las zonas de Utiel, Caudete de las Fuentes, Fuenterrobles, Camporrobles y Villargordo de Cabriel, se extienden sobre un mosaico formado por terrenos del Mioceno (arcillas, margas y calizas margosas, y algunas calizas lacustres) y lenguas del Cuaternario indiferenciado. Con pequeña entidad aparecen en la parte izquierda de esta mitad superior algunas calizas, arcillas o margas del Cretácico [225].

Las tres cuartas partes de la zona vitícola Utiel-Requena han evolucionado en superficie hacia suelos con perfil A/(B)/C con horizonte de humus muy poco desarrollado y hacia suelos pardo-calizos sobre material no consolidado. El cuarto inferior situado en el ángulo más al sur está caracterizado por perfiles poco diferenciados A/C sobre materiales calizos, rendziniformes con horizonte C de margas calizas. Principalmente la viña está implantada sobre suelos con perfil que descansa sobre roca madre no consolidada. Un 20% de la viña de la D.O. Utiel-Requena se desarrolla sobre margas calizas rendziniformes, con perfil A/C, con buen drenaje y material calizo en el subsuelo. Los demás viñedos se encuentran sobre perfiles tipo A/(B)/C sin acumulación de arcilla en el horizonte B, con buen drenaje y con horizonte de humus poco desarrollado; en general estas características son factores positivos para la obtención de caldos de calidad [225].

3.2.- CLIMATOLOGIA.

El clima de esta región es diferente del del resto de las comarcas valencianas, debido a las temperaturas más extremas causadas por su altitud y continentalidad. La D.O. Utiel-Requena se halla bajo la influencia del clima mediterráneo, con máximos de pluviosidad y fuertes tormentas en verano-otoño con vientos del este y sudeste. La evaporación es fuerte en verano y son frecuentes las heladas en invierno [225].

Las temperaturas medias anuales son de 14°C en Requena y 12°C en Utiel, siendo la media más fría la de enero (mes que se mantiene en torno a los 5°C) y la más cálida la de agosto (en el que se rebasan los 24°C). Más significativas son las profundas oscilaciones entre el día y la noche, que en el verano pueden alcanzar una amplitud de 20°C; también los valores extremos, de -5°C a -10°C en invierno, y de 35 a 40°C en agosto [256].

Las precipitaciones son regularmente escasas, en torno a los 400 mm anuales. El número de días lluviosos al año suele ser de 65 [225]. Las lluvias se distribuyen a lo largo del año con dos máximos en primavera y otoño (octubre suele ser el mes más lluvioso), con clara influencia monzónica. En invierno pueden presentarse algunas precipitaciones en forma de nieve, mientras que en verano las escasas precipitaciones suelen ser siempre en forma de granizo [256].

El número medio de horas de sol al año en la comarca es de 2600. El número de días totalmente cubiertos al año es de 60 y 130 el de despejados, y el periodo libre de heladas se extiende desde el 15 de abril al 25 de octubre [225].

3.3.- VARIEDADES DE UVA Y PORTAINJERTOS AUTORIZADOS EN ESTA D.O.

Las variedades preferentes en la D.O. Utiel-Requena son Bobal, Garnacha y Tempranillo entre los tintos, y Planta Nova y Garnacha Blanca entre las blancas.

El mayor porcentaje de cultivo lo presenta la variedad tinta Bobal con un 88.24%. Le siguen muy por debajo Garnacha (1.12%), Malvasía (0.92%), Planta Nova (0.42%), y otras variedades (2.47%) entre las que se hallan por orden decreciente de importancia Tempranillo, Macabeo, Mazuela, Palomino Fino, Garnacha Blanca, Tintorera, Graciano, Jaén, etc. El resto del total lo constituyen plantas sin injertar [225].

El rigor climático ha orientado desde antiguo a los viticultores de la zona hacia la adopción de variedades resistentes, habiendo encontrado en la Bobal a la cepa que mejor se adapta a estas condiciones [256]. Este tipo de vid da un alto rendimiento, es muy resistente a la sequía y en situaciones normales es poco atacada por enfermedades criptogámicas. Produce mostos abundantes, bien equilibrados, la acidez es relativamente alta, la concentración en azúcar no es elevada, y en años de temperaturas veraniegas no muy altas se obtienen mostos con pocos azúcares y ácidos. Es una variedad que da mucho color, lo cual la hace apta para la producción de tintos de doble pasta, con un aroma afrutado, algo ásperos por su elevado contenido en taninos y que no soportan bien la crianza; sin embargo es apreciada para la producción de rosados [13].

En relación con la sequedad y los altos porcentajes de caliza de estos suelos, los portainjertos más empleados actualmente son Millardet 420A (24.57%), Millardet 41B (23.83%), y Rupestris de Lot (21.81%) [225]. En la mayoría de casos se trata de pies híbridos cruzados de Chasselas y Berlaudier resistentes a la filoxera y apropiados a los suelos secos, reservándose para las cañadas y hondonadas más húmedas el de Riparia [256].

3.4.- LAS TECNICAS DE VINIFICACION EMPLEADAS EN LA D.O. UTIEL-REQUENA.

La vinificación es el conjunto de operaciones llevadas a cabo para transformar en vino el zumo de uva. Vinificar racionalmente es aplicar a un caso particular, en unas condiciones dadas, el conjunto de conocimientos adquiridos sobre los mecanismos y los factores que influyen en la vinificación. La vinificación no puede dejarse al azar con el pretexto de elaborar bajo formas tradicionales [240].

Los sistemas de elaboración empleados en la zona de Utiel-Requena siguen los esquemas clásicos. La adaptación de modernas tecnologías se está imponiendo poco a poco pero sin dejar de coexistir con las técnicas tradicionales. La mayor parte de la producción de vino en esta D.O. es de tintos y rosados; sin embargo también se vinifican, en pequeñísima cantidad y la mayoría de las veces de forma experimental, variedades blancas. A continuación se exponen los dos tipos de vinificación en la forma en que se realizan en Utiel-Requena.

3.4.1.- VINIFICACION TRADICIONAL EN TINTO.

Este tipo de vinificación se emplea para la obtención de vinos tintos doble pasta, y tintos directos y rosados, a partir de variedades tintas. La elaboración en tinto se basa en la fermentación del jugo de uva en presencia de la piel u hollejo y de las semillas u orujos. El fin de esta maceración es una extracción fraccionada de aquellos componentes que dan aroma, sabor, color, extracto y taninos. Los pigmentos situados en la

mayoría de las uvas tintas en los hollejos [3], y los taninos, mucílagos y otras sustancias que contribuyen al sabor y se hallan en los orujos [66], pasan al jugo de la uva por disolución. Los factores que influyen en la eficacia de disolución son:

- 1- La acción mecánica sobre los tejidos de la uva y la fragmentación de las partes sólidas ocasionada por el estrujado.
- 2- La temperatura a la que se realiza la maceración.
- 3- El tiempo que están en contacto mosto y orujos.
- 4- La mortificación de los tejidos y células bajo el sulfitado, la anaerobiosis y la presencia de alcohol.

La difusión de los componentes disueltos queda asegurada por los remontados o bazuqueos, que ponen en circulación el vino a través del sombrero de orujos, y por el prensado [240].

A continuación se ofrece un organigrama en el que se señalan los pasos necesarios para la obtención de los tres tipos de vino que se pueden elaborar a partir de una vinificación en tinto [144].

Los tratamientos que se realizan durante la vinificación son:

- 1- Para tintos directos: un sulfitado de la pasta a razón de 200-250 mg/l y una adición posterior durante la fermentación de 50 a 100 mg/l de SO_2 . Dos veces al día se procede a remontar el vino, facilitando de esta manera la difusión de sustancias desde los hollejos y semillas. Los días de maceración suelen ser unos 4 ó 5, descubándose cuando el vino ya no contiene cantidades notables de azúcar (generalmente a unos 1000 de densidad). Se realizan dos trasiegos: uno tras finalizar completamente la fermentación alcohólica, aproximadamente al mes de iniciarse ésta, y posteriormente otro durante la primavera.
- 2- Para tintos doble pasta: aquí la dosis de SO_2 que se adiciona a la pasta es mayor que en caso anterior a fin de que la extracción de color sea más intensa, de 200 a 300 mg/l; durante la fermentación se le añaden de 50 a

100 mg/l más. El número de remontados por día es de 2 ó 3. La duración de la maceración es de 7 días, descubiéndose a 1020-1010 de densidad. Los trasiegos a lo largo del año suelen ser de 2 a 3.

3- **Para vinos rosados:** se realiza una maceración parcial del mosto con los orujos y hollejos. El sulfitado se realiza a razón de unos 200 mg/l, después de haber salido la vendimia de la estrujadora. La duración de la maceración es de algunas horas, dependiendo del grado de color que se desee obtener. Tras este periodo se procede a un descube parcial denominado "sangrado", en el cual se extrae del 50 al 60% del mosto; el resto continúa elaborándose en tinto con un mayor tiempo de maceración. Una vez finalizada la fermentación alcohólica se descuba a 996 de densidad, y se trasiega dos veces al año.

3.4.2.- VINIFICACION TRADICIONAL EN BLANCO.

Este tipo de vinificación se basa en la ausencia de maceración del mosto con las partes sólidas del racimo; de esta manera se realiza la fermentación del mosto virgen. El oxígeno es el principal enemigo del vino blanco: desnaturaliza el aroma, destruye el afrutado y oscurece el color. Dado que es inevitable que el mosto esté en contacto con el aire en numerosas fases de la fermentación (estrujado, prensado y encubado), es preciso que estas operaciones se hagan con la máxima rapidez, y además que se utilice anhídrido sulfuroso (a razón de 200-400 mg/l); este producto actúa también como antioxidante y como inhibidor de las oxidasas naturales del mosto. Una forma de evitar la acción de las oxidasas es la realización de desfangados: clarificaciones artificiales del mosto mediante bentonita, gelatina y posterior decantación o centrifugado previos a la fermentación [240].

3.4.3.- TECNICAS MODERNAS DE VINIFICACION.

En la actualidad se han incorporado modernas tecnologías de vinificación en ciertas bodegas de la Comarca, que incluyen la termovinificación, la vinificación en continuo, y la vinificación con temperatura controlada.

La termovinificación pretende conseguir una mejor extracción de la materia colorante que la vinificación tradicional, separando la maceración y la fermentación, procesos que van unidos en el esquema tradicional. El calentamiento puede aplicarse a uvas enteras o a uvas estrujadas. En el primer caso, el hollejo adquirirá una temperatura elevada sin que el calor penetre hasta el centro de la pulpa; las células del hollejo quedan destruidas por esta cocción y, tras reventar el grano, difunden en el zumo las sustancias que contenía: antocianos, taninos y sustancias aromáticas. Si el calentamiento se aplica a uvas estrujadas, la difusión de sustancias desde los hollejos al zumo es proporcional al aumento de temperatura de la masa. Además del color, la piel cede otros principios que aumentan el extracto seco e intervienen en el sabor, mejorando el volumen gustativo [283]. El calentamiento extrae la casi totalidad de sustancias nitrogenadas solubles [240].

Entre las ventajas que representa este método de vinificación están: la disminución de la oxidación del mosto durante el calentamiento y maceración, con la posibilidad de disminuir las dosis de SO_2 ; la destrucción de oxidasas; mayor eficacia del prensado tras el calentamiento; y aumento de la intensidad colorante de los vinos. Las consecuencias desfavorables son las siguientes: disminución del color de los vinos durante la conservación y destrucción de enzimas pectolíticos y

proteolíticos; esto último explicaría el mayor enturbiamiento de los vinos de vendimias calentadas y obligaría a la adición de enzimas exógenos [283].

A pesar de que podríamos esperar una esterilización parcial de la uva tras este tratamiento, generalmente esto no ocurre; la vendimia fermenta espontáneamente y con una velocidad mayor que en el caso de la tradicional, inclusive a temperaturas muy altas (de 40 y 45°C). Asimismo, la fermentación maloláctica se produce con mayor precocidad que en la vinificación clásica. Este comportamiento de los microorganismos puede deberse a [229]:

- 1- Que la transferencia del calor en un medio mixto líquido-sólido no se hace de manera uniforme, y la esterilización resulta muy difícil de conseguir. A esto debe unirse la facilidad de infección ambiental y por contacto.
- 2- Que se seleccionan las levaduras termófilas.
- 3- Que a través del tratamiento térmico se enriquece el mosto en nitrógeno, ácido fosfórico, y factores de crecimiento.
- 4- Que se destruyen las toxinas y sustancias inhibitorias de los microorganismos.

La vinificación continua nace del intento de racionalizar la elaboración de vinos tintos en grandes volúmenes, y del de organizar bien el trabajo. El carácter temporal de la elaboración del vino plantea problemas de mano de obra y desaconseja inversiones importantes en material. En el caso de la vinificación masiva, aplicada a un solo tipo de vino y a una sola calidad, la vinificación continua es la mejor solución para esos problemas, ya que este sistema consigue una mejora de la calidad [240]. Este tipo de vinificación se basa en la utilización de un gran depósito de metal en el cual se va introduciendo por su parte inferior la vendimia estrujada y se va sacando el vino ya elaborado por la parte superior [240].

Las ventajas de este tipo de vinificación son: económicas, de automatización, centralización, y control de numerosas operaciones. Por otra parte, da lugar a fermentaciones a temperaturas más bajas y constantes que en el caso de las vinificaciones tradicionales: según RIBÉREAU-GAYON *et al.* la diferencia de temperatura entre el sistema continuo y el tradicional sería de 5 a 7°C [283]. Esto se debería a los aportes continuos de mosto fresco, a la mayor conductividad del metal sobre otros materiales empleados para cubas de vinificación, y a la posibilidad de que le sea incorporado al vinificador continuo un sistema de refrigeración. Otra ventaja de la vinificación continua se refiere al aspecto microbiológico: el número de levaduras del mosto en fermentación es bastante más elevado y constante, y dado que la vendimia fresca se introduce en un medio que contiene de 6 a 9° alcohólicos, se suprime el desarrollo de las levaduras más sensibles al alcohol (la mayoría de la microflora resistente es la formada por especies de *Saccharomyces*). También en este tipo de vinificación hay un mayor rendimiento de alcohol a partir de azúcar, explicable por la selección de cepas más resistentes y seguramente más productoras de etanol, y por la minimización de pérdidas al ser un recipiente cerrado. Los productos secundarios de la fermentación están en menor cantidad y la extracción de sustancias de los hollejos es más rápida, produciéndose así vinos de mayor intensidad colorante y algo más astringentes [283].

La vinificación a temperatura controlada es interesante sobre todo en el caso de los vinos blancos, pero también se emplea para vinificación en tinto con el fin de que las temperaturas de fermentación no sobrepasen los 25-30°C. Los sistemas de refrigeración son varios, desde los más sencillos que consisten en rociar las paredes de los tanques de fermentación con una cortina de agua, hasta los más sofisticados que utilizan tanques de acero inoxidable con doble camisa por la que circula agua refrigerada. Las pocas bodegas que poseen instalaciones de frío en la D.O. Utiel-Requena, las

utilizan para la elaboración de vinos rosados y el sistema que emplean es la irrigación de las paredes de los tanques. Las ventajas de este sistema de vinificación son:

1- Control de la actividad microbiana: la fermentación a bajas temperaturas (entre 15-18°C) hace que el aumento de alcohol afecte menos a la viabilidad de las células y, por otra parte refrena la producción de sustancias tóxicas, excretadas por ciertas levaduras cuando se someten a elevadas temperaturas [95]. Las bajas temperaturas impiden que se produzca la fermentación maloláctica.

2- Se pierden menos sustancias volátiles y se evapora menos alcohol [331].

3- Las sustancias tartáricas precipitan mejor y la clarificación es más completa [331].

Las desventajas del sistema radican en su alto costo y en el bajo rendimiento de la refrigeración si se trabaja con volúmenes grandes y en la ausencia de la descomposición biológica de la acidez.

CAPITULO II. Microbiología de las fermentaciones.

1.- INTRODUCCION.

La Enología es una ciencia microbiológica ya que son levaduras las que hacen el vino, son bacterias lácticas las que lo transforman, y son también bacterias las que lo destruyen. Otros microorganismos como los hongos, aunque no intervienen activamente en la elaboración de los vinos, forman parte de la flora epifita de las uvas y pasan al mosto tras el estrujado.

1.1.- ANTECEDENTES HISTORICOS DEL DESCUBRIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS DEL VINO.

A VAN LEEUWENHOEK (1680) se debe el descubrimiento de las levaduras en el mosto de uva y en malta de cerveza durante el proceso de elaboración del vino y la cerveza; sin embargo, no relacionó a estos microorganismos con la fermentación. LAVOISIER aborda el problema de la fermentación desde el punto de vista químico, demostrando en 1789 que durante la fermentación el azúcar es descompuesto en alcohol y anhídrido carbónico. En 1813 GAY-LUSSAC establece la estequiometría de esta reacción. Fue entre 1835 y 1837 cuando tres sabios, un francés (CAIGNARD-LATOURE) y dos alemanes (SCHWAN y KÜTZING), atribuyen el fenómeno fermentativo a los seres microscópicos descubiertos por LEEUWENHOEK. KÜTZING llegó a explicar la fermentación en base a la multiplicación de levaduras, y TURPIN poco después sostendrá que no hay fermentación si éstas no se reproducen. Así nació la teoría

vitalista, que se opondría durante algunos años a la teoría química defendida por químicos de la categoría de WÖHLER, LIEBIG y BERZELIUS. Según este último, la presencia de las levaduras en el medio fermentativo indicaba que éstas actuaban catalizando la fermentación, pero sin participar de forma activa en ella. Fue entonces cuando PASTEUR se entregó al estudio del problema y, a través de una serie de experiencias, demostró en 1858 la naturaleza biológica de la fermentación, afirmando que ésta es un proceso correlativo a la actividad vital de la levadura. También fue PASTEUR uno de los primeros en estudiar las enfermedades del vino, producidas por bacterias. El denominó a estas enfermedades: "acetificación", "vuelta", "grasa" y "amargor" [3]. Sin embargo, PASTEUR no pudo llegar mucho más allá en el intento de descubrir los microorganismos responsables de estas enfermedades, ya que se tropezó con la dificultad de poder lograr cultivos puros [3]. KOCK descubrió en 1881 la técnica de la purificación de los cultivos en medio sólido, llegando a la conclusión, posteriormente, de que las bacterias presentes en el vino eran responsables de la descomposición del ácido málico [229]. KUNZ encontró que el vino contenía ácido láctico, y MÖSLINGER en 1901 interpretó el hecho como que este ácido láctico era el resultado de la descomposición del ácido málico [229]. SEIFERT (1901) creyó aislar el germen responsable de la transformación del ácido málico en ácido láctico, y lo llamó *Micrococcus malolacticus* [229]. Sin embargo MÜLLER-TURGAU y OSTERWALDER en 1913 establecieron que el ácido málico es fermentado por todos los tipos de bacterias lácticas, y por tanto los enólogos no deberían hablar de "la bacteria maloláctica" como si de una especie única se tratase [229].

PASTEUR denominó *Mycoderma aceti* a aquellos microorganismos que transformaban el vino en vinagre, dando lugar a la enfermedad denominada "acetificación" [282]. Estas bacterias han sido menos estudiadas que las bacterias lácticas, y hasta que aparecieron los trabajos de DUPUY en 1952,

1957 y 1959 no se conocía nada sobre el aislamiento, cultivo e identificación de las cepas aisladas de vino. Posteriormente, MAUGENET y DIVIES han realizado estudios sobre la ecología, la fisiología, y el metabolismo de estos microorganismos del vino [282].

1.2.- ECOLOGIA DE LOS MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA UVA Y A LA VINIFICACION.

Sobre los frutos de las vides podemos encontrar una variada flora microbiana que comprende diversas especies de hongos filamentosos, de levaduras y de bacterias. Esta flora epifita sobre las uvas pasa al jugo cuando los frutos se estrujan y prensan. Dado el pH tan bajo que posee el mosto de la uva, sólo un pequeño número de microorganismos es capaz de desarrollarse en él; entre ellos se encuentran levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas [175].

Los hongos filamentosos son importantes en enología por el daño que pueden originar en los granos de uva antes o después de ser vendimiados, y además porque pueden crecer en los depósitos de fermentación o de almacenamiento, confiriendo al vino olor y sabor a moho [229]. Sin embargo, estos microorganismos no intervienen activamente en la elaboración del vino, ya que son rápidamente eliminados durante los primeros momentos de la fermentación debido a los efectos inhibitorios del etanol, del SO_2 [270], y del ambiente anaerobio (los hongos poseen metabolismo aerobio estricto).

A partir de las investigaciones de BENDA y otros autores [31], se desprende que las levaduras que encontramos sobre la superficie de las uvas no son transportadas allí por el viento, sino que son los insectos quienes las diseminan sobre los frutos. Los insectos son atraídos por los aromas

volátiles que se desarrollan durante la maduración de las uvas, se alimentan con el jugo de las mismas e ingieren, a veces, las levaduras presentes sobre su superficie. De hecho, se han aislado levaduras vivas del tracto digestivo de abejas y avispas. Es importante que las levaduras permanezcan vivas durante meses en el intestino de los insectos, ya que cuando éstos defecan en primavera tras su hibernación, las levaduras salen junto con los excrementos, esparciéndose sobre el néctar de las flores y los frutos en maduración. De esta manera se produce una rápida diseminación y multiplicación en la naturaleza. La transferencia de las levaduras de unos frutos a otros durante todo el verano está garantizada por toda clase de insectos; sin embargo la opinión de que las levaduras pueden sobrevivir durante el invierno sobre el suelo carece de base científica [31].

Las levaduras están presentes en las viñas desde el comienzo del envero, alcanzando un máximo poblacional en los frutos en el momento en el cual éstos logran su plena maduración [287]. Las levaduras colonizan los exudados de estomas y heridas en la superficie de los frutos en número variable, que va desde 10^3 a 10^6 células por grano de uva [287]. Las especies de levaduras existentes sobre los frutos son de naturaleza oxidativa como *Rhodotorula*, o débilmente fermentativa como *Hanseniaspora* o *Kloeckera*; *Saccharomyces cerevisiae* se encuentra en muy baja frecuencia. Sin embargo esta última especie parece colonizar el material de bodega [76], junto con *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia fermentans*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Pichia membranaefaciens* [175]. Durante los procesos de bodega, las levaduras de mayor poder fermentativo se desarrollan preferencialmente y colonizan el mosto. En los primeros momentos de la fermentación, aparecen grandes poblaciones de *H. uvarum* o *Kloeckera apiculata*, que rápidamente son sobrepasadas por *Saccharomyces* [282]. Esto se debe a la mayor resistencia de este género al SO_2 y al etanol que se va formando [31]. *Saccharomyces cerevisiae* es la verdadera "levadura del

vino", lleva a cabo la mayor parte de la fermentación, y es la que se encuentra en los estadios finales de la misma.

Las bacterias lácticas se encuentran sobre las hojas [263] y sobre los frutos de las vides [171, 245], aunque en menor cantidad que las bacterias acéticas y que las levaduras [175]. Muchos trabajos han demostrado la presencia de bacterias lácticas sobre los frutos de la vid, así, LAFON-LAFOURCADE [179] las aisló a partir de mostos obtenidos asépticamente a partir de uvas. También SAPISE-DOMERCQ *et al.* [301] detectaron la presencia de bacterias lácticas sobre uvas cuando estudiaban la influencia de los productos fitosanitarios sobre la microflora de la vid. KUNKEE *et al.* [171] informan del desarrollo espontáneo de la fermentación maloláctica en un vino preparado en laboratorio y que no había tenido contacto con el equipo de bodega. Otras experiencias sustentan la hipótesis de que la inoculación de los vinos con bacterias lácticas se produce principalmente en las operaciones de bodega. Así, WEBB e INGRAHAM [341] vinificaron uvas procedentes del mismo origen en dos bodegas diferentes, obteniendo la fermentación maloláctica espontánea tan sólo en una de ellas. Este resultado les lleva a afirmar que las bacterias lácticas no pueden estar sobre las uvas, pues en ese caso se habría obtenido la fermentación maloláctica en ambos casos. Las experiencias de RADLER [263] y de PEYNAUD y DOMERCQ [245] también demuestran la inoculación de mostos y vinos por bacterias lácticas procedentes del material de bodega.

Todas las fuentes de bacterias lácticas que hemos mencionado son importantes. Se sabe que las bacterias lácticas se presentan en bajo número sobre las uvas [72, 344]. Bajo condiciones favorables, especialmente tras la fermentación alcohólica y después de la autólisis de levaduras y de la liberación de nutrientes, las bacterias se multiplican hasta alcanzar un nivel detectable [179]. FLEET *et al.* [115] encontraron, en sus trabajos de microbiología de la elaboración de vinos que en Burdeos la presencia de

bacterias lácticas pasa desapercibida en los primeros momentos de la fermentación alcohólica, pero al cabo de 4 ó 5 días del inicio de la misma, ya eran detectables aunque su número era muy reducido; ésto podría explicar el que RADLER [263] no encontrase bacterias lácticas en mostos frescos, y sí en cambio tras dos semanas de haberse iniciado la fermentación alcohólica. PEYNAUD y DOMERCQ [244] señalaron que la fermentación maloláctica ocurre más frecuentemente en grandes vasijas de fermentación, donde se consiguen mayores niveles de bacterias lácticas viables, que en vasijas más pequeñas. Parece razonable pensar que los tanques de fermentación y almacenamiento retengan bacterias lácticas tras la consecución de la fermentación maloláctica. RIBÉREAU-GAYON y PEYNAUD [281] informaron de la presencia de bacterias malolácticas sobre las paredes y suelos de las bodegas y en los barriles de madera.

En los viñedos la distribución de las bacterias lácticas es irregular. Se observa que la fermentación maloláctica se realiza con más dificultad en vinos de ciertas zonas o regiones, sin que el estudio de la composición del jugo de uva permita explicar estas diferencias [282]. En Suiza MARET y SOZZI encontraron que predominaban los lactobacilos homofermentativos en mostos, los cuales desaparecían rápidamente durante la fermentación alcohólica, dejando paso a los lactobacilos heterofermentativos; sin embargo tras la fermentación la población láctica se componía, principalmente, de *Pediococcus* y de lactobacilos heterofermentativos [211, 212]. MARET et al. encontraron también *Leuconostoc oenos* en todos los vinos del cantón suizo de Valais [213]. En vinos israelíes CHALFAN et al. [79] aislaron las especies *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *L. oenos*, *Leuconostoc dextranicum* y *Streptobacterium* sp. En Australia PAN et al. [235] aislaron *L. plantarum* y *L. oenos* en mostos y al final de la fermentación alcohólica. Durante la fermentación maloláctica estos autores encontraron que las especies más numerosas eran *Pediococcus pentosaceus* y

Pediococcus cerevisiae, y eran éstas las responsables de la fermentación maloláctica. Estas observaciones se vieron corroboradas unos años más tarde por COSTELLO *et al.* [72]. Sin embargo, la mayoría de autores consideran responsable de la fermentación maloláctica a *L. oenos* [62, 99, 120, 276], aunque en vinos alemanes, al igual que en los australianos, parece ser que es *P. cerevisiae* quien conduce la fermentación maloláctica [31]. Esta diversidad puede estar causada por características específicas del vino: pH, composición, clima y modo de vinificación y de conservación, etc., aunque también puede ser resultado del método de aislamiento [344].

Como ya hemos comentado en el Apartado anterior, las bacterias acéticas han sido objeto de un pequeño número de publicaciones. Esta falta de interés puede explicarse por el hecho de que estos organismos, aerobios estrictos, sólo se desarrollan en la superficie del vino en contacto con el aire, y es suficiente evitar la penetración del aire en los depósitos para prevenir su alteración [282]. Por otro lado, la aplicación de nuevas técnicas de análisis ha facilitado el aislamiento selectivo de las bacterias del ácido acético [183]. LAFON-LAFOURCADE y JOYEUX [184] estudiaron la evolución de estas bacterias, en número y especie, desde la uva hasta el vino. Los resultados mostraron que las bacterias acéticas están siempre presentes a lo largo de la elaboración del vino; su crecimiento y metabolismo requiere sólo una pequeña cantidad de oxígeno.

En algunos casos las bacterias acéticas se han encontrado en concentración de 10^2 células por mililitro en mosto. Al comienzo de la vendimia, éstas eran algo más numerosas sobre uvas infectadas con *Botrytis cinerea* [184]. Sin embargo, al final de la vendimia la población acética sobre uvas infectadas era muy superior al de las sanas, alcanzando 10^4 - 10^6 células por mililitro de mosto de uvas estropeadas. JOYEUX [191] afirma que la cantidad de bacterias acéticas encontradas sobre uvas era directamente proporcional al grado de infección de las mismas.

Las bacterias acéticas pertenecen a dos géneros: *Gluconobacter* y *Acetobacter* [190]. A las especies del primer género se las encuentra sobre todo en las uvas, a las segundas en el vino; esto se puede explicar por su afinidad respectiva por la glucosa y por el etanol [190]. El trabajo de LAFON-LAFOURCADE y JOYEUX [184] muestra que *Gluconobacter* infecta, casi exclusivamente, uvas tintas sanas. *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianum* aparecen junto con *Gluconobacter* si las uvas están algo alteradas, y constituyen el 45-85% de la población si la alteración es completa. En este caso, las bacterias acéticas pueden encontrarse en número equivalente o superior al de las levaduras [175]. En el curso de la fermentación alcohólica, la población de bacterias acéticas disminuye en gran escala, aunque menos rápidamente de lo que se podría suponer [190]. *Gluconobacter oxidans* sobrevive en baja proporción durante la fermentación alcohólica, y su desaparición virtual está relacionada con su intolerancia al etanol [157]. Esta especie puede contaminar el vino almacenado cuando los barriles se rellenan para compensar la evaporación, pero no sobrevive durante mucho tiempo. *Acetobacter aceti* es la especie más representativa sobre las uvas atacadas por *Botrytis cinerea*; posiblemente su presencia en uvas infectadas se ve facilitada por la producción de etanol por las levaduras que se multiplican sobre las grietas de las pieles dañadas. Esta especie puede sobrevivir durante el almacenamiento del vino en barriles de madera, ya que la cantidad de oxígeno que penetra a través de sus paredes es suficiente para evitar la completa destrucción de la población [157]. Esta población residual puede desarrollarse si el vino se airea mediante alguna manipulación, produciendo ácido acético en cantidades tales que estropeen la calidad del vino. Para que este crecimiento tenga lugar en el vino, sólo hace falta un contacto de 2 ó 3 minutos con el aire [191]. El crecimiento de bacterias acéticas en el mosto provoca una parada precoz de la fermentación alcohólica, debido a la inhibición de las levaduras, y una

estimulación de la fermentación maloláctica [158].

1.3.- LAS LEVADURAS.

Las levaduras no constituyen un taxón definido, están incluidas dentro del reino *Fungi*, que comprende microorganismos eucariotas, con pared celular, quimioorganotrofos, y aerobios o anaerobios facultativos. Las levaduras se distinguen del resto de los hongos porque, usualmente, se presentan en forma unicelular, aunque algunas especies pueden formar estructuras filamentosas como pseudomicelio o micelio verdadero. Las levaduras se incluyen dentro de los Ascomicetos (hongos capaces de producir esporas sexuales dentro de estructuras denominadas "ascas"), de los Basidiomicetos (levaduras capaces de producir estructuras denominadas "basidios"), y de los Deuteromicetos (hongos imperfectos: levaduras incapaces de producir ascosporas sexuales pero en ocasiones forman ballistosporas).

1.3.1.- FORMAS DE REPRODUCCION EN LEVADURAS.

Las levaduras pueden reproducirse de forma asexual (mediante gemación, división binaria, o esporas asexuales), y de forma sexual. En el caso de la reproducción asexual por gemación, el núcleo de la célula madre duplica su material genético, y éste se dirige hacia la periferia de la célula; allí se produce la mitosis y el material nuclear duplicado se introduce en una yema que surge de la superficie. La yema queda unida a la célula madre hasta que alcanza un tamaño semejante; entonces se produce una

estrangulación de la zona de contacto entre la célula madre y la hija, y éstas se separan. Seguidamente ambas células podrán gemar a su vez. A veces la célula hija, en lugar de separarse queda unida a la célula madre, dando lugar a cadenas o grupos de células que constituyen el denominado "pseudomicelio". La formación de las yemas puede llevarse a cabo siempre por el mismo lugar de la superficie (gemación monopolar), por los dos extremos de una célula (gemación bipolar), o por cualquier punto de su superficie (gemación multipolar). Las levaduras que se reproducen asexualmente por división binaria (de forma semejante a como lo hacen las bacterias), tras la mitosis y síntesis de componentes citoplasmáticos se alargan, y en su zona ecuatorial se forma un tabique transversal que separa la primitiva célula madre en dos células hijas idénticas entre sí.

En algunas ocasiones ciertas levaduras se reproducen sexualmente. En Ascomicetos, dependiendo de las especies, la fase sexual se sitúa en distintos momentos del ciclo vital, el cual puede ser de tres tipos:

1.- Ciclo diplofásico. En este caso las células vegetativas diploides cesan de gemar y se transforman en ascas en donde se originan, mediante meiosis, cuatro ascosporas haploides. Estas ascosporas se fecundarán entre sí para dar un cigoto diploide, el cual se multiplicará por gemación. Las células que siguen este tipo de ciclo vital pasan la mayor parte del mismo en forma diploide. La mayoría de las cepas de *Saccharomyces* siguen este ciclo.

2.- Ciclo haplofásico. Dos células vegetativas haploides se conjugan y el cigoto formado sufre rápidamente la meiosis y se transforma en asca, en la cual se producen ascosporas haploides que al germinar dan células vegetativas haploides. En este caso, la mayor parte del ciclo vital de estas células se realiza bajo forma haploide. Este tipo de ciclo es típico de *Zygosaccharomyces*.

3.- Ciclo haplodifásico. Aquí las ascosporas haploides dan lugar, al germinar, a células vegetativas haploides. Estas células vegetativas son capaces de fecundarse entre sí, dando lugar a un cigoto diploide que por gemación producirá células vegetativas diploides. Algunas de estas células sufren la meiosis, transformándose en un asca que contendrá cuatro ascosporas haploides. Este ciclo es típico de *Hansenula polymorpha*.

La formación de ascosporas se produce cuando el medio sobre el que se desarrollan las levaduras se vuelve desfavorable por agotamiento de nutrientes, desecación, etc. No todas las células de un cultivo esporulan, incluso en los casos más favorables para la esporulación sólo una pequeña proporción de células se transforma en ascas. Una vez que la espora encuentra condiciones favorables de crecimiento germina, liberándose del asca y dando una célula vegetativa.

Los Basidiomicetos también presentan ciclos de vida en los cuales hay una fase sexual. Esta fase sexual se inicia con la formación de un micelio dicariótico a partir de la conjugación de hifas haploides. En ciertas ocasiones los dos núcleos de la fase dicariótica pueden fusionarse, dando lugar a un cigoto que se transformará en una teliospora o un basidio. Estas estructuras sexuales sufrirán posteriormente una meiosis dando lugar a hifas haploides que reiniciarán de nuevo el ciclo.

1.3.2.- LEVADURAS ASOCIADAS AL PROCESO DE FERMENTACION.

Entre las levaduras más importantes en el proceso fermentativo hemos de destacar a *Saccharomyces cerevisiae*, ya que es la única levadura capaz de fermentar el mosto hasta agotar totalmente el azúcar, dando lugar además a productos secundarios deseables. Es la especie que con más frecuencia se

ha hallado en mostos en fermentación y en vinos ya terminados [282]. Ciertas variedades de esta especie (p.e. *Saccharomyces bayanus*) son capaces de dar lugar a altas concentraciones de etanol; se aconseja su inoculación para eliminar el azúcar residual de fermentaciones inacabadas [282], y para fermentar mostos de uvas sobremaduras [283]. Otras levaduras pertenecientes también a *S. cerevisiae*, y capaces de desarrollarse sobre la superficie del vino, son importantes para la consecución de vinos tipo Jerez; sus características más sobresalientes son que liberan gran cantidad de acetaldehído y ésteres, y que degradan ácido acético. *Torulaspóra delbrueckii* también es una levadura interesante en enología, ya que produce cantidades mucho menores de ácido acético que *S. cerevisiae*. Si además en fermentaciones secuenciales, se siembra en primer lugar *T. delbrueckii* da lugar a condiciones que hacen disminuir la tasa de fermentación gliceropirúvica de *S. cerevisiae* [175]. Durante los primeros estadios de la fermentación encontramos las denominadas levaduras "apiculadas" tales como especies de los géneros *Hanseniaspora* y *Kloeckera*; estas especies producen poco alcohol (del 3 al 4% en volumen [240]), y son muy sensibles al mismo y al SO_2 , por lo que su contribución a la fermentación es muy pequeña. Sin embargo hay autores que piensan que son responsables de la producción de aromas afrutados en los vinos [31, 175, 282]. También encontramos al inicio de la fermentación *M. pulcherrima* (o su estado imperfecto *Candida pulcherrima*), *Candida stellata*, *Hansenula anomala* y especies del género *Pichia*. Todas ellas, en general, desaparecen tras la adición de SO_2 y después que el mosto ha alcanzado los 4 ó 5° alcohólicos, dejando paso a *Saccharomyces*.

Las levaduras pueden ocasionar también enfermedades en el vino. PEYNAUD y DOMERCQ [243] han establecido que la misma levadura puede ser deseable o indeseable bajo diferentes condiciones; así por ejemplo *Saccharomyces oviformis* es deseable para fermentar vinos con alto contenido

en azúcar, pero es perjudicial cuando da lugar a refermentaciones una vez embotellado el vino [270]. Otras especies son indeseables cualquiera que sea el momento en que aparezcan, por ejemplo las especies del género *Brettanomyces* [5, 270], *Saccharomyces ludwigii* [175, 270], *Zygosaccharomyces bailii* [175], *Candida vini* [240], o especies de *Pichia* [240]; las pertenecientes a este último género son levaduras contaminantes de bodega que se desarrollan sobre la superficie de los vinos. El carácter perjudicial de estas levaduras se debe a que producen productos secundarios que disminuyen la calidad del vino.

1.3.3.- METABOLISMO DE LAS LEVADURAS.

El metabolismo de las levaduras es muy variado, hay levaduras totalmente aerobias que obtienen su energía por respiración de compuestos de carbono mientras que otras pueden ser oxidativas o fermentativas dependiendo de las condiciones ambientales en las que se hallen. La capacidad de utilizar compuestos de carbono y de nitrógeno varía de especie en especie, y constituye una de las bases de clasificación de las levaduras, como veremos posteriormente. Por otra parte, las levaduras se diferencian por sus características fisiológicas y por los productos secundarios a los que dan lugar durante la fermentación alcohólica [4].

Hay levaduras que pueden utilizar ciertos azúcares por vía oxidativa o por vía fermentativa. La fermentación de la glucosa constituye en las levaduras un proceso anaeróbico; sin embargo, éstas son capaces de respirar obteniendo de esta forma más energía. En condiciones aeróbicas la fermentación disminuye en beneficio de la respiración. En algunas levaduras puede reprimirse totalmente la fermentación al airear intensamente el cultivo. Esta inhibición de la fermentación alcohólica por la presencia de

oxígeno se denomina "efecto PASTEUR" [305]. Por el contrario, puede inhibirse la síntesis de citocromos por una alta concentración de azúcares en los mostos, con lo cual se paraliza la respiración; a este fenómeno, inverso del anterior, se le conoce como "efecto CRABTREE" [175]. La predominancia del proceso oxidativo sobre el fermentativo o viceversa, se explica desde el punto de vista energético: en condiciones anaeróbicas sólo se forman 2 moles de ATP por mol de glucosa, mientras que en condiciones aeróbicas se forman 36 moles de ATP y 2 moles de GTP por mol de glucosa [305]. La célula se ajusta a la efectividad en la producción de energía mediante una regulación en la transformación del sustrato.

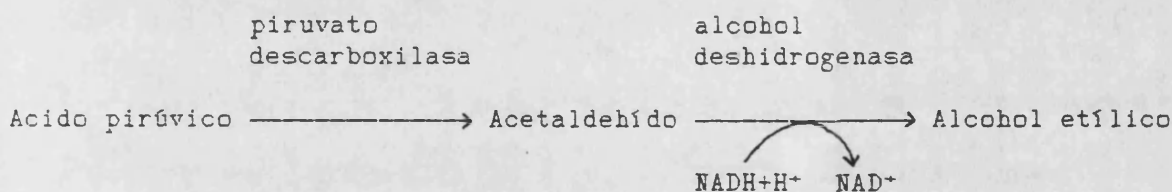
Podemos diferenciar dos etapas en el comportamiento metabólico de las levaduras durante la fermentación: una primera en la que las levaduras se multiplican activamente utilizando la vía oxidativa, hasta alcanzar en poco tiempo un número elevado, y una segunda en la que por agotamiento del oxígeno emplean la vía fermentativa menos rentable energéticamente. Esta última vía es la que produce etanol a partir de glucosa. Las levaduras para multiplicarse de forma rápida necesitan oxígeno; generalmente, las operaciones de bodega tales como el estrujado, despalillado, bombeo, escurrido y prensado, aseguran una aireación que permite el rápido crecimiento de las células a expensas de la glucosa. Esta glucosa mediante glucólisis y posteriormente por ciclo de Krebs se transforma en CO_2 y H_2O . El agotamiento progresivo del oxígeno disuelto en el medio, va haciendo que las condiciones sean cada vez más anaerobias y que el metabolismo de las levaduras pase a ser mayoritariamente fermentativo. Tras la glucólisis, el piruvato ya no se dirige al ciclo de Krebs, bloqueado por la acumulación de $\text{NADH}+\text{H}^+$ a falta de aceptor final de la cadena de electrones (el oxígeno), sino que se reduce transformándose en etanol y oxidando al $\text{NADH}+\text{H}^+$. Existe una relación directa entre el número de levaduras y la tasa de fermentación de azúcares; una buena aireación inicial de los mostos permite alcanzar un

número elevado de células, que fermentarán rápidamente los azúcares hasta su agotamiento completo [282].

Los azúcares utilizables por levaduras son captados del medio e introducidos en el citoplasma celular. Una vez allí estos compuestos se transforman, mediante una serie de reacciones que constituyen la glucólisis, en ácido pirúvico. La glucólisis se produce tanto en condiciones aerobias como anaerobias. El conjunto de reacciones de la glucólisis está descrito en la Figura 1.

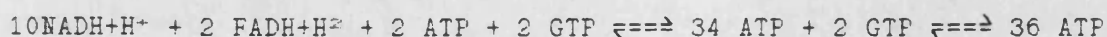
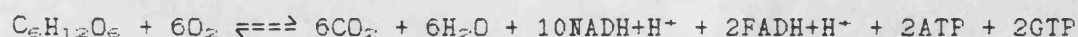
Una vez obtenido el ácido pirúvico, éste puede transformarse por dos vías principales según las condiciones aerobias o anaerobias del medio. Si existe oxígeno, el ácido pirúvico se descarboxila a acetil coenzima A y entra en el ciclo de KREBS dando lugar a CO_2 y H_2O (Figura 2).

En anaerobiosis, el ácido pirúvico se descarboxila hasta acetaldehído, y posteriormente éste se reduce a partir de $\text{NADH}+\text{H}^+$, dando etanol.



El balance global de la degradación de glucosa según las dos vías es el siguiente:

a) Vía oxidativa.



FRUCTOSA
GALACTOSA
MANOSA
PENTOSAS

fosforilación

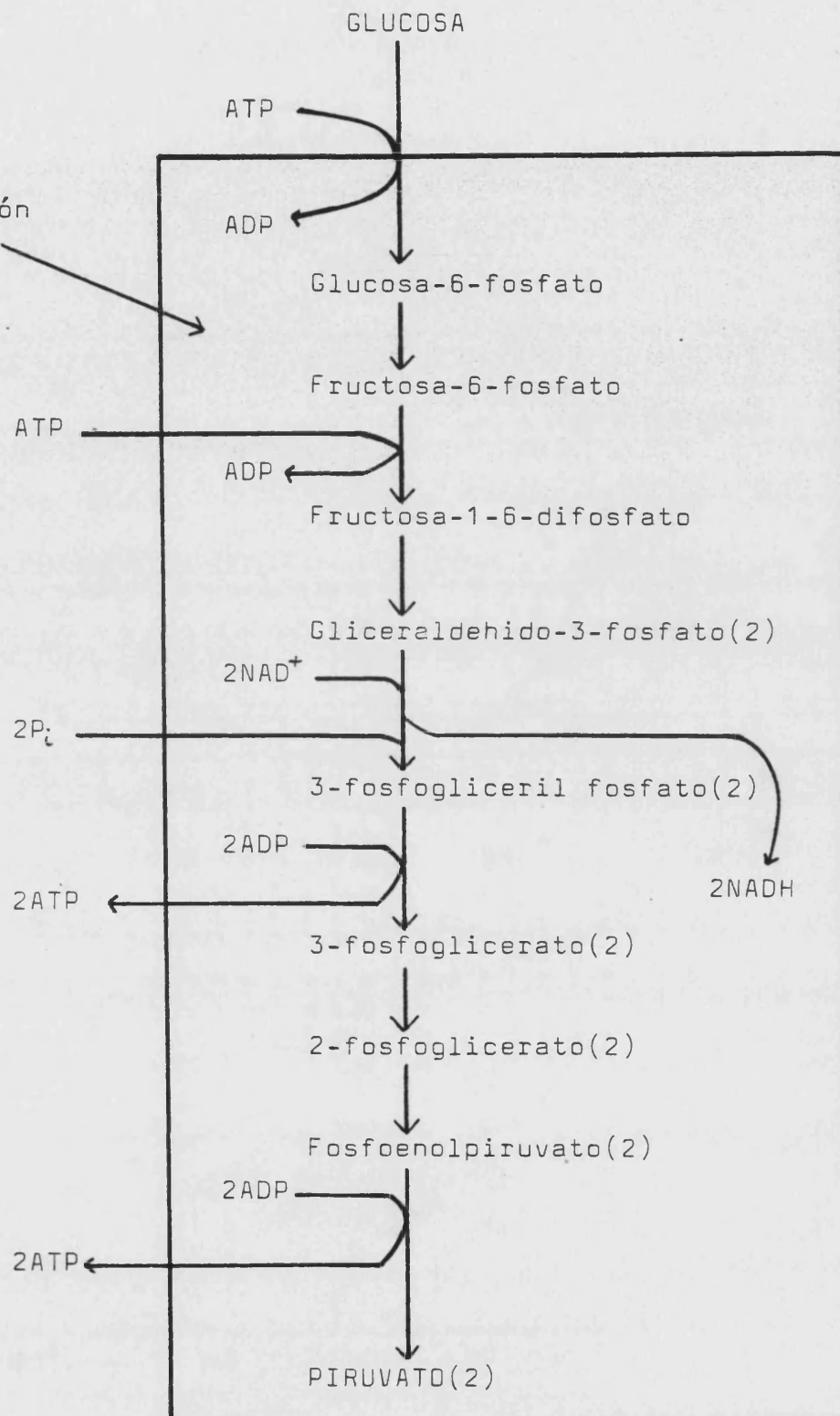


Figura 1- Vía de degradación de los azúcares mediante glucolisis.
(LEHNINGER, 1978, (197))

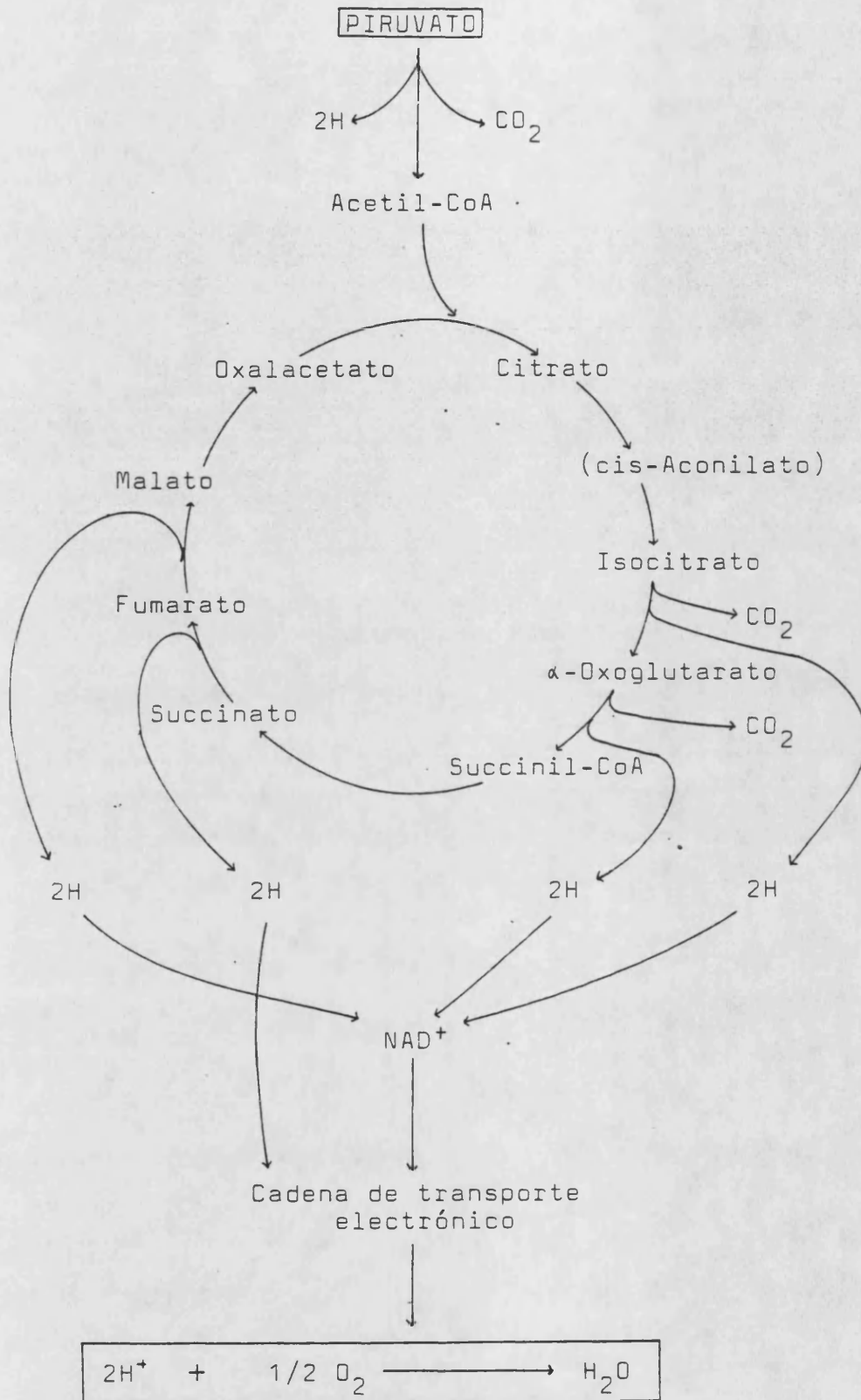
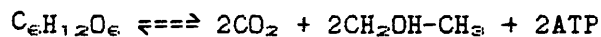


Figura 2- Degradaci3n del 3cido pir3vico originado en la glicolisis mediante el ciclo de Krebs, en condiciones aerobias. (LEHNINGER, 1978, (197))

b) Vía fermentativa.

1.3.3.1.- LA FERMENTACION GLICEROPIRUVICA Y LOS PRODUCTOS SECUNDARIOS.

No todas las moléculas de glucosa de un mosto son degradadas según las dos vías descritas anteriormente; un cierto número de ellas son transformadas vía fermentación gliceropirúvica, que rinde como productos finales glicerina y ácido pirúvico. La fermentación y la respiración de la glucosa utilizan distintos mecanismos de reoxidación del $NADH+H^+$ producido en la glucolisis; en el caso de la fermentación alcohólica el $NADH+H^+$ reduce al acetaldehído y, de esta forma, se recupera NAD^+ . Pero al comienzo del fenómeno fermentativo el acetaldehído no existe en el medio, ya que éste se forma precisamente a la salida de la glucolisis (Figura 3).

Existe así un periodo de inducción, durante el cual la reoxidación del $NADH+H^+$ se hace a expensas de una molécula de fosfohidroxiacetona (resultante de la ruptura de la fructosa 1,6 difosfato en las dos triosas fosfato); la reducción de este compuesto lleva a la formación de glicerina. Simultáneamente, el ácido 3 fosfoglicérico, que proviene del 3 fosfogliceraldehído, se transforma por reducción en ácido pirúvico. Este se descarboxila convirtiéndose en acetaldehído. Pero el acetaldehído no puede ser reducido a etanol porque el $NADH+H^+$ que necesita ya ha sido empleado en la formación de glicerina a partir de la fosfohidroxiacetona. De esta forma, cada vez que se produce una molécula de glicerina se acumula una de acetaldehído. Con ello se logrará que se acumule a su vez una molécula de ácido pirúvico, que es el origen de numerosos productos secundarios.

La comparación de los esquemas de fermentaciones alcohólica y gliceropirúvica demuestra la competencia entre los dos aceptores de

Glucosa o fructosa

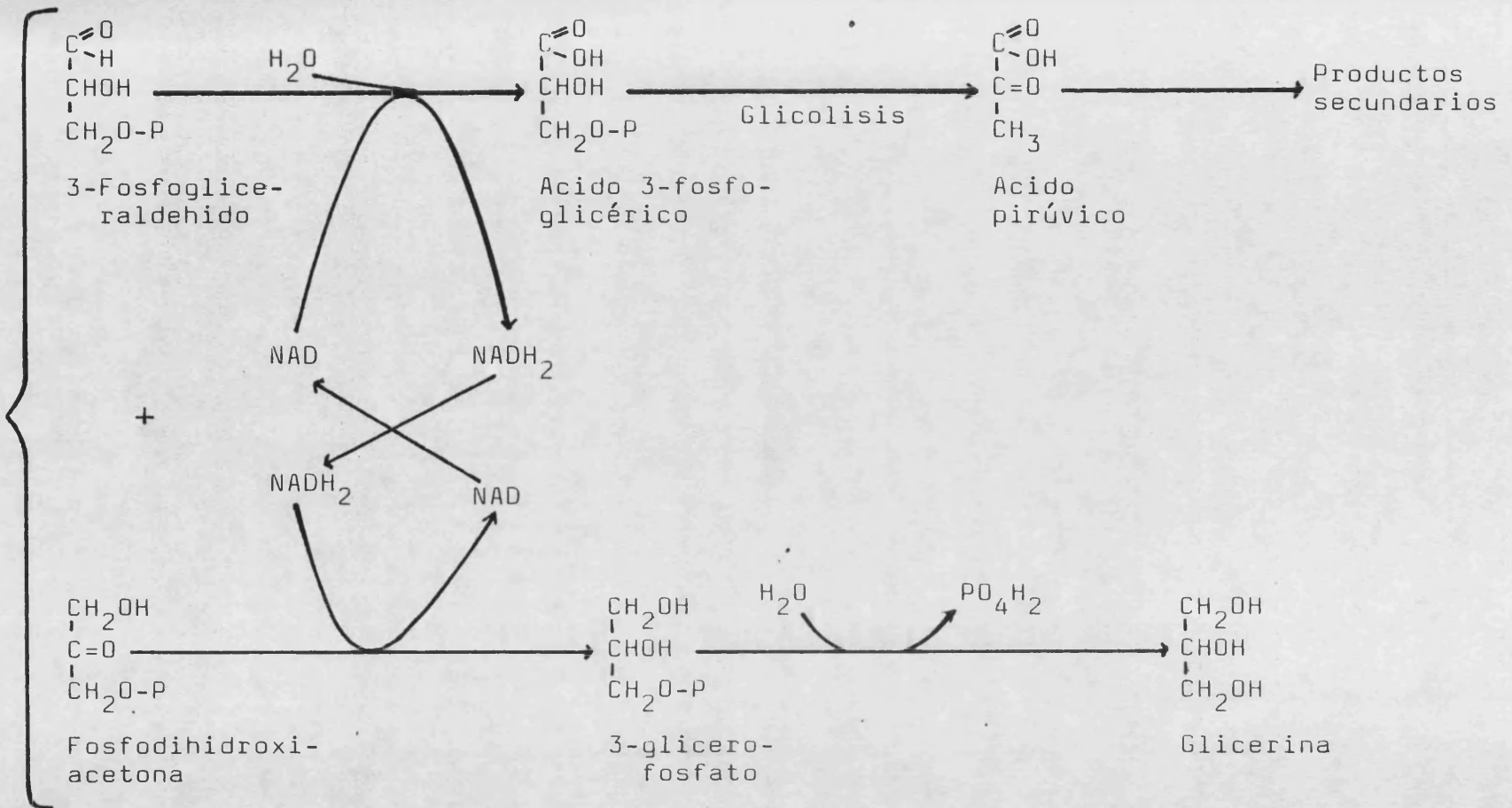


Figura 3- Fermentación gliceropirúvica. (OREGLIA, 1978, (229))

protones: el acetaldehído por una parte y la fosfohidroxiacetona por otra. El primero es más fácil de reducir, y por ello es el que oxida preferentemente al $\text{NADH}+\text{H}^+$ cuando ambos compuestos están en concentraciones similares. Los mecanismos de la fermentación alcohólica y gliceropirúvica están íntimamente ligados: la fermentación gliceropirúvica (y por consiguiente la producción de glicerina), como ya antes hemos explicado, predomina al principio de la fermentación; pero ni siquiera en el periodo de plena fermentación alcohólica se tiene una fermentación alcohólica pura. El porcentaje de conversión de la glucosa del mosto es del 92% por fermentación alcohólica y 8% por fermentación gliceropirúvica.

El ácido pirúvico procedente de la fermentación gliceropirúvica da origen a diferentes productos secundarios, según mecanismos comunes a muchos tipos de fermentación (Figura 4).

En resumen, los productos secundarios más importantes a partir del pirúvico son: ácido acético, ácido fórmico, ácido butírico, ácido láctico, acetoína, 2,3 butanodiol (y éste por oxidación diacetilo), ácido oxalacético, ácido málico, ácido fumárico, ácido propiónico, ácido succínico y acetona.

En 1936, GENEVOIS [175] trató de establecer una ecuación que explicase en qué proporciones se producían estos productos secundarios a partir de la glucosa. La ecuación puede representarse como sigue [175]:

$$2a + 5s + 2m + b + h = g$$

donde (a) es la cantidad de ácido acético, (s) la de succínico, (m) la de acetoína, (b) el 2,3 butanodiol, (h) el acetaldehído y (g) el glicerol.

La cantidad de productos secundarios formados varía sin embargo según la naturaleza de la levadura, la composición del mosto, la conducción de la fermentación, la temperatura, el pH y la aireación [104, 269, 282]. El

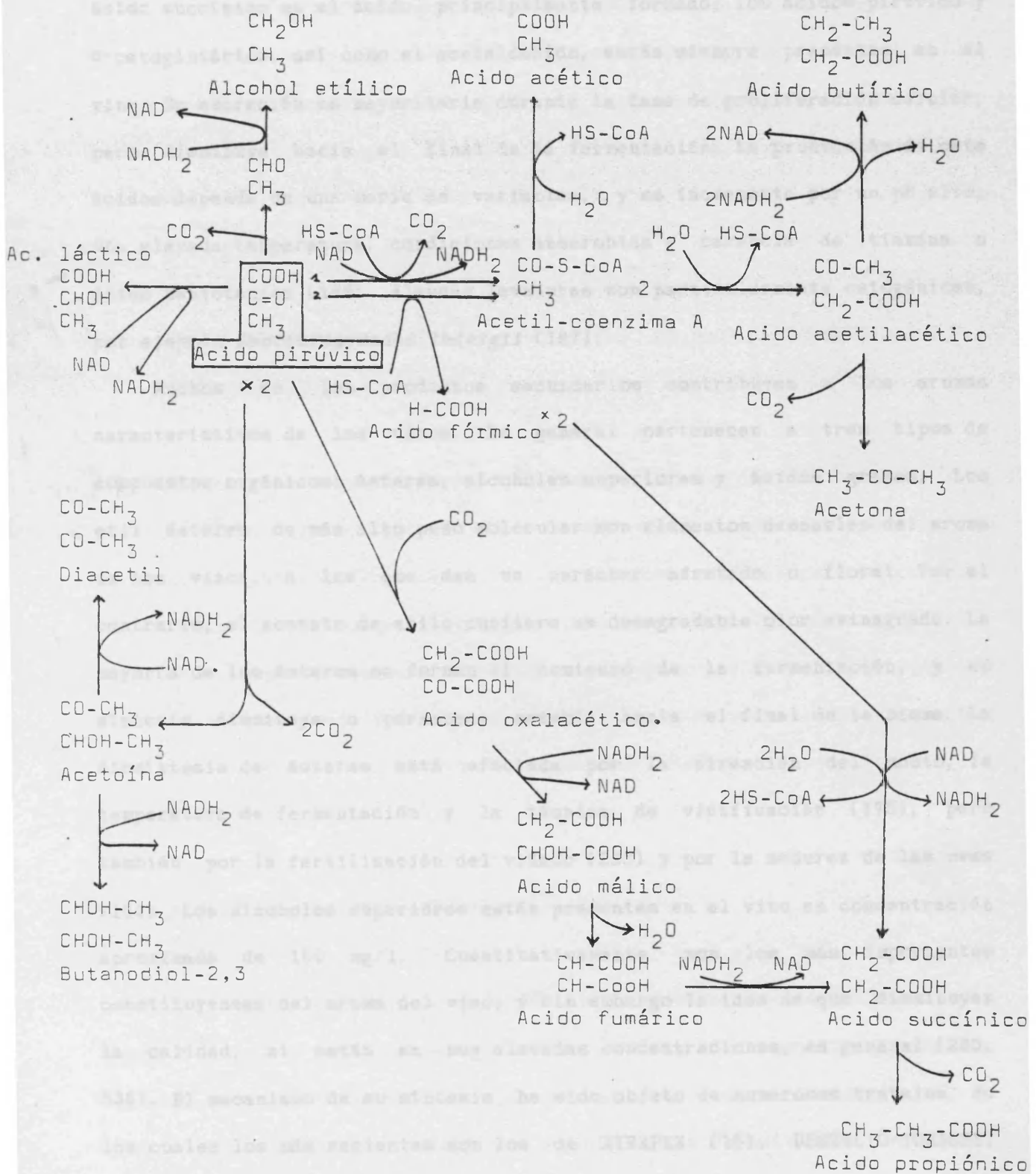


Figura 4- Formación de productos secundarios a partir del ácido pirúvico originado por la fermentación gliceropirúvica. (OREGLIA, 1978, (229))

ácido succínico es el ácido principalmente formado; los ácidos pirúvico y α -cetoglutárico, así como el acetaldehído, están siempre presentes en el vino. Su excreción es mayoritaria durante la fase de proliferación celular, pero disminuye hacia el final de la fermentación. La producción de ceto ácidos depende de una serie de variables, y se incrementa por un pH alto, una elevada temperatura, condiciones anaerobias y carencia de tiamina o ácido pantoténico [186]. Algunas levaduras son particularmente cetogénicas, por ejemplo *Saccharomyces ludwigii* [187].

Muchos de los productos secundarios contribuyen a los aromas característicos de los vinos. En general pertenecen a tres tipos de compuestos orgánicos: ésteres, alcoholes superiores y ácidos grasos. Los etil ésteres de más alto peso molecular son elementos deseables del aroma de los vinos, a los que dan un carácter afrutado o floral. Por el contrario, el acetato de etilo confiere un desagradable olor avinagrado. La mayoría de los ésteres se forman al comienzo de la fermentación, y su síntesis disminuye o permanece estable hacia el final de la misma. La biosíntesis de ésteres está afectada por la aireación del mosto, la temperatura de fermentación y la técnica de vinificación [175], pero también por la fertilización del viñedo [233] y por la madurez de las uvas [150]. Los alcoholes superiores están presentes en el vino en concentración aproximada de 100 mg/l. Cuantitativamente son los más importantes constituyentes del aroma del vino, y sin embargo la idea de que disminuyen la calidad, si están en muy elevadas concentraciones, es general [283, 338]. El mecanismo de su síntesis ha sido objeto de numerosos trabajos, de los cuales los más recientes son los de AYRAPAA [15], USSEGLIO-TOMASSET [333] y WEBB [340]. Es durante la fase de crecimiento exponencial de las levaduras cuando se lleva a cabo su síntesis [345]. La concentración relativa de los distintos tipos depende de la fuente de nitrógeno del medio y de la especie o cepa de levadura [272, 315, 322, 342]. Los ácidos grasos

de 4 a 6 átomos de carbono también afectan al aroma del vino, a pesar de la baja concentración en que se hallan [339], así como los de 6, 8 y 10 átomos de carbono, aunque éstos están presentes en mayores concentraciones [105]. La formación de ácidos grasos depende en gran medida de las especies de levadura [332].

1.3.4.- FACTORES QUE AFECTAN A LA VIABILIDAD DE LAS LEVADURAS Y A LA FERMENTACION.

Los factores que afectan el desarrollo de las levaduras, y su crecimiento o multiplicación, son los mismos que influyen en la fermentación. Sólo se produce la transformación del azúcar en alcohol cuando las levaduras se desarrollan bien. Como todos los seres vivos, las levaduras tienen necesidades precisas en lo que se refiere a su nutrición y al medio en que viven. En este Apartado vamos a estudiar los factores más importantes que afectan al crecimiento de las levaduras y, por tanto, a la fermentación.

1.3.4.1.- INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.

La temperatura mínima para la actividad vital de las levaduras está entre 4 y 7°C, y la máxima a 40-42°C [229]. La temperatura óptima de fermentación para la mayoría de las levaduras del vino está entre 22°C y 27°C, según SCHONDERL [104]. La rapidez de la fermentación, como la de cualquier proceso bioquímico, aumenta con la temperatura: cada 10°C la velocidad de la misma se duplica; sin embargo por encima de los 30°C, si bien al principio la fermentación es rápida, ésta puede llegar a detenerse debido a una especie de "agotamiento" de las levaduras [240].

Cuanto más elevada es la temperatura, más rápido es el comienzo de la fermentación, pero ésta se detiene antes y el grado alcohólico es menor; esto se debe a que la población máxima de levaduras que se alcanza es menor a temperaturas más altas [31]. Por ello, cuando se quiere alcanzar un grado alcohólico elevado es necesario mantener una temperatura de fermentación bastante baja [240]. NAVARRO y DURAND [175] han determinado la biomasa formada bajo idénticas condiciones de fermentación pero con diferentes temperaturas: 3 g/l a 10°C, 2.6 g/l a 20°C, y 2.1 g/l a 30°C. Los autores relacionan este fenómeno con la acumulación de etanol en las células [59, 154]. Además, la concentración de esteroides en las células disminuye conforme aumenta la temperatura; este hecho puede explicar también la detención prematura del crecimiento celular a temperaturas superiores a 35°C [194]. La temperatura afecta también a la producción de compuestos volátiles [162, 260, 319]. Sin embargo, la temperatura tiene otros efectos en el vino distintos del efecto directo sobre la actividad y el crecimiento de las levaduras: se produce una pérdida de alcohol y componentes aromáticos a temperaturas altas, hay pérdidas en la eficiencia de fermentación [31].

1.3.4.2.- INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE AZUCARES.

Glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa son los sustratos normales para las levaduras del vino; sin embargo las pentosas, que están generalmente en una concentración de 1 g/l, no pueden ser fermentadas por ellas, así como tampoco la dextrina o el almidón [3]. Aunque la mayoría de las levaduras fermentan la glucosa más rápidamente que la fructosa, hay especies que son fructofílicas y atacan preferencialmente la fructosa. Según COOTTSCHALK, la razón de este comportamiento es que la pared celular de estas levaduras es más permeable a la fructosa [145]. Una concentración del 25% de azúcar en

un mosto retarda la fermentación, y a concentraciones superiores (70%) las levaduras del vino son incapaces de fermentar [3]. El efecto que elevadas concentraciones de azúcar tienen sobre las levaduras del vino ha sido ampliamente estudiado por NISHINO *et al.* [226]. Estos autores han llegado a la conclusión de que concentraciones crecientes de azúcar en el medio dan lugar a un incremento en la fase de latencia, a una mayor tasa de muerte en el periodo, a una disminución del número máximo de células viables, a un enlentecimiento de la fermentación, y a un aumento de azúcares residuales en el medio. Estos autores también observaron que a mayor presión osmótica el volumen de las células disminuía. A determinadas presiones osmóticas se puede producir la plasmolisis de las células. En el mosto los principales responsables de la presión osmótica son los azúcares. En mostos de elevado contenido en azúcares se obtiene menor producción de alcohol y más acidez volátil [3, 229].

1.3.4.3.- INFLUENCIA DEL ETANOL.

El etanol producido por la fermentación de los azúcares es el principal inhibidor del crecimiento y de la fermentación. Su acumulación máxima en las células precede a la detención del crecimiento de las levaduras [175]. El etanol disminuye la tasa de fermentación, ya que afecta a la actividad de los enzimas implicados en la misma, por otro lado disminuye la tasa de crecimiento [59], aumenta la duración de la fase de latencia y reduce la población máxima de células [175]. Por otro lado la viabilidad de las células disminuye conforme aumenta la concentración de etanol en el medio. A pesar de que algunos autores han mostrado que el efecto del etanol producido por las levaduras inhibe en mayor medida que el añadido exógenamente, a causa de que se acumula en el interior de las células [59, 228], LOUREIRO y VAN UDEN [208] y CASEY e INGLEDEW [59] han

demostrado que la cantidad de etanol acumulado es muy inferior a la que los otros autores afirman, y por tanto ésta no sería la causa del mayor efecto inhibitor del etanol generado por levaduras.

La temperatura también tiene un efecto sinérgico con el etanol, de manera que a una determinada concentración del mismo el aumento de temperatura provoca un incremento de la tasa de muerte térmica [208, 209].

Los alcoholes superiores también ejercen una inhibición [59], que es tanto mayor cuanto mayor es el número de átomos de carbono en la molécula [282]. Los ácidos grasos de 6 a 10 átomos de carbono y sus ésteres tienen un efecto sinérgico con el etanol, produciendo una disminución en la viabilidad de las células de levadura [175].

1.3.4.4.- INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES ANAERÓBICAS Y DEL CO₂.

El oxígeno tiene una influencia fundamental sobre el crecimiento y la multiplicación de las levaduras, ya que es éste el que le permita utilizar los azúcares oxidativamente y, de esta manera, obtener mayor rendimiento energético para su crecimiento. Sin embargo, y como ya hemos visto anteriormente, el O₂ inhibe la fermentación (efecto PASTEUR).

El anhídrido carbónico no tiene influencia sobre la actividad de las levaduras si a medida que se produce, durante la fermentación, se va desprendiendo [229]. Sin embargo, elevadas presiones de CO₂ en el mosto inhiben el crecimiento de las levaduras: a 7.2 atmósferas de presión de CO₂ a 15°C el crecimiento celular cesa [169]; si embargo, la fermentación de los azúcares puede llevarse a cabo hasta con una presión de 14 atmósferas; alrededor de 30 atmósferas la célula muere. A elevadas presiones de CO₂ hay mayor producción de ácidos volátiles. La inhibición del crecimiento debido a elevadas presiones de CO₂ se ve potenciada por el etanol y por los pHs bajos [169].

1.3.4.5.- INFLUENCIA DE LOS TANINOS.

La influencia de los taninos es una cuestión controvertida. SINGHTON y ESAN [315] concluyeron que los fenoles naturales de las uvas y vinos, que incluyen los taninos, son inhibidores de levaduras y bacterias. Sin embargo, el efecto inhibitorio es de tan bajo orden que raramente tiene importancia práctica, y cuando lo tiene es sólo en los casos de combinaciones con otros factores inhibidores. Hay incluso evidencias de efectos que van desde la estimulación a la inhibición de levaduras por diferentes fenoles específicos. La adsorción de taninos a la superficie celular es una causa de inhibición [3].

1.3.4.6.- INFLUENCIA DEL pH.

El pH de los mostos varía de 3.0 a 3.9. El valor de pH característico de un vino depende del contenido en ácidos, principalmente málico y tartárico, que presente. A nivel microbiológico es un factor selectivo: sólo un pequeño número de microorganismos puede desarrollarse a estos pHs tan bajos. Las levaduras son capaces de crecer en un amplio rango de pHs, que va desde 3 a 6. A pHs inferiores a 2.8, el crecimiento de levaduras ya presenta dificultades. El inicio de la fermentación es mucho más rápido a pHs más elevados, ya que en estos casos la fase de latencia se reduce, y por otra parte la actividad fermentadora se incrementa [231, 232]. El pH afecta también a la síntesis de productos secundarios, y puede presentar efecto sinérgico con otros parámetros ya estudiados.

1.3.4.7.- INFLUENCIA DEL SO₂.

El SO₂ inhibe a los microorganismos indeseables que pueden afectar negativamente la calidad de un vino. Este grupo de microorganismos incluye bacterias acéticas, bacterias lácticas y algunas levaduras. Este producto se emplea con la finalidad de eliminar especies de levaduras tales como *K. apiculata* y *M. pulcherrima*, ya que éstas producen concentraciones elevadas de ácidos volátiles y sustancias combinantes del SO₂ [30, 322]. Además la levaduras apiculadas, presentes de forma normal en los mostos en elevado número, pueden inhibir el desarrollo de *S. cerevisiae* [31]. Esto lleva a un comienzo más tardío y más lento de la fermentación. El SO₂ afecta también el curso de la fermentación de *Saccharomyces*, de manera que la fase de latencia previa a la fermentación es tanto mayor cuanto más SO₂ existe en el mosto. A las levaduras sólo les afecta la proporción de SO₂ en forma libre presente en el medio. El SO₂ también provoca alteraciones del metabolismo de levaduras. Así BENDA [31] afirma que el SO₂ da lugar a una disminución o anulación del efecto PASTEUR, de manera que la levadura sigue fermentando aún en condiciones aeróbicas. Por otra parte CIOLFI et al. [65] han demostrado que el SO₂ influye en la producción de compuestos volátiles, aumentando la producción de ésteres del ácido acético, en particular acetato de etilo. La influencia que el SO₂ muestra sobre las células varía de especie en especie y de cepa en cepa. Además, su efecto depende del pH (es inversamente proporcional) y del contenido en etanol del medio en proporción directa.

1.3.4.8.- INFLUENCIA DE LAS SUSTANCIAS INHIBIDORAS PRESENTES DE FORMA NATURAL EN EL MOSTO.

La presencia en el mosto de sustancias antibióticas, excretadas por *Botrytis cinerea* u otros hongos, disminuye la velocidad de fermentación, y la finalización de la misma no es posible en ocasiones. Sustancias inhibidoras semejantes a la botriticina pueden ser también acetogénicas [282].

El crecimiento de las levaduras también resulta inhibido, como ya hemos visto antes, por alcoholes superiores y sus ésteres, y además por ácidos grasos de 8 a 10 átomos de carbono [191]. Parece ser que estos compuestos se adsorben sobre las levaduras e impiden el intercambio con el medio externo [191]. LAFON-LAFOURCADE *et al.* [182] y GENEIX *et al.* [136] han llevado a cabo una serie de interesantes experiencias para eliminar estas sustancias inhibidoras de la fermentación, mediante la utilización de paredes celulares [177, 181, 192] y polisacáridos insolubles [193].

1.4.- LAS BACTERIAS LACTICAS.

Las bacterias lácticas constituyen un extenso grupo que se define por un conjunto de propiedades fisiológicas y estructurales comunes. Todos los miembros de ese grupo son Gram (+), no forman esporas, y son inmóviles (con pocas excepciones). Metabólicamente, dependen de los hidratos de carbono a los que utilizan vía fermentación: son fermentadores obligados. No presentan heminas (citocromos, catalasa). A pesar de carecer de estos compuestos, las bacterias lácticas son capaces de crecer en presencia de oxígeno atmosférico; son desde anaerobias facultativas hasta

microaerófilas. Otra característica de las bacterias lácticas la constituyen sus complejas exigencias nutritivas. La mayoría requiere vitaminas y aminoácidos como factores de crecimiento. La morfología de estas células varía entre esférica y bacilar. Al dividirse estas células pueden o separarse o mantenerse unidas formando agrupaciones celulares distintas, definidas como parejas, cadenas, tétradas, sarcinas o racimos; cada agrupación es característica de los distintos géneros de bacterias lácticas. Las bacterias lácticas más frecuentemente encontradas en el vino pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*.

1.4.1.- METABOLISMO DE LAS BACTERIAS LACTICAS.

Ya hemos mencionado que las bacterias lácticas son fermentadoras. Dependiendo de las especies los azúcares son fermentados por dos vías distintas, denominadas "fermentación láctica homofermentativa" y "fermentación láctica heterofermentativa".

Las bacterias lácticas homofermentativas degradan la glucosa por la vía Embden-Meyerhof (EM), y al llegar a piruvato éste se reduce, dando lugar al ácido láctico (Figura 1). Esta transformación hace que se produzca ácido láctico con un rendimiento del 90% a partir de la glucosa. Tan sólo una pequeña parte del piruvato será descarboxilada y convertida en etanol y anhídrido carbónico o acetoína. El ácido láctico que se produce puede ser D(-), L(+) o DL, dependiendo de la estereoespecificidad del enzima existente, la lactato deshidrogenasa, y de la presencia de una lactato racemasa [202]. La posesión de uno u otro enzima o de ambos, es un criterio necesario para la clasificación de las bacterias lácticas [323]. Las bacterias lácticas heterofermentativas carecen de los enzimas principales de la vía EM, la aldolasa y la triosa fosfato isomerasa (Figura 5). Por

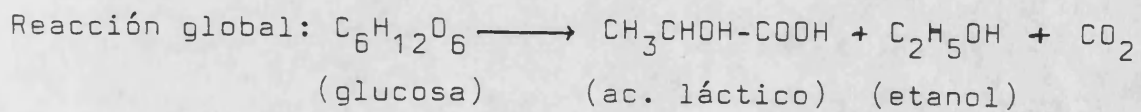
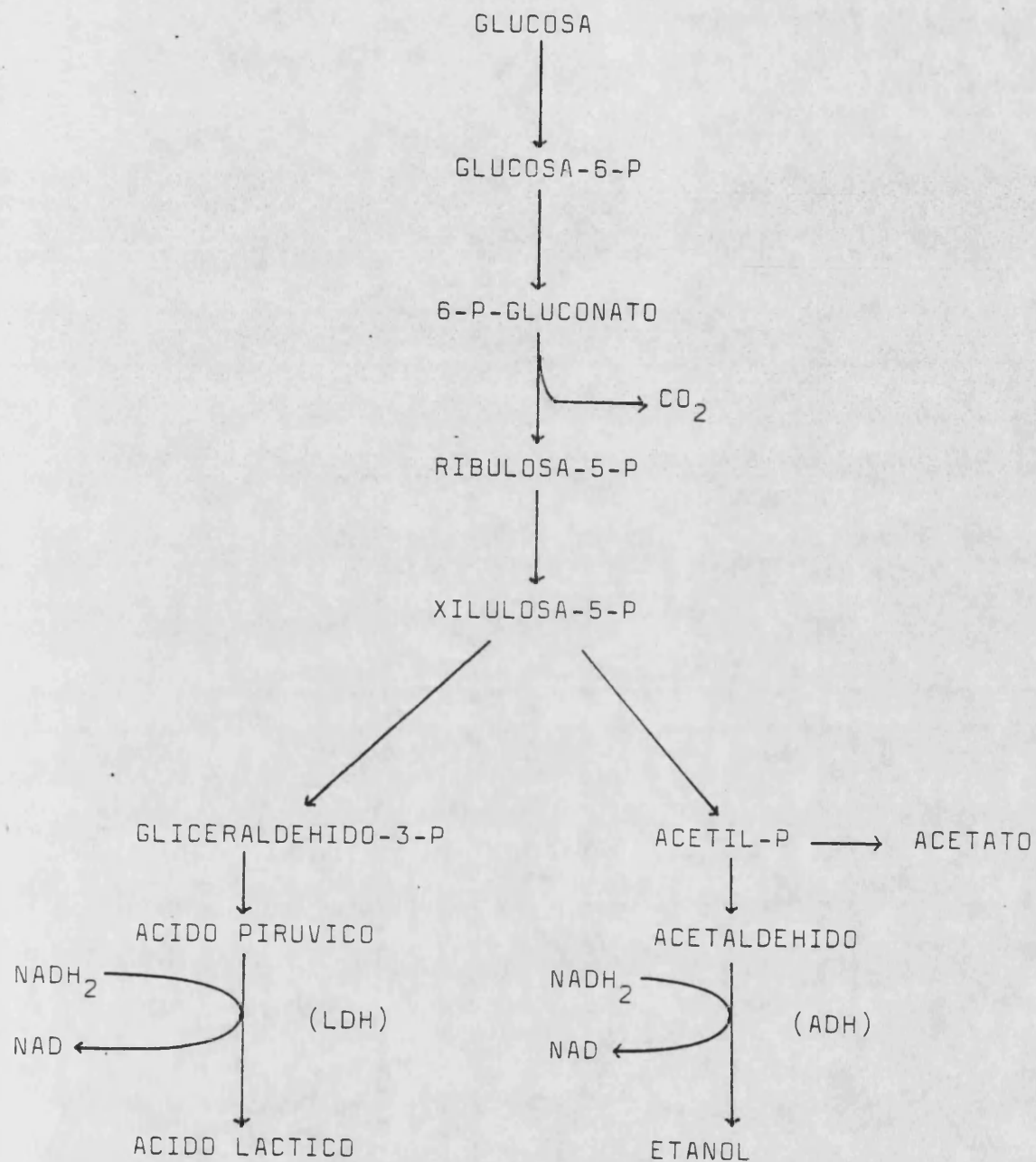


Figura 5- Fermentación de la glucosa por las bacterias heterofermentativas. (Resumido a partir de KANDLER, 1983, (94))

esta razón, fermentan la glucosa por la vía de las pentosas fosfato hasta la formación de CO_2 , gliceraldehído 3 fosfato y acetil fosfato; el gliceraldehído 3 fosfato es degradado a ácido láctico por la vía EM, y el acetil fosfato da lugar a etanol. De esta manera se forman cantidades equimoleculares de CO_2 , ácido láctico y etanol. La relación entre la producción de etanol o acetato a partir de acetil fosfato depende del potencial de oxidoreducción del sistema [159]. Si un aceptor adicional de protones (p.e. oxígeno o fructosa) está disponible, no se forma etanol, sino que el oxígeno se reduce a H_2O_2 o H_2O y la fructosa se reduce a su vez a manitol [159].

La capacidad de metabolizar pentosas varía mucho entre las bacterias lácticas; la posesión de esta capacidad es un carácter estable, y ha sido usado como criterio en la identificación de especies [282]. La fermentación de las pentosas lleva a la formación de elevadas cantidades de ácido acético [175].

Las exigencias de determinados aminoácidos como fuente de nitrógeno, dependen de la especie o de la cepa, y de las condiciones de cultivo [133, 134].

Las bacterias lácticas también son capaces de metabolizar ciertos ácidos orgánicos presentes en los vinos, tales como los ácidos cítrico, málico, tartárico y fumárico. Este metabolismo de los ácidos orgánicos es importante a nivel práctico porque puede provocar importantes cambios organolépticos en los vinos. Los productos de fermentación de los ácidos orgánicos pueden mejorar la calidad de un vino, aumentando su complejidad organoléptica, pero también pueden disminuir su calidad, si se producen productos indeseables. A la capacidad de fermentar ácido málico se le denomina "fermentación maloláctica", y lo estudiaremos en profundidad en el Capítulo III. La degradación del ácido tartárico no es una característica muy extendida entre las bacterias lácticas del vino [265], y no es propia

de las especies sino de cada cepa. La utilización de este ácido se puede llevar a cabo por dos vías distintas según que las bacterias sean homo o heterofermentativas [175, 265]. En ambos casos se produce ácido acético, el vino se muestra plano y avinagrado, y el olor recuerda a la col fermentada debido a la formación de acetoína; estas características suponen la enfermedad denominada "vuelta" [175, 282]. La degradación del ácido cítrico también lleva a la formación de ácido acético, acetoína y diacetilo [89, 91, 175, 311]. A partir de la acetoína se puede obtener 2,3-butanodiol [206]. Estos compuestos contribuyen favorablemente a la complejidad organoléptica de un vino [168], siempre que no sobrepasen ciertas cantidades; así por ejemplo concentraciones superiores a 3 mg/l de diacetilo confieren sabor a mantequilla al vino. La degradación del ácido fumárico conduce según PILONE *et al.* [255] a la formación de ácido málico, que posteriormente se transforma en láctico. En general, los metabolismos del ácido cítrico y del tartárico producen un incremento de la acidez volátil del vino. En este contexto DELFINI [99] define la bacteria láctica ideal a aquélla que sea eficaz degradadora del ácido málico e incapaz de degradar otros ácidos.

Las vías de degradación de estos cuatro ácidos orgánicos se exponen en la Figura 6.

PASTEUR, como ya hemos dicho, al inicio de esta introducción, describió las bacterias lácticas como microorganismos perjudiciales para los vinos, ya que provocaban varias "enfermedades" en el mismo. Sólo 60 años más tarde, FERRE mostró la importancia de la fermentación maloláctica en los vinos finos de Borgoña. En realidad no se puede establecer una separación neta entre bacterias lácticas útiles y bacterias lácticas dañinas, ya que todas pueden ser favorables o perjudiciales, en función del momento en que se desarrollen y de los sustratos a los que ataquen. Así la bacteria ideal sería aquélla que solamente llevase a cabo la fermentación

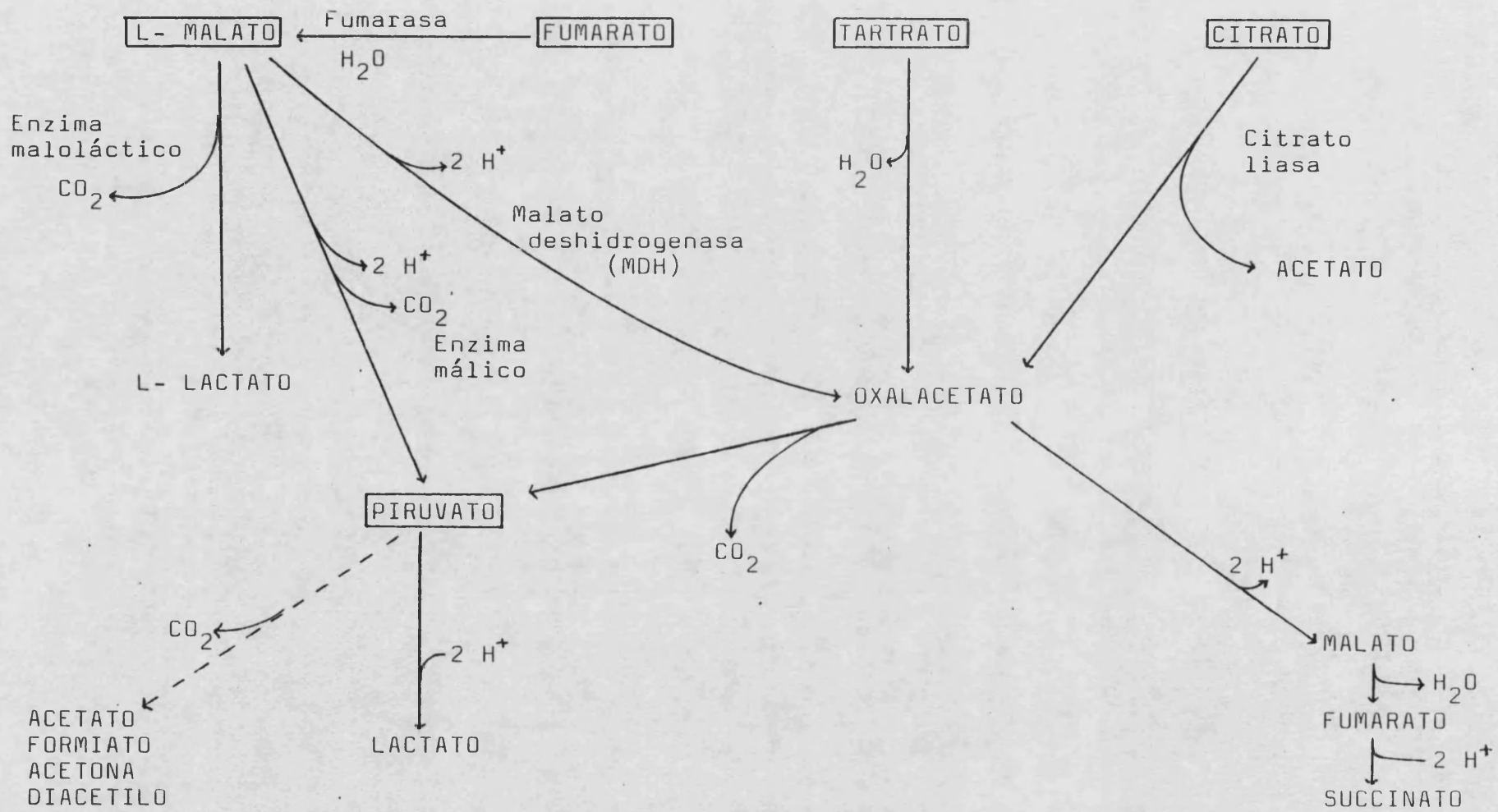


Figura 6- Vías metabólicas de degradación de ácidos carboxílicos en bacterias lácticas. (RADLER y BRÖHL; 1984, (266))

maloláctica pura. En realidad, no existe tal bacteria, y no hay bacterias totalmente inofensivas, sino que hay grados en la peligrosidad que presenta una determinada bacteria según las propiedades de su especie, las condiciones en las que se encuentra y, sobre todo, según la presencia de azúcares residuales (glucosa y fructosa) en los vinos. RIBÉREAU-GAYON [282] establece que dos de los factores que permiten juzgar la inocuidad de las cepas son los pHs umbrales de ataque a los azúcares y al ácido málico. Cuanto más separados estén estos dos pHs umbrales, menor probabilidad de perjuicio.

1.4.2.- FACTORES QUE AFECTAN AL CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS LACTICAS.

El desarrollo de las bacterias lácticas está afectado por la temperatura, el pH, la concentración de etanol, de taninos y de ácidos orgánicos, y por el contenido en SO₂ y en CO₂ en el medio. La dependencia fisiológica del pH que tienen las bacterias lácticas presenta una importancia enológica considerable. El pH óptimo de crecimiento se halla entre pHs de 4.3 y 4.8, valores superiores a los que se encuentran normalmente en los vinos [151, 264]; sin embargo, algunas cepas son capaces de crecer a pH 3. El pH tiene también un efecto selectivo sobre las especies [221].

En cuanto a la temperatura, las bacterias lácticas del vino son mesófilas, con un óptimo entre 20 y 25°C. Temperaturas diferentes de cultivo afectan a la tasa de crecimiento y a las tasas metabólicas de los organismos [238]. Un descenso de la temperatura en 5°C es suficiente para eliminar una gran parte de la población inicial, para disminuir la biomasa formada y para prolongar la fermentación maloláctica en tres semanas [175]. Estos efectos serán todavía más drásticos si el pH se hace más ácido o la concentración de alcohol aumenta. A 15°C o menos, el crecimiento bacteriano

es débil; sin embargo, si la fermentación maloláctica ha comenzado por encima de los 15°C, puede seguir adelante a temperaturas más bajas [282].

Entre los factores químicos el etanol es el principal inhibidor del crecimiento [263]. La resistencia al etanol varía con la cepa, así como con otras condiciones del medio. En general, una concentración superior al 13% (v/v) limita poderosamente el crecimiento bacteriano. Sin embargo, se han encontrado cepas capaces de crecer en vinos con más del 20% (v/v) de etanol [175, 270].

Las bacterias lácticas, en contraposición a las levaduras, son muy sensibles al SO₂ libre y al SO₂ combinado [119, 189], aunque el primero tiene mayor poder inhibitorio. Los cocos se ven más afectados por el SO₂ que los bacilos, y ambos son inhibidos tanto en la fase de latencia como durante la fase de crecimiento activo [189]. El SO₂ también inhibe el metabolismo de los azúcares y de los ácidos orgánicos.

El papel de la aireación es controvertido. Las bacterias lácticas son anaerobias facultativas o microaerófilas. Algunos autores piensan que la aireación facilita el crecimiento bacteriano [282], pero otros opinan que una ligera presión de CO₂ es estimuladora [343]. MAYER [31] observó que no había crecimiento de *Leuconostoc* en aire libre de CO₂, o en atmósfera de nitrógeno puro, mientras que sí se daba en atmósfera de N₂ + CO₂.

La acción que ciertos polifenoles tienen sobre las bacterias lácticas es controvertida. Así mientras algunos autores piensan que los taninos poseen cierta acción antibacteriana [282], otros opinan que los compuestos fenólicos no afectan negativamente a las bacterias lácticas [174], y otros han llegado a la conclusión de que pueden tener efectos activadores, inhibidores o ser indiferentes en función de la cepa bacteriana y de las condiciones del medio [70].

Los ácidos láctico, succínico y tartárico tienen un efecto desfavorable sobre la fermentación maloláctica [172]. El ácido tartárico,

bajo condiciones de idéntico pH, reduce la cantidad de biomasa formada [175], y también ocurre lo mismo con el ácido málico a elevadas concentraciones [45]. El ácido fumárico estimula el crecimiento bacteriano en bajas concentraciones, pero se transforma en inhibidor en cantidades superiores a 600 mg/l [255].

Hay que tener en cuenta el efecto inhibidor que las levaduras y virus ejercen sobre el desarrollo de las bacterias lácticas. BEELMAN *et al.* [28] ya observaron que el crecimiento de *Leuconostoc oenos* ML-34 queda seriamente afectado cuando crece en un medio en el que también se ha sembrado *Saccharomyces cerevisiae* (cultivo mixto); estos autores también comprobaron que la degradación de ácido málico era inferior en el medio sembrado con cultivo mixto que en el inoculado únicamente con *L. oenos* ML-34. En este sentido BILINSKI *et al.* [36] han informado que dos especies de levaduras (*Kluyveromyces thermotolerans* y *Kloeckera apiculata*) presentan actividad antibacteriana sobre *L. plantarum* y *Bacillus megaterium*. Por otro lado son muchos los estudios que hablan de la existencia de cepas de levaduras productoras de SO₂ [35, 195, 294, 346]; éstas afectarían tanto al crecimiento como a la actividad de las bacterias lácticas, dada su sensibilidad a este compuesto. Una serie de estudios recientes [64, 138, 139, 321] han mostrado que ciertas dificultades en la realización de la fermentación maloláctica se deben a la infección de las bacterias lácticas por virus. Estos virus destruyen las poblaciones de *L. oenos*, impidiendo que se realice la fermentación maloláctica. Sin embargo, el hongo *Botrytis cinerea* no sólo no inhibe a las bacterias lácticas sino todo lo contrario. SAN ROMAO [297] ha informado de que el glicerol producido por este hongo estimula el crecimiento y la fermentación de azúcares en bacterias lácticas.

1.5.- LAS BACTERIAS ACÉTICAS Y LA OXIDACION DEL ETANOL.

Las bacterias acéticas, denominadas por PASTEUR *Mycoderma aceti*, son células cilíndricas muy cortas, agrupadas en cadenas o parejas, Gram (-) y aerobias estrictas. El papel de estas bacterias en la elaboración de vinos, no es tan importante ni tan complejo como el de las bacterias lácticas. Generalmente, no se presentan problemas con ellas si se guardan las normas de higiene necesarias.

La descripción de las bacterias acéticas encontradas en uvas, mosto o vino se basa generalmente en el sistema de FRATEUR [123]. Este sistema divide el género *Acetobacter* en cuatro subgrupos bioquímicos: peroxidans, oxidans, mesoxidans y suboxidans (Tabla 1). Para diferenciarlos se utilizaba la actividad catalasa, la oxidación del acetato y lactato, y la formación de cetonas y ácido glucónico. Por otro lado, la presencia de flagelos peritricos en algunos miembros de *Acetobacter* llevó a la división del género en dos géneros diferentes: *Acetobacter*, con flagelos peritricos, y *Acetomonas*, con flagelación polar [198]. Se han cuestionado las subdivisiones establecidas por FRATEUR porque el cambio gradual de características de cepa a cepa impide una definición clara de los límites entre grupos. ASAI en 1968 [31] sugirió una división taxonómica de las bacterias acéticas en dos géneros: *Acetobacter* y *Gluconobacter* (idéntico a *Acetomonas*). Cada género presentaría solamente una especie, *Acetobacter aceti* y *Gluconobacter oxydans* respectivamente, y todas las formas descritas previamente se consideran variedades de esa especie determinada. El "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" [316] mantiene la división de la familia *Acetobacteriaceae* en los dos géneros que ya describió ASAI: *Acetobacter* y *Gluconobacter*. Las bases para la separación de ambos géneros son las que definió FRATEUR: capacidad de oxidación de ácido láctico y

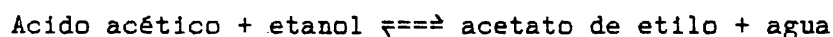
Grupo	Organismo	Catalasa	Oxidación lactato y acetato	Formación cetonas	Formación ácido glucónico	Flagelación
Peroxidans	<i>A. paradoxum</i>	-	+	-	-	peritrica
	<i>A. peroxidans</i>	-	+	-	-	peritrica
Oxidans	<i>A. ascendens</i>	+	+	-	-	peritrica
	<i>A. rancens</i>	+	+	(+)	+	peritrica
	<i>A. lovaniense</i>	+	+	(+)	+	peritrica
Mesoxidans	<i>A. mesoxydans</i>	+	+	+	+	peritrica
	<i>A. xylinum</i>	+	+	+	+	peritrica
	<i>A. aceti</i>	+	+	+	+	peritrica
Suboxidans	<i>A. suboxydans</i>	+	-	+	+++	polar
	<i>A. melanogenum</i>	+	-	+	+++	polar

Tabla 1.- Bioquímica y fisiología de las bacterias del ácido acético *Acetobacter* según FRATEUR [123].

ácido acético a CO_2 , y tipo de flagelación. Sin embargo, *Acetobacter* no contiene únicamente una especie, sino cuatro: *Acetobacter aceti*, *Acetobacter liquefaciens*, *Acetobacter pasteurianus* y *Acetobacter hansenii*. El género *Gluconobacter* es monoespecífico, y su especie es *Gluconobacter oxydans*.

Las fuentes de carbono que utilizan principalmente estas bacterias son glucosa y etanol en el caso de *Gluconobacter*, y etanol, glicerol, hexosas y lactato en el caso de *Acetobacter* [47]. Las fuentes de nitrógeno son minerales (sales de amonio) u orgánicas (extracto de levadura, extracto de carne). Hay cierta relación entre la fuente de carbono y la de nitrógeno [175].

La actividad metabólica más conocida de estos organismos, en el campo de la enología, es la oxidación del etanol del vino (Figura 7). El alcohol del vino es oxidado, transformándose en ácido acético y agua. Las bacterias necesitan mucho aire para multiplicarse y producir esa oxidación. Esta gran necesidad de oxígeno hace que *Acetobacter* (el género más frecuente en vinos) sólo pueda desarrollarse en la superficie de contacto vino-aire. La formación de ácido acético va siempre acompañada de su esterificación. *Acetobacter* forma acetato de etilo a partir de ácido acético y de etanol:



Es el acetato de etilo, y no el ácido acético, el que confiere a los vinos picados el gusto avinagrado, ya que el umbral de detección del primer compuesto es mucho más bajo que el del ácido acético.

Los factores más importantes que influyen en el desarrollo de estas bacterias en el vino son: pH, concentración de etanol, aireación y cantidad de SO_2 . El pH mínimo que toleran las bacterias acéticas depende de la concentración de etanol; así, para 8.2% de etanol el pH límite es de 3.0, y

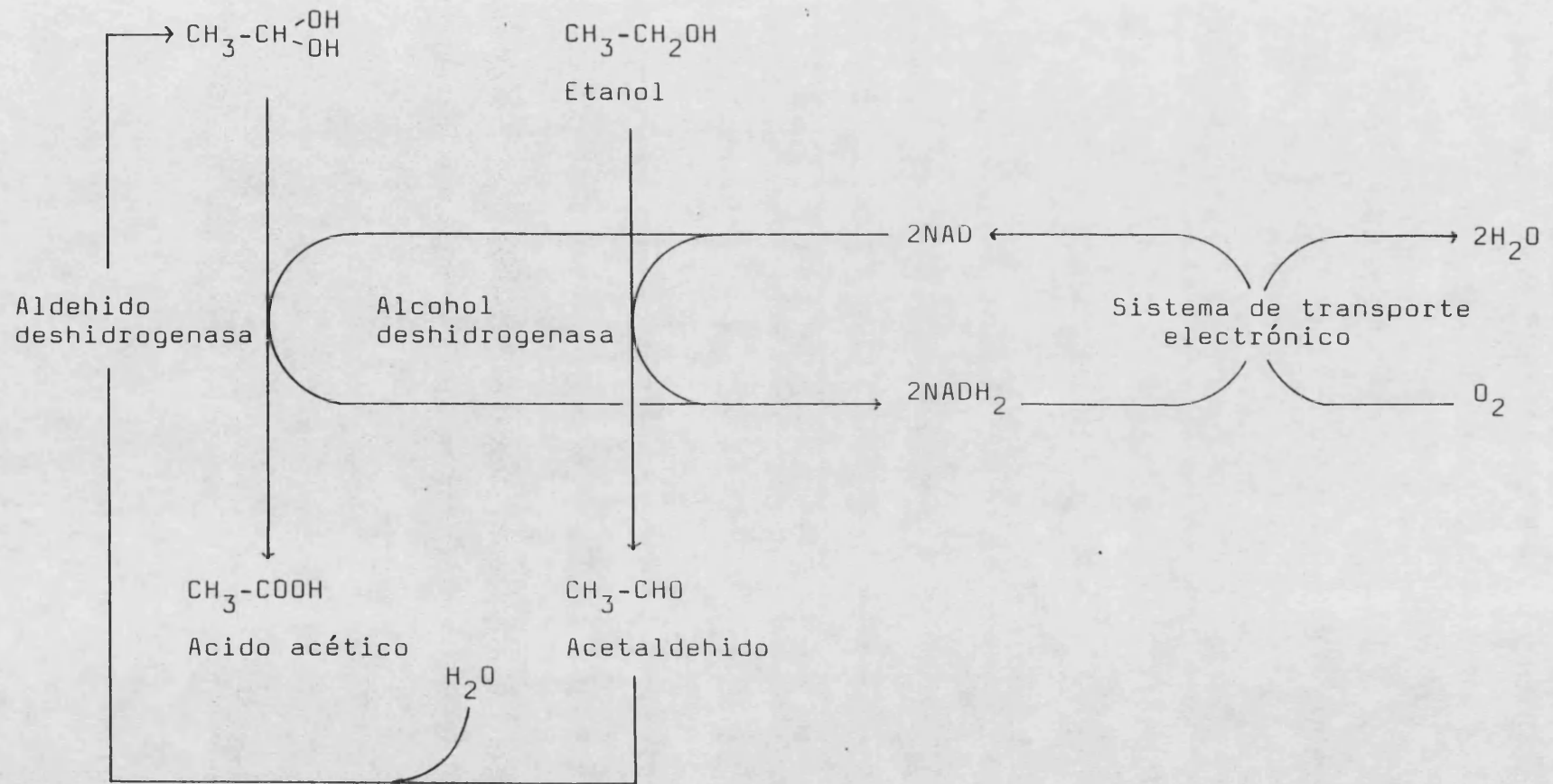


Figura 7- Ruta metabólica de la oxidación del etanol por las bacterias acéticas. (LAFON-LAFOURCADE, 1983, (175))

para un vino de 12.5% es de 3.4 [109]. El etanol, en elevadas concentraciones, es un inhibidor, y en la práctica los vinos de alta graduación raramente se acetifican. RANKINE [270] observó que la acetificación es pequeña por debajo de pH 3.2, y que un contenido en alcohol del 15% previene el crecimiento de bacterias acéticas. La aireación es totalmente necesaria para el desarrollo de estos microorganismos, aunque pequeñas cantidades de oxígeno permiten la supervivencia de una población residual de bacterias acéticas [157], e incluso la producción de 0.1 a 0.2 g/l de ácido acético en 24 horas a 19°C y a pH 3.5 [184].

La temperatura elevada es un factor acelerador del avinagramiento de los vinos: la alteración es dos veces más rápida a 28°C que a 23°C, y dos veces más rápida a 23°C que a 18°C [240]. Las bacterias acéticas son sensibles al SO₂. DUPUY, en su Tesis Doctoral [282], ha mostrado que hay fijación de SO₂ sobre las células bacterianas e inhibición de la oxidación de etanol. Se ha visto que estas reacciones son reversibles (al menos para pequeñas dosis de SO₂ y que la duración de la acción es limitada), puesto que por lavado las células pueden desprenderse del SO₂ fijado y eliminar así la inhibición de la oxidación del alcohol. Según DUPUY, la inhibición puede explicarse por un bloqueo de las funciones tiol presentes en los enzimas al fijarse el SO₂.

1.6.- OBJETIVOS DEL TRABAJO.

Las experiencias realizadas en esta parte del trabajo están encaminadas a resolver una serie de cuestiones que constituyen la finalidad de esta investigación. Estos objetivos se centran en:

- a) Conocer qué tipo de **flora levaduriforme** se asocia a los mostos de la D.O. Utiel-Requena; establecer qué semejanzas o diferencias existen con otras zonas vitícolas y evaluar si existen variaciones de la flora levaduriforme asociada a distintas localizaciones y vendimias.
- b) Estudiar la **evolución de los parámetros físico-químicos** a lo largo de la fermentación, relacionándola con el sistema de vinificación empleado. Esto nos permitirá evaluar las ventajas o inconvenientes del sistema de vinificación tradicional frente al sistema BIDONE.
- c) Determinar la **evolución de la microflora** durante la fermentación, estableciendo de que manera influye en la misma el tipo de vinificación, así como los distintos tratamientos a los que se han sometido los mostos y vinos.
- d) Conocer los **tipos de levaduras que llevan a cabo la fermentación alcohólica** en la D.O. Utiel-Requena.
- e) Establecer un método fiable de **clasificación de bacterias lácticas** aisladas del vino.
- f) Caracterizar la **fisiología y metabolismo de las bacterias lácticas** que se aislen, a fin de contar con el mayor número posible de criterios para realizar una selección de las mismas de cara a la consecución de la fermentación maloláctica.

2.- MATERIAL Y METODOS.

2.1.- PROCEDENCIA DE LOS MOSTOS.

Los mostos analizados durante las campañas 1982-1983 y 1983-1984 procedían de distintas localizaciones dentro de la D.O. Utiel-Requena.

Durante la campaña 1982-1983 se tomaron muestras de la Cooperativa San Pedro de los Corrales de Utiel. Esta bodega vinifica las uvas procedentes de los viñedos pertenecientes a esta aldea. Los datos geoclimáticos propios de Utiel (municipio al cual pertenece esta población) ya se han mencionado en el primer Capítulo. La principal variedad cultivada en los límites de los Corrales de Utiel es la Bobal, mayoritaria como ya hemos visto en toda la D.O. Utiel-Requena. En la campaña 1982-1983 esta Cooperativa se dedicó a la producción de rosados y dobles pastas. La elaboración de los rosados se realizó siguiendo la técnica tradicional: corta maceración con los hollejos, sangrado, y posterior fermentación. Durante esas vendimias se realizó el seguimiento de siete depósitos de fermentación (A, B, C, D, E, F y G) de forma independiente. Tras el primer descube, finalizada la fermentación alcohólica, se utilizó el depósito G para rellenar los cinco primeros, a fin de no mezclar vinos extraños. Sin embargo, el F tuvo que rellenarse con otro tipo de vino distinto al no contener el depósito G suficiente cantidad para todos ellos. De esta forma, el número inicial de depósitos se redujo a seis. La capacidad de estos depósitos de fermentación oscilaba entre 10000 y 20000 litros.

Durante la campaña 1983-1984 se continuaron los estudios en esta Cooperativa y sobre el mismo tipo de mostos de Bobal, destinados a rosados.

Dadas las elevadas temperaturas de fermentación que durante la primera campaña soportaron los mostos (38.5°C), los técnicos de la bodega adoptaron un sistema especial de vinificación discontinua: se trataba de una variante del método del argentino BIDONE [229]. Según este autor, se mezclaron mostos en plena fermentación tumultuosa con mostos frescos sulfitados que no habían empezado a fermentar. Con este sistema se lograba rebajar en algún grado las temperaturas del proceso (35°C), y además se conseguía acabar más rápidamente las fermentaciones que en el caso de la vinificación tradicional de acuerdo con la bibliografía [229].

El problema que supuso este cambio de estrategia en nuestras investigaciones fue grande, ya que nos impedía estudiar de forma individualizada las fermentaciones de unos mostos iniciales determinados. Esto nos planteaba el dilema del estudio de mostos elaborados mediante vinificación tradicional, como en la campaña anterior pero en otra zona, o seguir estudiando los mostos de los Corrales de Utiel. Sin embargo, es cierto que nos permitía por otro lado comparar los efectos de ambas formas de tratar el mosto para su vinificación en una misma bodega. Dado que además nuestro interés se centraba en conocer la microflora de esta zona y de esa variedad de uva, nos decidimos por la segunda opción, a fin de eliminar las variaciones debidas a la situación geográfica y microclimática. Por otro lado podríamos obtener información acerca de cómo la técnica de BIDONE alteraba las poblaciones microbianas respecto a la vinificación tradicional. En esta campaña se muestrearon 17 depósitos distintos, a lo largo de diferentes momentos de la fermentación que correspondían a los que se habían seguido el año anterior.

También durante la campaña 1983-1984 se estudió la microflora de cinco variedades de uva cultivadas en el campo de experiencias de la Escuela de Viticultura y Enología de Requena: Bobal, Cabernet-Sauvignon, Garnacha, Macabeo y Tempranillo. Algunas de estas variedades como Garnacha, Macabeo y

Tempranillo se cultivan en pequeña proporción en la D.O. Utiel-Requena, mientras que Cabernet-Sauvignon sólo se utiliza en plan experimental con la intención de adaptarla a esta zona y estudiar la calidad de los caldos que pueda producir. Se siguió además la evolución completa de la fermentación de mostos de cuatro de estas variedades: Bobal, Garnacha, Macabeo y Tempranillo. La elaboración fue de tipo tradicional en la bodega de la citada escuela.

Por último, también se realizaron en 1984 controles esporádicos de vinos con fermentación alcohólica finalizada y con inicio de fermentación maloláctica en la Cooperativa Virgen de Loreto de las Cuevas de Utiel.

2.2.- DESCRIPCION DE LA VINIFICACION DE LOS MOSTOS ESTUDIADOS. TRATAMIENTOS DE VINIFICACION.

En la Tabla 2 se especifican los tratamientos de prefermentación a los que se sometieron los diferentes mostos.

Tras la fermentación alcohólica todos sufrieron una evolución muy semejante: clarificación espontánea del mosto, primer trasiego para eliminar las heces durante los meses de Noviembre-Diciembre sin adición de sulfuroso, y por último en los meses de primavera (Marzo-Abril) un segundo trasiego, con adición de 20 mg/l de SO₂ en los todos los casos excepto en los mostos de Bobal, Garnacha y Macabeo vinificados en la Escuela.

Muestra	Fase	Origen ^a	Año	S.V. ^b	Tratamientos prefermentativos				Trasiegos	
					SO ₂ ^c	CT ^d	EP ^e	B ^f	Primero	Segundo
A	I	CSP	1982	T	200	-	0	0	N(20)	A(0)
B	I	CSP	1982	T	200	-	0	0	N(20)	A(0)
C	I	CSP	1982	T	200	-	0	0	N(20)	A(0)
D	I	CSP	1982	T	200	-	0	0	N(20)	A(0)
E	I	CSP	1982	T	200	-	0	0	N(20)	A(0)
F	I	CSP	1982	T	200	-	0	0	N(20)	A(0)
G	I	CSP	1982	T	200	-	0	0	N(20)	A(0)
N1	I	CSP	1983	B	120	-	30	0	D(20)	A(0)
N2	I	CSP	1983	B	120	-	30	0	D(20)	A(0)
N3	I	CSP	1983	B	120	-	30	0	D(20)	A(0)
N4	I	CSP	1983	B	120	-	30	0	D(20)	A(0)
N5	II	CSP	1983	B	0	-	0	0	D(20)	A(0)
N6	II	CSP	1983	B	0	-	0	0	D(20)	A(0)
N7	II	CSP	1983	B	0	-	0	0	D(20)	A(0)
N8	II	CSP	1983	B	0	-	0	0	D(20)	A(0)
N9	III	CSP	1983	B	0	-	0	0	D(20)	A(0)
N10	III	CSP	1983	B	0	-	0	0	D(20)	A(0)
N11	III	CSP	1983	B	0	-	0	0	D(20)	A(0)
N12	III	CSP	1983	B	0	-	0	0	D(20)	A(0)
N13	IV	CSP	1983	B	0	-	0	0	D(20)	A(0)
N14	IV	CSP	1983	B	0	-	0	0	D(20)	A(0)
N15	IV	CSP	1983	B	0	-	0	0	D(20)	A(0)
N16	IV	CSP	1983	B	0	-	0	0	D(20)	A(0)
N17	VI	CSP	1983	B	20	-	0	0	D(20)	A(0)
N18	VI	CSP	1983	B	20	-	0	0	D(20)	A(0)
N19	VI	CSP	1983	B	20	-	0	0	D(20)	A(0)
N20	VI	CSP	1983	B	20	-	0	0	D(20)	A(0)
Bo	I	EVE	1983	T	0	+(19)	0	0	N(0)	M(0)
Gar	I	EVE	1983	T	70	-	0	60	N(0)	M(0)
Mac	I	EVE	1983	T	100	-	50	0	N(0)	M(0)
Tem	I	EVE	1983	T	70	+(19)	10	60	N(0)	M(0)
C-S	I	EVE	1983	T	?	-	0	0	N(0)	M(0)
G	VI	CVL	1983	T	?	-	?	?	?	?

Tabla 2.- Características de los mostos y vinos analizados en el presente estudio. ^aOrigen: "CSP" Cooperativa San Pedro de los Coorales de Utiel; "EVE" Escuela de Enología y Viticultura de Requena; "CVC" Cooperativa Virgen de Loreto de las Cuevas de Utiel. ^bSistema de vinificación: "T" tradicional; "B" BIDONE. ^cCantidad de SO₂ añadido (mg/l). ^d"CT" control de temperatura; "-" sin control, "+" con control; entre paréntesis grados a los que se realizó la fermentación controlada. ^e"EP" adición de enzimas pectolíticos (mg/l). ^f"B" adición de bentonita (mg/l). "A" trasiego en el mes de Abril, "D" en el mes de Diciembre, "M" en el mes de Marzo, "N" en el mes de Noviembre; entre paréntesis la dosis de SO₂ añadida en cada caso en el correspondiente trasiego (mg/l). "?" Dato no conocido.

2.3.- TOMA DE MUESTRAS.

Las muestras se tomaron en botellas estériles de cuello estrecho que eran lanzadas provistas de un lastre hacia el fondo de los depósitos, luego eran recuperadas tirando del cordel al cual estaban atadas. Durante la bajada y la ascensión, la botella se llenaba a lo largo de todo su recorrido. De esta forma salvávamos el error de muestrear solamente la parte superficial, donde posiblemente el número de levaduras fuera mayor, y donde se hallarían sobreestimadas aquéllas de metabolismo más oxidativo debido a la mayor oxigenación. El muestreo a través de los grifos situados en el fondo del depósito tenía los mismos problemas respecto a la representatividad de todas las especies. Una vez obtenidas las muestras se tapaban con un tapón estéril y se colocaban en la nevera portátil durante su transporte al laboratorio.

Los muestreos se realizaron en distintos momentos de la vinificación, que aplicando los principios seguidos por diferentes autores [22, 130, 131, 154, 161, 220, 262, 298, 318] fueron:

Fase I: Inmediatamente después de que los mostos rosados habían sido sangrados tras maceración de 3-4 horas con los hollejos. En el caso de mostos tintos se realizó el muestreo a las pocas horas de encubadas las uvas estrujadas. Para los mostos blancos se tomó la muestra inmediatamente después del prensado. En los muestreos realizados en esta fase ninguno de los mostos había sido tratado con SO_2 .

Fase II: Cuando los mostos estaban en plena fermentación tumultuosa, aproximadamente a una densidad ($d_{20/20}$) de 1040-1030.

Fase III: Al final de la fermentación tumultuosa, aproximadamente a una $d_{20/20}$ de 1020.

Fase IV: Hacia el final de la fermentación alcohólica, cuando la $d_{20/20}$ era de 1000.

Fase V: Inmediatamente antes del primer trasiego (en invierno).

Fase VI: Inmediatamente después del primer trasiego.

Fase VII: Tras el segundo trasiego (en primavera).

2.4.- ANALISIS FISICO-QUIMICOS DE LOS MOSTOS.

Se realizaron análisis físico-químicos de los mostos a lo largo de su vinificación, a fin de caracterizar y estudiar la posible influencia que en la variación de la microflora tuvieran estos factores.

Los parámetros que se escogieron son los que de forma general recomienda la bibliografía: temperatura, pH, densidad relativa, grado Baumé, grado alcohólico, azúcares reductores, cenizas tras la fermentación alcohólica, extracto seco, extracto reducido, acidez total, acidez volátil, polifenoles totales, intensidad colorante, SO₂ total y libre, contenido en hierro, y contenido en ácidos málico y láctico [230].

2.4.1.- MEDIDA DE LA TEMPERATURA.

La medida de la temperatura a la que se hallaban los mostos o vinos se tomaba en el mismo depósito de fermentación o conservación. Para ello se introducía un vástago de madera de unos dos metros de largo provisto de un termómetro de alcohol en el centro del depósito. Este sistema nos daba una idea mucho más real de la temperatura que si se medía ésta en la porción de vino o mosto sacada como muestra.

2.4.2.- MEDIDA DEL pH.

La mayor parte de las propiedades del vino y de los fenómenos que en él ocurren dependen de su acidez. Ahora bien, hay que distinguir entre acidez titulable y la noción de pH. La acidez titulable, también llamada total en el caso de los vinos, es la suma de los ácidos libres, mientras que el pH es una medida de la concentración de hidrogeniones y que está en relación con la naturaleza de los ácidos, su concentración, y la proporción que está en forma de sales [284]. El pH se midió mediante un pHmetro Crison con un electrodo de vidrio Ingold una vez llegada la muestra al laboratorio.

2.4.3.- MEDIDA DE LA DENSIDAD RELATIVA.

La determinación de la densidad relativa no reviste importancia fundamental en sí misma, pero permite estimar aproximadamente el extracto seco y apreciar el contenido en azúcares.

La densidad relativa ($d_{20/20}$) es la relación expresada en cifras decimales de la masa volumétrica del mosto a 20°C con la masa volumétrica del agua a la misma temperatura. La densidad relativa de un mosto se midió con un juego de aerómetros que comprendían desde una $d_{20/20}$ de 1150 hasta 900. Estos aparatos estaban graduados para unas temperaturas 15/4, por lo que para expresarlas en $d_{20/20}$ había que realizar una serie de correcciones que vienen indicadas en tablas. Dado que los mostos en fermentación son mezclas hidroalcohólicas, la medida de la densidad relativa también tiene que ser corregida en función del grado alcohólico de la muestra.

Para medir este parámetro se llenó una probeta con 250 ml de mosto o vino, y en ella se sumergían un aerómetro y un termómetro. Tras agitar el

contenido de la probeta se esperó un minuto y se leyó la temperatura. A continuación se sacó el termómetro y se leyó la escala del aerómetro por la parte alta del menisco. Se leyó de nuevo la temperatura y, si ésta había variado, se realizó de nuevo la medida de la densidad. El valor así obtenido se corrigió mediante tablas para hallar la equivalencia de la densidad relativa a 15/4. Este método permite conseguir resultados con una aproximación de 0.003 g/ml [284].

A partir de la $d_{20/20}$ se puede también calcular mediante fórmulas el contenido en azúcares (s) en gramos por litro de un mosto, y el contenido de la muestra en extracto no azucarado (E) [284]:

$$s = 2560 (d_{20/20} - 1) - 22.2$$

$$E = 0.0195 s + 22.634$$

En el caso de los vinos, se pueden eliminar con facilidad los inconvenientes producidos por el alcohol para la determinación del extracto azucarado mediante la fórmula de TAVARIE, que permite obtener la densidad relativa del residuo sin alcohol [7]:

$$d_r = d_v - d_m + 1.000$$

siendo (d_r) la $d_{20/20}$ del residuo sin alcohol, (d_v) la densidad del vino a 20°C con relación al agua a 20°C, y (d_m) la densidad a 20°C de la mezcla hidroalcohólica de igual graduación alcohólica que el vino con relación al agua a 20°C.

2.4.4.- MEDIDA DEL GRADO BAUME.

En el caso de los mostos, a veces se utilizan otras unidades distintas de la $d_{20/20}$ para la expresión de la densidad, tal es el caso de los grados Baumé.

Hay una correspondencia lineal entre $d_{20/20}$ y grados Baumé, y para simplificar los cálculos existen unas tablas de equivalencia entre ambos tipos de medidas [129].

2.4.5.- MEDIDA DEL GRADO ALCOHOLICO.

Se definen los grados alcohólicos ($^{\circ}A$) que contiene un líquido hidroalcohólico como la cantidad en mililitros de etanol que contienen 100 ml de la mezcla, ambos medidos a $20^{\circ}C$. Esta definición puede extrapolarse a los vinos, aunque en los destilados obtenidos no se separa el etanol de sus homólogos y se dosifica no solamente el etanol en forma de alcohol, sino también la pequeña fracción contenida en los ésteres [284].

La determinación del grado alcohólico de un vino puede realizarse por métodos físicos, químicos y enzimáticos. Nosotros realizamos esta medida por destilación y estimación posterior de la densidad de la mezcla hidroalcohólica mediante un alcoholómetro, ya que éste es el procedimiento oficialmente adoptado en todos los países.

El equipo de destilación constaba de un matraz esférico de 1000 ml de capacidad unido herméticamente a una columna rectificadora de 20 cm de longitud; esta columna se oponía al arrastre mecánico del líquido y hacía caer de nuevo al matraz vapores que no correspondían al etanol. El destilado pasaba luego a través de un refrigerante tipo West de 40 cm de longitud, y a través de un tubo de goma se recogía en un matraz aforado de

igual volumen que el utilizado para medir la cantidad de vino a destilar, y en el que se habían añadido algunos mililitros de agua destilada para crear un cierre hidráulico con la goma.

En el balón de 1000 ml se colocaron 200 ml del vino problema, el cual se neutralizó con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para evitar que se escapara el etanol en forma de gas y que sustancias volátiles, como SO_2 , CO_2 o ácido acético, salieran por el destilado y alteraran la medida. También se le colocó piedra pómez para facilitar la ebullición. Una vez conseguida la neutralización, se calentó el balón y se recogió un volumen de destilado de unos 150 ml (cantidad citada como suficiente para contener todo el etanol del vino [284]). Tras lavado de la goma se retiró y enfrió el matraz aforado, enrasando hasta 200 ml con agua destilada, que era el volumen inicial puesto a destilar.

La muestra hidroalcohólica se homogeneizó, se pasó a una probeta, y se introdujo un alcoholómetro calibrado a 15/15, leyendo tangente por la parte inferior del menisco. Se procuró que la temperatura de la muestra fuera de 15°C , y en caso contrario se corrigió el valor mediante tablas; posteriormente se buscó la correspondencia en tablas entre $^\circ\text{A}15/15$ y $^\circ\text{A}20/20$, que es como debe expresarse [284].

2.4.6.- MEDIDA DE LOS AZUCARES REDUCTORES.

Los mostos y vinos contienen pentosas y hexosas que constituyen los azúcares reductores, llamados así porque son capaces de reducir los licores alcalinos cúpricos. Las hexosas son los azúcares mayoritarios, estando en concentraciones de 150 a 250 g/l. Entre las hexosas presentes en el vino encontramos D-glucosa y D-fructosa mayoritariamente, y D-galactosa en menor proporción. Las pentosas se encuentran en pequeñas cantidades, pudiendo ir de 0.3 a 2 g/l. Las pentosas contenidas en los vinos son L-arabinosa,

D-xilosa, D-ribosa y L-ramnosa [284].

La dosificación de los azúcares reductores en las muestras se llevó a cabo por el método de decoloración del licor de FEHLING [284]. Este licor se compone de dos soluciones cuyas composiciones son las siguientes:

Solución A:	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	34.64	g
	H ₂ O	hasta 500	ml
Solución B:	Tartrato potásico	173	g
	NaOH	50	g
	H ₂ O	hasta 500	ml

Estas dos soluciones se mezclan al 50% y la solución resultante se ajusta con agua de forma que 10 ml del reactivo final sean decolorados por 10 ml de una solución de 5 g/l de azúcar invertido [284].

En el licor de FEHLING el cobre está como hidróxido cúprico, y por ello es de color azul. La función del tartrato potásico es la de solubilizar al Cu(OH)₂. La determinación requiere de:

- **Proceso de decoloración.** Este método requiere que se opere sobre soluciones azucaradas lo más exentas posible de materias extrañas, especialmente polifenoles, perfectamente decoloradas y que conserven su limpidez durante el tiempo que dure la determinación. En nuestro caso la decoloración la realizamos con carbón en polvo, previamente saturado de materias reductoras. Se mezclaron 100 ml de vino con 4 g del carbón, se pasaron a través de papel de filtro y el líquido claro resultante se pasó a una bureta.
- **Proceso de reducción.** En un matraz esférico de 250 ml se colocaron 10 ml de licor de FEHLING, 40 ml de agua destilada y piedra pómez, llevándose a ebullición. Fuera del fuego se añadió gota a gota el vino decolorado de la bureta, llevándose de nuevo a ebullición sin dejar de

agitar. El proceso se repitió hasta que el color azul del licor de FEHLING hubiera desaparecido por completo, y apareciera un precipitado de color rojo correspondiente al Cu_2O en el fondo, dejando el sobrenadante completamente transparente.

La cantidad de azúcares reductores contenidos en el vino viene dada por la siguiente expresión:

$$y = 50 / x$$

donde (y) es la cantidad de azúcares reductores en g/l, y (x) el volumen en ml utilizados para decolorar el licor de FEHLING.

2.4.7.- MEDIDA DEL EXTRACTO SECO.

El extracto seco total del vino es el peso del residuo fijo obtenido tras la evaporación de las sustancias volátiles. Su cálculo se puede realizar evaporando una porción de vino y pesando el residuo sólido restante. Hay dos métodos que se basan en este procedimiento: uno realiza la evaporación en baño durante 6 horas a 100°C y a presión atmosférica; sin embargo, las críticas sobre la validez de este método han sido muchas. Por ello la Convención Internacional sobre Análisis de Vinos estableció un método estandarizado que consistía en la evaporación a 70°C a presión reducida y con aire seco. Por otro lado, es posible también el cálculo del extracto seco a partir de la densidad relativa mediante la fórmula de TAVARIE (ver Apartado 2.4.3 de este Capítulo). La aplicación de esta fórmula nos da la densidad del residuo sin alcohol [210]. La correspondencia entre esta densidad y la cantidad de extracto seco total en gramos por litro viene establecida por unas tablas [284]. La relación entre

ambos valores viene dada por la expresión:

$$E_w = (d_r - 1) \times 2.6 \times 10^3$$

donde E_w es el extracto seco expresado en g/l según WINDISCH y d_r es la densidad correspondiente al extracto seco (densidad del residuo sin alcohol) [284].

Dado que numerosos autores han constatado la validez del cálculo matemático respecto a los valores obtenidos por evaporación a 70°C a presión reducida [284], nosotros hemos hallado nuestros extractos secos utilizando el procedimiento anteriormente descrito.

2.4.8.- MEDIDA DEL EXTRACTO NO REDUCTOR.

El extracto no reductor (E_n) se halla por diferencia entre el extracto seco (E_w) y los azúcares reductores (y):

$$E_n = E_w - y$$

El extracto no reductor constituye el conjunto de sustancias fijas distintas de los azúcares que quedan tras la evaporación de las sustancias volátiles del vino [284].

2.4.9.- MEDIDA DE LA CANTIDAD DE CENIZAS.

Las cenizas son aquellas materias minerales que permanecen al calcinar el extracto seco hasta que queda desprovisto de todo indicio de carbón. Del

peso de las cenizas, de su aspecto y de su reacción más o menos alcalina se pueden extraer conclusiones sobre falsificaciones de los vinos.

La determinación del peso de las cenizas supone dos etapas:

- a) **Primera calcinación:** 20 ml de vino evaporado se colocan en una cápsula con unas gotas de aceite y se sitúa sobre un foco calorífico. Allí se mantiene hasta que deje de emitir humo.
- b) **Segunda calcinación:** La cápsula se coloca en una mufla que no supere los 525°C, y se saca cuando las cenizas presentan un color característico grisáceo, sin ningún punto negro de carbón [284].

2.4.10.- MEDIDA DE LA ACIDEZ TOTAL.

La suma de las funciones ácidas libres, no combinadas por bases, o la suma de los hidrógenos ácidos procedentes de los ácidos totalmente libres y de los que lo están en parte, constituye la acidez total del vino [284].

La determinación de la acidez total se realiza por titulación del vino en presencia de un indicador que vire a pH neutro y de una solución valorada de NaOH [284]. La medida de la acidez total se expresa como g/l de ácido sulfúrico o de ácido tartárico. Nosotros lo realizamos como g/l de ácido tartárico, para lo cual utilizamos la siguiente expresión [129]:

$$A_t = v \cdot 0.75$$

donde (A_t) es la acidez total expresada en g/l de ácido tartárico, y (v) el volumen de NaOH 0.1 N empleado para neutralizar.

La técnica consistió en valorar la cantidad de ácidos presentes en 10 ml de vino. Se utilizó como indicador fenolftaleína, y como base NaOH 0.1 N.

2.4.11.- MEDIDA DE LA ACIDEZ VOLATIL.

La definición de acidez volátil fue suministrada por FONZES-DIACON y JAULMES en 1930: "la acidez volátil es el conjunto de ácidos grasos de la serie acética que se hallan en el vino"; se excluyen por tanto de esta definición el ácido láctico, el succínico, el carbónico, y el anhídrido sulfuroso [284].

La mayoría de los procedimientos para la determinación de la acidez volátil se fundan en la destilación del vino y el arrastre de las sustancias volátiles mediante vapor de agua. Nosotros realizamos la determinación según el método de GARCIA TENA [129], que se basa en que cada ácido volátil de una mezcla destila independientemente, según su "ley de destilación". Expresamos la acidez volátil como g/l de ácido acético, aunque también se puede expresar como g/l de H_2SO_4 .

2.4.12.- MEDIDA DEL ANHIDRIDO SULFUROSO TOTAL Y LIBRE.

El SO_2 introducido en un vino se combina en pocas horas con sustancias que presentan una función carbonilo, pero parte de él también queda sin combinar en forma de ion bisulfito, constituyendo el SO_2 libre. El SO_2 total es la suma de las fracciones libre y combinada.

El fundamento de la cuantificación del SO_2 total y libre se basa en la oxidación de éste por el iodo molecular en medio ácido. El medio debe ser ácido pues de lo contrario el I_2 oxida a los polifenoles del vino; además al entrar en juego el SO_2 libre la reacción no es cuantitativa en un medio no ácido.

Para la determinación del SO_2 total seguimos un método volumétrico que consistió en añadir 10 ml de una solución 1 N KOH a 20 ml de vino, para favorecer que el SO_2 combinado pasara a libre. Tras agitar, dejamos reposar 15 minutos con el matraz tapado para evitar evaporaciones. Posteriormente, se añadieron 5 ml de H_2SO_4 0.33 N y 2-3 ml de una solución de 10 g/l de almidón como indicador. Se valoró con una solución de iodo 0.02 N, multiplicándose la cantidad de iodo empleada por 0.032 para hallar la concentración de SO_2 total en g/l [129].

Para la estimación del SO_2 libre se siguió un esquema similar, pero sin añadir KOH: a 50 ml de muestra se añadieron 5 ml de H_2SO_4 0.33 N y 1-2 ml de una solución de 10 g/l de almidón. Se valoró también con iodo 0.02 N, y se multiplicó el volumen necesario de iodo por 0.0128 en este caso para obtener la cantidad de SO_2 libre en g/l [129].

La fracción de SO_2 combinado se obtuvo por diferencia entre el SO_2 total y el libre [129].

2.4.13.- MEDIDA DEL CONTENIDO EN HIERRO.

El vino contiene siempre hierro en pequeñas cantidades, el cual puede tener dos orígenes: uno intrínseco, el jugo de la uva, y otro extrínseco: tierra que ensucia las uvas, mala manipulación, contaminación en el momento del transporte por los equipos metálicos de la bodega, etc.

Es importante conocer la concentración del hierro en los vinos, ya que éste en cantidades superiores a 10 mg/l y en vinos con oxígeno disuelto puede dar lugar a quiebras por unión a la materia colorante o al ácido fosfórico en forma de Fe^{+3} .

La determinación del contenido en hierro de las muestras se realizó por el método del tiocianato. Este método se basa en la propiedad que tiene

el tiocianato de colorearse de rojo en presencia de Fe^{+3} libre. Se requiere la preparación de una curva patrón de Fe^{+3} , y el contenido se expresa en mg/l [284].

Para realizar el ensayo se tomaron 10 ml de las muestras de vino y patrones (p.e. 3, 6, 9, 12, 15 y 18 mg/ml de FeCl_3), y se añadió a cada tubo 1 ml de HCl puro diluido a la mitad, y 1 ml de una solución al 20% de KSCN. En este momento la coloración roja obtenida correspondía al Fe^{+3} existente en las muestras. Seguidamente se añadieron a cada tubo 5 gotas de agua oxigenada de 10 volúmenes, oxidando el Fe^{+2} y determinándose así el hierro total. Por comparación de los colores obtenidos en cada muestra de vino frente a los patrones se estableció el hierro contenido en cada caso [284].

2.4.14.- DETERMINACION DE LOS COMPUESTOS FENOLICOS TOTALES EN LOS VINOS.

Los fenoles en el vino varían desde compuestos relativamente simples, cuyo origen son las vides, hasta sustancias complejas del tipo de taninos, cuyo origen es la madera de los barriles donde se envejece el vino. Los fenoles también pueden proceder de los aromas artificiales u otras sustancias añadidas al vino. Estos compuestos fenólicos son importantes por diversas razones: proporcionan color al vino, son responsables de la astringencia y son capaces de reducir al oxígeno oxidándose a su vez y produciendo el "pardeamiento" del vino.

Existen varios métodos para la determinación del contenido total de fenoles en vinos; de todos ellos los más empleados han sido el de NEUBAUER-LÖWENTHAL y el de FOLIN-DENIS [7]. El primero fue durante algún tiempo el método oficial de la "Association of Official Analytical Chemists", pero se substituyó más tarde por el de FOLIN-DENIS. Más recientemente, el reactivo

FOLIN-DENIS se reemplazó por el de FOLIN-CIOCALTEU.

El procedimiento se basa en la reducción del wolframato sódico y del molibdato sódico (componentes del reactivo de FOLIN-CIOCALTEU) por oxidación de los fenoles (IG22). Tras disponer 1 ml de vino, diluido si hace falta, en un matraz aforado de 100 ml se añaden 5 ml del reactivo de FOLIN-CIOCALTEU y 10 ml de una solución de carbonato sódico al 20% (p/v). Se enrasa a 100 ml y, tras reposo de 30 minutos, se lee la absorbancia a 765 nm en cubetas de 1 cm de paso de luz [7]. La absorbancia será proporcional a la concentración de compuestos fenólicos. Para expresar esta absorbancia en mg/l de fenoles totales se realiza una curva de calibrado construida con distintas concentraciones de ácido gálico (disolución reserva de fenol). La absorbancia que presentan estas soluciones patrón a 765 nm se representa frente a la concentración de fenoles totales (expresada en miliequivalentes de ácido gálico). Los valores de fenoles totales en el vino se hallarán por interpolación en la curva patrón [7].

2.4.15.- DETERMINACION DE LA INTENSIDAD COLORANTE.

El problema de la definición del color de los vinos ha avanzado mucho desde el advenimiento de los métodos espectrofotométricos. La caracterización del color se reduce a traducir por valores simples la curva de absorción del vino.

En el caso de los vinos blancos, no existe ningún pico de absorbancia en el espectro visible, aunque se presenta un máximo a 270-280 nm. Se han realizado escasos estudios sobre la apreciación del color de los vinos blancos, si bien puede decirse que la medida de la absorbancia a 440 nm con cubetas de 1 cm de paso de luz, es un procedimiento simple que permite el estudio de la oxidación de estos vinos.

En el caso de los tintos, mejor caracterizados, los vinos jóvenes muestran un máximo de absorción a 520 nm responsable del color rojo definido, debido a los antocianos de la uva; por otro lado, presentan un mínimo a 420 nm. Cuando el vino envejece, el máximo a 520 nm tiende a desaparecer y el mínimo de 420 nm a aumentar. Esto corresponde a un incremento del color amarillo (420 nm) en relación con el rojo (520 nm), lo cual explica la evolución de un color rojo definido hacia un tinte rojo-anaranjado.

Para definir el matiz del color de vinos tintos o rosados, SUDRAUD propuso utilizar la relación de las absorbancias a 420 y a 520 nm; estos valores permiten comparar entre sí vinos influenciados por diferentes factores: vinificación, conservación, añejamiento, etc. [284].

La intensidad colorante y el tinte de un vino tinto o rosado vienen pues definidos por las siguientes expresiones, que son las que hemos seguido para nuestras muestras:

$$I = D_{420} + D_{520}$$

$$T = D_{420} / D_{520}$$

donde (I) es la intensidad colorante, (D) la densidad óptica medida en cubeta de paso de luz de 1 cm en el caso de rosados y 0.1 cm en el caso de tintos para la longitud de onda especificada, y (T) el tinte o matiz del vino.

2.4.16.- DOSIFICACION DEL CONTENIDO EN ACIDOS MALICO Y LACTICO.

El interés inicial que para nosotros presentaba la detección de estos ácidos era el seguimiento de la fermentación maloláctica en vinos. Para ello empleamos un método cualitativo sencillo y rápido: la cromatografía en papel. Es un sistema comunmente empleado en bodega para observar la marcha de la fermentación maloláctica. Se puede realizar también con esta técnica una aproximación semicuantitativa de las concentraciones de ácidos málico y láctico midiendo las superficies de las manchas y comparándolas con las superficies de soluciones conocidas de estos ácidos, ya que la relación entre superficie y concentración es directa [284].

De cada muestra obtenida se tomaron 10 μ l y se aplicaron sobre un papel Whatman 3 MM; una vez seca la muestra se volvieron a aplicar otros 10 μ l en el mismo punto y se dejó secar de nuevo. La cromatografía se desarrolló en un solvente-revelador compuesto por dos soluciones: la primera formada por azul de bromofenol disuelto al 0.1% (p/v) en alcohol n-butílico, y la segunda por un 40% (v/v) de ácido acético glacial, 10% (v/v) de ácido fórmico, y 50% (v/v) de agua destilada. Estas dos soluciones se mezclaron en proporción de 5 partes de la primera por 2 partes de la segunda. Esta mezcla solvente-reveladora es una modificación de la empleada por KUNKEE *et al.* [170] y RIBÉREAU-GAYON *et al.* [284] (R. MICHELENA, comunicación personal). La modificación consiste en que la fracción ácida del solvente está constituida por ácido fórmico y ácido acético glacial, y no por uno sólo de estos ácidos, como ocurre en las fórmulas de los autores anteriormente citados.

2.5.- MEDIOS DE CULTIVO.

En todos los medios que se reseñan a continuación la composición se expresa en cantidades para volúmenes finales de un litro, añadiéndose el agua destilada necesaria en cada caso.

2.5.1.- MEDIOS DE CULTIVO PARA HONGOS FILAMENTOSOS Y LEVADURAS.

- **AA:** Agar acetato de McCLARY [201]

Glucosa	1	g
KCl	1.8	g
Extracto de levadura	2.5	g
NaCH ₃ COO · 3H ₂ O	8.2	g
Agar	20	g

El medio se esterilizó a 121°C durante 20 minutos.

- **AAR:** Agar arbutina [165]

Arbutina	5	g
Extracto de levadura	5	g
Agar	20	g

Tras autoclavar a 121°C durante 20 minutos se añadió un 1% de una solución de NH₄FeHC₆H₅O₇ al 1% esterilizada por filtración.

- **AEM:** Agar extracto de malta [201]

Extracto de malta	100	g
Agar	20	g

Se ajustó el pH a 5.4 y se esterilizó a 121°C durante 20 minutos.

- **AG:** Agar de GORODKOWA [201]

Glucosa	1	g
Peptona	10	g
NaCl	5	g
Agar	20	g

Se esterilizó durante 20 minutos a 121°C.

- **ASD:** Agar sal de DAVIS [130, 147]

NH_4NO_3	1	g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	g
Na_2HPO_4	4	g
KH_2PO_4	2	g
NaCl	1	g
Extracto de levadura	1	g
Glucosa	10	g
Agar	15	g

El pH se ajustó a 6.6 y se esterilizó a 121°C durante 20 min.

- **EM:** Medio extracto de malta [201]

Extracto de malta	150	g
-------------------	-----	---

Se ajustó el pH a 5.4 y se esterilizó a 115°C durante 30 minutos.

- GCC: Medio de glucosa y carbonato cálcico [165]

Glucosa	50	g
Extracto de levadura	5	g
CaCO ₃	5	g
Agar	20	g

Se esterilizó el medio a 121°C durante 20 minutos, y una vez enfriado a 50°C se agitó para resuspender el CaCO₃, dejándose los tubos inclinados para su solidificación.

- GL: Medio de glucosa al 50% [165]

Glucosa	500	g
Extracto de levadura	5	g
Agar	30	g

Se esterilizó el medio a 115°C durante 30 minutos, dejándose los tubos inclinados para su solidificación.

- HM: Medio de harina de maíz [201]

Se agitaron 12.5 g de harina de maíz en 300 ml de H₂O a 60°C durante 1 hora. Se filtró a través de papel de filtro, se ajustó el volumen a 300 ml y se añadieron 6 g de agar; se autoclavó durante 20 minutos a 121°C.

- **MB**: Medio malta de BLAKESLEE [257]

Glucosa	20	g
Extracto de malta	20	g
Peptona micológica	1	g

Se ajustó el pH a 5.5 y se esterilizó a 115°C durante 30 minutos. En el caso de que fuera medio sólido, se añadió agar al 1.5% final.

- **MV**: Medio basal de WICKERHAM [165]

Extracto de levadura	4.5	g
Peptona	7.5	g
Azul de bromotimol	0.04	g

Se ajustó el pH a 6.8 y se esterilizó a 115°C durante 30 minutos.

- **VFYB**: Medio "Vitamin-Free Yeast Base" (Difco) [165, 201]

Se utilizó el medio en las cantidades y forma especificadas por el fabricante.

- **YCB**: Medio "Yeast Carbon Base" (Difco) [165, 201]

Se utilizó el medio en las cantidades y forma especificadas por el fabricante.

- **YM:** Medio extracto de levadura-extracto de malta [201]

Extracto de levadura	3	g
Extracto de malta	3	g
Peptona micológica	5	g
Glucosa	10	g

Se ajustó el pH a 5.5, y se esterilizó a 121°C durante 20 minutos. En el caso de medio sólido, se añadió agar al 1.5% final.

- **YNB:** Medio "Yeast Nitrogen Base" (Difco) [165, 201]

Se utilizó el medio en las cantidades y forma especificadas por el fabricante.

2.5.2.- MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS ACETICAS.

- **AM:** Agar manitol [327]

Extracto de levadura	5	g
Peptona	3	g
Manitol	25	g
Agar	15	g

A este medio se le añadió un indicador de pH para observar acidificación por parte de las colonias. El indicador utilizado consistió en una solución acuosa de verde de bromocresol al 2.2% (p/v), añadiéndose al medio a razón de 1 ml por litro. Se ajustó el pH del medio a 5.5 y se esterilizó a 121°C durante 20 min.

- MC: Medio de CARR [58]

Extracto de levadura	30	g
Solución verde de bromocresol	1	ml
Agar	15	g

La solución de verde de bromocresol se preparó como en el AM. El pH del medio se ajustó a 5.5 y se esterilizó a 121°C durante 20 min. Una vez esterilizado se añadió etanol de 95° en proporción de 20 ml por litro de medio.

2.5.3.- MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS LACTICAS.

- ATB: Medio de jugo de tomate ácido [133]

Peptona	10	g
Extracto de levadura	5	g
Glucosa	10	g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	g
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.05	g
Jugo de tomate	250	ml

Para preparar el medio, los 250 ml de jugo de tomate se maceraron con 750 ml de agua destilada durante 20 horas a 4°C. Posteriormente se centrifugaron a 1000 x g durante 20 minutos y el sobrenadante se filtró a través de papel Whatman nº 541. Se recogió el filtrado en un matraz, se añadieron el resto de los componentes, el pH se ajustó a 4.8 y se enrasó hasta 1000 ml. El medio se esterilizó durante 20 minutos a 121°C. Posteriormente se adicionaron 50 ml de cisteína · HCl al 1% (p/v) esterilizados por filtración.

- BB: Medio basal para la producción de ácido láctico [253] modificado

Triptona	20	g
Peptona	5	g
Extracto de levadura	5	g
Cisteína · HCl	0.5	g
Tween 80	0.05	ml

El pH del medio se ajustó a 5.5, y se esterilizó durante 20 minutos a 121°C.

- C: Medio basal de asimilación de ácidos [79]

Peptona	10	g
Extracto de levadura	5	g
Glucosa	10	g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	g
MnSO ₄ · 1H ₂ O	25	mg
Cisteína · HCl	5	mg
Jugo de tomate	200	ml

El jugo de tomate se preparó como en el medio ATB. El pH final del medio se ajustó a 4.8, y se esterilizó durante 20 minutos a 121°C.

- FC: Medio basal de fermentación de carbohidratos [133]

Peptona	15	g
Extracto de levadura	6	g
NaCl	5	g
Verde de bromocresol	0.04	g
Agar	5	g

El pH del medio se ajustó a 5.2, se repartió en tubos a razón de 5 ml por tubo, y se autoclavó a 121°C durante 20 minutos. Los tubos se enfriaron hasta 45°C y se suplementaron con 0.5 ml de la fuente de carbono a ensayar. Los carbohidratos se prepararon al 2% (p/v), excepto la L-arabinosa que se preparó al 5% (p/v), y se esterilizaron separadamente por filtración.

- HFM: Medio homo-heterofermentativo [308] método de GIBSON ABD-EL MALEK

Glucosa	50	g
Extracto de levadura	2.5	g
Jugo de tomate (pH 6.5)	100	ml
Leche desnatada rehidratada	800	ml
Agar	3	g

Para este medio los 100 ml de jugo de tomate se utilizaron directamente, y sólo se corrigió el pH del mismo previamente a su adición al resto de los componentes. El medio se esterilizó a 121°C durante 20 min.

- JT: Medio de jugo de tomate [308]

Glucosa	10	g
Extracto de levadura	5	g
Peptona	5	g
KH ₂ PO ₄	0.5	g
KCl	0.125	g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.125	g
NaCl	0.125	g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.125	g
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.003	g
Verde de bromocresol	0.03	g
Jugo de tomate	150	ml

El jugo de tomate se preparó como en el medio ATB, ajustando en este caso el pH final a 5.0. Se esterilizó a 121°C durante 20 min.

- **JU:** Medio de jugo de uva [308]

Jugo de uva	500	ml
Extracto de levadura	5	g
Acido sórbico	1.2	g

El pH del medio se ajustó a 4.5. Se esterilizó a 115°C durante 30 minutos.

- **LT:** Medio de leche tornasolada [147]

Leche desnatada en polvo	100	g
Tornasol	0.75	g

El pH del medio se ajustó a 6.8, y se esterilizó a 115°C durante 30 minutos.

- **LTGE:** Medio de leche tornasolada, glucosa y extracto de levadura [147]

Leche desnatada en polvo	100	g
Tornasol	0.75	g
Extracto de levadura	3	g
Glucosa	10	g

El pH del medio se ajustó a 6.8, y se esterilizó a 115°C durante 30 minutos.

- **MLO:** Medio para *Leuconostoc oenos* [67]

Glucosa	10	g
Extracto de levadura	5	g
Fructosa	5	g
Triptona	10	g
(NH ₄) ₂ HC ₆ H ₅ O ₇	3.5	g
Cisteína · HCl	0.5	g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	g
MnSO ₄ · 1H ₂ O	0.05	g
Tween 80	1	ml
Jugo de tomate	100	ml

El jugo de tomate se procesó como en el medio ATB. El pH se ajustó a 4.8 y se esterilizó a 121°C durante 20 min. Para conseguir el medio MLO con agar, este componente se preparó por un lado a doble concentración (5% para el medio sólido y 1% para el semisólido), y por otro el medio MLO también al doble. Ambos se esterilizaron por separado y se mezclaron posteriormente en volúmenes iguales.

- **MRS:** Medio MRS (Oxoid) [93]

Se utilizó el medio en las cantidades y forma especificadas por el fabricante. En el caso de preparar medio sólido se añadió agar al 1.5% final, y al 0.2% para el semisólido.

- **MRSF:** Medio MRS de fermentación (Adsa-Micro)

Se utilizó el medio en las cantidades y forma especificadas por el fabricante. El medio se repartió en tubos con campana DURHAM y se añadió glucosa estéril hasta una concentración final de 5 g/l.

- MRSM: Medio MRS modificado [282]

Triptona	10	g
Extracto de carne	10	g
Extracto de levadura	5	g
KH ₂ PO ₄	2	g
NaCH ₃ COO	5	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2	g
MnSO ₄ · 1H ₂ O	0.05	g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	g
C ₆ H ₆ O ₇	2	g
Glucosa	2	g
Fructosa	2	g
Sacarosa	2	g
Arabinosa	2	g
Xilosa	2	g
Acido DL-málico	5	g

El pH de este medio se ajustó a 4.2 y se esterilizó a 121°C durante 20 minutos.

- PM: Medio para la producción de manitol [80]

Triptona	20	g
Peptona	5	g
Extracto de levadura	5	g
Fructosa	5	g
Tween 80	1	ml

El pH se ajustó a 5.5 y se esterilizó a 121°C durante 20 minutos. La fructosa se esterilizó por separado mediante filtración.

- TJ: Medio para la asimilación de ácido fumárico [79]

Triptona	20	g
Peptona	5	g
Extracto de levadura	5	g
Glucosa	3	g
Lactosa	2	g
Cicloheximida	100	mg
Jugo de tomate	200	ml

El jugo de tomate se preparó como en el medio ATB. El pH de este medio se ajustó a 5.5 y se esterilizó a 121°C durante 20 min.

2.6.- CEPAS DE COLECCION.

A lo largo del presente estudio, se utilizaron varias cepas de colección como referencia en alguno de los trabajos que se llevaron a cabo. Estas cepas fueron *Lactobacillus brevis* CECT216, *Lactobacillus plantarum* CECT220 y *Leuconstoc oenos* ML-34.

2.7.- TECNICA PARA EL RECUESTO DE HONGOS FILAMENTOSOS.

Para el recuento de hongos filamentosos se realizó una siembra en placa sobre medio sólido MB. Las muestras obtenidas en bodega se diluyeron convenientemente en de suero fisiológico estéril a pH 7.0. De cada dilución se sembraron dos placas y el inóculo se repartió en la superficie del agar mediante un asa Digraidsky. Posteriormente las placas se incubaron a 25°C durante una semana.

2.8.- TECNICA PARA EL RECUENTO Y AISLAMIENTO DE LEVADURAS.

Para el recuento y aislamiento de levaduras se escogió el método de recuento en placa, que es el que proporciona una visión precisa tanto del número total de levaduras, como del de probables especies distintas. Este objetivo no hubiera podido llevarse a cabo si se hubiera empleado un método de enriquecimiento, ya que se hubieran alterado tanto las cifras absolutas como las proporciones relativas de las distintas especies.

A la hora de escoger un medio para el recuento y aislamiento de levaduras, nos enfrentamos a la duda de emplear un medio natural, como el mosto de uva, o un medio sintético. Muchos autores son partidarios de medios de aislamiento cuya composición esté relacionada con el hábitat del que se pretende recoger las levaduras, en nuestro caso de mostos y vinos [22, 76, 209, 237, 262, 320]. La dificultad de obtención de mostos frescos en cualquier momento del año, los problemas que plantea el no emplear un medio de cultivo de composición siempre definida, la presencia de posibles inhibidores del crecimiento levaduriforme en los mostos (como la botriticina producida por *Botrytis*), y el riesgo que supone la utilización de jugos comerciales que puedan contener inhibidores del crecimiento como conservantes, han decidido a muchos autores [75, 236, 261, 287, 289, 303] y a nosotros mismos a emplear un medio sintético. La mayor parte de los investigadores usan medios a base de extracto de malta, peptona y, a veces, extracto de levadura. Nosotros escogimos el medio MB que contiene extracto de malta, peptona y glucosa en una proporción que se aproxima a la concentración de azúcar en los mostos, y el medio ASD (a base de extracto de levadura, glucosa y sales minerales) que según GARCIA MAIQUEZ [130] daba

buenos resultados en el aislamiento de levaduras. Tanto al ASD como al agar MB se les añadió una solución estéril de ácido cítrico al 10% esterilizada por filtración hasta hacer descender el pH a 3.5. Se prepararon también placas de agar MB a las que se les mantuvo el pH a 5.5, y a las que se añadió difenilo (esterilizado por filtración) hasta una concentración final de 0.1 mg/ml a fin de inhibir el desarrollo de mohos [183].

Las muestras se sembraron, una vez diluídas convenientemente, sobre placas de agar de estos medios modificados. Las placas se incubaron a 25°C durante 3-5 días.

Para observar el número de cepas distintas que aparecían en las placas, se anotaron los diferentes tipos coloniales que crecieron y el número de representantes de cada uno. Se operó con la premisa de que cada morfología colonial representaba una cepa distinta. Las colonias seleccionadas se sembraron sobre placas de MB a fin de purificarlas convenientemente.

2.9.- TECNICA PARA EL RECuento DE BACTERIAS ACETICAS.

Los medios sólidos empleados para el recuento de bacterias acéticas fueron el MC y el AM. En este caso, al igual que en de las levaduras, se trabajó con dos medios para elegir el más conveniente. En ambos casos la presencia de acéticas se detectó por el viraje de color del medio alrededor de las colonias positivas.

La inoculación de las placas se realizó tras dilución de las muestras, y éstas se incubaron a 28°C durante 3-5 días.

2.10.- TECNICA PARA EL RECuento Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS LACTICAS.

Las bacterias lácticas pueden ser aisladas del vino por tres procedimientos generales:

- a) el primero asume que las bacterias lácticas pueden presentarse en el vino en bajo número, y por ello se requiere un enriquecimiento en medio líquido antes de ser sembradas en placa [79, 211, 212, 213, 343]. WIBOWO *et al.* [344] afirman que la principal desventaja de este sistema es que proporciona información sólo de la presencia o ausencia de bacterias lácticas, pero no permite la cuantificación de las mismas.
- b) Un segundo procedimiento de aislamiento consiste en la inoculación de las muestras de mosto o vino directamente en placas de agar [27, 71, 72, 90, 91, 115, 166, 179, 183, 217, 234, 285, 292]. Este sistema puede ofrecer información acerca de las frecuencias relativas de las diferentes especies de bacterias lácticas. En este caso se realiza un recuento de células viables, pero a causa del pequeño volumen de la muestra inoculable en placa, no es posible detectar bacterias si su concentración en los mostos es inferior a 10 células por mililitro [344, 234].
- c) El tercer método se basa en la filtración de volúmenes mayores de vino a través de membranas esterilizantes. Las células presentes en las muestras son retenidas en la superficie de la membrana, y son capaces de desarrollar colonias una vez ésta ha sido incubada sobre el agar [234, 268, 344]. El inconveniente principal de este sistema es la posible colmatación de los filtros si se procesan mostos en las primeras fases de fermentación, debido a la gran cantidad de sustancias y levaduras en suspensión. También un elevado número de levaduras puede enmascarar el crecimiento de las bacterias sobre el

filtro.

El medio de cultivo ideal para los aislamientos de bacterias lácticas debería permitir el crecimiento de todas las especies de *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* que se encuentran en el vino. Este medio ideal no existe debido a la complejidad de requerimientos nutricionales de las bacterias lácticas [234]. Uno de los medios de cultivo más empleados para el aislamiento de bacterias lácticas es el agar MRS [241] y el agar MRS modificado [282]. El medio MRS desarrollado por MAN *et al.* [93] ha sido recomendado por un Subcomité del Comité Internacional de Nomenclatura Bacteriana en 1968. Este medio resulta muy adecuado sea cual sea el hábitat del cual han sido aisladas las bacterias lácticas.

De los tres procedimientos anteriormente mencionados, nosotros elegimos el primer procedimiento, realizando un enriquecimiento en medio MRSM adicionado de alcohol feniletílico a una concentración final de 3 mg/ml, a fin de evitar el crecimiento de levaduras y bacterias Gram negativas [57]. Dado que también nos interesaba conocer la evolución del número de bacterias a lo largo de la fermentación, aplicamos por primera vez para las bacterias lácticas un método de recuento de viables compatible con el aislamiento por enriquecimiento: la técnica del Número Más Probable (NMP) [147]. Para el recuento se utilizaron tres series de tres tubos con 9 ml de MRSM selectivo cada uno. En cada serie se sembró 1 ml de las muestras directas y/o diluciones decimales crecientes de las mismas. Los tubos sembrados se incubaron a 28°C durante 3-5 días, al cabo de los cuales se anotó el número de tubos que presentaban crecimiento en cada serie, obteniéndose de esta manera una combinación de tres números que se denomina "número significativo". Este número significativo se hizo corresponder con el número más probable de bacterias por mililitro en las tablas de McCRAZY [147].

A partir de los tubos NMP positivos se realizó el aislamiento de las bacterias lácticas crecidas en el medio de enriquecimiento selectivo, mediante siembra por estría en placa de MRS.

2.11.- SISTEMAS DE CONSERVACION DE LEVADURAS Y BACTERIAS LACTICAS.

Las técnicas de conservación de levaduras y bacterias lácticas empleadas han sido dos: mantenimiento de cultivos en medios nutritivos agarizados y refrigerados a 4°C, y además la liofilización de cultivos crecidos.

Las cepas de levaduras aisladas de las placas de recuento fueron purificadas por siembra en estría sobre placas de MB. Una vez purificada, cada cepa se sembró en dos tubos de agar YM inclinado, y tras dos días de incubación a 28°C se almacenaron en cámara fría a 4°C. Se realizaron resiembras de las mismas cada tres meses en el mismo tipo de medio. Dado que las ciertas cepas perdían viabilidad muy deprisa y había que resembrarlas con tanta frecuencia, se pensó en utilizar un sistema de conservación menos costoso y más eficaz. Por ello se recurrió a la liofilización de cultivos crecidos en MB sólido inclinado durante 24-48 horas. Estos cultivos se recogieron con una solución de glucosa al 7.5% estéril para proteger a los microorganismos de los efectos de la congelación, obteniéndose una suspensión muy concentrada que se congelaba en nitrógeno líquido, y se liofilizaba en tubos adecuados que posteriormente se cerraban al vacío. Con este sistema se evitaba el problema de la muerte de las cepas y el costoso proceso de las resiembras. Tras la liofilización, se comprobaba la viabilidad de los líófilos mediante rehidratación de un control y siembra en MB.

Por su parte, las cepas de bacterias lácticas purificadas sobre placas de MRS fueron sembradas por picadura en tubos con medio MRS semisólido, ya que el carácter de este medio favorece la conservación de los microorganismos microaerófilos como las bacterias lácticas. Las resiembras de estos microorganismos debían hacerse al cabo de 1 ó 2 meses.

Las ventajas de la liofilización como medio de conservación eran también aplicables a este tipo de organismos. En el caso de las bacterias lácticas las cepas a liofilizar se hacían crecer en un medio líquido MRS a 28°C durante 1 a 3 días según las cepas. Tras haberse conseguido un cultivo denso éste se centrifugaba para recoger las células; éstas se lavaban con ácido glutámico 0.067 M y se volvía a centrifugar. El sedimento se recogía con una pequeña cantidad de ácido glutámico a fin de conseguir una suspensión concentrada, la cual era repartida en tubos especiales para la liofilización. En este caso el medio protector de las células era el ácido glutámico. También en este caso se comprobaba la viabilidad de los cultivos sometidos a la liofilización.

2.12.- TECNICAS PARA LA IDENTIFICACION DE LEVADURAS.

En la evolución de la taxonomía de las levaduras podemos distinguir tres periodos, caracterizados por el establecimiento de distintos criterios de clasificación. En un primer periodo son los caracteres morfológicos los que prevalecen a la hora de identificar. El segundo periodo se caracteriza por una mayor estandarización de los criterios sistemáticos, principalmente morfológicos, que culmina con los estudios de LODDER y KREGER-VAN RIJ (1952) seguidos en 1970 por LODDER que publica el libro "The Yeasts, a Taxonomic Study". En el tercer periodo a los criterios morfológicos y

fisiológicos se añaden criterios moleculares, que han venido a resolver relaciones entre especies y géneros [116].

Cuando iniciamos nuestros trabajos de aislamiento e identificación de levaduras, contábamos con los trabajos de WICKERHAM (1951, 1952) y los más actuales de LODDER (1970); en éstos últimos se basaban la gran mayoría de investigadores para realizar taxonomía de levaduras.

En un principio la clasificación de nuestras cepas siguió los criterios de este autor, pero dado que en curso de las investigaciones aparecieron dos nuevas obras, "The Yeasts" (BARNETT et al., 1983 [181]) y "The Yeasts, a Taxonomic Study" (KREGER-VAN RIJ, 1984 [165]), las primitivas pruebas fueron ampliadas y la clasificación revisada, incluyendo nuestras cepas en las especies definidas según los más recientes estudios taxonómicos.

De esta forma, la metodología que seguimos finalmente fue la siguiente:

2.12.1.- OBSERVACION DE LAS CARACTERISTICAS DE LA REPRODUCCION VEGETATIVA.

2.12.1.1.- MODO DE REPRODUCCION VEGETATIVA.

2.12.1.2.- CARACTERISTICAS DE LAS CELULAS VEGETATIVAS.

- Forma y tamaño en medio EM [201].
- Formación de pseudomicelio y micelio verdadero en placa de agar HM según la técnica de DALMAU [201].
- Formación de endosporas asexuales en AEM [201].
- Formación de clamidosporas en AEM [201].

- Formación de ballistosporas en los medios AEM y HM según la técnica de KREGER-VAN RIJ [165].

2.12.2.- CARACTERISTICAS SEXUALES.

Formación y características de ascas y ascosporas sobre los medios AG y AA [201]. La observación de la presencia de ascosporas se realizó mediante tinción con verde de malaquita según SCHAEFFER-FULTON [165].

2.12.3.- CARACTERES FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS.

Las características fisiológicas sirven para describir, diferenciar e identificar especies, géneros y cepas. Las características más útiles para las identificaciones rutinarias son aquellas que se refieren a la utilización de fuentes de carbono y nitrógeno, requerimientos de factores de crecimiento, crecimiento a elevadas temperaturas y en medios de elevada presión osmótica, formación de metabolitos característicos, y susceptibilidad de la levadura a los antibióticos.

2.12.3.1.- UTILIZACIÓN DE COMPUESTOS DE CARBONO.

- Fermentación de carbohidratos.

Se utilizó para este ensayo el medio basal de WICKERHAM [165], ensayándose los siguientes azúcares: galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, melibiosa, rafinosa, sacarosa y trehalosa. Estos compuestos se prepararon en solución acuosa al 6% (p/v) (12% para la rafinosa), y se esterilizaron por filtración; posteriormente, se añadieron al medio basal estéril, de

modo que la concentración final de los azúcares en el medio era del 2% (4% para la rafinosa). Estos tubos se inocularon con 0.1 ml de una suspensión hecha a partir de 4.5 ml de agua estéril en un tubo de agar de MB crecido con levaduras durante 24-48 horas.

Los tubos se incubaron durante 21 días a 28°C, y la prueba de fermentación se dio por positiva si a lo largo de este periodo se observaba desprendimiento de gas en las campanas DURHAM y cambio de color en los tubos. Las lecturas se realizaron diariamente la primera semana, y luego semanalmente.

- Asimilación de carbohidratos.

En este caso se empleó como medio basal el YNB, ya que en estos ensayos es totalmente necesario usar productos estandarizados con alto grado de pureza, carentes de toda contaminación que pudiera llevar a resultados erróneos. Las sustancias ensayadas en esta prueba como posibles fuentes de carbono fueron: ácido cítrico, ácido succínico, adonitol, almidón soluble, arbutina, celobiosa, D-arabinosa, D-manitol, D-ribosa, D-xilosa, eritritol, galactosa, glicerol, glucosa, inositol, L-arabinosa, L-ramnosa, L-sorbosa, lactosa, maltosa, melecitosa, melibiosa, rafinosa, sacarosa y trehalosa. Estos productos se prepararon al 5% (p/v) (10% para la rafinosa) y el medio basal YNB se preparó concentrado 10 veces; todos ellos se esterilizaron por filtración. De esta forma se prepararon tubos con 5 ml de medio con concentraciones de carbohidrato finales del 0.5 ó 1% (p/v).

La inoculación de estas pruebas se realizó con 0.1 ml de un cultivo crecido en YNB con glucosa al 0.1% (p/v) diluido con YNB hasta obtener una turbidez correspondiente al punto 2 de la escala McFARLAND [114]. Los tubos se incubaron durante 28 días a 28°C, realizándose las lecturas diariamente la primera semana y luego semanalmente.

- Desdoblamiento de la arbutina.

El desdoblamiento de la arbutina es una prueba para evidenciar la actividad β -glucosidasa en las cepas de levaduras. Si existe este enzima, la arbutina se hidroliza liberando hidroquinona, la cual produce color negro al combinarse con las sales férricas solubles incorporadas al medio. Los tubos de medio AAR inclinado se sembraron por estría, y se incubaron durante 5 días a 28°C. El desdoblamiento de la arbutina se evidenció por la aparición de color negro en el medio.

2.12.3.2.- ASIMILACION DE COMPUESTOS NITROGENADOS.

Las levaduras son capaces de utilizar diversas fuentes de nitrógeno, como por ejemplo cadaverina, creatina, creatinina, etilamina, L-lisina, nitrato o nitrito. La capacidad o incapacidad de utilizar nitrato como fuente de nitrógeno como criterio taxonómico es muy importante, ya que muchos géneros se caracterizan por su incapacidad para asimilarlo. Mientras que la asimilación de nitrato sirve tanto para diferenciar géneros como especies, en el caso de la cadaverina, etilamina y L-lisina sólo pueden discriminarse especies. Por ello, nosotros hemos realizado la prueba de la asimilación del nitrato a todas las cepas, mientras que el resto de compuestos de nitrógeno sólo se ha ensayado en aquellas cepas que necesitaban de ese resultado para la adscripción a una especie determinada.

Las pruebas de asimilación se llevaron a cabo según la técnica de observación del crecimiento en medio líquido (WICKERHAM [165]), utilizando como medio basal el YCB. Las fuentes de nitrógeno a ensayar y el medio basal YCB se prepararon concentrados 10 veces, y todos ellos se esterilizaron por filtración. De esta forma se prepararon tubos con 5 ml de medio, añadiendo 0.5 ml de YCB 10 veces concentrado y 0.5 ml de la fuente

de nitrógeno correspondiente 10 veces concentrada a 4 ml de agua estéril. Las concentraciones de las sustancias nitrogenadas en el medio final fueron (en g/l): cadaverina dihidroclorhidrato (0.68), etilamina clorhidrato (0.64), KNO_3 (0.78), L-Lisina (0.56), y NaNO_2 (0.26).

La inoculación de los tubos de asimilación de fuentes de nitrógeno se realizó como los de asimilación de fuentes de carbono, y se procedió de igual forma para la lectura de resultados a lo largo de 21 días.

2.12.3.3.- CRECIMIENTO EN MEDIO LIBRE DE VITAMINAS Y OBSERVACION DE REQUERIMIENTOS VITAMINICOS.

La utilización de la prueba de la capacidad para crecer en un medio mineral carente de vitaminas fue introducida por WICKERHAN (1951). La detección de esta característica ha de realizarse sobre un medio mineral completo, estandarizado y libre de vitaminas, como por ejemplo el VFYB. Sobre este medio basal se pueden ensayar los requerimientos de vitaminas tanto de forma individual como globalizada. Las vitaminas que se prueban normalmente son las siguientes: ácido fólico, ácido p-aminobenzoico, biotina, inositol, niacina, pantotenato cálcico, piridoxina, riboflavina y tiamina.

El medio VFYB se preparó 10 veces concentrado y se esterilizó por filtración, preparándose tubos con 5 ml de medio en el caso de que se empleara para la prueba de crecimiento sin vitaminas. Si se ensayaban requerimientos vitamínicos específicos, se añadía la solución de vitaminas a probar concentrada 10 veces y esterilizada por filtración por separado. Las cantidades de vitaminas en la solución concentrada eran (en mg/l): ácido fólico (0.02), ácido p-aminobenzoico (2), biotina (0.2), inositol (100), niacina (4), pantotenato cálcico (20), piridoxina clorhidrato (4), riboflavina (2), y tiamina clorhidrato (4).

Los tubos se inocularon de igual forma que las pruebas de asimilación de compuestos de carbono, incubándose a 25°C durante 7 días. En algunas ocasiones fue necesario el paso de un asa del cultivo crecido en el tubo a otro igual estéril para confirmar el resultado de la prueba.

2.12.3.4.- CRECIMIENTO EN MEDIO CON ALTAS PRESIONES OSMOTICAS.

Las levaduras aisladas a partir de sustratos con alto contenido en azúcares o en sales son resistentes generalmente a altas presiones osmóticas. Mientras que una gran variedad de cepas es capaz de crecer con concentraciones de glucosa de hasta el 40% (p/p), pocas lo hacen con cantidades del 50 al 70%. La capacidad de crecer con altas concentraciones de azúcar se determina mediante la observación del crecimiento en medio GL, que contiene el 50% (p/p) de glucosa [165]. Los tubos inoculados se incubaron a 28°C durante 21 días.

2.12.3.5.- CRECIMIENTO A DIVERSAS TEMPERATURAS.

La capacidad de crecer a diferentes temperaturas se ensayó en medio MB sólido en tubo inclinado. Estos tubos se incubaron a 37°C y 45°C. Se probaron otras temperaturas cuando la clave de identificación de una cepa así lo requería [165].

El tiempo que duró la incubación fue de 2 a 4 días. Si los resultados no eran claros, se reinoculó otro tubo a partir del dudoso, y se incubó en las mismas condiciones. Los resultados de este segundo tubo se tomaron como definitivos.

2.12.3.6.- PRODUCCION DE ACIDO ACETICO A PARTIR DE LA GLUCOSA.

La mayoría de los cultivos de levaduras producen trazas de ácidos. Cuando se sintetiza gran cantidad de ácido acético, esta propiedad puede emplearse como prueba diagnóstica característica del organismo, siempre y cuando se observe bajo condiciones estandarizadas. Esta prueba se llevó a cabo sobre medio GCC.

La prueba se dio como positiva en el caso de que el CaCO_3 se disolviera por acción del ácido acético producido por el cultivo.

2.12.3.7.- FORMACION DE COMPUESTOS AMILOIDES EXTRACELULARES.

ASCHNER *et al.* (1945) y MAGER y ASCHNER (1947) encontraron que algunas levaduras, bajo condiciones de crecimiento adecuadas, eran capaces de formar polisacáridos extracelulares, que daban color azul o verdeazulado al ponerlos en contacto con una solución de yoduro [165].

La realización de esta prueba se llevó a cabo en el medio YNB de asimilación de la glucosa. Tras los 28 días de incubación, se añadió una gota de solución de lugol a los tubos (KI 2 g, I_2 1 g, H_2O 300 ml). Se consideró la prueba positiva cuando aparecía un color azul.

2.12.3.8.- RESISTENCIA A LA CICLOHEXIMIDA.

WHIFFEN en 1948 fue el primero en informar que las levaduras diferían en su sensibilidad hacia la cicloheximida [165]. Sus resultados indicaron que las levaduras se pueden dividir en tres categorías según su sensibilidad a este antibiótico: las especies muy sensibles son inhibidas por 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; especies moderadamente sensibles son inhibidas con 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$; y especies tolerantes no inhibidas por concentraciones de hasta 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Debido sin embargo a que las cepas pueden adaptarse a concentraciones bajas de cicloheximida, se ensayan dos concentraciones: 100 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ [165].

La resistencia a la cicloheximida se determinó por crecimiento en medio YNB + glucosa (10 g/l) + cicloheximida (100 ó 1000 $\mu\text{g/ml}$, diluída en acetona). Este medio se preparó 10 veces concentrado y se esterilizó por filtración, siendo el volumen final en el ensayo de 5 ml.

Los tubos se sembraron como se indica en el Apartado 2.12.3.1 de este Capítulo para la asimilación de compuestos de carbono, y se incubaron a 28°C durante 21 días y en agitación.

2.13.- TECNICAS PARA LA IDENTIFICACION DE BACTERIAS LACTICAS.

El término "bacterias del ácido láctico" describe un conjunto de organismos que son conocidos principalmente por su capacidad de formar ácido láctico a partir de una fuente de carbono fermentable. Al inicio del siglo XX se observó que este grupo de bacterias no ocupaban hábitats restringidos, y que presentaban características morfológicas y fisiológicas muy diversas. A fin de delimitar estas bacterias dentro de una estructura unificada, ORLA-JENSEN (1919) propuso unos criterios para la demarcación del grupo [323].

Los criterios usados por ORLA-JENSEN para diferenciar taxonómicamente a las bacterias lácticas fueron:

- a) Morfológicos: bacilos o cocos Gram (+) que no forman esporas, y no presentan movilidad excepto determinados casos.
- b) Fisiológicos: presentan un metabolismo fermentativo, que da como producto final principalmente ácido láctico; son catalasa (-), microaerófilas o anaerobias; presentan requerimientos nutricionales,

son quimioorganotrofas y mesófilas.

Aunque la descripción morfológica y fisiológica del grupo, tal como la estableció ORLA-JENSEN, no se ha alterado significativamente, se han realizado revisiones extensas dentro de las divisiones genéricas. Así, de los 6 géneros inicialmente establecidos (*Betabacterium*, *Streptobacterium*, *Thermobacterium*, *Betacoccus*, *Streptococcus* y *Tetracoccus*), sólo el género *Streptococcus* perdura en el actual esquema de clasificación [47]; el resto ha sido incluido en los géneros *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactobacillus*.

Los avances en metodologías y las modernas filosofías sobre clasificación hacen que la taxonomía se halle en fase de constante revisión. Así en la séptima edición del "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (BREED et al. [46]) las bacterias lácticas estaban incluidas en una sola familia; sin embargo, en la octava edición (BUCHANAN y GIBBONS [47]) se distribuyeron en dos familias. En la séptima edición la clasificación se basaba principalmente en las características bioquímicas, mientras que en la octava las morfológicas tenían carácter preferente, creándose dos familias distintas en razón de las mismas: *Streptococcaceae* y *Lactobacillaceae*. La novena edición del "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (SNEATH et al. [316]) mantiene como básicas las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas ya utilizadas en la edición anterior, pero incluyendo criterios más modernos a fin de establecer relaciones dentro del grupo de las bacterias lácticas. Estos criterios son el análisis del rRNA 16S, homología DNA-DNA, análisis de componentes de la pared celular, y movilidad electroforética de las deshidrogenasas del ácido láctico [316, 160]. Afortunadamente la mayoría de especies de interés industrial se encuentra bien definida y su clasificación no requiere el uso de técnicas tan complejas, por lo que los autores que trabajan a niveles de identificación rutinaria optan por la realización de pruebas bioquímicas y morfológicas [160, 307, 323].

La clasificación de las cepas aisladas por nosotros durante las campañas 1982-83, 1983-84 y 1984-85 se ha realizado siguiendo los criterios del "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" [47] y de SHARPE [307]. Ya que en 1986 apareció la obra de revisión taxonómica "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" [316], tanto las cepas ya incluidas en especies como las que no se lograron encuadrar en ninguna, se compararon con las especies descritas en este Manual, a fin de actualizar su clasificación. Dado por otro lado que nuestras cepas provenían de ambientes muy concretos como son mostos y vinos, hemos completado la caracterización de las mismas añadiendo aquellas pruebas utilizadas por otros autores que han aislado bacterias lácticas a partir de las mismas fuentes. Estas pruebas son:

- a) Cambios producidos en la leche tornasolada y en leche tornasolada-glucosa-extracto de levadura, utilizada por GARVIE [133] en la caracterización de *Leuconostoc* y por CHALFAN et al. [79] en la de bacterias lácticas en general.
- b) Crecimiento de las cepas a pHs bajos, tal y como postulan GARVIE [133], CHALFAN et al. [79], MARET y SOZZI [211], SHARPE [307] y DELFINI [99].
- c) Degradación de ácidos orgánicos presentes en mostos y vinos, de gran importancia para los investigadores de bacterias lácticas de la industria enológica según BARRE [19], PEYNAUD y DOMERCQ [246], PEYNAUD y SAPI-S-DOMERCQ [248], GARVIE [133], PILONE y KUNKEE [253], CHALFAN et al. [79], BEELMAN et al. [27] y SHARPE [307].
- d) Crecimiento a diferentes temperaturas, según recomiendan BARRE [19], CHALFAN et al. [79] y SHARPE [307].
- e) Producción de manitol a partir de fructosa, observada por CHALFAN et al. [79] y PILONE y KUNKEE [253].

Las cepas aisladas en nuestros trabajos fueron adscritas a la familia de las bacterias lácticas si cumplían los siguientes requisitos: bacilos o cocos Gram (+), catalasa (-), no esporulados, e inmóviles [47, 323].

Posteriormente, se pasó a la diferenciación primero en género y luego en especie, según los criterios que se señalan a continuación.

2.13.1.- DIFERENCIACION EN GENEROS DE LAS CEPAS DE BACTERIAS LACTICAS.

2.13.1.1.- MORFOLOGIA MICROSCOPICA Y COLONIAL.

Ya que la separación en familias *Streptococcaceae* y *Lactobacillaceae* se basa en la forma de las células, la caracterización microscópica tiene un valor indudable. Nosotros observamos células crecidas en medio MRS durante 3 días, cuando los cultivos eran jóvenes, y al cabo de una semana, para verificar si se producían alteraciones de la forma con el envejecimiento del cultivo. La observación se realizó con un microscopio de contraste de fases Zeiss III, analizando la forma, disposición de las células y tipo de división celular.

La morfología colonial, tanto en estadios jóvenes como en maduros, se observó directamente en las placas de agar MRS mediante la utilización de una lupa binocular Zeiss.

2.13.1.2.- CARACTER HOMO O HETEROFERMENTATIVO.

El carácter homo o heterofermentativo de las cepas de las bacterias lácticas hace referencia a los productos finales de la fermentación de la glucosa, y establece diferencias entre grandes grupos dentro de *Lactobacillaceae* y *Streptococcaceae* [296]. Las cepas homofermentativas convierten la glucosa en ácido láctico con un rendimiento del 85% o superior [323]. Esta conversión la llevan a cabo mediante glucólisis (vía EMBDEN-MEYERHOF) y posterior reducción mediante láctico deshidrogenasas.

Las cepas heterofermentativas fermentan la glucosa por la vía de las pentosas monofosfato, dando como productos finales ácido láctico, CO_2 y etanol en cantidades equimolares [94].

Las cepas homofermentativas se separan de las heterofermentativas observando la producción de gas a partir de la glucosa, según el método de GIBSON y ABD-EL-MALEK en medio HFM [91]. Este medio semisólido cubierto con un tapón de agar al 2% nos muestra la producción de gas por desplazamiento del agar o la producción de burbujas en el medio. Los tubos se inocularon a partir de un cultivo joven crecido en MRS o MLO al 1% de la siguiente forma: las células obtenidas del cultivo crecido se lavaron con suero fisiológico y se inocularon en el medio fundido a 45°C ; tras la homogenización y enfriamiento del medio se depositó el agar al 2% fundido sobre la superficie. Los tubos se incubaron a 28°C y se observó la producción de gas diariamente, hasta un total de 10 días; en algunos casos dudosos o de baja producción de gas, se dejaba otros 10 días para comprobar los resultados.

Para observar este carácter se empleó también el medio de fermentación MRSF. Los tubos se inocularon por duplicado al 1% a partir de un precultivo, crecido en MRS o MLO según los casos, hasta el final de la fase exponencial. Se incubaron a 28°C durante 14 días, observándose diariamente la posible presencia de gas en las campanas.

Para comprobar la validez de los resultados de estas pruebas, éstas se realizaron también con las cepas de colección relacionadas en el Apartado 2.6 de este Capítulo.

2.13.2.- CONFIRMACION DE LA DIFERENCIACION EN GENEROS.

Dado que las observaciones microscópicas no son siempre claras en la distinción de formas bacilares o coccoides, y que el desprendimiento de CO_2 a partir de la glucosa puede pasar desapercibido en cepas poco activas, se presentan a continuación una serie de pruebas que pueden servir para confirmar los resultados observados anteriormente.

2.13.2.1.- NATURALEZA DEL ISOMERO DEL ACIDO LACTICO PRODUCIDO A PARTIR DE LA GLUCOSA.

Esta prueba nos ayuda a distinguir entre cocos y bacilos heterofermentadores, ya que los primeros producen exclusivamente D(-) láctico, mientras que los segundos producen la mezcla racémica DL-láctico [323].

Se investigaron los isómeros ópticos del ácido láctico producido a partir de glucosa por diferentes cepas, mediante la cuantificación de las formas L(+) y D(-) láctico. Para ello las cepas fueron crecidas durante 14 días a 28°C en medio BB. Este medio es idéntico al medio BB descrito por PILONE y KUNKEE [253], excepto que en lugar de extracto de hígado contiene 0.5 g/l de clorhidrato de cisteína como agente reductor. El ensayo se realizó en presencia (0.2 g/l) o ausencia de glucosa en el medio BB, y los tubos se inocularon de la forma que se describe en el Apartado 2.13.1.2 de este Capítulo. Tras la incubación se centrifugaron los cultivos, se eliminaron las células y se utilizó el sobrenadante para realizar las cuantificaciones de isómeros. Las determinaciones de ácido láctico total se realizaron siguiendo el método colorimétrico de PILONE y KUNKEE [252], y el isómero L(+)-láctico mediante el sistema enzimático de Boehringer [38] basado en NOLL [227]. El ácido D(-)-láctico se estimó por diferencia entre

el láctico total y el L(+)-láctico, y para distinguir las cantidades de estos compuestos que eran debidas a la glucosa o a otras fuentes se emplearon los extractos de medios con o sin glucosa.

2.13.2.2.- PRODUCCION DE MANITOL A PARTIR DE FRUCTOSA.

Esta prueba ha sido de gran valor para la diferenciación entre bacterias lácticas homo y heterofermentativas, ya que sólo las heterolácticas producen manitol a partir de la fructosa [47, 79, 120, 166, 167].

La producción de manitol se ensayó siguiendo el protocolo establecido por CHALFAN *et al.* en 1975 [80]. Las cepas se hicieron crecer en el medio PM durante 14 días a 28°C. La inoculación de los tubos se realizó al 1% a partir de un cultivo crecido en MRS o MLO, cuyas células fueron centrifugadas y lavadas con suero fisiológico. Las muestras se trataron con HCl concentrado a fin de eliminar la fructosa, mientras que el manitol no se veía afectado por este tratamiento [80]. La detección de la presencia de manitol en el medio de cultivo se realizó mediante cromatografía en capa fina [80]. Dado que el revelador utilizado por CHALFAN *et al.* [80] presentaba como componente la benzidina y ésta no se comercializa actualmente por ser cancerígena, se probaron dos soluciones reveladoras de azúcares y polialcoholes como alternativas al de CHALFAN *et al.* La primera solución se preparó disolviendo 0.5 g de permanganato potásico en 100 ml de NaOH 1N [279].

Una vez desarrollada la cromatografía y seca, se pulverizó con esta solución y se calentó la placa a 100°C durante 10-20 minutos.

La segunda solución reveladora estaba compuesta por AgNO₃ [279]. Esta solución comprendía dos mezclas que se prepararon de la siguiente manera:

- a) **Solución de pulverización I.** Se añadió 1 ml de solución acuosa saturada de AgNO_3 a 200 ml de acetona, y se adicionaron 5-10 ml de agua, hasta que se disolvió el precipitado formado.
- b) **Solución de pulverización II.** Se disolvieron 20 g de NaOH en la menor cantidad posible de agua, y se enrasó con metanol a un volumen final de 1000 ml.

2.13.2.3.- PRUEBA DE LA DESAMINACION DE LA ARGININA.

Como la observación microscópica no es concluyente para distinguir entre cocos homo y bacilos heterofermentativos, se hace necesaria la realización de otro tipo de ensayos para tal fin, como la prueba de la desaminación de la arginina. Se considera que esta prueba ayuda a la diferenciación entre bacterias homo y heterofermentativas, debido a que el 85% de las cepas capaces de desaminar la arginina son heterolácticas. Este ensayo pues por sí sólo no puede conducirnos a una clasificación segura [282]; sin embargo nosotros la utilizamos a fin de obtener la caracterización fisiológica más completa de nuestras cepas, y de esta forma asegurar una correcta clasificación [79, 99, 211, 307].

La producción de amoníaco a partir de la arginina se determinó usando el medio MRS a pH 4.8 con o sin adición de L-arginina a una concentración final de 0.3% (p/v) [93]. Los tubos se inocularon al 1% con células lavadas y se incubaron a 28°C durante 5 días, tras los cuales la presencia de amoníaco se detectó por la aparición de color rojo tras la adición del reactivo de NESSLER [147].

2.13.3.- PRUEBAS PARA LA INCLUSION DE LAS CEPAS EN ESPECIES.

En base a la morfología y al carácter homo o heterofermentativo de las bacterias lácticas se establecen cuatro grandes grupos de microorganismos: cocos heterofermentativos, cocos homofermentativos, bacilos heterofermentativos y bacilos homofermentativos. Los dos primeros grupos se incluyen dentro de la familia *Streptococcaceae*, y los dos últimos en la familia *Lactobacillaceae*. Dentro de *Streptococcaceae* el carácter homo o heterofermentativo, la naturaleza del ácido láctico producido a partir de la glucosa, y los planos de división de las células nos llevan a la inclusión de las cepas en géneros distintos. En el caso de *Lactobacillaceae* sólo se reconoce el género *Lactobacillus*. Dentro de los géneros las especies se diferencian por medio de pruebas bioquímicas y fisiológicas, y en la actualidad además por criterios moleculares. A continuación describiremos las pruebas más importantes para la inclusión de las cepas a nivel de especies.

2.13.3.1.- CRECIMIENTO A 15°C Y 45°C.

Como ya establecíamos al principio del Apartado 2.13 de este Capítulo, ORLA-JENSEN había utilizado el crecimiento a estas temperaturas para describir los grupos *Betabacterium*, *Streptobacterium* y *Thermobacterium* dentro de los bacilos lácticos [323]. Esta denominación no se utiliza actualmente, pero sin embargo el criterio del crecimiento a 15 y 45°C sí se ha mantenido [19, 79, 307].

Los ensayos de temperaturas se realizaron en medio MRS o MLO inoculados al 1% a partir de un precultivo del mismo medio. Los tubos se incubaron a las temperaturas citadas durante un periodo de 14 días, leyéndose los resultados cada dos.

2.13.3.2.- CRECIMIENTO A DIVERSOS pHs.

La prueba de crecimiento a diferentes pHs es fundamental para la separación en especies dentro de *Pediococcus*, y también importante dentro del género *Leuconostoc*.

Basándonos en los trabajos de GARVIE [133] sobre *Leuconostoc oenos* y de SHARPE [307] y CHALFAN et al. [79] sobre bacterias lácticas en general, hemos establecido los siguientes valores de pH a ensayar: 3.7, 4.2, 4.8, 5.0 y 5.5 [307]. Las pruebas se realizaron en medio MRS y en medio MLO. La modificación del pH de los medios se llevó a cabo con HCl y NaOH, bien 1 ó 10 M. Los tubos se inocularon de igual forma que en el caso anterior, y se incubaron a 28°C durante dos semanas.

2.13.3.3.- ACTIVIDAD DE LOS MICROORGANISMOS SOBRE LA LECHE TORNASOLADA Y SOBRE LECHE TORNASOLADA-GLUCOSA-EXTRACTO DE LEVADURA.

HARRIGAN y McCANCE utilizan esta prueba para la separación de los géneros *Leuconostoc* y *Pediococcus* de los *Streptococcus* lácticos, ya que los dos primeros son bastante inactivos sobre estos medios [147]. Por otro lado, la séptima y octava ediciones del "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" [47, 316] utilizan esta prueba para la caracterización de distintas especies dentro del género *Leuconostoc*, y CHALFAN et al. [79] la emplea como una prueba más en la caracterización de bacterias lácticas aisladas de vinos.

Estas pruebas se realizaron en los medios LT y LTGE, los cuales se inocularon al 1% con células lavadas precultivadas en MRS o MLO. Se incubaron a 28°C durante un periodo de 7 a 14 días. Se observó la producción de ácido por viraje del indicador, de coagulación, de reducción

por desaparición del color, y de gas por formación de burbujas.

2.13.3.4.- CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE 10% DE ETANOL.

Este ensayo es fundamental, junto con el del crecimiento a diversos valores de pH, para la diferenciación de *Leuconostoc oenos* de las demás especies del género [133, 253]. Sin embargo, se realizó también para el resto de las bacterias lácticas aisladas porque se juzgó como una prueba importante para la selección de cepas con características enológicas interesantes.

Las cepas se crecieron previamente en medio MRS, o MLO en el caso de cocos heterofermentativos, hasta final de la fase exponencial. De aquí se inoculó al 1% en medio fresco adicionado del 10% (v/v) de etanol absoluto (esterilizado previamente por filtración). Los cultivos se incubaron a 28°C durante 4 días, observándose diariamente si se había producido crecimiento.

2.13.3.5.- FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS.

En todos los grupos de bacterias lácticas la fermentación de carbohidratos permite la diferenciación de cepas en especies. Los patrones de fermentación pueden ser determinados mediante diversos métodos:

- a) El primero consiste en el ensayo convencional en tubos; éstos contienen un medio basal al cual se le añade la fuente de carbono (esterilizada por filtración) que se desea probar. El medio basal es semisólido o líquido [19, 99, 213, 253], con un indicador de pH para detectar la fermentación de azúcares [133].
- b) El segundo procedimiento para investigar la utilización de carbohidratos es el método de la miniplaca [156], que es más rápido e implica la utilización de menor cantidad de material y de medios [307, 155].

c) Por último, hemos de citar los sistemas de identificación API 50 L [12] y API 50 CH [10], que son de fácil manejo y dan resultados rápidamente. LAFON-LAFOURCADE [183] defiende el uso de la tira 50 L por su rapidez y sencillez de manejo, así como por su fiabilidad en la clasificación de cualquier tipo de bacteria, incluido *Leuconostoc oenos*. Otros autores también han basado la identificación de bacterias lácticas en el sistema API 50 L [72, 211]. Sin embargo, la tira API 50 L ha sido sustituida recientemente por sus fabricantes, debido a que algunos investigadores que la emplearon encontraron que ciertas pruebas fisiológicas presentes en esta tira daban resultados opuestos a los que se conseguían cuando la prueba se realizaba en tubo [296]. La tira 50 CH es un sistema mucho más versátil, y que sirve para la clasificación de microorganismos tales como *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Bacillaceae* y bacterias lácticas. Cuando se aplica esta tira para la clasificación de bacterias lácticas, se utiliza como medio basal MRS, denominándose entonces sistema API 50 CHL [11]. Es el sistema miniaturizado más empleado actualmente para la clasificación de las bacterias lácticas del vino [90, 179, 334]. La tira API 50 CHL, consta únicamente de pruebas bioquímicas de fermentación de carbohidratos, y no hace referencia a las antiguas pruebas fisiológicas específicas para bacterias lácticas que presentaba la 50 L.

Para realizar nuestras investigaciones elegimos el sistema API 50 CHL por su rapidez a la hora de identificar gran número de cepas; las pruebas fisiológicas que no existen en esta tira y que fueron necesarias para la clasificación, se llevaron a cabo en tubo según la metodología descrita anteriormente. La inoculación de la tira API 50 CHL se realizó siguiendo el método establecido en el protocolo descrito por la casa proveedora.

Los cocos heterofermentativos, sin embargo son difíciles de clasificar a causa de que sus necesidades nutricionales son complejas. Esto plantea problemas a la hora de encontrar un medio adecuado para establecer su patrón de fermentación [166]. Como las cepas eran de crecimiento lento, y no desarrollaban su actividad fermentativa en los plazos establecidos por el protocolo de identificación del sistema API 50 CHL, se investigó la fermentación de carbohidratos en tubo de medio FC según los estudios clásicos de GARVIE [133]. En este caso se ensayaron los siguientes azúcares: D-arabinosa, L-arabinosa, celobiosa, dextrina, esculina, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, D-manitol, manosa, melecitosa, melibiosa, rafinosa, ramnosa, ribosa, sacarosa, salicina, L-sorbosa, trehalosa y xilosa. La concentración final de los mismos fue de 20 mg/ml, excepto en el caso de la L-arabinosa que se utilizó a razón de 50 mg/ml [133]. Los tubos se inocularon al 5% con células lavadas en el medio fundido a 45°C, tras lo cual se dejaron solidificar. Los tubos se incubaron a 28°C durante 21 días. Se consideraron como positivos aquéllos que presentaron un viraje de color debido al indicador.

2.13.3.6.- FORMACION DE DEXTRANO A PARTIR DE SACAROSA.

La producción de dextrano a partir de la sacarosa es una prueba útil para establecer diferencias entre las especies de *Leuconostoc* [47, 307, 316].

El método para la realización de esta prueba consiste en hacer crecer la cepa en medio ATB suplementado con un 10% de una solución de sacarosa al 50% (p/v) [133]. Las placas se sembraron por estría y se incubaron en cámara de anaerobiosis con una atmósfera de CO₂ + H₂ durante 14 días a 28°C. La prueba se consideró como positiva cuando se observó una consistencia mucosa en las colonias bacterianas, a consecuencia de la

producción de dextrano.

2.13.3.7.- UTILIZACION DE LOS ACIDOS CITRICO Y MALICO.

La degradación de estos ácidos por parte de las cepas adscritas al género *Leuconostoc* también constituye una prueba de interés taxonómico, dado que sirve para diferenciar especies dentro de este género [27, 47, 79, 155, 253].

La observación de la capacidad de utilización de estos ácidos se realizó en medio basal C, al que se le añadieron los ácidos L-málico o cítrico a una concentración final de 10 g/l [79]. Las respuestas de los microorganismos a estos ácidos se observaron mediante cromatografía en papel [284]. Los tubos se inocularon utilizando la densidad óptica correspondiente al punto 2 de la escala McFARLAND [114], y se incubaron a 28°C durante 1 mes. Se tomaron muestras semanalmente a fin de observar la posible degradación de estos ácidos y la rapidez con la que se realizaba.

2.13.4.- OTRAS PRUEBAS DE CARACTERIZACION.

Completando las pruebas establecidas para la taxonomía de las bacterias lácticas, realizamos otras que pudieran tener interés desde el punto de vista enológico. De esta forma realizamos estudios sobre la velocidad de crecimiento a distintas temperaturas diferentes de las mencionadas (15 y 45°C), y también investigamos la actividad de nuestras cepas sobre otros ácidos orgánicos, distintos de los ya descritos, presentes en mostos y vinos.

Para la elección de las temperaturas a ensayar nos basamos en los estudios de otros autores para caracterizar sus propias cepas: SHARPE

[307], CHALFAN *et al.* [79], BARRE [19], y MARET y SOZZI [211]. Por ello se ensayaron además las temperaturas de 10°C, 25°C y 37°C, siguiendo la metodología explicada en el Apartado 2.13.3.1 de este Capítulo.

Es también importante el conocer la actividad de las bacterias lácticas frente a los ácidos tartárico y fumárico, dado que el primero es el principal ácido presente en el vino, y que además su posible oxidación por parte de estos microorganismos da lugar a ácido acético y a acetoína, que disminuyen la calidad de los vinos [175]. Por otro lado el estudio de la actividad de las bacterias sobre el ácido fumárico es interesante, ya que este ácido puede utilizarse para controlar el crecimiento de las bacterias, estimulándolo o inhibiéndolo [31]. El ensayo de utilización de los ácidos tartárico y fumárico se realizó de forma semejante al de los ácidos cítrico y málico (Apartado 2.13.3.7 de este Capítulo), excepto que en el caso del fumárico el medio que se empleó fue el medio TJ, y la concentración final de este ácido fue de 0.5 g/l [79].

3.- RESULTADOS Y DISCUSION.

3.1.- PARAMETROS FISICO-QUIMICOS.

El seguimiento de los parámetros físico-químicos nos ha permitido conocer cuál es la evolución de los distintos componentes del vino a lo largo de la vinificación. La interpretación de esta evolución en correspondencia con el sistema de vinificación utilizado y con la dinámica de la población microbiana es lo que pasamos a exponer seguidamente.

3.1.1.- VINIFICACIONES DE UVA BOBAL EN LA COOPERATIVA SAN PEDRO.

Los parámetros físico-químicos correspondientes a los diferentes depósitos muestreados a lo largo de 1982 y 1983 se presentan en las Tablas 3 a 16. Las medias de estos valores (Tablas 10 y 16) nos muestran que en 1982 las uvas presentaban un mayor contenido en azúcar y una concentración algo más baja de ácido málico que en 1983. Estas dos características nos informan sobre el grado de madurez de las uvas. RIBÉREAU-GAYON et al. [282] definen la madurez industrial de la uva como el momento en que el contenido en azúcar es máximo. Asimismo, la acidez es un dato muy importante para determinar la madurez. La acidez total del zumo de uva verde es de unos 20 g/l (expresados en g/l de H_2SO_4), la del zumo de uva madura varía entre 4 y

Depósito "A"	Fases				
	I	II	III	IV	VI
Acidez total (g/l)	6.23	6.45	6.27	5.97	5.31
Acidez volátil (g/l)	0.00	0.33	0.46	0.46	0.52
Acido málico (g/l)	2.90	2.10	1.82	1.68	1.50
Azúcares (g/l)	218.70	91.50	61.10	17.80	1.50
Cenizas (g/l)	-	-	-	2.24	1.27
Densidad relativa	1.0929	1.0348	1.0200	1.0000	0.9924
Extracto seco (g/l)	242.20	114.70	83.70	40.40	24.00
Extracto no reductor (g/l)	23.50	23.20	22.50	22.60	22.50
Grado alcohólico	0.00	6.73	9.00	11.77	12.93
Grado Baumé	12.33	4.75	2.83	0.00	0.00
Hierro total (mg/l)	0.50	0.50	1.50	2.00	2.50
Intensidad colorante	1.930	a	a	a	0.928
absorbancia a 420 nm	0.720	a	a	a	0.348
absorbancia a 520 nm	1.210	a	a	a	0.580
pH	3.28	3.20	3.21	3.19	3.37
Polifenoles totales (mg/l)	242.00	235.00	231.00	219.00	218.00
SO ₂ libre (mg/l)	0.00	10.00	10.00	7.00	13.00
SO ₂ total (mg/l)	0.00	83.00	83.00	82.00	115.00
Temperatura (°C)	24.00	23.00	34.00	33.00	17.50

Tabla 3.- Depósito "A". Evolución de los parámetros físico-químicos a lo largo de la fermentación. "-" prueba no realizada. "a" medidas no efectuadas; durante la fermentación no se obtenían resultados fiables.

Depósito "B"	Fases				
	I	II (b)	III	IV	VI
Acidez total (g/l)	6.27		5.81	5.73	5.31
Acidez volátil (g/l)	0.00		0.26	0.39	0.52
Acido málico (g/l)	2.82		1.82	1.68	1.51
Azúcares (g/l)	226.00		58.13	22.98	1.40
Cenizas (g/l)	-		-	2.32	1.48
Densidad relativa	1.0959		1.0182	1.0021	0.9921
Extracto seco (g/l)	249.90		81.30	46.80	24.50
Extracto no reductor (g/l)	23.90		23.17	23.82	23.10
Grado alcohólico	0.00		9.76	12.12	13.33
Grado Baumé	12.69		2.53	0.34	0.00
Hierro total (mg/l)	0.75		1.00	2.50	3.00
Intensidad colorante	1.115		a	a	0.987
absorbancia a 420 nm	0.435		a	a	0.389
absorbancia a 520 nm	0.680		a	a	0.598
pH	3.28		3.25	3.19	3.38
Polifenoles totales (mg/l)	242.00		219.00	194.00	183.00
SO ₂ libre (mg/l)	0.00		7.00	7.03	11.00
SO ₂ total (mg/l)	0.00		108.00	106.00	130.00
Temperatura (°C)	19.00		31.00	33.00	17.50

Tabla 4.- Depósito "B". Evolución de los parámetros físico-químicos a lo largo de la fermentación. "-" prueba no realizada. "a" medidas no efectuadas; durante la fermentación no se obtenían resultados fiables. "b" muestreo no realizado.

Depósito "C"	Fases				
	I	II (b)	III	IV	VI
Acidez total (g/l)	6.12		6.12	5.80	5.55
Acidez volátil (g/l)	0.00		0.33	0.46	0.56
Acido málico (g/l)	1.82		1.68	1.47	1.40
Azúcares (g/l)	223.80		64.49	28.00	2.75
Cenizas (g/l)	-		-	2.59	1.36
Densidad relativa	1.0944		1.0216	1.0045	0.9924
Extracto seco (g/l)	246.20		88.10	52.50	25.80
Extracto no reductor (g/l)	22.40		23.61	24.50	23.05
Grado alcohólico	0.00		9.08	11.92	13.48
Grado Baumé	12.51		3.08	0.68	0.00
Hierro total (mg/l)	0.50		1.00	1.50	4.10
Intensidad colorante	0.976		a	a	0.885
absorbancia a 420 nm	0.366		a	a	0.332
absorbancia a 520 nm	0.610		a	a	0.553
pH	3.28		3.14	3.23	3.29
Polifenoles totales (mg/l)	200.00		201.00	198.00	163.00
SO ₂ libre (mg/l)	0.00		7.00	10.00	12.00
SO ₂ total (mg/l)	0.00		150.00	124.00	128.00
Temperatura (°C)	17.00		31.00	35.00	17.50

Tabla 5.- Depósito "C". Evolución de los parámetros físico-químicos a lo largo de la fermentación. "-" prueba no realizada. "a" medidas no efectuadas; durante la fermentación no se obtenían resultados fiables. "b" muestreo no realizado.

Depósito "D"	Fases				
	I	II (b)	III	IV	VI
Acidez total (g/l)	6.45		5.97	5.97	5.92
Acidez volátil (g/l)	0.00		0.33	0.33	0.52
Acido málico (g/l)	2.57		2.50	1.75	1.67
Azúcares (g/l)	226.00		62.23	21.90	2.40
Cenizas (g/l)	-		-	2.63	1.67
Densidad relativa	1.0962		1.0199	1.0016	0.9921
Extracto seco (g/l)	250.90		86.00	46.20	25.80
Extracto no reductor (g/l)	24.90		23.77	25.30	23.40
Grado alcohólico	0.00		9.80	12.31	13.73
Grado Baumé	12.73		2.82	0.25	0.00
Hierro total (mg/l)	1.00		1.80	3.00	3.75
Intensidad colorante	1.690		a	a	1.170
absorbancia a 420 nm	0.680		a	a	0.480
absorbancia a 520 nm	1.010		a	a	0.690
pH	3.43		3.22	3.39	3.42
Polifenoles totales (mg/l)	261.00		230.00	201.00	201.00
SO ₂ libre (mg/l)	0.00		6.00	10.00	11.00
SO ₂ total (mg/l)	0.00		112.00	103.00	140.00
Temperatura (°C)	14.00		35.00	37.00	17.50

Tabla 6.- Depósito "D". Evolución de los parámetros físico-químicos a lo largo de la fermentación. "-" prueba no realizada. "a" medidas no efectuadas; durante la fermentación no se obtenían resultados fiables. "b" muestreo no realizado.

Depósito "E"	Fases				
	I	II (b)	III	IV	VI
Acidez total (g/l)	6.12		5.81	5.70	5.45
Acidez volátil (g/l)	0.00		0.26	0.33	0.59
Acido málico (g/l)	3.41		2.47	2.18	2.07
Azúcares (g/l)	230.80		63.76	22.12	1.95
Cenizas (g/l)	-		-	2.80	1.88
Densidad relativa	1.0976		1.0201	1.0016	0.9917
Extracto seco (g/l)	254.70		86.50	46.20	25.00
Extracto no reductor (g/l)	23.90		22.74	24.08	23.05
Grado alcohólico	0.00		9.78	12.28	13.83
Grado Baumé	12.90		2.84	0.25	0.00
Hierro total (mg/l)	1.00		1.00	4.00	4.00
Intensidad colorante	1.942		a	a	1.758
absorbancia a 420 nm	0.720		a	a	0.659
absorbancia a 520 nm	1.222		a	a	1.099
pH	3.41		3.23	3.40	3.46
Polifenoles totales (mg/l)	366.00		345.00	263.00	259.00
SO ₂ libre (mg/l)	0.00		7.00	13.00	11.00
SO ₂ total (mg/l)	0.00		115.00	113.00	155.00
Temperatura (°C)	29.50		34.00	38.50	17.50

Tabla 7.- Depósito "E". Evolución de los parámetros físico-químicos a lo largo de la fermentación. "-" prueba no realizada. "a" medidas no efectuadas; durante la fermentación no se obtenían resultados fiables. "b" muestreo no realizado.

Depósito "F"	Fases				
	I	II (b)	III	IV	VI
Acidez total (g/l)	6.20		6.12	5.41	5.45
Acidez volátil (g/l)	0.00		0.39	0.39	0.46
Acido málico (g/l)	3.57		3.27	2.04	2.00
Azúcares (g/l)	234.00		75.82	24.60	1.85
Cenizas (g/l)	-		-	2.30	1.48
Densidad relativa	1.0994		1.0258	1.0020	0.9921
Extracto seco (g/l)	259.40		99.50	47.30	24.80
Extracto no reductor (g/l)	25.40		24.68	22.70	22.95
Grado alcohólico	0.00		9.33	12.31	13.38
Grado Baumé	13.11		3.63	0.33	0.00
Hierro total (mg/l)	1.00		1.70	3.50	3.75
Intensidad colorante	2.360		a	a	1.043
absorbancia a 420 nm	0.960		a	a	0.420
absorbancia a 520 nm	1.400		a	a	0.623
pH	3.37		3.26	3.39	3.42
Polifenoles totales (mg/l)	263.00		253.00	262.00	261.00
SO ₂ libre (mg/l)	0.00		7.00	10.00	14.00
SO ₂ total (mg/l)	0.00		140.00	151.00	175.00
Temperatura (°C)	17.00		33.50	34.00	17.50

Tabla 8.- Depósito "F". Evolución de los parámetros físico-químicos a lo largo de la fermentación. "-" prueba no realizada. "a" medidas no efectuadas; durante la fermentación no se obtenían resultados fiables. "b" muestreo no realizado.

8 g/l (expresados de la misma manera) [240]. La acidez total de un mosto está constituida por tres ácidos principalmente: el ácido tartárico, el ácido málico y el ácido cítrico [282]. La disminución progresiva de la acidez a lo largo de la maduración se explica por el comportamiento de los ácidos tartárico y málico. Mientras que la concentración de ácido tartárico es la misma en un grano verde que en uno maduro, el ácido málico va disminuyendo progresivamente conforme avanza la maduración. Esta disminución se debe a la transformación metabólica que convierte el ácido málico en azúcar. Por ello la cantidad de ácido málico que presentan las uvas al ser vendimiadas nos informa sobre su grado de madurez. PEYNAUD [241] define el índice de madurez como el cociente entre el contenido en azúcares y la acidez total. A mayor índice, mayor grado de maduración.

El pH de los mostos es ligeramente superior en 1983 (3.46) que en 1982 (3.33). Esto está en concordancia con los valores de acidez total. Sin embargo WEJNAR en 1968 [26] demostró que existe una baja correlación entre el pH y la acidez total del vino. Estableció que existía una correlación positiva (0.785) entre la concentración de ácido tartárico y el pH, mientras que la correlación entre el pH y la concentración de ácido málico era negativa (-0.622). Este autor informó que el pH estaba regulado principalmente por el contenido en ácido tartárico y por la relación entre este ácido y la concentración de potasio, y también por la relación entre el ácido tartárico y la alcalinidad de las cenizas [26]. Por ello podemos suponer que el contenido en ácido tartárico en los mostos obtenidos en 1982 era superior al de los mostos de año siguiente, que sin embargo presentaban una mayor concentración de ácido málico.

Las vendimias del año 1983 comenzaron en la misma fecha que las del año 1982; sin embargo todos los mostos muestreados por nosotros en 1982 presentaban un mayor índice de madurez (35.2) que los obtenidos en 1983 (31.4). Esto significa que durante el verano de 1982 la maduración se

Depósito "6"	Fases				
	I	II	III	IV	VI (b)
Acidez total (g/l)	7.35	7.85	6.85	5.97	
Acidez volátil (g/l)	0.00	0.72	0.72	0.72	
Acido málico (g/l)	3.20	2.50	2.01	2.01	
Azúcares (g/l)	238.54	86.60	71.40	22.04	
Cenizas (g/l)	-	-	-	1.58	
Densidad relativa	1.1003	1.0308	1.0233	1.0018	
Extracto seco (g/l)	261.80	111.60	95.10	46.20	
Extracto no reductor (g/l)	23.26	24.90	23.70	23.80	
Grado alcohólico	0.00	8.86	9.88	12.23	
Grado Baumé	13.22	4.34	3.29	0.30	
Hierro total (mg/l)	1.00	1.00	1.00	3.75	
Intensidad colorante	2.010	a	a	a	
absorbancia a 420 nm	0.760	a	a	a	
absorbancia a 520 nm	1.250	a	a	a	
pH	3.28	3.23	3.26	3.42	
Polifenoles totales (mg/l)	316.00	309.00	294.00	289.00	
SO ₂ libre (mg/l)	0.00	16.00	20.00	15.00	
SO ₂ total (mg/l)	0.00	265.00	275.00	176.00	
Temperatura (°C)	16.00	32.00	35.00	29.50	

Tabla 9.- Depósito "6". Evolución de los parámetros físico-químicos a lo largo de la fermentación. "-" prueba no realizada. "a" medidas no efectuadas; durante la fermentación no se obtenían resultados fiables. "b" esta muestra no pudo tomarse debido a que este depósito pasó a rellenar los otros y se agotó completamente.

Medias Bobal Coop. S. Pedro 1982	Fases				
	I	II	III	IV	VI (c)
Acidez total (g/l)	6.39	6.09	6.14	5.79	5.50
Acidez volátil (g/l)	0.00	0.53	0.39	0.44	0.53
Acido málico (g/l)	2.90	2.30	2.22	1.83	1.69
Azúcares (g/l)	228.26	89.10	65.28	22.78	2.00
Cenizas (g/l)	-	-	-	2.35	1.52
Densidad relativa	1.0967	1.0328	1.0213	1.0019	0.9921
Extracto seco (g/l)	252.16	113.15	88.60	46.51	24.98
Extracto no reductor (g/l)	23.89	24.10	23.47	23.83	23.00
Grado alcohólico	0.00	7.80	9.52	12.13	13.45
Grado Baumé	12.78	4.55	3.00	0.31	0.00
Hierro total (mg/l)	0.82	0.75	1.29	2.89	3.52
Intensidad colorante	1.717	a	a	a	1.127
absorbancia a 420 nm	0.663	a	a	a	0.437
absorbancia a 520 nm	1.054	a	a	a	0.690
pH	3.33	3.22	3.22	3.29	3.39
Polifenoles totales (mg/l)	270.00	272.00	253.30	233.00	214.17
SO ₂ libre (mg/l)	0.00	13.00	9.10	10.28	12.00
SO ₂ total (mg/l)	0.00	174.00	140.43	122.14	157.83
Temperatura (°C)	19.50	32.50	33.36	35.67	17.50

Tabla 10.- Media de los vinos Bobal de la Cooperativa en 1982. Evolución de los parámetros físico-químicos a lo largo de la fermentación. "-" prueba no realizada. "a" medidas no efectuadas: durante la fermentación no se obtenían resultados fiables. "b" medias correspondientes a los dos únicos depósitos que se muestrearon en esta fase. "c" medias correspondientes a los seis depósitos que se muestrearon en esta fase.

Parámetros físico-químicos	Fase I			
	N1	N2	N3	N4
Acidez total (g/l)	6.75	5.57	6.75	5.37
Acidez volátil (g/l)	0.00	0.00	0.00	0.00
Acido málico (g/l)	3.00	2.50	4.00	2.70
Azúcares (g/l)	210.00	187.00	193.00	221.00
Densidad relativa	1.0898	1.0812	1.0835	1.0940
Extracto seco (g/l)	231.00	211.50	217.50	245.20
Extracto no reductor (g/l)	21.10	25.00	25.50	25.20
Grado alcohólico	0.00	0.00	0.00	0.00
Grado Baumé	11.95	10.89	11.17	12.46
Hierro total (mg/l)	0.68	0.90	0.73	0.35
Intensidad colorante	1.891	1.980	1.828	2.052
absorbancia a 420 nm	0.726	0.792	0.668	0.820
absorbancia a 520 nm	1.165	1.188	1.160	1.232
pH	3.70	3.31	3.39	3.42
Polifenoles totales (mg/l)	277.00	269.00	283.00	304.00
SO ₂ libre (mg/l)	0.00	0.00	0.00	0.00
SO ₂ total (mg/l)	0.00	0.00	0.00	0.00
Temperatura (°C)	22.00	25.00	32.50	22.00

Tabla 11.- Parámetros físico-químicos correspondientes a los cuatro depósitos muestreados en la Fase I.

Parámetros físico-químicos	Fase II			
	N5	N6	N7	N8
Acidez total (g/l)	5.70	6.03	6.98	6.79
Acidez volátil (g/l)	0.28	0.24	0.32	0.29
Acido málico (g/l)	2.79	2.30	2.77	3.20
Azúcares (g/l)	146.70	136.70	75.10	64.70
Densidad relativa	1.0599	1.0567	1.0309	1.0293
Extracto seco (g/l)	171.90	163.00	99.30	91.50
Extracto no reductor (g/l)	25.20	24.30	24.20	26.80
Grado alcohólico	4.30	4.18	5.26	6.25
Grado Baumé	6.20	7.79	4.35	4.13
Hierro total (mg/l)	0.91	1.20	1.70	0.92
pH	3.32	3.13	3.17	3.19
Polifenoles totales (mg/l)	254.00	322.00	218.00	359.00
SO ₂ libre (mg/l)	7.20	5.40	10.40	4.30
SO ₂ total (mg/l)	103.00	93.30	82.80	107.50
Temperatura (°C)	26.00	31.00	31.00	26.00

Tabla 12.- Parámetros físico-químicos correspondientes a los cuatro depósitos muestreados en la Fase II.

Parámetros físico-químicos	Fase III			
	N9	N10	N11	N12
Acidez total (g/l)	6.49	6.26	6.21	6.39
Acidez volátil (g/l)	0.36	0.41	0.30	0.28
Acido málico (g/l)	2.31	2.30	2.59	2.10
Azúcares (g/l)	58.30	48.00	51.20	58.90
Densidad relativa	1.0195	1.0167	1.0176	1.0240
Extracto seco (g/l)	78.50	73.50	75.60	89.10
Extracto no reductor (g/l)	20.20	25.50	24.40	30.20
Grado alcohólico	7.85	8.50	8.40	7.50
Grado Baumé	2.77	2.38	2.51	3.40
Hierro total (mg/l)	0.23	1.85	2.15	1.17
pH	3.22	3.27	3.25	3.35
Polifenoles totales (mg/l)	216.00	365.00	312.00	362.00
SO ₂ libre (mg/l)	6.50	13.00	8.70	16.30
SO ₂ total (mg/l)	76.00	92.60	100.00	94.70
Temperatura (°C)	29.00	32.00	32.00	31.00

Tabla 13.- Parámetros físico-químicos correspondientes a los cuatro depósitos muestreados en la Fase III.

Parámetros físico-químicos	Fase IV			
	N13	N14	N15	N16
Acidez total (g/l)	6.36	6.23	6.03	6.56
Acidez volátil (g/l)	0.41	0.39	0.43	0.37
Acido málico (g/l)	2.51	2.30	2.84	1.90
Azúcares (g/l)	28.80	17.30	11.80	16.50
Densidad relativa	1.0078	1.0017	1.0007	1.0017
Extracto seco (g/l)	54.60	43.90	37.20	43.60
Extracto no reductor (g/l)	25.80	26.30	25.40	27.10
Grado alcohólico	9.75	11.50	11.00	11.40
Grado Baumé	1.12	0.25	0.10	0.25
Hierro total (mg/l)	1.98	2.16	2.50	3.15
pH	3.28	3.27	3.27	3.35
Polifenoles totales (mg/l)	390.00	242.00	274.00	344.00
SO ₂ libre (mg/l)	13.00	15.20	14.00	11.90
SO ₂ total (mg/l)	57.70	101.30	77.30	87.00
Temperatura (°C)	34.00	32.00	35.00	35.00

Tabla 14.- Parámetros físico-químicos correspondientes a los cuatro depósitos muestreados en la Fase IV.

Parámetros físico-químicos	Fase VI			
	N17	N18	N19	N20
Acidez total (g/l)	6.31	5.63	5.73	5.92
Acidez volátil (g/l)	0.50	0.42	0.49	0.46
Acido málico (g/l)	0.50	2.10	2.56	2.00
Azúcares (g/l)	1.10	1.60	2.76	1.03
Densidad relativa	0.9932	0.9936	0.9939	0.9926
Extracto seco (g/l)	24.00	24.20	27.10	22.40
Extracto no reductor (g/l)	22.90	22.60	24.34	21.37
Grado alcohólico	12.23	11.93	12.63	12.18
Grado Baumé	0.00	0.00	0.00	0.00
Hierro total (mg/l)	3.40	3.80	3.52	3.10
Intensidad colorante	1.932	1.507	1.426	2.123
absorbancia a 420 nm	0.790	0.586	0.531	0.722
absorbancia a 520 nm	1.142	0.921	0.895	1.401
pH	3.55	3.47	3.52	3.46
Polifenoles totales (mg/l)	285.00	252.00	259.00	321.00
SO ₂ libre (mg/l)	12.00	16.20	13.60	12.30
SO ₂ total (mg/l)	97.70	102.50	99.50	89.00
Temperatura (°C)	15.00	15.00	14.50	14.50

Tabla 15.- Parámetros físico-químicos correspondientes a los cuatro depósitos muestreados en la Fase VI.

Parámetros físico-químicos	Fases				
	I	II	III	IV	VI
Acidez total (g/l)	6.11	6.38	6.34	6.30	5.90
Acidez volátil (g/l)	0.00	0.28	0.34	0.40	0.47
Acido málico (g/l)	3.05	2.77	2.33	2.39	1.79
Azúcares (g/l)	202.80	106.30	54.03	18.60	1.62
Densidad relativa	1.0894	1.0442	1.0195	1.0030	0.9933
Extracto seco (g/l)	226.30	131.43	79.18	44.83	24.40
Extracto no reductor (g/l)	24.20	25.13	25.07	26.15	22.80
Grado alcohólico	0.00	5.00	8.06	10.91	12.24
Grado Baumé	11.62	6.12	2.77	0.43	0.00
Hierro total (mg/l)	0.67	1.18	1.35	2.45	3.46
Intensidad colorante	1.938	a	a	a	1.747
absorbancia a 420 nm	0.752	a	a	a	0.656
absorbancia a 520 nm	1.186	a	a	a	1.091
pH	3.46	3.19	3.27	3.29	3.50
Polifenoles totales (mg/l)	283.30	283.30	313.80	312.50	279.30
SO ₂ libre (mg/l)	0.00	6.80	11.13	13.53	13.53
SO ₂ total (mg/l)	0.00	96.70	90.83	80.83	96.90
Temperatura (°C)	25.40	29.00	31.00	34.00	14.75

Tabla 16.- Medias de los valores físico-químicos de los depósitos muestreados en cada fase a lo largo de las fermentaciones. "a" medidas no efectuadas; durante la fermentación no se obtenían resultados fiables.

estas razones los rendimientos en la producción de etanol aumentan conforme progresa la fermentación, puesto que la totalidad del azúcar es transformado por esta vía en etanol. Posteriormente durante las últimas fases de la fermentación el rendimiento vuelve a disminuir. Esto se debe a la carencia de sustrato y a la pérdida de viabilidad que afecta a las transformaciones metabólicas.

La relación existente entre la aireación y el rendimiento en etanol también queda patente al observar los dos tipos de vinificación investigados. Así podemos constatar que en 1982 (Tablas 3 a 10) el máximo rendimiento se obtiene durante la fermentación tumultuosa en el intervalo entre las Fases II y III, que es donde mayor grado de anaerobiosis se genera, y donde también existe mayor carga microbiana. A partir de una densidad relativa media de unos 1.020 el rendimiento en la transformación de azúcar comienza a disminuir. Sin embargo, si observamos los rendimientos medios en la campaña 1983 (Tabla 16), en la que se fermentó por el procedimiento BIDONE, el rendimiento más alto (superior al obtenido en cualquier fase del año 1982) se obtuvo entre las Fases III y IV. Este retraso en la consecución de los mayores rendimientos se explica por las sucesivas adiciones de mostos frescos que sufren los depósitos con la consiguiente aireación y la aportación de levaduras respiratorias presentes en estos mostos añadidos. Una vez finalizadas las adiciones, cesa la aportación de oxígeno y la anaerobiosis actúa potenciando la fermentación. En el sistema BIDONE hay un aporte periódico de mosto fresco, lo que supone una incorporación de nutrientes y una dilución del efecto inhibitor del etanol. Esto hace que la actividad de las células sea más efectiva en cuanto a la transformación de los azúcares en etanol que en el sistema tradicional.

Otro parámetro que evoluciona de forma semejante tanto en la vinificación tradicional como en la vinificación BIDONE es la acidez total.

Este parámetro presenta unos valores medios de 6.48 g/l en tartárico en mostos del año 1982 (Tabla 10) y de 6.11 g/l en los de 1983 (Tabla 16). Durante los primeros momentos de la fermentación hay un ligero incremento de la acidez total, pero luego se observa una disminución progresiva de la misma (Tablas 3 a 16). Durante la fermentación se producen dos fenómenos opuestos que afectan al valor de acidez: por un lado hay un aumento de ácidos orgánicos tales como ácido succínico, ácido láctico y ácido acético, originados durante el metabolismo celular [229]. Por otro lado, la adición de SO_2 a los mostos provoca la formación de H_2SO_3 [229], y el CO_2 desprendido por las levaduras se combina con H_2O para formar otro ácido: H_2CO_3 . La formación de estos ácidos explicaría el incremento inicial en la acidez total, mientras que la disminución posterior se produciría por la pérdida de otros ácidos, tales como el ácido tartárico, el ácido málico y el ácido cítrico presentes originariamente en los mostos. Esta pérdida se debe a dos causas: la precipitación de las sales insolubles de estos ácidos, y la degradación biológica de los mismos por parte de levaduras y bacterias [229]. El contenido en ácido tartárico de un vino es siempre inferior al del mosto de partida. El ácido tartárico, presente en el vino, se encuentra en forma de tartrato ácido de calcio o de potasio. Este último compuesto tiene una baja solubilidad en agua, y además ésta disminuye al aumentar la concentración de etanol [229] y decrecer la temperatura [331]. Durante la fermentación las sales ácidas del ácido tartárico forman cristales insolubles que precipitan, disminuyendo de esta forma el contenido en este ácido en el vino. Los otros dos ácidos mayoritarios en el mosto, el ácido málico y el ácido cítrico, son susceptibles de degradación microbiana, y así se puede rebajar notablemente su concentración, y con ello el valor de la acidez total. A partir de los datos obtenidos es lógico pensar que al inicio de la fermentación el balance de la formación de ácidos supera a la pérdida de los mismos, mientras que posteriormente se

invierte esta tendencia.

De la evolución del pH (Tablas 3 a 16) podemos deducir que el conjunto de los ácidos formados al inicio de la fermentación presenta un mayor grado de disociación, lo que hace que el pH disminuya. Sin embargo, a lo largo de la fermentación la pérdida progresiva de acidez y la sustitución de ácidos más fuertes por otros más débiles explicarían la subida de pH.

El contenido en hierro es bastante semejante en los mostos de 1982 y de 1983 (Tablas 3 a 16), si bien algo más elevado por término medio en 1982 (Tabla 10). La evolución de la concentración del mismo es similar en todos los mostos estudiados: se observa un progresivo aumento en el contenido en hierro a medida que avanza la fermentación. Este enriquecimiento es de origen exógeno. Los tanques en los que se realizó la vinificación de estos vinos eran de cemento armado, y según OREGLIA [229] este material puede ceder hierro y calcio al vino en determinadas ocasiones. Por otro lado, los sinfines, las bocas de mangas, y otros utensilios empleados en el transporte de vino en bodega frecuentemente son de hierro y no se hallan protegidos por pinturas adecuadas. Esto hace que el vino que circula a través de ellos se enriquezca en este metal. Altos contenidos en hierro son peligrosos, ya que si éste se oxida a Fe^{+3} y se combina con iones dihidrógenofosfato, sustancias tánicas o sustancias responsables del color de los vinos, dará lugar a compuestos insolubles que originarán "quebras férricas".

Los parámetros que definen el color y la concentración de polifenoles totales presentan un valor máximo en los mostos recién sangrados (Tablas 3 a 16), ya que es durante la maceración cuando se favorece la disolución y difusión de sustancias tánicas y colorantes. RIRÉREAU-GAYON *et al.* [283] establecen que durante la maceración el comportamiento de los antocianos (pigmentos rojos) y de los taninos no es similar. Durante la maceración son los antocianos los que aumentan más rápidamente en el mosto, alcanzando un

máximo y disminuyendo posteriormente. Sin embargo, los taninos aumentan continuamente, más rápidamente en los primeros momentos y luego más lentamente. A medida que progresa la fermentación los polifenoles van disminuyendo por distintas causas; unos polimerizan o se combinan con las proteínas y sedimentan [229], otros se adsorben sobre sólidos insolubles del mosto o sobre las paredes de las levaduras [283], y otros (como los antocianos) se destruyen por fenómenos de reducción [283]. Todo ello lleva a una disminución de la intensidad colorante de los vinos [283]. Por otro lado TROOST [331] opina que el SO_2 añadido en exceso también tiene un efecto "aclaramiento", pues convierte la materia colorante en un compuesto incoloro.

Ya se han comentado en el Apartado 2.2.4.1 los efectos que la adición de SO_2 provoca en los mostos en fermentación. Este producto se emplea de forma generalizada en las vinificaciones, aunque no siempre se utiliza en las dosis adecuadas. Las adiciones excesivas de SO_2 pueden provocar olores a H_2S y a mercaptano [240], y sabores amargos debido a la formación de etanal [295]. Por otro lado, los posibles efectos negativos sobre la salud [51] han llevado a investigar sobre técnicas de vinificación que permitan una disminución en la cantidad de SO_2 añadido, sin que se vea comprometida la calidad del vino [24, 51, 216, 295]. Durante la campaña 1982 se añadieron a los mostos 200 mg/l de SO_2 (Tabla 2). Esta dosis, algo elevada, fue rebajada a 120 mg/l en el año siguiente. El SO_2 añadido antes del inicio de la fermentación sufre una disminución a lo largo de la misma (Tablas 3 a 16). Esta tendencia es característica de todos los mostos estudiados. El SO_2 se pierde por evaporación, por oxidación a sulfato o reducción a H_2S [35], y por formación de combinaciones estables [271] con productos producidos por el metabolismo de levaduras tales como el acetaldehído [24, 240, 322]. Otros productos secundarios del metabolismo tales como el ácido pirúvico, ácido α -cetoglutárico [299] y sustancias con

función cetona originadas por la oxidación de azúcares [176] también se combinan con el SO_2 , aunque estas combinaciones son inestables y reversibles [216]. Debido a esta causa, observamos que durante el periodo de fermentación tumultuosa, que es donde mayor cantidad de productos secundarios se generan, la proporción de SO_2 libre frente a SO_2 combinado está desplazada hacia este último estado, mientras que hacia el final de la fermentación aumenta algo la fracción libre respecto de la total. Por otro lado, en la vinificación por el sistema BIDONE se observa un mayor porcentaje de SO_2 libre frente al SO_2 total que en la vinificación tradicional (Tablas 3 a 16). En la muestra tomada tras el primer trasiego (Fase VI), se observan unas subidas de la concentración de SO_2 que son debidas a la adición de 20 mg/l (Tabla 2). El efecto que ejerce este producto sobre la flora microbiana lo estudiaremos posteriormente.

Por último, podemos observar que el ácido málico (Tablas 3 a 16) presente en los mostos recién obtenidos, sufre una disminución paulatina durante la fermentación. Este descenso se debe a una posible utilización de este ácido por parte de algunas levaduras. A pesar de que el género *Schizosaccharomyces* [81, 82, 111] es uno de los más activos en la degradación del ácido málico, otras cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* también son capaces de degradarlo [56,112]. Sin embargo, hay autores que también han apreciado capacidad de producción de ácido málico por parte de las levaduras. Así, RADLER y LANG [267] observaron que *Saccharomyces uvarum* puede formar 2 g/l de ácido málico en medio líquido. FATTICENTI et al. [112] cuantificaron esta producción de ácido málico en 8 cepas de la especie *S. cerevisiae*, mientras que BRAVO y REDONDO [44] hallaron que tanto *Saccharomyces ludwigii* como *Saccharomyces ellipsoideus* eran productoras de ácido málico. A pesar de que en nuestras vinificaciones pueda haberse sintetizado ácido málico por algunas de las especies nombradas (también presentes en nuestros mostos), ésto no ha podido ser

detectato, ya que el análisis del contenido en ácido málico hace referencia al contenido total del mismo. Lo que sí podemos asegurar es que la actividad degradadora de este ácido en el mosto en fermentación fue superior a la productora, caso de existir ésta, durante toda la fermentación.

La evolución de la temperatura a lo largo de la fermentación es semejante en ambos tipos de vinificación estudiados (Tablas 3 a 16): los mostos van incrementando progresivamente su temperatura como consecuencia de la liberación de calor por la respiración y fermentación. En principio se podría pensar que este aumento de temperatura sería máximo durante la fermentación tumultuosa, pero el aislamiento térmico que supone el vinificar en depósitos de cemento hace que las calorías se acumulen progresivamente, dando máximos hacia el final de la fermentación alcohólica. El excesivo incremento de la temperatura durante la vinificación de los mostos es un problema que afecta principalmente a los países cálidos. En la zona levantina, es frecuente encontrar que en el momento de iniciar la fermentación, los mostos presentan ya temperaturas iguales o superiores a 30°C [41], mientras que en el curso de la fermentación se llegan a alcanzar los 40°C [215] e incluso a superarlos [41, 50]. Los efectos que las elevadas temperaturas de fermentación tienen sobre los vinos pueden agruparse en efectos físico-químicos directos y efectos sobre la viabilidad, biomasa y metabolismo de los microorganismos.

Dentro de los efectos físico-químicos tenemos que una temperatura alta produce una mayor extracción de color en la vinificación con maceración de crujeos [75, 215], pero también provoca una mayor disolución de materias astringentes (taninos), sobre todo en presencia de alcohol, lo que dará lugar a vinos muy ásperos [215]. Por otro lado, la elevación de la temperatura provoca una mayor tasa de evaporación de etanol [73] y compuestos aromáticos volátiles [31]. Otro efecto negativo a tener en

cuenta es que se produce una oxidación más pronunciada de los compuestos fenólicos del vino [50], con el consiguiente efecto sobre el color y el sabor de los mismos.

En cuanto a los efectos que las altas temperaturas tienen sobre las levaduras podemos agruparlos en: disminución de la viabilidad de las células, disminución de la cantidad máxima de células durante la fermentación [240], y cambios en el metabolismo de las levaduras [37, 50, 52, 73]. Los dos primeros efectos pueden dar lugar a la interrupción de la fermentación antes del agotamiento total de los azúcares, produciendo vinos dulces y por ello susceptibles de alteraciones tanto por bacterias lácticas como por bacterias acéticas. Las paradas de fermentación son un problema que afecta a la mayor parte de las zonas vinícolas de clima cálido [41, 50, 52, 215]. PEYNAUD [240] achaca la pérdida de viabilidad de las células a un fenómeno de agotamiento, producido por una deficiencia en la asimilación de sustancias nitrogenadas y por el efecto sinérgico negativo que ejerce el etanol sobre las levaduras sometidas a elevadas temperaturas [208, 209]. Por su parte, LAFON-LAFOURCADE [175] establece que la síntesis de esteroides, necesarios para la membrana celular, disminuye rápidamente a altas temperaturas. Esta disminución en esteroides podría ser la causa de las paradas de fermentación por encima de los 35°C [194]. Respecto a las diferencias en el número de células que se alcanza cuando se fermenta a diferentes temperaturas, PEYNAUD [240] afirma que a pesar de que a temperaturas más altas el comienzo de la fermentación es más rápido, el número máximo de levaduras que se obtiene es inferior.

La velocidad de las reacciones bioquímicas depende de la temperatura: un aumento de ésta hace que se acelere el proceso; pero a partir de un momento determinado, se produce un efecto negativo (el cual afecta principalmente a los enzimas) que hace disminuir la velocidad. CANTARELLI [52] cita que los mejores rendimientos en la transformación de azúcares en

etanol por parte de las levaduras, se producían alrededor de los 15-17°C, mientras que por encima de los 30°C estos rendimientos disminuían en distinto grado en función de la cepa. Es posible que tanto esta disminución del rendimiento de las levaduras como la pérdida por evaporación, debidos ambos a la influencia de la temperatura, sean responsables de que los rendimientos medios en el sistema tradicional sean inferiores a los del sistema BIDONE. Así, en el sistema BIDONE son necesarios 16.4 g de azúcar para producir un grado alcohólico, mientras que en el tradicional se requieren 16.8 g (Tablas 10 y 16).

La disminución de la capacidad fermentativa originada por las altas temperaturas también podría explicar el mayor contenido en azúcares residuales obtenido en la vinificación tradicional (Tablas 10 y 16). Estas diferencias que relacionan la temperatura y los azúcares residuales han sido constatadas por BISSON *et al.* [37], llegando a la conclusión de que a mayor temperatura, mayor cantidad de azúcares residuales en el medio.

Por otro lado COTTRELL y McLELLAND [73] han observado que, en general, la acidez total de un vino fermentado a temperaturas más altas es menor que la del fermentado a temperaturas más bajas. Este comportamiento también ha sido comprobado por nosotros (Tablas 3 a 16): la vinificación tradicional, donde se alcanzaba mayor temperatura, daba una pérdida media de acidez total de 0.98 g/l, mientras que el sistema BIDONE sólo producía una pérdida de 0.27 g/l. BISSON *et al.* [37] y BACCIONI y CANTARELLI [16] encontraron, por el contrario, un comportamiento inverso, es decir que la acidez total aumentaba al elevarse la temperatura. BISSON *et al.* [37] achacan este fenómeno a una mayor síntesis de ácidos orgánicos provenientes del metabolismo secundario de las levaduras. Nosotros no disponemos de bases suficientes para establecer si las diferencias encontradas en nuestro trabajo se deben exclusivamente a la síntesis de ácidos por las levaduras, o también a fenómenos de precipitación e incluso descomposición biológica

de estos ácidos.

Otros efectos que el exceso de temperatura tiene sobre el metabolismo de las levaduras son: incremento en la síntesis de ácido acético [16, 52], disminución en la producción de ésteres volátiles [16, 37], decrecimiento en la síntesis de ácidos grasos [37], y aumento en la producción de alcoholes superiores [37, 52] y de glicerina [16].

Para paliar los efectos negativos que estos excesos de temperaturas tienen sobre los vinos, la Coopertativa de San Pedro de los Corrales de Utiel cambió el sistema tradicional de vinificación llevado a cabo en 1982, por el sistema BIDONE en 1983. Las ventajas del sistema BIDONE sobre el tradicional, según OREGLIA [229], son las siguientes: una iniciación más rápida de la fermentación, una fermentación más breve y pura, una disminución de la temperatura de fermentación, un buen inicio de la fermentación incluso en vino con bajo contenido en azúcar, y obtención de vinos suaves, afrutados, con baja concentración en ácido acético, de mayor grado alcohólico y de color más intenso y firme. Todas estas ventajas han sido corroboradas por los datos físico-químicos de los mostos elaborados bajo los dos sistemas (Tablas 3 a 16). Con el sistema BIDONE, los vinos obtenidos presentan una acidez volátil media ligeramente inferior a los vinificados tradicionalmente, 0.07 g/l menos (Tablas 10 y 16), el rendimiento alcohólico es mayor, aunque el contenido de etanol en valor absoluto sea menor, y la pérdida de color a lo largo de la fermentación es notablemente inferior.

3.1.2.- VINIFICACIONES DE DISTINTAS VARIEDADES EN LA BODEGA DE LA ESCUELA DE VITICULTURA Y ENOLOGIA.

La evolución de los parámetros físico-químicos a lo largo de la fermentación de mostos procedentes de las variedades Bobal, Garnacha, Macabeo y Tempranillo se halla descrita en las Tablas 17, 18, 19, 20.

Los índices de madurez de estas variedades fueron 40.35 para Garnacha, 39.53 para Tempranillo, y 31.18 para Macabeo. Ignoramos cuál fue el de Bobal, puesto que la primera muestra que tomamos ya se encontraba fermentando, y la relación entre el contenido de azúcares y la acidez total, en estas condiciones, no reflejaba el estado inicial del mosto. Tanto Garnacha como Tempranillo presentaban índices de maduración mayores que los de las uvas vinificadas en la Cooperativa San Pedro.

Los rendimientos en la transformación de azúcares en alcohol son más altos en la vinificación de Tempranillo, algo menores en Garnacha, más bajos todavía en Macabeo, y los más bajos de todos se alcanzaron con Bobal (Tablas 17 a 20). Vamos a tratar de explicar las causas de estas diferencias. El rendimiento más alto se produce en la fermentación de los mostos de Tempranillo, realizada a temperatura controlada de 19°C. Como ya hemos visto en el Apartado anterior, a temperaturas bajas el rendimiento fermentativo de las levaduras es más alto, su actividad metabólica se prolonga durante más tiempo [240], y las pérdidas por evaporación son menores [73]. La vinificación de los mostos de Garnacha dio lugar a rendimientos mayores que los de Macabeo; esto puede deberse a que a estos mostos se les adicionó durante la fermentación 60 mg/l de bentonita como clarificante. OREGLIA [229] establece que esta práctica, lejos de obstaculizar la fermentación, la acelera y además da lugar a incremento en la concentración de etanol. Este aumento es del orden de 0.2 a 0.5 grados alcohólicos y está en estrecha relación con el rendimiento fermentativo.

Bobal EVE 1983	Fases			
	II	III	IV	V
Acidez total (g/l)	5.70	6.31	5.70	5.25
Acidez volátil (g/l)	0.20	0.31	0.47	0.69
Acido málico (g/l)	2.60	2.10	1.77	0.00
Azúcares (g/l)	112.00	60.00	6.70	1.10
Densidad relativa	1.0531	1.0293	0.9982	0.9933
Extracto seco (g/l)	141.80	95.10	28.70	21.30
Extracto no reductor (g/l)	29.80	35.10	22.00	20.20
Grado alcohólico	0.95	5.28	9.50	10.90
Grado Baumé	7.32	4.13	0.00	0.00
Hierro total (mg/l)	0.80	0.80	0.75	0.70
Intensidad colorante	1.381	a	a	1.131
absorbancia a 420 nm	0.531	a	a	0.457
absorbancia a 520 nm	0.850	a	a	0.674
pH	3.50	3.65	3.61	3.70
Polifenoles totales (mg/l)	272.00	260.00	247.00	230.00
SO ₂ libre (mg/l)	0.00	0.00	0.00	0.00
SO ₂ total (mg/l)	0.00	0.00	0.00	0.00
Temperatura (°C)	19.00	19.00	17.00	16.50

Tabla 17.- Vinificación de mostos rosados de Bobal en la Escuela de Viticultura y Enología de Requena ("EVE") en 1983. Evolución de los parámetros físico-químicos a lo largo de la fermentación. "a" medidas no efectuadas; durante la fermentación no se obtenían resultados fiables.

Macabeo EVE 1983	Fases			
	I	III	IV	V
Acidez total (g/l)	6.35	7.61	7.95	7.50
Acidez volátil (g/l)	0.00	0.89	1.25	1.35
Acido málico (g/l)	2.50	2.40	2.00	0.00
Azúcares (g/l)	198.00	72.80	14.60	1.27
Densidad relativa	1.0827	1.0294	0.9994	0.9923
Extracto seco (g/l)	215.40	93.30	33.60	21.40
Extracto no reductor (g/l)	17.40	20.50	19.00	20.10
Grado alcohólico	0.00	6.90	10.10	12.05
Grado Baumé	11.09	4.14	0.00	0.00
Hierro total (mg/l)	0.50	0.52	0.53	0.53
Intensidad colorante	0.517	a	a	0.498
absorbancia a 420 nm	0.365	a	a	0.351
absorbancia a 520 nm	0.152	a	a	0.147
pH	3.64	3.20	3.40	3.75
Polifenoles totales (mg/l)	125.00	124.00	124.00	113.00
SO ₂ libre (mg/l)	0.00	7.30	8.00	9.10
SO ₂ total (mg/l)	0.00	103.50	97.60	95.80
Temperatura (°C)	19.50	23.00	20.50	15.50

Tabla 18.- Vinificación de mostos blancos de Macabeo en la Escuela de Viticultura y Enología de Requena ("EVE") en 1983. Evolución de los parámetros físico-químicos a lo largo de la fermentación. "a" medidas no efectuadas: durante la fermentación no se obtenían resultados fiables.

Garnacha EVE 1983	Fases			
	I	III	IV	V
Acidez total (g/l)	5.18	5.30	5.03	4.98
Acidez volátil (g/l)	0.00	0.23	0.23	0.22
Acido málico (g/l)	1.50	1.50	0.97	0.00
Azúcares (g/l)	209.00	75.40	28.20	1.30
Densidad relativa	1.0899	1.0250	1.0040	0.9912
Extracto seco (g/l)	260.70	97.20	51.20	19.87
Extracto no reductor (g/l)	51.70	21.80	23.00	18.60
Grado alcohólico	0.00	9.23	11.90	13.23
Grado Baumé	11.96	3.55	0.58	0.00
Hierro total (mg/l)	0.70	0.80	0.80	0.87
Intensidad colorante	1.117	a	a	1.288
absorbancia a 420 nm	0.422	a	a	0.585
absorbancia a 520 nm	0.695	a	a	0.703
pH	3.33	3.24	3.30	3.41
Polifenoles totales (mg/l)	267.00	256.00	251.00	239.00
SD ₂ libre (mg/l)	0.00	7.80	8.60	9.50
SD ₂ total (mg/l)	0.00	73.40	74.20	65.30
Temperatura (°C)	23.00	24.50	22.00	19.00

Tabla 19.- Vinificación de mostos rosados de Garnacha en la Escuela de Viticultura y Enología de Requena ("EVE") en 1983. Evolución de los parámetros físico-químicos a lo largo de la fermentación. "a" medidas no efectuadas: durante la fermentación no se obtenían resultados fiables.

Tempranillo EVE 1983	Fases			
	I	III	IV	V
Acidez total (g/l)	5.59	5.65	5.52	5.07
Acidez volátil (g/l)	0.00	0.10	0.14	0.14
Acido málico (g/l)	2.10	1.80	1.70	0.37
Azúcares (g/l)	221.00	67.40	24.10	1.20
Densidad relativa	1.0940	1.0220	1.0009	0.9910
Extracto seco (g/l)	245.20	90.20	43.10	23.70
Extracto no reductor (g/l)	24.20	22.80	20.30	22.50
Grado alcohólico	0.00	9.41	11.92	14.00
Grado Baumé	12.49	3.10	0.07	0.00
Hierro total (mg/l)	0.65	0.78	0.70	0.67
Intensidad colorante	1.025	a	a	1.235
absorbancia a 420 nm	0.399	a	a	0.575
absorbancia a 520 nm	0.626	a	a	0.660
pH	3.55	3.48	3.56	3.65
Polifenoles totales (mg/l)	257.00	263.00	261.00	256.00
SO ₂ libre (mg/l)	0.00	6.50	6.00	8.00
SO ₂ total (mg/l)	0.00	67.00	64.30	63.10
Temperatura (°C)	23.50	18.00	19.00	18.50

Tabla 20.- Vinificación de mostos rosados de Tempranillo en la Escuela de Viticultura y Enología de Requena ("EVE") en 1983. Evolución de los parámetros físico-químicos a lo largo de la fermentación. "a" medidas no efectuadas; durante la fermentación no se obtenían resultados fiables.

OREGLIA explica este favorecimiento de la fermentación porque la bentonita es capaz de eliminar sustancias antibióticas producidas por las levaduras o por *Botrytis cinerea*, y suprime la influencia negativa de restos de pesticidas [229]. Estos efectos de la bentonita pueden explicar también un mayor número de células durante la fermentación de mostos de Garnacha respecto al que encontramos en Macabeo.

Por último, hemos de comentar el caso de la vinificación de Bobal que se realizó sin adición de SO_2 . Aquí los rendimientos fueron bajos, dado que una gran parte de los azúcares del mosto fueron consumidos aeróbicamente por levaduras salvajes (entendiendo como "salvajes" aquéllas distintas de *Saccharomyces*) de metabolismo eminentemente respiratorio, que han persistido en el mosto en ausencia de SO_2 . De esta manera nos encontramos que en la primera fase muestreada teníamos una densidad de 1.0531 y sólo 0.95° de alcohol formados. Generalmente a esta densidad lo corresponde una graduación alcohólica de 4 a 5° alcohólicos.

El pH siguió la misma evolución en tres de las cuatro vinificaciones estudiadas, y es semejante a la que hemos definido en el Apartado anterior para las vinificaciones seguidas en la Cooperativa San Pedro. Durante la fermentación de mostos de Bobal, el pH no descendió y luego aumentó, sino que mantuvo una línea ascendente continua. En este caso, al no haber adición de SO_2 , no se ha producido acidificación del mosto, y el balance entre producción y consumo de ácidos orgánicos por parte de las levaduras parece decantarse por la sustitución de ácidos más fuertes por otros más débiles.

La acidez total también evoluciona en la forma ya explicada en el Apartado 3.1.1 de este Capítulo. Sin embargo, en estos casos parece no cumplirse la relación entre el aumento de temperatura y disminución de la acidez, ya que los mostos fermentados a temperatura ambiente, Garnacha y Macabeo, presentan menor pérdida de acidez que los fermentados a 19°C. Es

posible que temperaturas tan bajas como 19°C y concentraciones alcohólicas de 14.1° en Tempranillo, favorezcan más la precipitación de bitartratos y de esta forma se vea disminuída la acidez total en mayor grado. Por otra parte el aumento excesivo de acidez total en la fermentación de mostos de Macabeo se debió al incremento de ácido acético producido por el metabolismo de ciertas levaduras de las que nos ocuparemos posteriormente.

La acidez volátil evolucionó en la forma acostumbrada, incrementándose la concentración de ácido acético a lo largo de la fermentación, pero sin superar límites peligrosos excepto en el caso de Macabeo, ya comentado. Después de Macabeo, Bobal es la que presenta mayor acidez volátil. Esto se debe posiblemente a que esta vinificación se realizó sin SO₂ y ésto provocó la presencia prolongada de levaduras acetogénicas durante la fermentación [270].

El contenido en hierro de los mostos varió entre 0.5 y 0.8 mg/l (Tablas 17 a 20). En dos de estas vinificaciones no se observó prácticamente ningún enriquecimiento en este metal, ya que los mostos se vinificaron en recipientes de fibra de vidrio que no presenta los problemas de cesión de hierro que pueden presentar los de cemento [229]. En otros dos depósitos: Tempranillo y Garnacha, el contenido en hierro aumenta ligeramente, del orden de 0.17 mg/l en Garnacha y del orden de 0.13 en Tempranillo. Dado que estas vinificaciones se realizaron en depósitos de fibra de vidrio como los otros, no nos es posible pensar en una cesión de hierro por los recipientes de fermentación. Posiblemente el tratamiento con bentonita que han sufrido estos mostos pueda explicar este incremento en hierro. OREGLIA [229] nos habla de la cesión de este metal al emplear bentonita como clarificante.

En cuanto a intensidad colorante hemos de observar dos cosas (Tablas 17 a 20): la intensidad colorante en el primer muestreo de los rosados Tempranillo y Garnacha es menor que en el último muestreo. Esto se debe a

que la primera muestra se tomó antes de que se adicionase el SO_2 al mosto en maceración con los hollejos y los orujos. Es de todos bien conocido el efecto favorable de la disolución de materia colorante que tiene este producto [240]. Por lo tanto tras el primer muestreo hubo un aumento de intensidad colorante. Por otro lado también se produce una disminución de los compuestos fenólicos a lo largo de la fermentación por polimerización, adsorción y precipitación. Esto podemos observarlo en la vinificación de Bobal en la cual la primera muestra se tomó después de la maceración; se constata una disminución de polifenoles y de intensidad colorante en la última muestra. También queda comprobado en la vinificación de Macabéo en la cual no hubo maceración con los orujos, y por tanto no hubo incremento de la intensidad colorante tras la adición de SO_2 .

La adición de SO_2 a estos mostos ha sido siempre inferior a las realizadas en la Cooperativa San Pedro; las cantidades varían de 0 a 100 mg/l (Tabla 2). En todos los casos se observa una disminución progresiva del SO_2 total a lo largo de la fermentación, que es menor en el caso de Tempranillo (Tablas 17 a 20). Esto puede deberse a que la vinificación de este mosto se realizó a 19°C , y las pérdidas de SO_2 por evaporación fueron menores. Por otro lado podemos observar que la proporción de SO_2 libre es menor durante la fermentación tumultuosa, y posteriormente aumenta. Esto se debe a que el metabolismo más activo de las levaduras en esta fase da lugar a compuestos secundarios capaces de combinarse con el SO_2 , tales como ácido pirúvico, ácido α -cetoglutárico y acetaldehído [176, 299], con lo cual la fracción libre del SO_2 es muy reducida. Al final de la fermentación, el agotamiento de los azúcares u otros compuestos capaces de combinarse, aunque en baja proporción con el SO_2 [176], hace que aumente el porcentaje de SO_2 libre. Por otro lado, y confirmando los resultados de CANTARELLI [51], observamos que en vinificaciones realizadas a temperaturas más bajas, la relación SO_2 libre / SO_2 combinado es menor a temperaturas más altas.

Así en la vinificación de Tempranillo la media del SO_2 libre durante la fermentación fue de 10.5%, mientras que en Garnacha y Macabeo fue de 9.3%. El ácido málico en estos mostos variaba de 1.5 g/l en Garnacha hasta 2.6 en Bobal (Tablas 17 a 20). En todos los casos durante la fermentación alcohólica disminuía ligeramente la cantidad de este ácido; la actividad de ciertas levaduras explicaría esta disminución. Sin embargo, observamos que en las últimas fases de la vinificación esta degradación se acrecentaba, y ésto coincidía con el aumento de la población de bacterias lácticas (Figuras 22 a 25). Por ello suponemos que son estos microorganismos los responsables finales de su degradación.

La temperatura en estas vinificaciones ha sido un parámetro controlado en algunos casos, y falta de control en otros. Las diferencias que podemos encontrar en los mostos vinificados a distintas temperaturas son: un mayor rendimiento en etanol (excepto en el caso de Bobal que se vinificó sin SO_2), un mayor contenido en SO_2 libre, menor acidez volátil, y un crecimiento más paulatino y lento de las células de levaduras. Todas estas características abogan por la vinificación a bajas temperaturas.

3.2.- PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS.

Durante 1982 y 1983 se realizaron seguimientos físico-químicos y microbiológicos de varias vinificaciones. En 1982 se tomaron muestras en la Cooperativa San Pedro de los Corrales de Utiel, realizándose un seguimiento de siete depósitos donde fermentaban, por el sistema tradicional, mostos de uva Bobal destinados a la producción de rosados. Dado que se ha demostrado que la microflora puede variar en relación con la localización de los viñedos y con el año y momento de la recolección [141, 258], en 1983 se

continuó muestreando en esta bodega, a fin de establecer si se producían variaciones de los microorganismos asociados a los mostos a lo largo de vendimias sucesivas. Por otro lado en 1983 se estudió también la influencia que el sistema de vinificación podía tener sobre la evolución de la microflora a lo largo de la fermentación. Para ello se compararon los datos de las vinificaciones por el sistema tradicional (1982), con los de las vinificaciones por el sistema BIDONE efectuadas en 1983 en la misma bodega. En 1983 también se caracterizó la influencia que localizaciones distintas de los viñedos tenían sobre la microflora presente en los mostos, comparando los resultados obtenidos en la Cooperativa San Pedro de los Corrales de Utiel con los de la Escuela de Viticultura y Enología de Requena. Finalmente, se analizaron las diferencias en la composición de la microflora presente en los mostos de distintas variedades de uva: Bobal (destinados a rosados), Cabernet-Sauvignon (tintos), Garnacha (rosados), Macabeo (blancos) y Tempranillo (rosados). Estos últimos mostos se vinificaron según el sistema tradicional en la Escuela de Viticultura y Enología en 1983, pero bajo distintas condiciones de fermentación. Los tratamientos de vinificación que sufrieron estos mostos se detallan en la Tabla 2. Esto nos permitió determinar además la influencia que estas condiciones tenían sobre la dinámica de las poblaciones microbianas.

Durante 1982 se observó la evolución del número total de bacterias acéticas, bacterias lácticas, levaduras y mohos. Para las primeras se emplearon dos tipos de medios de cultivo sólidos: AM y MC; para el recuento de bacterias lácticas se eligió la técnica del Número Más Probable en medio líquido, empleando el MSRM adicionado de alcohol feniletílico (concentración final de 3 mg/ml) a fin de evitar el crecimiento de levaduras y bacterias Gram (-) [52]. El recuento de levaduras se realizó en tres medios de cultivo sólidos diferentes: MB y ASD acidificados con ácido cítrico hasta un pH de 3.5, y MB a pH 5.5 y adicionado de difenilo (0.1

mg/ml) para eliminar los mohos [183]. Finalmente, los mohos se contaron una vez crecieron sobre medio MB sin difenilo a pH de 5.5 donde fueron sembradas las muestras.

En el año 1983 se continuó utilizando estas técnicas de recuento, aunque con alguna modificación. En primer lugar se abandonó la idea de realizar un recuento de bacterias acéticas durante la fermentación, dado que a lo largo de los muestreos realizados el año anterior no obtuvimos ninguna evidencia de su existencia en ninguno de los depósitos muestreados. Respecto a los recuentos de levaduras, de los tres medios ensayados para tal fin llegamos a la conclusión de que en MB con difenilo a pH=5.5 era donde aparecía el mayor número de especies distintas (Tabla 21), y además las colonias crecían más rápidamente sobre este medio, y eran de mayor diámetro. Es por ello que se eligió el medio MB a un pH de 5.5 y adicionado de difenilo para realizar los recuentos de levaduras durante 1983, desestimando los otros sistemas por ser menos adecuados, y además porque de esta forma se simplificaba el procesamiento de las numerosas muestras.

3.2.1.- EVOLUCION DE LA MICROFLORA EN LAS VINIFICACIONES DE LA COOPERATIVA SAN PEDRO.

Los resultados de los recuentos obtenidos durante el año 1982 se observan en las Figuras 8 a 15. En ellas se muestra la evolución continua de las poblaciones de bacterias acéticas, bacterias lácticas, levaduras y mohos a lo largo de la fermentación de cada uno de los depósitos muestreados.

En ninguno de los muestreos realizados aparecieron bacterias acéticas. Esto puede deberse a la no idoneidad de los sistemas empleados, cosa poco probable a juzgar por las opiniones de diversos investigadores [58, 327], a

Especies	Medios de cultivo				
	MB (a)	MB (b)	ASD (b)	AM (c)	MC (d)
<i>Aureobasidium pullulans*</i>	+	+	+	+	+
<i>Candida boidinii</i>	-	-	+	+	+
<i>Candida pulcherrima</i>	+	+	+	-	-
<i>Candida stellata</i>	+	+	-	-	-
<i>Hansenula anomala</i>	+	-	-	+	+
<i>Hansenula mrakii</i>	-	-	-	+	+
<i>Kloeckera apis</i>	+	+	-	+	+
<i>Pichia fermentans</i>	+	+	-	+	+
<i>Pichia kluyveri</i>	+	+	+	-	-
<i>Pichia membranaefaciens</i>	+	+	-	-	-
<i>Rhodotorula rubra</i>	+	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i>	+	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>capensis</i>	+	-	-	+	+
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>cerevisiae</i>	+	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>chevalieri</i>	+	+	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>steineri</i>	+	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>uvarum</i>	-	+	-	-	-
<i>Sporobolomyces roseus</i>	+	-	-	-	-

Tabla 21.- Aparición de especies de levaduras sobre distintos medios de cultivo. "a" adicionado de difenilo 0.1 mg/ml. "b" acidificado hasta pH=3.5 con ácido cítrico al 10%. "c" medio agar manitol para el recuento de bacterias acéticas. "d" medio de Carr para el recuento de bacterias acéticas. "+" crecimiento observado. "-" crecimiento no observado. *Esta especie no está considerada como levadura en las actuales claves taxonómicas.

Deposito "A"

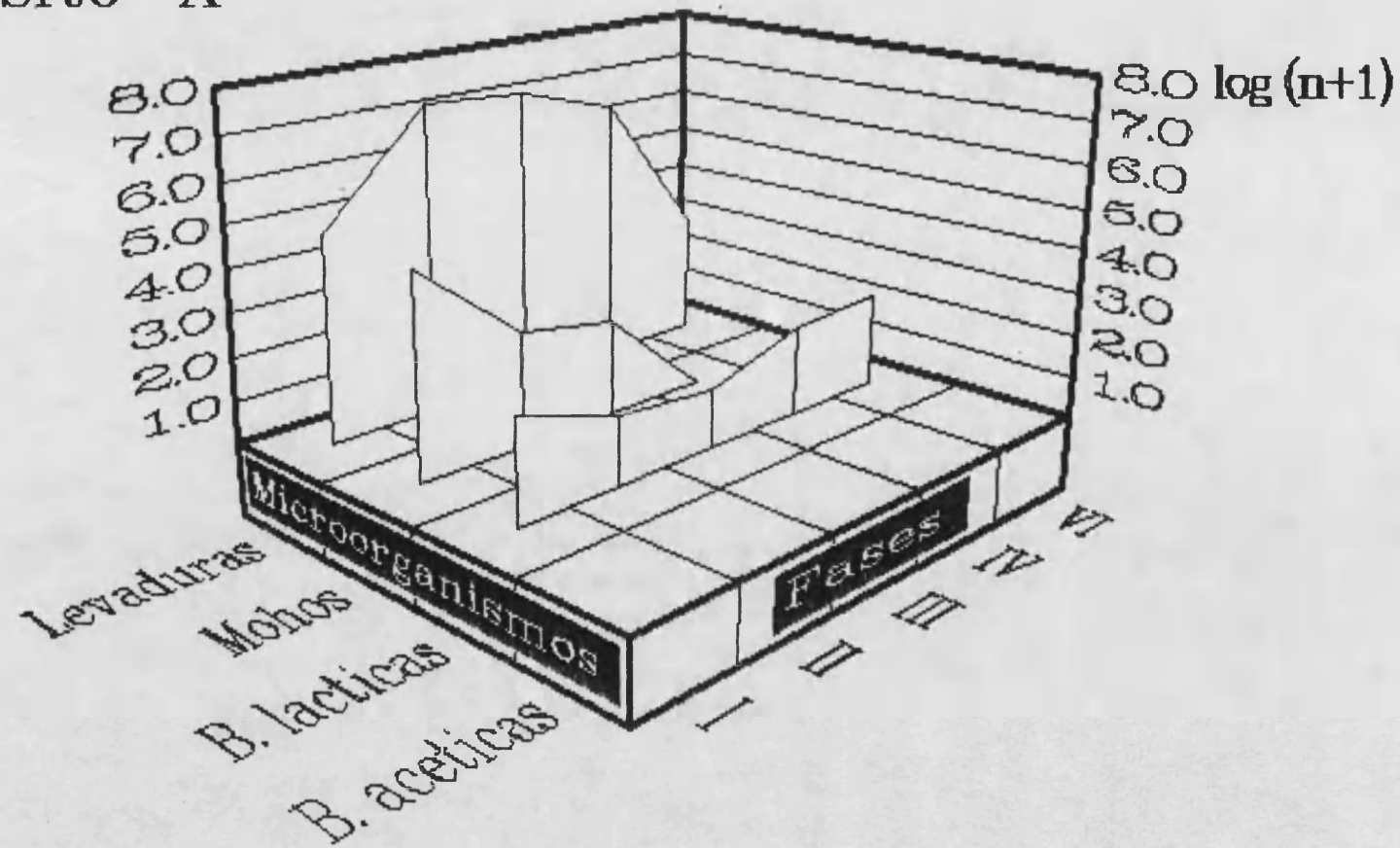


Figura 8.- Evolución de la microflora en el depósito A. Vinificación de uva Bobal por el sistema tradicional. (Cooperativa San Pedro), campaña 1982. Los recuentos de bacterias acéticas, levaduras y mohos se expresan como $\log(n+1)$ siendo "n" el número de ufc/ml. El recuento de bacterias lácticas se expresa de igual forma, pero en este caso "n" representa el Número Más Probable de células por ml.

Deposito "B"

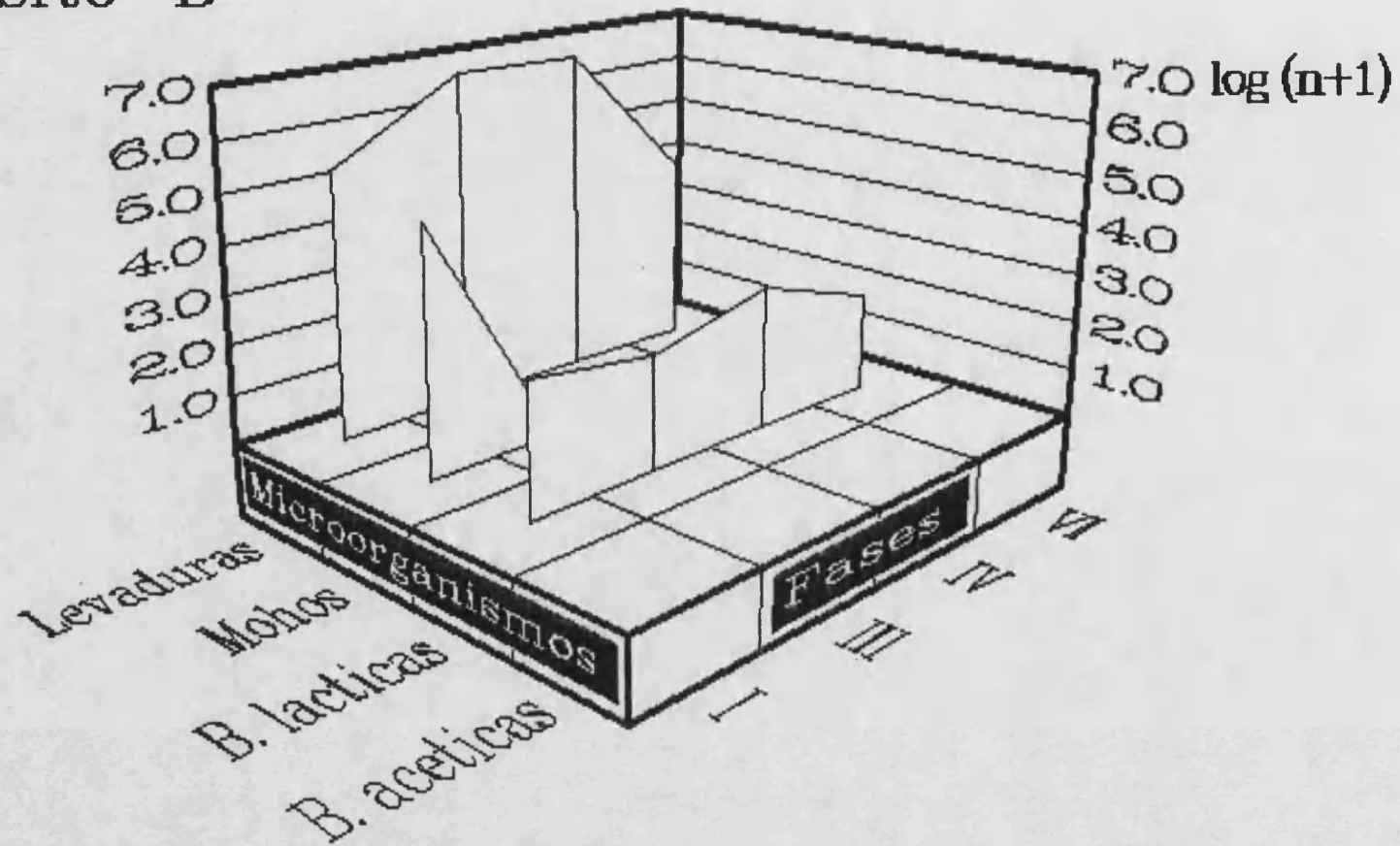


Figura 9.- Evolución de la microflora en el depósito B. Vinificación de uva Bobal por el sistema tradicional. (Cooperativa San Pedro), campaña 1982. Los recuentos de bacterias acéticas, levaduras y mohos se expresan como $\log(n+1)$ siendo "n" el número de ufc/ml. El recuento de bacterias lácticas se expresa de igual forma, pero en este caso "n" representa el Número Más Probable de células por ml.

Deposito "C"

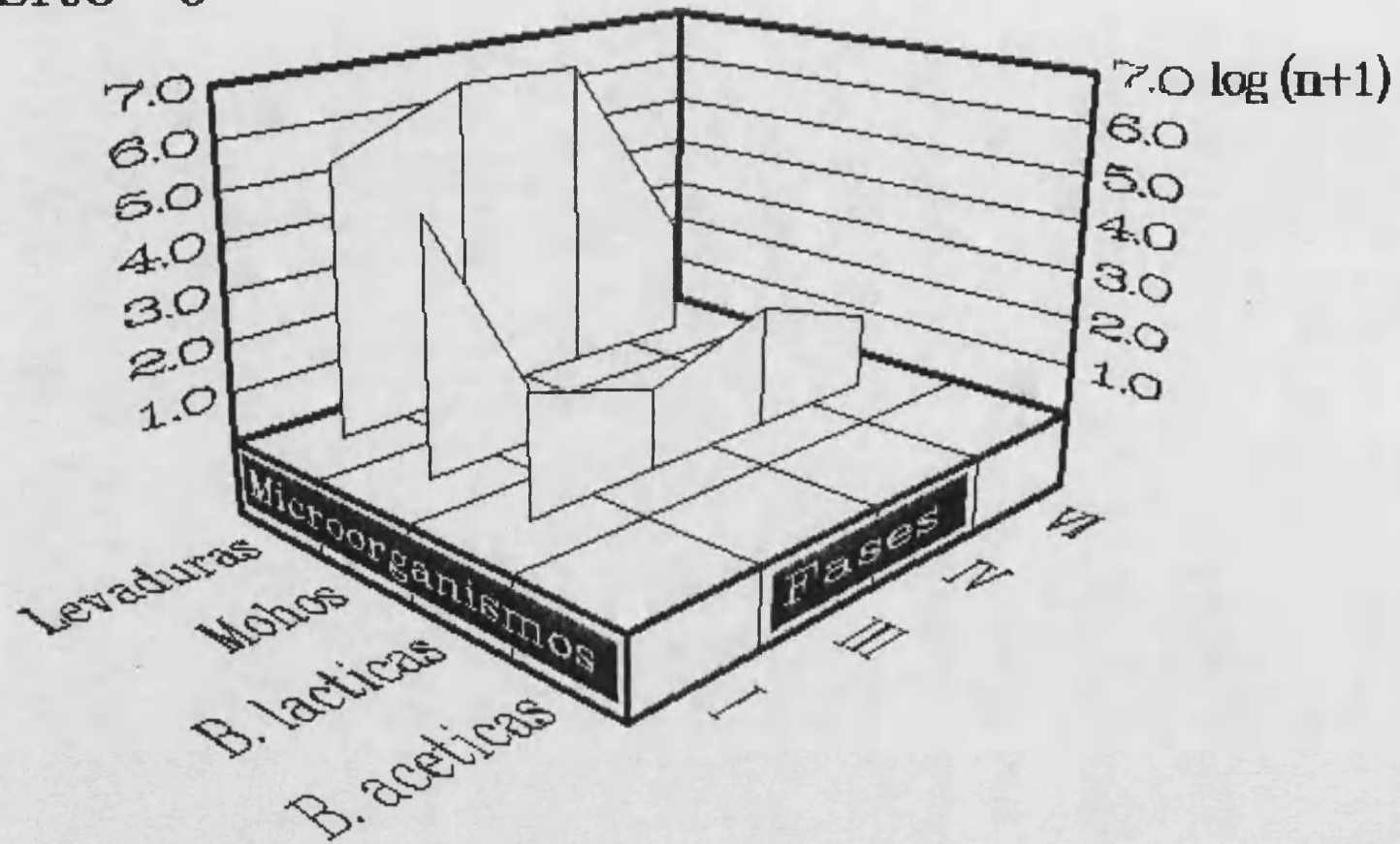


Figura 10.— Evolución de la microflora en el depósito C. Vinificación de uva Bobal por el sistema tradicional. (Cooperativa San Pedro), campaña 1982. Los recuentos de bacterias acéticas, levaduras y mohos se expresan como $\log(n+1)$ siendo "n" el número de ufc/ml. El recuento de bacterias lácticas se expresa de igual forma, pero en este caso "n" representa el Número Más Probable de células por ml.

Deposito "D"

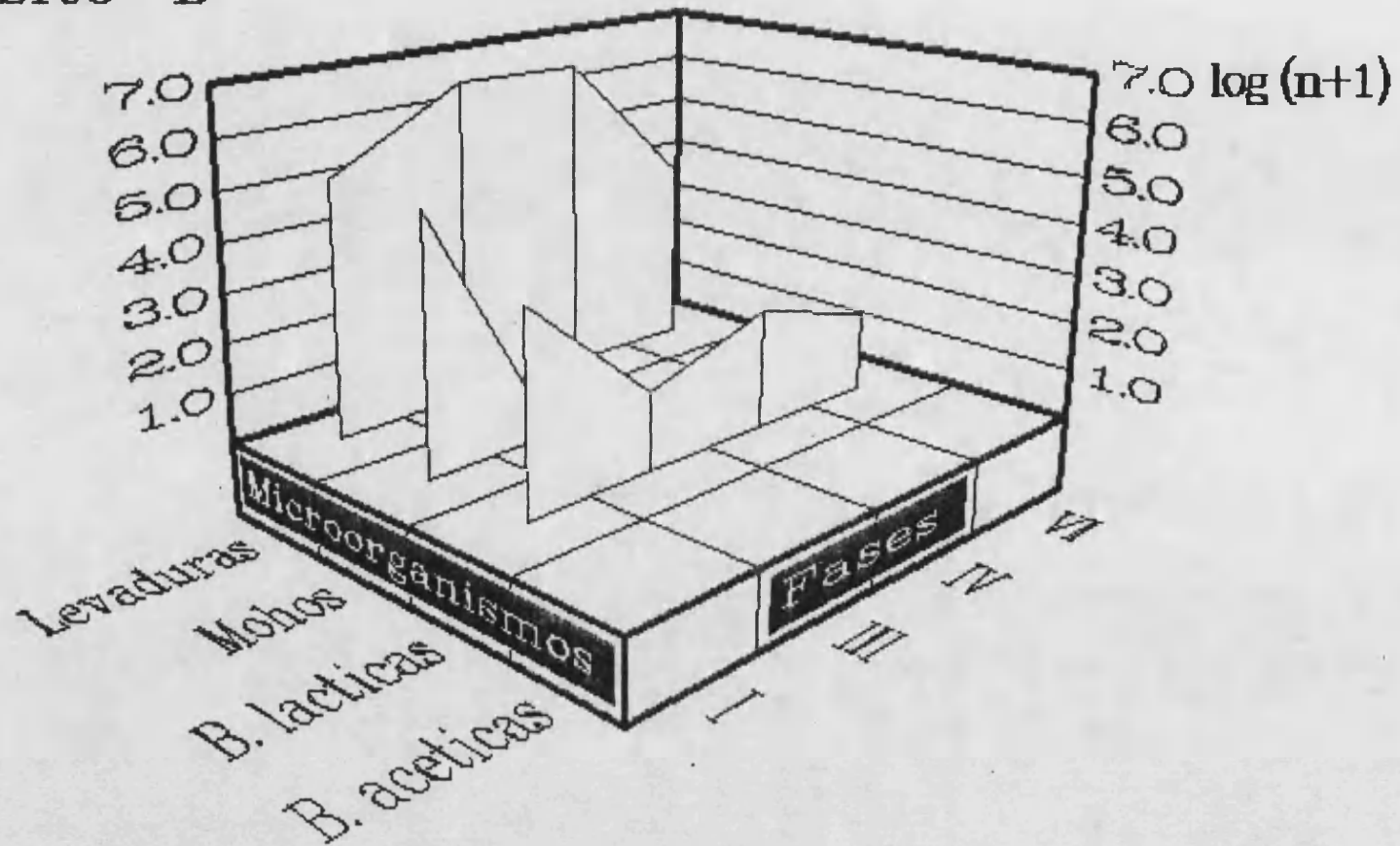


Figura 11.- Evolución de la microflora en el depósito D. Vinificación de uva Bobal por el sistema tradicional. (Cooperativa San Pedro), campaña 1982. Los recuentos de bacterias acéticas, levaduras y mohos se expresan como $\log(n+1)$ siendo "n" el número de ufc/ml. El recuento de bacterias lácticas se expresa de igual forma, pero en este caso "n" representa el Número Más Probable de células por ml.

Deposito "E"

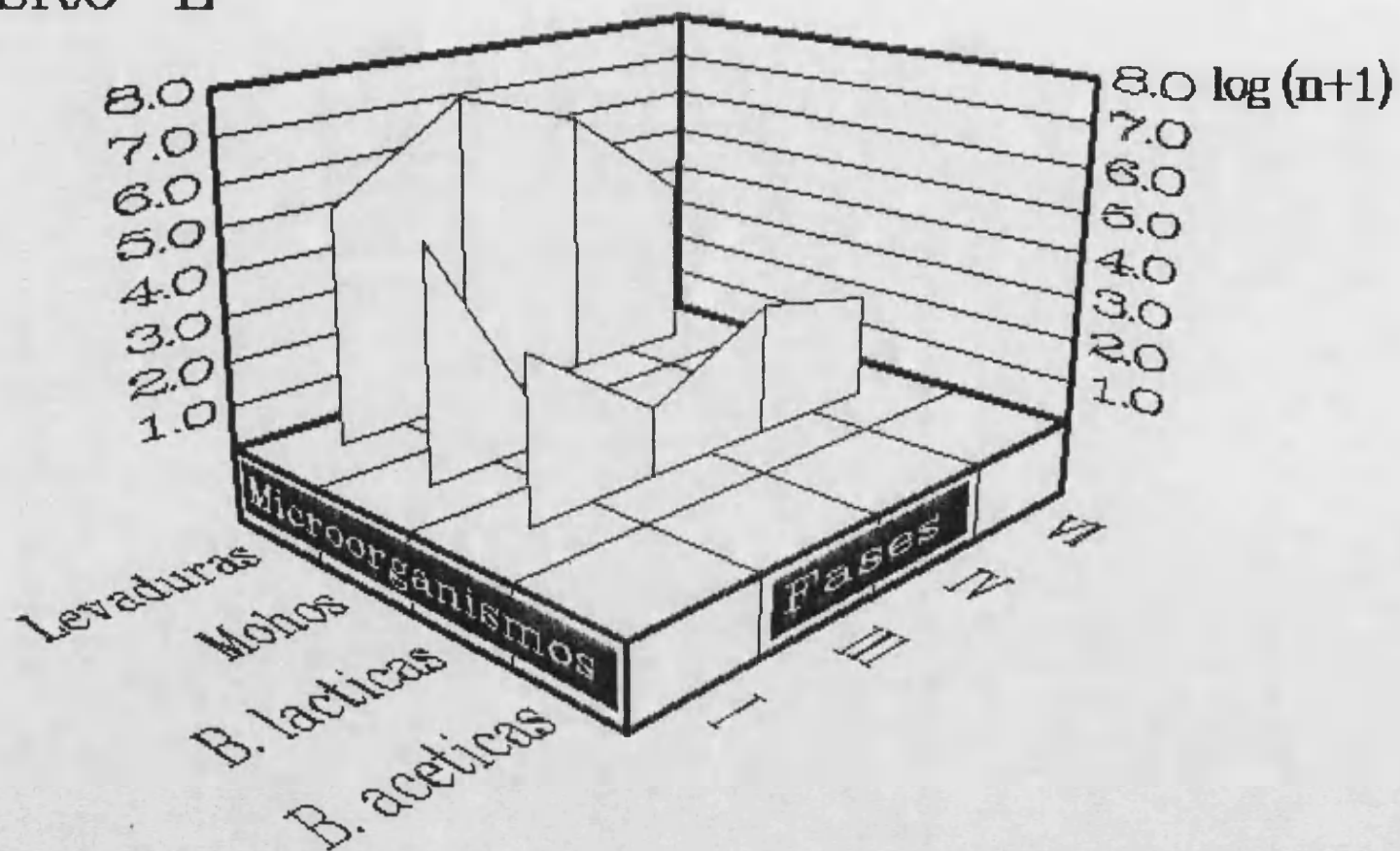


Figura 12.- Evolución de la microflora en el depósito E. Vinificación de uva Bobal por el sistema tradicional. (Cooperativa San Pedro), campaña 1982. Los recuentos de bacterias acéticas, levaduras y mohos se expresan como $\log(n+1)$ siendo "n" el número de ufc/ml. El recuento de bacterias lácticas se expresa de igual forma, pero en este caso "n" representa el Número Más Probable de células por ml.

Deposito "F"

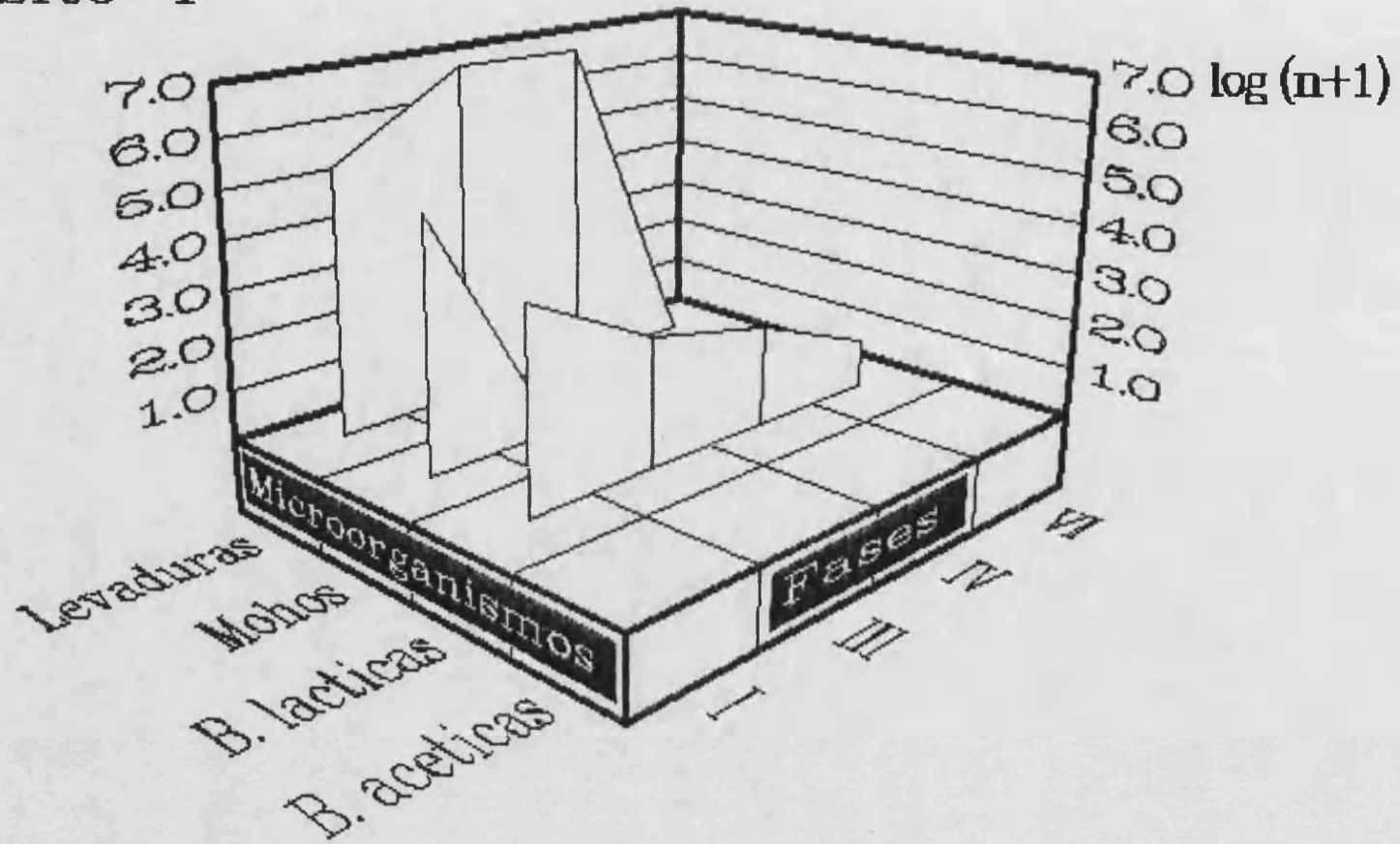


Figura 13.- Evolución de la microflora en el depósito F. Vinificación de uva Bobal por el sistema tradicional. (Cooperativa San Pedro), campaña 1982. Los recuentos de bacterias acéticas, levaduras y mohos se expresan como $\log(n+1)$ siendo "n" el número de ufc/ml. El recuento de bacterias lácticas se expresa de igual forma, pero en este caso "n" representa el Número Más Probable de células por ml.

Deposito "G"

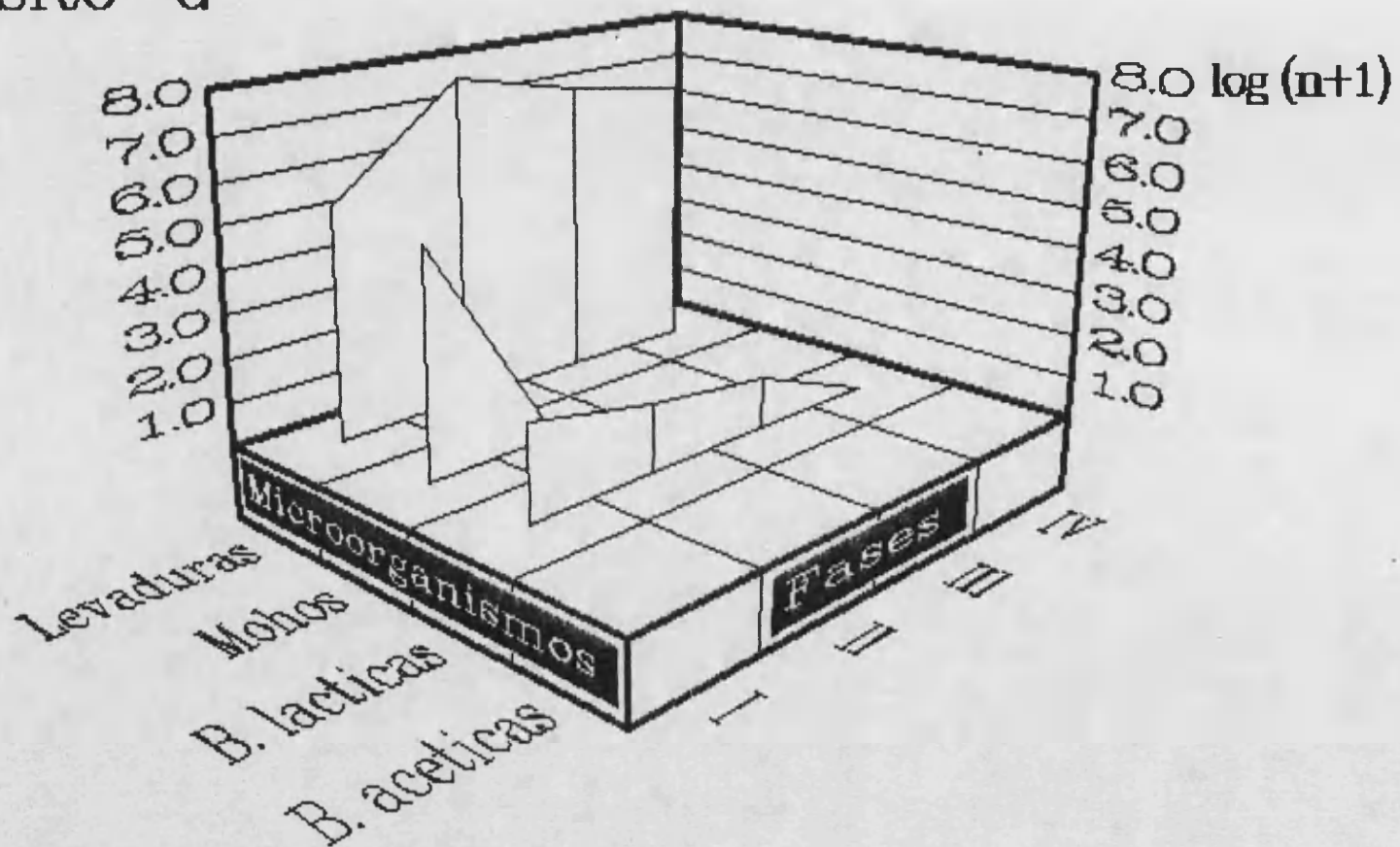


Figura 14.- Evolución de la microflora en el depósito G. Vinificación de uva Bobal por el sistema tradicional. (Cooperativa San Pedro), campaña 1982. Los recuentos de bacterias acéticas, levaduras y mohos se expresan como $\log(n+1)$ siendo "n" el número de ufc/ml. El recuento de bacterias lácticas se expresa de igual forma, pero en este caso "n" representa el Número Más Probable de células por ml.

Medias Coop. 1982

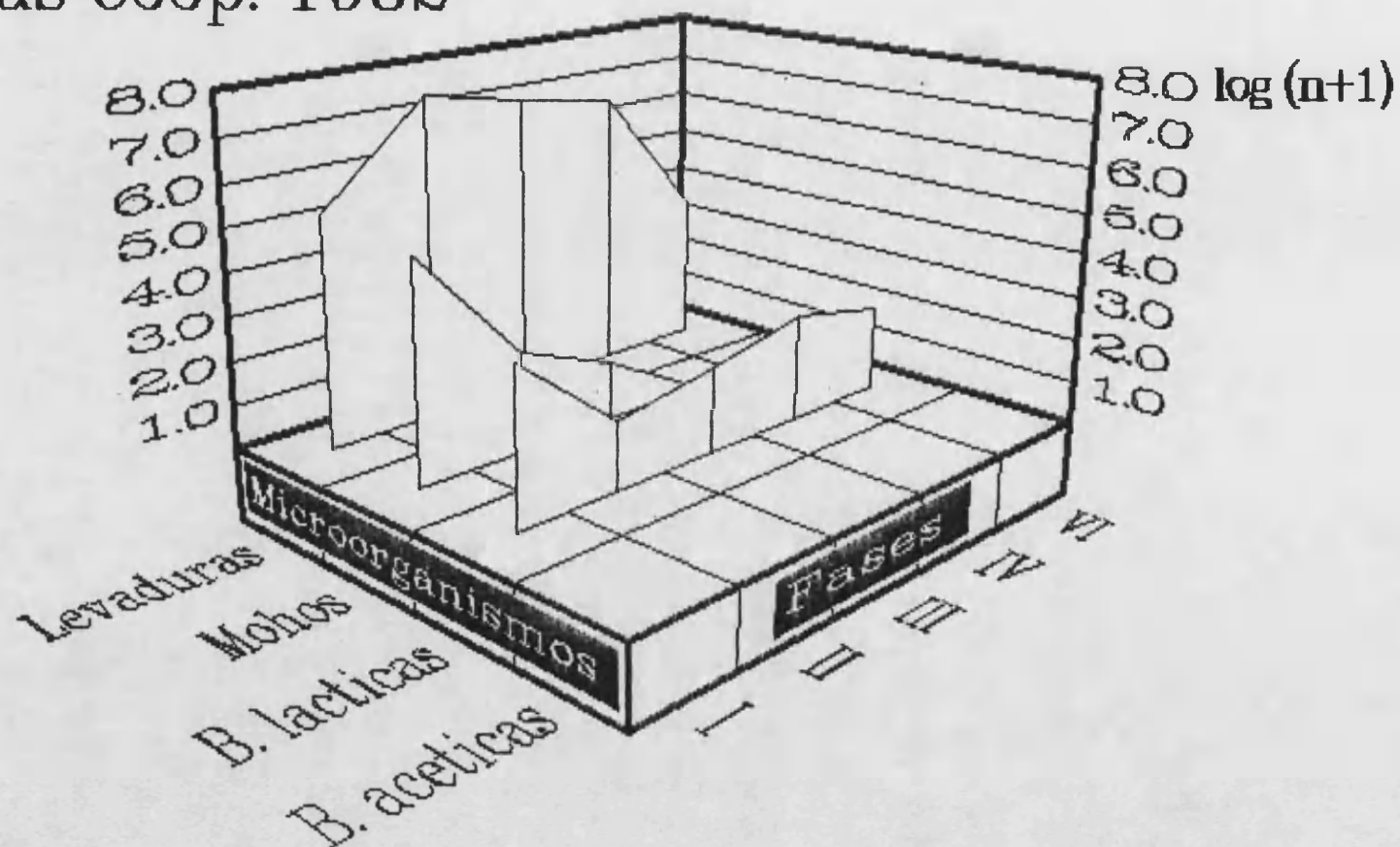


Figura 15.- Evolución de la microflora durante la vinificación tradicional.(Cooperativa San Pedro), campaña 1982. Los datos de la figura representan las medias de los valores obtenidos a partir de los depósitos muestreados en cada fase. Los recuentos de las bacterias acéticas, levaduras y mohos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. El recuento de bacterias lácticas se expresa de igual forma, pero en este caso "n" representa el Número Más Probable de células por ml.

la ausencia total de bacterias acéticas en todas las muestras procesadas, o a una concentración de las mismas inferior a la permitida por la sensibilidad del método. Esta ausencia podría explicarse por la fuerte sulfitación a la que fueron sometidos estos mostos: es bien sabido que las bacterias Gram (-) son muy sensibles a él [24].

En mostos recién sangrados sin sulfitar, encontramos que el número de bacterias lácticas era bajo, del orden de 4×10^3 células por mililitro por término medio (Figura 15). Estos resultados son coincidentes con los de muchos otros autores [72, 91, 175, 179]. Por otro lado, observamos que la concentración de bacterias lácticas en los mostos no era homogénea (Figuras 8 a 21), sino que variaba entre 150 y 11000 células por mililitro. Esto puede deberse a diferencias en la concentración de flora láctica sobre las uvas. RIBÉREAU-GAYON [282] nos habla de que la distribución de bacterias lácticas en los viñedos es irregular, y por esta causa mostos procedentes de un mismo campo de cultivo pueden en algunos casos llevar a cabo la fermentación maloláctica, cuando el inóculo aportado por las uvas es suficiente, y en otros no. Los datos obtenidos de los vinos en plena fermentación nos llevan a la conclusión de que el número inicial de bacterias lácticas disminuye rápidamente en los primeros días, y sigue descendiendo paulatinamente durante toda la fermentación. Esta disminución se puede deber a varias causas: en principio, los bajos pHs con los que las bacterias entran en contacto al pasar al mosto: a pH más bajo desaparecerán mayor número de bacterias lácticas [282]; en segundo lugar, al efecto negativo que el SO_2 ejerce sobre gran parte de la población bacteriana [179, 221, 270]; en tercer lugar, al progresivo incremento en etanol que sufre el mosto lo que hace que aquellas cepas más sensibles desaparezcan [72, 175, 179]; y en cuarto lugar a la competencia con levaduras, ya que éstas influyen negativamente sobre el crecimiento de las bacterias lácticas [28, 121]. Hacia el final de la fermentación alcohólica (Figuras 8 a 21),

Fase I

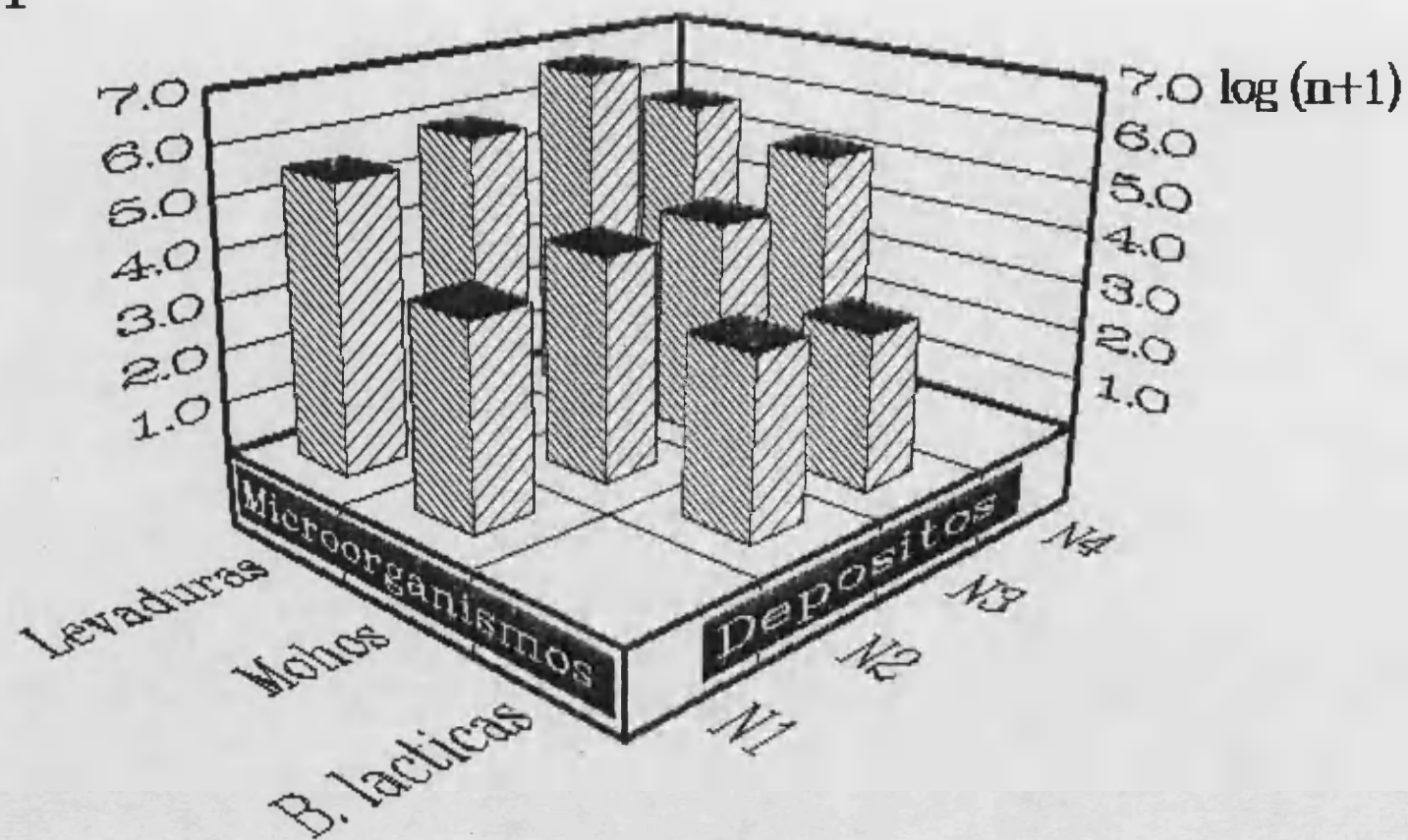


Figura 16.- Microorganismos asociados a mostos sin sulfitar (Fase I). Vinificación de uva Bobal sistema Bidone. (Cooperativa San Pedro), campaña 1983. Los recuentos de levaduras y mohos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. El recuento de bacterias lácticas se expresa de igual forma , pero en este caso "n" representa el Número Más Probable de células por ml. El recuento de bacterias lácticas se realizó solo en dos depósitos, mientras que los otros microorganismos se estudiaron en cuatro de ellos.

Fase II

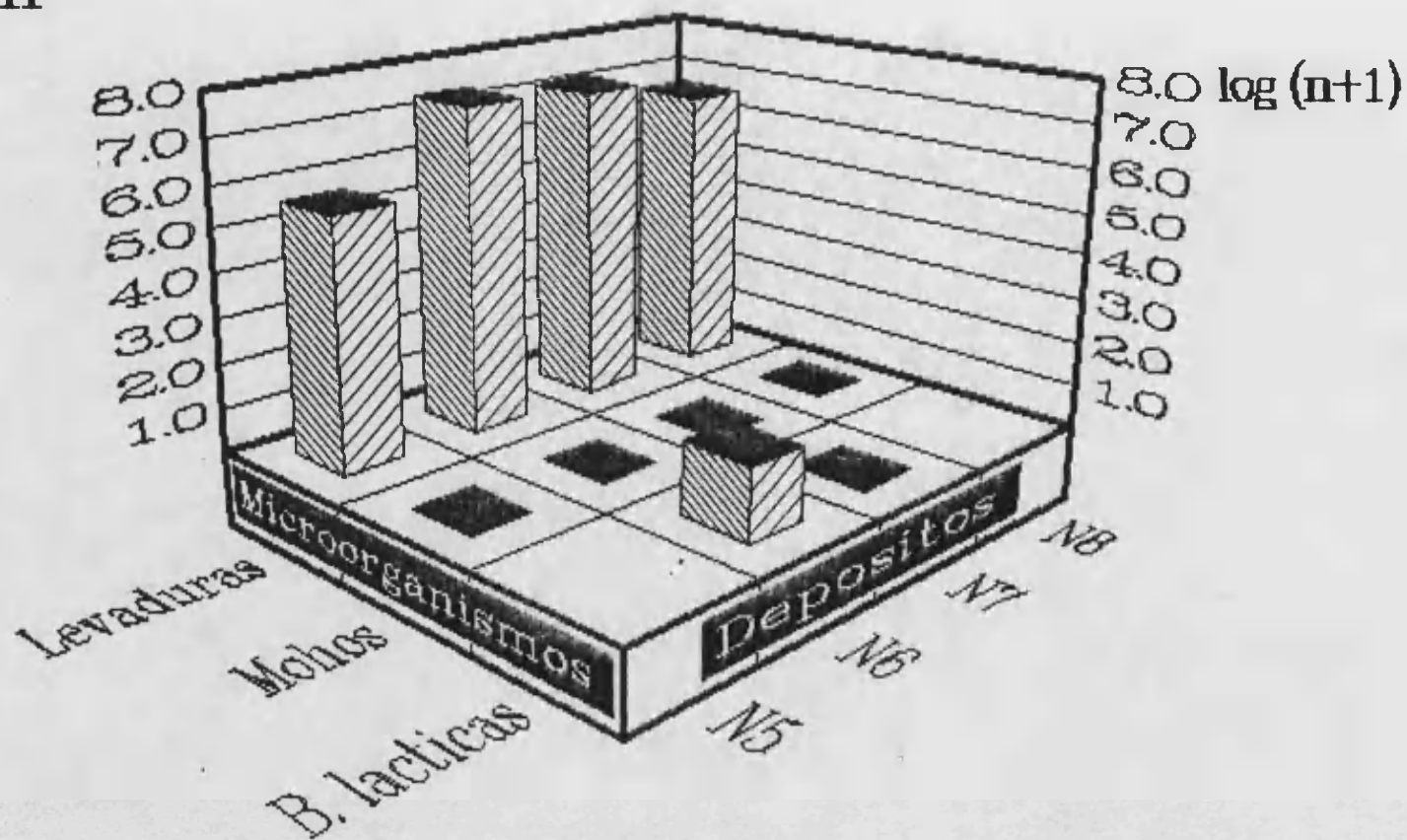


Figura 17.- Microorganismos asociados a mostos en plena fermentación tumultuosa (Fase II). Vinificación de uva Bobal sistema Bidone. (Cooperativa San Pedro), campaña 1983. Los recuentos de levaduras y mohos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. El recuento de bacterias lácticas se expresa de igual forma, pero en este caso "n" representa el Número Más Probable de células por ml. El recuento de bacterias lácticas se realizó solo en dos depósitos, mientras que los otros microorganismos se estudiaron en cuatro de ellos.

Fase III

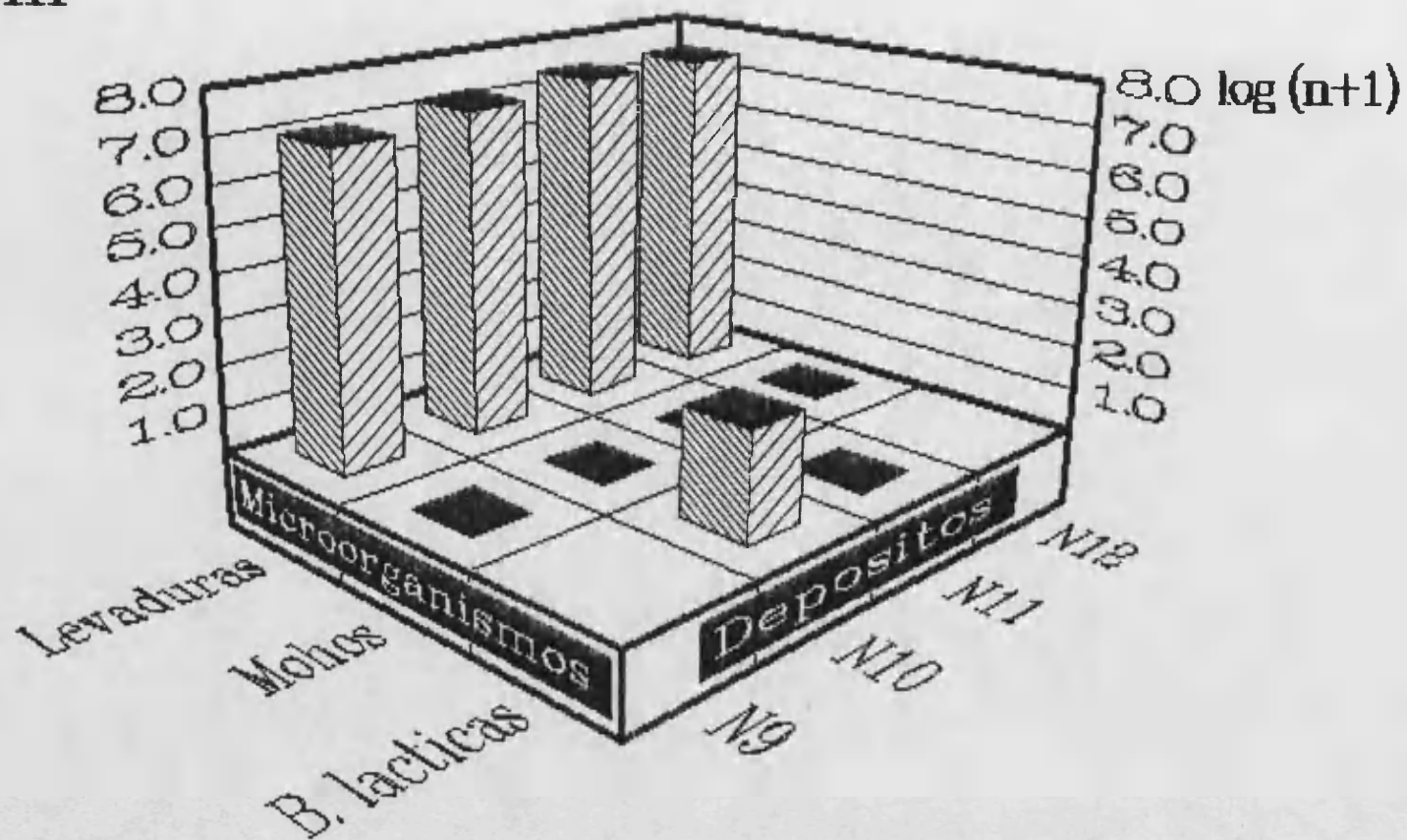


Figura 18.- Microorganismos asociados con el final de la fermentación tumultuosa (Fase III). Vinificación de uva Bobal sistema Bidone. (Cooperativa San Pedro), campaña 1983. Los recuentos de levaduras y mohos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. El recuento de bacterias lácticas se expresa de igual forma, pero en este caso "n" representa el Número Más Probable de células por ml. El recuento de bacterias lácticas se realizó solo en dos depósitos, mientras que los otros microorganismos se estudiaron en cuatro de ellos.

Fase IV

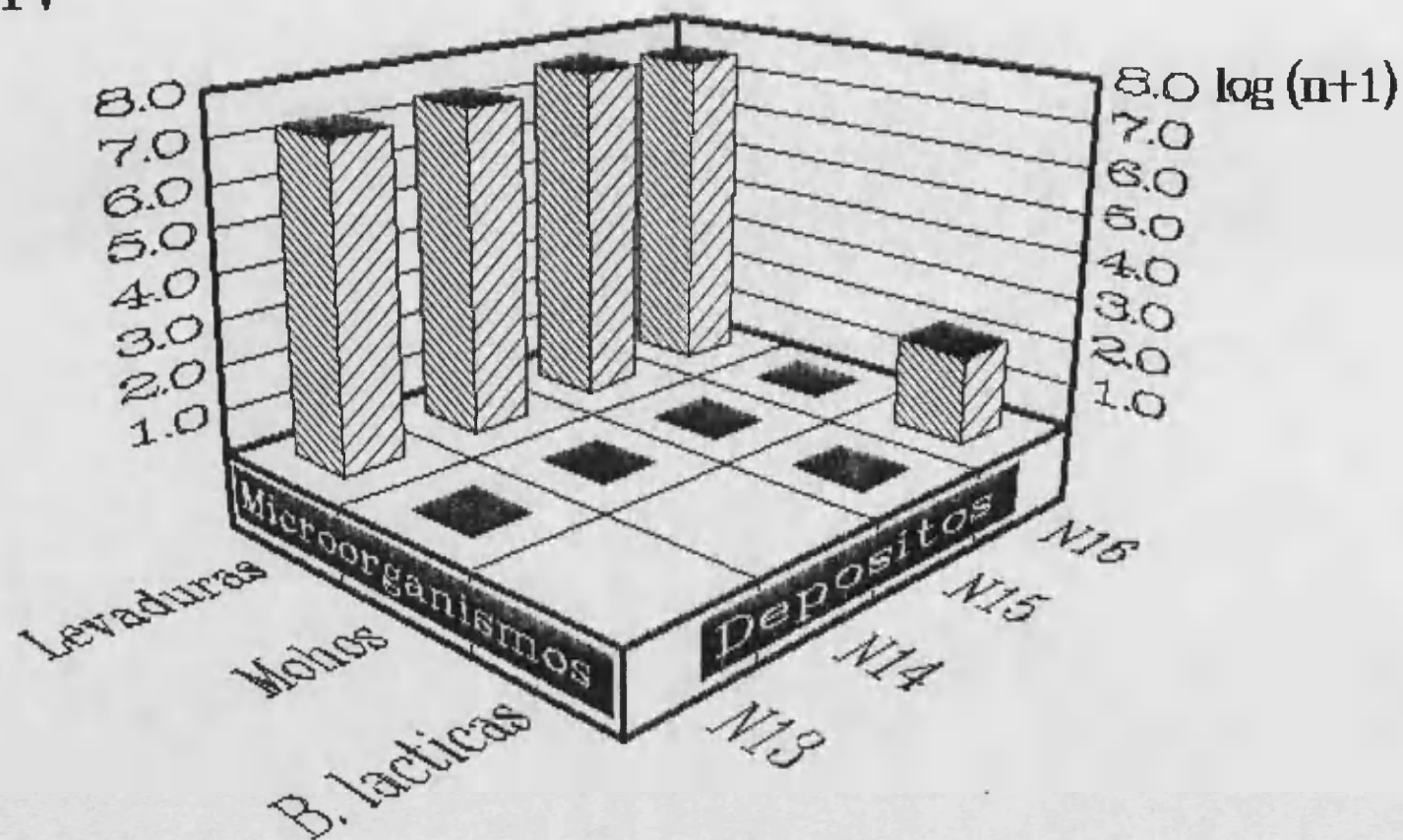


Figura 19.- Microorganismos asociados con el final de la fermentación alcohólica (Fase IV). Vinificación de uva Bobal sistema Bidone. (Cooperativa San Pedro), campaña 1983. Los recuentos de levaduras y mohos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. El recuento de bacterias lácticas se expresa de igual forma, pero en este caso "n" representa el Número Más Probable de células por ml. El recuento de bacterias lácticas se realizó solo en dos depósitos, mientras que los otros microorganismos se estudiaron en cuatro de ellos.

Fase VI

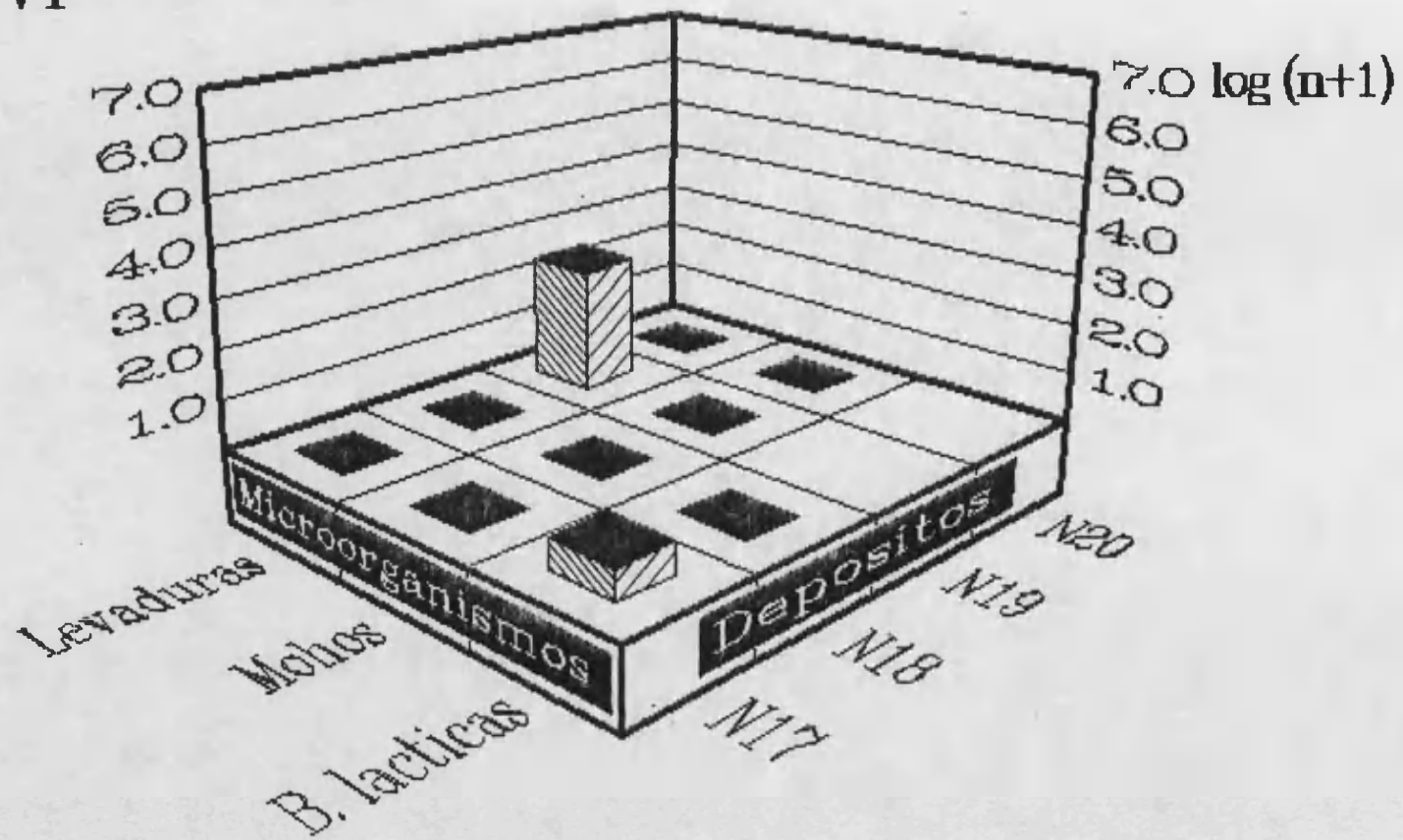


Figura 20.- Microorganismos hallados tras el primer trasiego (Fase VI). Vinificación de uva Bobal sistema Bidone. (Cooperativa San Pedro), campaña 1983. Los recuentos de levaduras y mohos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. El recuento de bacterias lácticas se expresa de igual forma, pero en este caso "n" representa el Número Más Probable de células por ml. El recuento de bacterias lácticas se realizó solo en dos depósitos, mientras que los otros microorganismos se estudiaron en cuatro de ellos.

Medias Coop. 1983

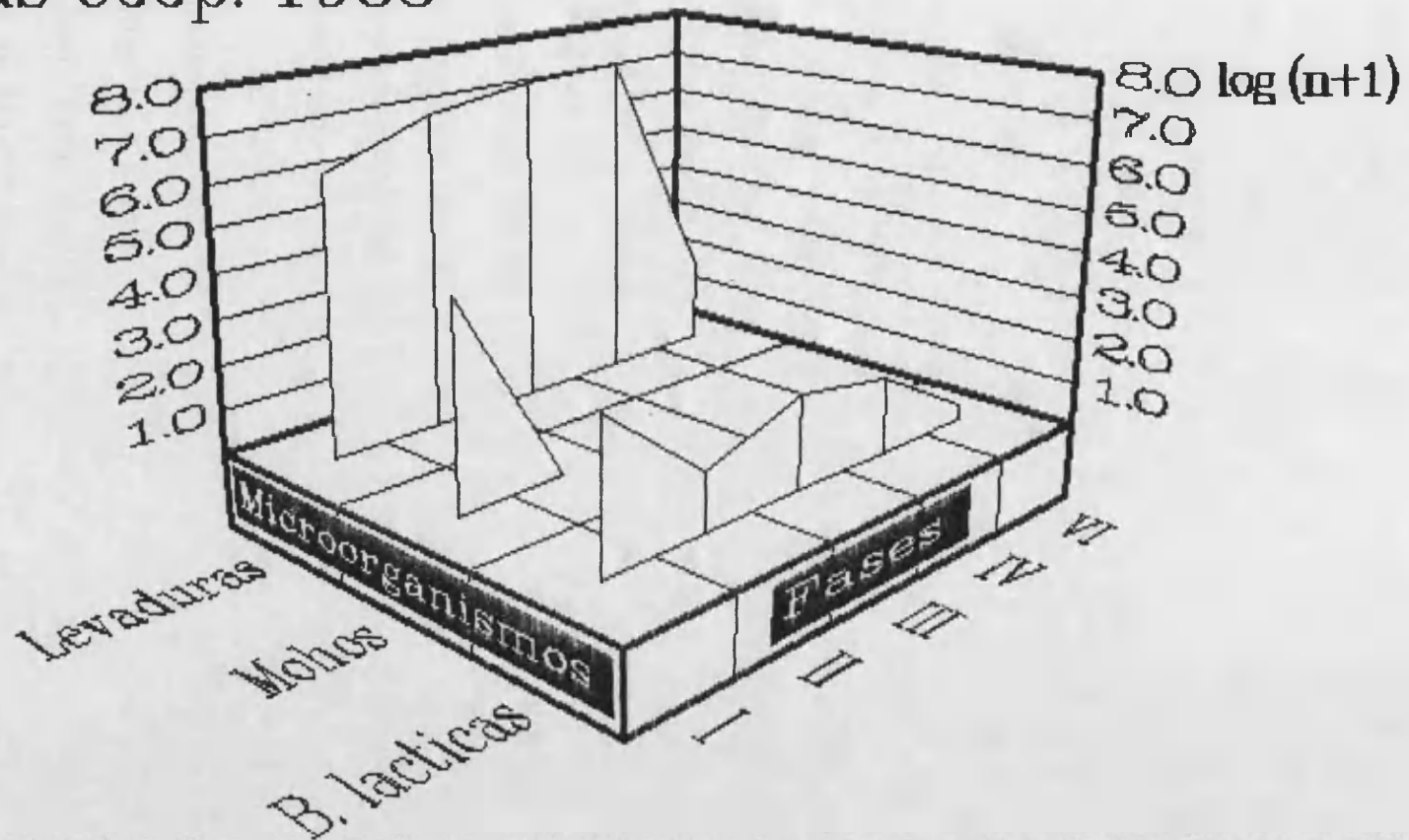


Figura 21. - Evolución de la microflora durante la vinificación por el sistema Bidone. (Cooperativa San Pedro), campaña 1983. Los datos de la figura representan las medias de los valores obtenidos a partir de los depósitos muestreados en cada fase. Los recuentos de levaduras y mohos se expresan como $\log(n+1)$ siendo "n" el número de ufc/ml. El recuento de bacterias lácticas se expresa de igual forma, pero en este caso "n" representa el Número Más Probable de células por ml. El recuento de bacterias lácticas se realizó solo en dos depósitos, mientras que los otros microorganismos se estudiaron en cuatro de ellos.

se observa un ligero incremento del número de bacterias lácticas. Aquellas bacterias más resistentes al SO_2 y al etanol pueden crecer en el medio al disminuir la competencia con las levaduras, que van muriendo hacia el final de la fermentación y liberando sustancias nutritivas al lisarse [119]. GUILLOUX-BENATIER *et al.* [145] han llevado a cabo un estudio de los efectos que tienen diferentes autolisados de levadura sobre el crecimiento de las bacterias lácticas y sobre la consecución de la fermentación maloláctica. Estos autores han observado que el grado de proteólisis del autolisado influye positivamente sobre el crecimiento de las bacterias, y que esta influencia depende de las condiciones del medio (pH, contenido en etanol) y del tipo de bacteria láctica que se ensaye. BEELMAN *et al.* [28], por su parte, observan un efecto beneficioso sobre el crecimiento de las bacterias cuando éstas se ponen en contacto con las levaduras presentes en las heces. El pequeño crecimiento de la población láctica que observamos en nuestras experiencias no pudo alcanzar números elevados, ya que las bajas temperaturas de la bodega tras el muestreo correspondiente a la 4ª Fase, y la adición de 20 mg/l de SO_2 inmediatamente después del primer trasiego, hicieron disminuir de nuevo la población. En ninguno de los siete depósitos muestreados en 1982 se realizó la fermentación maloláctica.

En 1982 las levaduras, en mostos recién sangrados y sin SO_2 , presentaban una concentración más uniforme que las bacterias lácticas (Figuras 8 a 15), encontrándose valores de 10^8 ufc/ml. PARISH y CARROLL [236] citan que la población levaduriforme sobre la superficie de las uvas es de 10^3 - 10^4 ufc/cm². PEYNAUD y DOMERCQ [31] también obtienen un número semejante sobre las uvas, pero a partir del estrujado de las mismas el número de células se incrementa, de forma que los mostos frescos por ellos analizados contenían poblaciones de 10^8 - 10^9 ufc/ml. Estos datos sugieren que una parte de la población levaduriforme presente en el mosto tiene como origen el equipo de bodega [31, 76, 229]. Una vez que se inicia la

fermentación alcohólica en nuestros mostos, el número inicial de levaduras crece rápidamente hasta alcanzar valores de 10^7 ufc/ml durante la fase tumultuosa de la fermentación (Figuras 8 a 15). Este número máximo de levaduras va decreciendo paulatinamente hacia el final de la fermentación tumultuosa, aunque en la Fase IV, cuando la densidad es aproximadamente 1.0000 y la cantidad de azúcares es de 22 g/l, todavía persisten en el medio 10^6 ufc/ml. La población levaduriforme sigue disminuyendo progresivamente, y tras el trasiego realizado en los vinos ya acabados (Fase VI), sólo encontramos poblaciones de levaduras viables que van de 0 a 10^4 ufc/ml (Figuras 8 a 15). Las diferencias en la concentración de células tras el trasiego pueden explicarse en función de la efectividad del mismo en cada uno de los depósitos muestreados, y del número de levaduras capaces de sobrevivir en las condiciones en que se hallan los vinos terminados, con baja cantidad de nutrientes, alto contenido en etanol, y además con una dosis de 20 mg/l de SO_2 adicionada tras el trasiego. Las muestras correspondientes al muestreo realizado tras el segundo trasiego no produjeron ningún crecimiento en las placas de aislamiento (datos no expuestos en las Figuras); tan sólo en el depósito B encontramos una población residual de 4.7×10^3 levaduras viables por mililitro. PEYNAUD [240] encuentra que en vinos jóvenes tras varios meses de reposo, se pueden hallar hasta 2×10^5 células por mililitro; sin embargo este valor se refiere a un recuento total, no a células viables que es el dato que nosotros consideramos.

La evolución del número de levaduras a lo largo de la fermentación está en concordancia con lo observado por LAFON-LAFOURCADE [191] y RIBÉREAU-GAYON [280]. Este último autor nos informa que la mayor cantidad de azúcares del mosto se consume durante la fase exponencial y la fase estacionaria del crecimiento levaduriforme; esta afirmación se ve corroborada en nuestras experiencias al comparar el consumo de azúcares con

la evolución de la población levaduriforme (Figuras 8 a 15, Tablas 3 a 10). La disminución progresiva del número máximo de células se debe posiblemente a una serie de factores como son su sensibilidad al etanol, la acumulación de productos tóxicos tales como ácidos grasos de cadena larga (octanoico y decanoico) [181], y a la disminución del contenido intracelular de esteroides que tiene lugar durante la fase de proliferación de las levaduras [280], y que afecta tanto a la viabilidad como a la tasa de fermentación de las mismas [94].

La influencia que la población de mohos tiene en la fermentación es muy limitada, ya que estos microorganismos, que forman parte de la microflora asociada a la uva [3, 282], desaparecen rápidamente a lo largo de la fermentación por su sensibilidad al SO_2 [270, 306], al etanol [270], y a las condiciones anaerobias que se crean en el mosto en fermentación, ya que estos organismos son fuertemente aerobios [3]. En nuestros muestreos solamente hemos detectado mohos, en general, en mostos recién sangrados y sin SO_2 . En las siguientes Fases raramente aparecen (Figuras 8 a 15), y cuando lo hacen se observa que su número es muy reducido y su carácter residual (Figura 8).

La evolución de la microflora en la vinificación por el sistema BIDONE realizada con uva Bobal en 1983, nos muestra un comportamiento bastante similar al que ya hemos comentado para las vinificaciones de 1982. En este caso la representación del número de microorganismos a lo largo de la fermentación se realiza en forma de diagrama de barras, ya que debido al propio sistema de vinificación, los depósitos perdían su individualidad y las poblaciones su continuidad. No se realizaron seguimientos de un mismo depósito sino de varios elegidos al azar, teniendo en cuenta que se encontraran en unas fases de fermentación previamente establecidas por nosotros. Por esta razón, no nos pareció adecuada la representación continua de los datos en la forma en que lo hicimos en la campaña anterior.

En este año, además de realizar un recuento de bacterias lácticas, se procedió al aislamiento e identificación de las mismas. Este cambio de estrategia se debió al interés que se suscitó en la D.O. Utiel-Requena por la necesidad de control de los problemas de exceso de acidez que se observaba en los mostos de Bobal en determinadas campañas. Este exceso de acidez podría solventarse con la utilización controlada de ciertas bacterias lácticas que eliminarían el ácido málico. El interés del aislamiento e identificación de las cepas se debía a la necesidad de caracterizarlas, con el fin de seleccionar aquéllas más adecuadas para usos enológicos. La evolución del número de bacterias a lo largo de la vinificación por el sistema BIDONE, se realizó a partir de los datos obtenidos de 10 depósitos muestreados en distintos momentos del proceso. Posteriormente se realizó el aislamiento de las especies que aparecían en cada una de las fases analizadas.

- La población de bacterias lácticas encontradas en mostos recién sangrados fue de 10^8 células por mililitro (Figuras 16 y 21), cifra semejante a la hallada el año anterior (Figura 15). Se puede apreciar que durante la fermentación (Figura 21) disminuye este número: en alguno de los muestreos realizados no se obtuvo crecimiento en los medios de recuento empleados (Figuras 17 a 20), mientras que en los restantes las cifras variaban entre 40 y 230 células por mililitro. El número de bacterias lácticas es muy bajo en este caso, y aquí no se aprecia ese pequeño incremento que se producía en las vinificaciones del año anterior al final de la fermentación alcohólica. Este comportamiento puede ser explicado por el hecho de que en el sistema BIDONE, el máximo de población levaduriforme se alcanza hacia el final de la fermentación, con lo cual la competencia con levaduras y la carencia de sustancias nutritivas originadas por la lisis de éstas impide el crecimiento de aquellas bacterias que habían sobrevivido por su resistencia al SO_2 y al etanol. Tras el primer trasiego y adición de 20

mg/l de SO_2 , sólo se aislaron bacterias lácticas de uno de los depósitos muestreados, y el número de células vivas que se obtuvo fue de 4 por mililitro.

A pesar de que en las vinificaciones por el sistema BIDONE se empleó una dosis de SO_2 inferior a la usada en 1982 con el sistema tradicional, la proporción de SO_2 libre en relación con el total fue mayor en 1983. Aunque para las bacterias lácticas la fracción combinada del SO_2 no es inocua, la forma libre es la más efectiva [174, 189, 271]. Por ello una concentración más elevada de SO_2 libre durante la vinificación BIDONE podría explicar el menor porcentaje de bacterias lácticas encontradas.

En el caso de las levaduras vemos que la población inicial en mostos recién sangrados fue de 10^5 - 10^6 ufc/ml, y el número máximo de levaduras del orden de 10^7 ufc/ml; ambas cifras son bastante similares a alcanzadas el año anterior en la vinificación tradicional (Figuras 16 a 21). Sin embargo, podemos observar que durante la vinificación tradicional el mayor número de células viables se alcanza en la Fase II, cuando la fermentación está en plena actividad, y posteriormente la viabilidad de las células disminuye progresivamente hasta finalizar la fermentación (Figura 15). Con el sistema BIDONE, las levaduras a lo largo de la fermentación van aumentando paulatinamente en número, y es al final de la misma cuando contamos con una mayor concentración de las mismas (Figura 21).

El que se mantenga el crecimiento de la población levaduriforme durante más tiempo en el sistema BIDONE, puede deberse a que las adiciones sucesivas de mosto fresco proporcionan nuevos elementos nutritivos al mosto en fermentación. También puede contribuir el que las nuevas levaduras añadidas sean mayoritariamente fermentadoras, ya que el resto han sido eliminadas por la adición de SO_2 a los mostos recién obtenidos [229]. Por otro lado las aportaciones de mosto fresco provocan la dilución de la concentración de alcohol formada, así como la disminución de la temperatura de

fermentación [229]. De esta manera se ven frenados dos de los efectos que afectan negativamente a la viabilidad de las células. Las altas temperaturas (superiores a 32°C) actúan disminuyendo la tasa de crecimiento y la tasa de fermentación [16]. El etanol también influye disminuyendo las tasas de crecimiento, fermentación y viabilidad conforme aumenta su concentración [208, 209, 228]. Por otro lado, hay un efecto sinérgico entre el etanol y la temperatura; así concentraciones crecientes de etanol disminuyen la temperatura máxima de crecimiento de las levaduras [336]. De esta manera la disminución de las temperaturas que se consiguen con el sistema BIDONE favorece el mantenimiento de una población alta de levaduras viables durante mayor tiempo. Otro aspecto negativo que tienen las altas temperaturas de fermentación alcanzadas en el sistema tradicional es que éstas desajustan el proceso glucolítico con acumulación de glicerol, acetoína, 2,3-butanodiol, y ácido acético vía fermentación gliceropirúvica (Figura 4). Las diferencias respecto a la cantidad de ácido acético formado pueden observarse en las Tablas 10 y 16.

Los mohos presentan el mismo comportamiento bajo ambos sistemas de vinificación: desaparecen totalmente en los primeros momentos de la fermentación, y ya no vuelven a surgir posteriormente.

3.2.2.- EVOLUCION DE LA MICROFLORA EN LAS VINIFICACIONES DE LA ESCUELA DE VITICULTURA Y ENOLOGIA.

Respecto a la evolución que sufrieron los microorganismos en las fermentaciones realizadas en la Escuela de Enología y Viticultura de Requena, éstas estaban muy relacionadas con los tratamientos de vinificación a los que fueron sometidos los mostos.

A partir de los datos obtenidos en las primeras fases analizadas (Figuras 22 a 25), observamos que la irregularidad en la distribución del número de bacterias lácticas en los mostos sin sulfitar era concomitante con la ya encontrada en las vinificaciones de la Cooperativa. Así encontramos que en mostos de Cabernet-Sauvignon y Garnacha el número de bacterias lácticas por mililitro era de aproximadamente 2×10^2 , mientras que en Bobal, Macabeo y Tempranillo fue de 10^3 células por mililitro. Los números de levaduras en mostos frescos son algo mayores que los detectados en la Cooperativa durante los dos años estudiados (10^6 ufc/ml). Los mohos se hallaron en concentración de 10^4 ufc/ml, y solamente se detectaron en las primeras muestras tomadas durante la fermentación. La causa de su desaparición ya ha sido comentada anteriormente.

El efecto que los distintos tratamientos de vinificación, realizados en la Escuela de Viticultura y Enología, tienen sobre la microflora se aprecia claramente en la evolución de bacterias lácticas y levaduras. Durante la fermentación alcohólica observamos una disminución de la población láctica semejante a la ya comentada para mostos vinificados en la Cooperativa. Este comportamiento ha sido detectado por varios autores: FLEET *et al.* [115], COSTELLO *et al.* [72], y LAFON-LAFOURCADE *et al.* [179]. La disminución observada en las fermentaciones de Garnacha, Macabeo y Tempranillo, no se apreció sin embargo en la vinificación de Bobal. Esta última fermentación se diferenciaba del resto en que no se había adicionado SO_2 . En este caso no tenía lugar el efecto negativo que tiene este producto sobre las bacterias. El que la población láctica resistente al etanol no pueda crecer en este mosto, puede ser debido a la competencia con las levaduras. RIBÉREAU-GAYON *et al.* [282] establecen que una de las causas que pueden explicar este antagonismo es la competencia por los azúcares y sustancias nitrogenadas del mosto. En general el crecimiento más rápido de las levaduras frente a las bacterias, las hace ser la población mayoritaria

Bobal

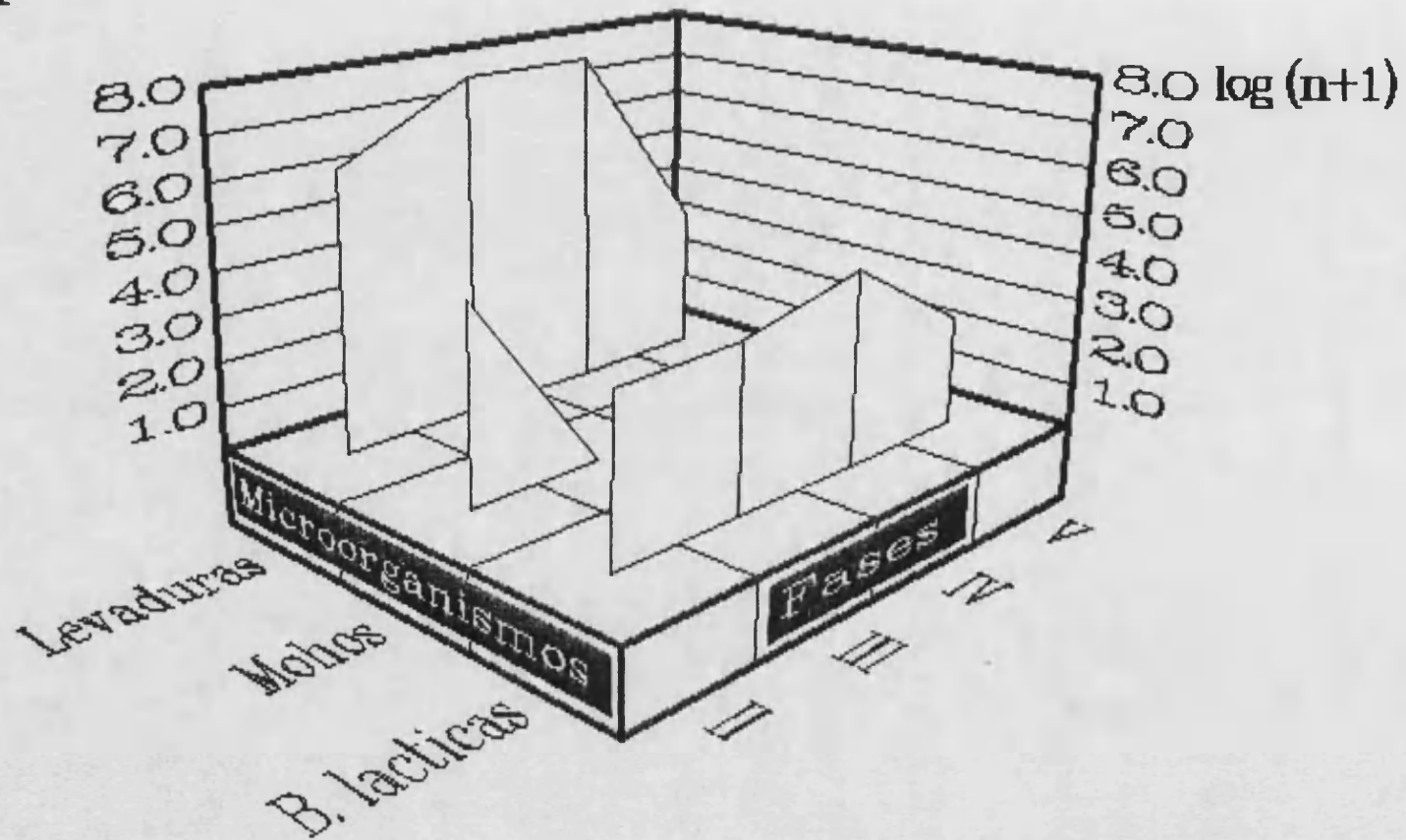


Figura 22.— Evolución de la microflora de la variedad Bobal. (Escuela de Viticultura y Enología), campaña 1983. Condiciones de vinificación especificadas en la Tabla 2. Los recuentos de levaduras y mohos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. El recuento de bacterias lácticas se expresa de igual forma, pero en este caso "n" representa el Número Más Probable de células por ml.

Macabeo

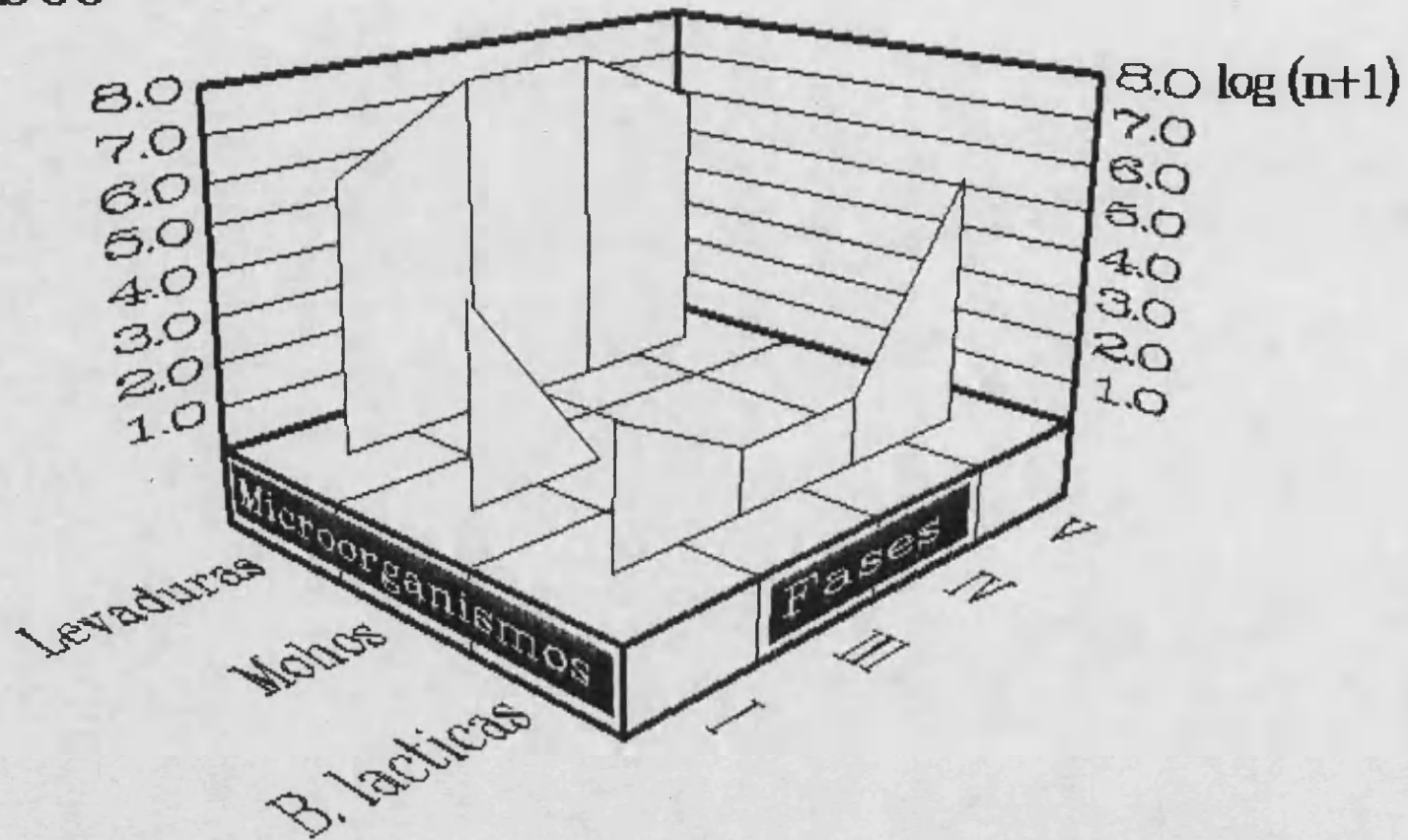


Figura 23.- Evolución de la microflora de la variedad Macabeo. (Escuela de Viticultura y Enología), campaña 1983. Condiciones de vinificación especificadas en la Tabla 2. Los recuentos de levaduras y mohos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. El recuento de bacterias lácticas se expresa de igual forma, pero en este caso "n" representa el Número Más Probable de células por ml.

Garnacha

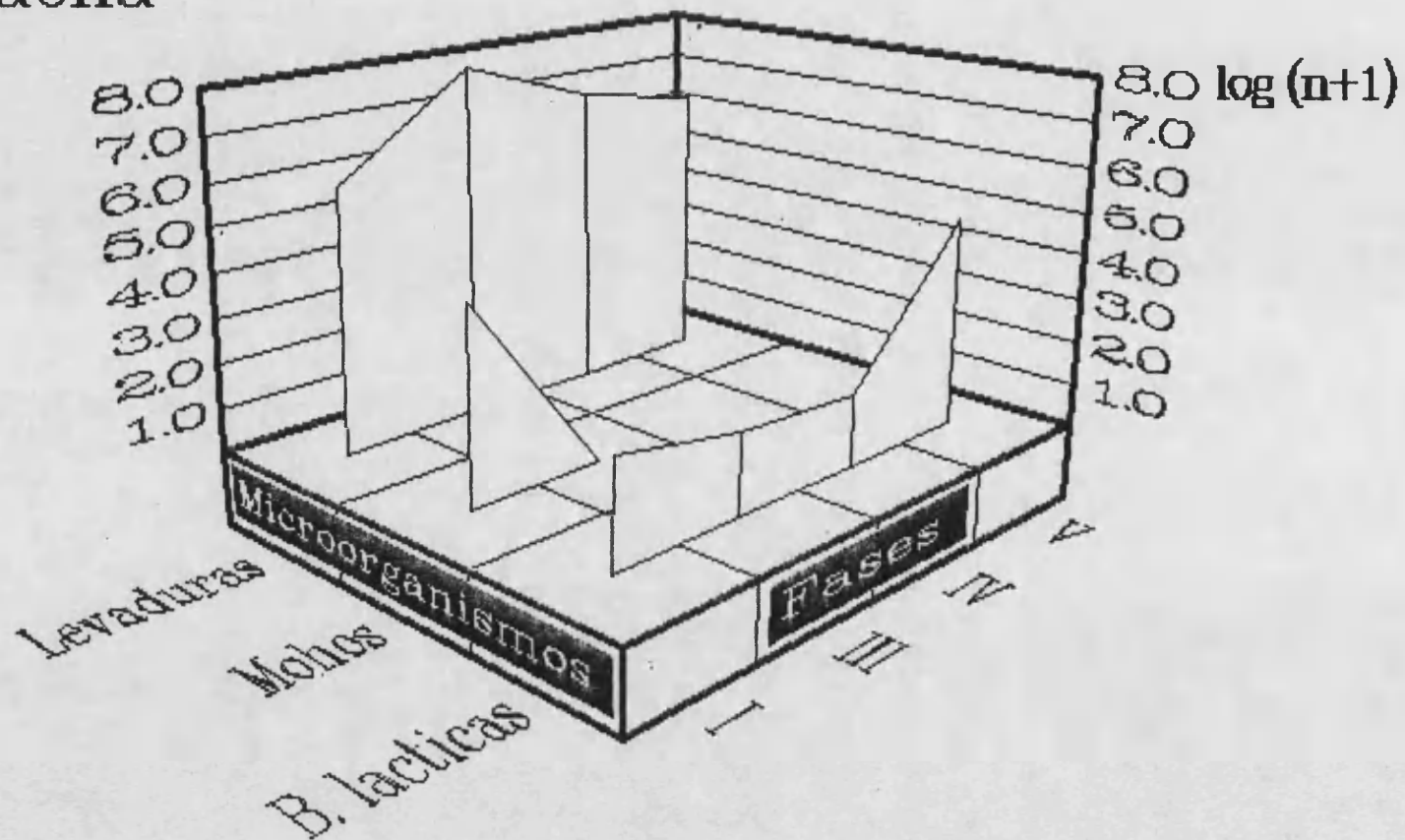


Figura 24.- Evolución de la microflora de la variedad Garnacha. (Escuela de Viticultura y Enología), campaña 1983. Condiciones de vinificación especificadas en la Tabla 2. Los recuentos de levaduras y mohos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. El recuento de bacterias lácticas se expresa de igual forma, pero en este caso "n" representa el Número Más Probable de células por ml.

Tempranillo

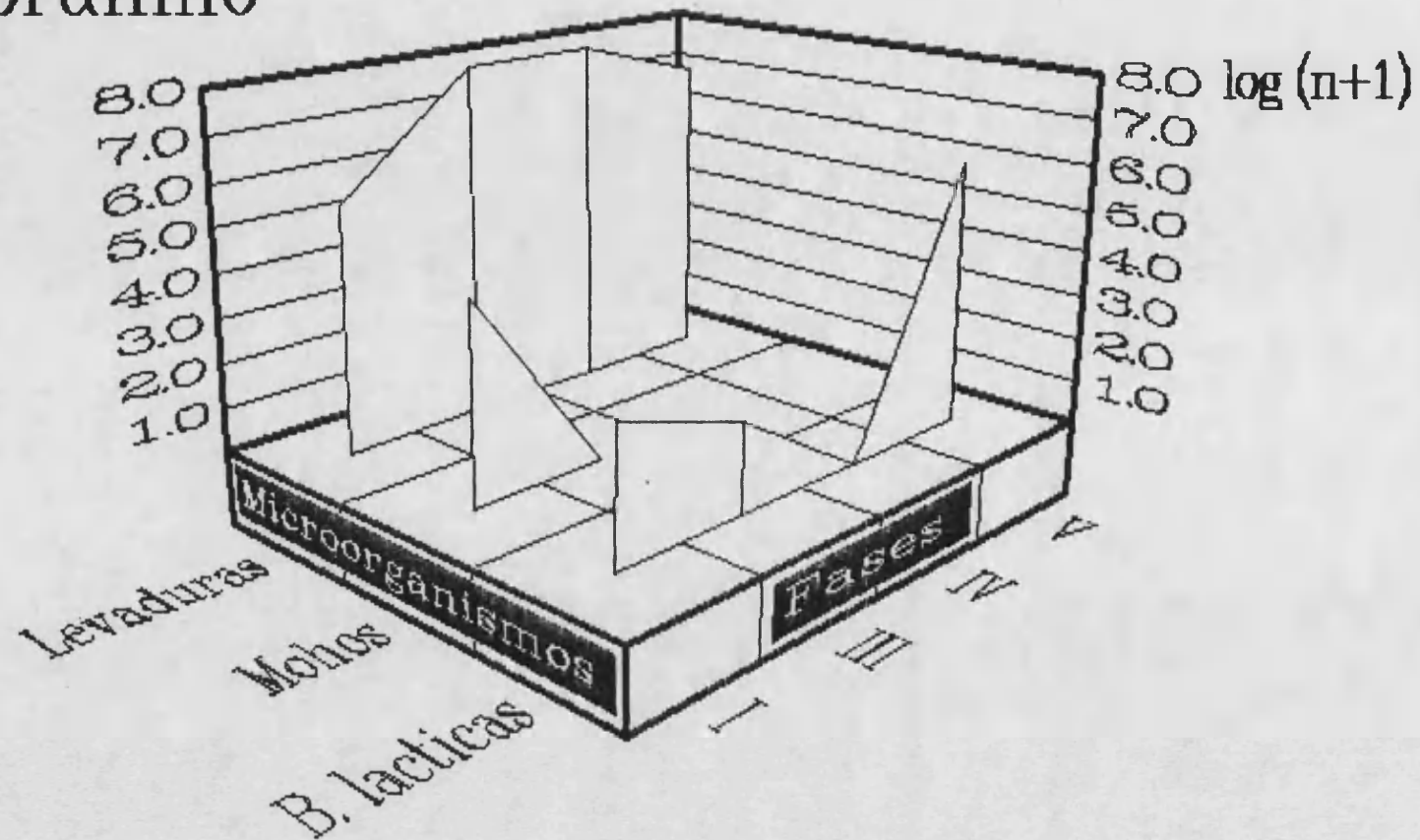


Figura 25.- Evolución de la microflora de la variedad Tempranillo. (Escuela de Viticultura y Enología), campaña 1983. Condiciones de vinificación especificadas en la Tabla 2. Los recuentos de levaduras y mohos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. El recuento de bacterias lácticas se expresa de igual forma, pero en este caso "n" representa el Número Más Probable de células por ml.

en los mostos en fermentación, y por ello la que requiere nutrientes en mayor cantidad. Esta captación de nutrientes por parte de las levaduras frena el desarrollo de las bacterias lácticas.

En todos los casos (Figuras 22 a 25), se observaba también que al final de la fermentación alcohólica (Fase IV) la población bacteriana aumentaba, hasta producir la fermentación maloláctica en todos los vinos, aunque con diferentes velocidades según los casos. La fermentación maloláctica que más rápidamente se llevó a cabo fue la de Bobal, en la cual se realizó al cabo de 22 días tras el inicio de la fermentación alcohólica. A continuación finalizó la fermentación maloláctica el vino procedente de Garnacha, al cabo de 29 días del inicio de la fermentación alcohólica; luego el de Macabeo (34 días), y por último el de Tempranillo (48 días). Los números de bacterias lácticas encontradas en la Fase V (Figuras 22 a 25) nos informa que en los vinos que ya habían completado la fermentación maloláctica la población láctica había disminuído notablemente en Bobal, Garnacha y Macabeo, mientras que en Tempranillo, en el que la fermentación maloláctica se hallaba realizándose en esos momentos, la población alcanzaba órdenes de 10^6 células por mililitro. El que la fermentación maloláctica tardase más en realizarse en ese depósito que en el resto puede deberse a varias causas: las levaduras alcanzan la población máxima hacia el final de la fermentación alcohólica, con lo cual el inicio del crecimiento bacteriano se ve frenado por la competencia; la temperatura de fermentación de mosto de Tempranillo fue menos favorable al crecimiento de las bacterias que la que se dió en otras fermentaciones [175]; y por último, la concentración de etanol en este mosto fue más elevada que en el resto. Todo ello puede explicar la mayor lentitud en el desencadenamiento de la fermentación maloláctica.

La evolución de las bacterias lácticas tras la fermentación maloláctica en las vinificaciones de Bobal, Garnacha y Macabeo es

semejante: disminuye el número de células viables, aunque en grados distintos. Donde menos se aprecia la disminución del número de bacterias lácticas tras la fermentación maloláctica, es en el caso de Macabeo, luego en Garnacha, y finalmente en Bobal. En el vino procedente de Tempranillo no se pudo observar este efecto, ya que el último muestreo realizado coincidió con el apogeo de la fermentación maloláctica.

A pesar de ser Macabeo el vino que mayor cantidad de SO_2 total contenía, la cantidad de SO_2 libre era muy semejante a la de Garnacha (Tablas 18 y 19); sin embargo el pH más bajo de este último puede que hiciera que la fracción no disociada del SO_2 y más activa como antimicrobiana (H_2SO_3), fuera mayor en Garnacha que en Macabeo. SCHOPFER y AERNY [306] han observado que el pH influye en la proporción disociada del SO_2 en solución, de forma que a pHs menores la proporción de H_2SO_3 aumenta respecto a las formas disociadas HSO_3^- y SO_3^{2-} , y que la actividad antiséptica del SO_2 se debe principalmente a la fracción no disociada. Por otro lado el vino de Macabeo presentaba una menor concentración de etanol que el de Garnacha, y una temperatura de conservación alrededor de los 16°C , mientras que el de Garnacha se mantuvo 2 ó 3° por encima. LAFON-LAFOURCADE y RIBÉREAU-GAYON [191] han señalado que diferencias en la concentración de SO_2 , en el contenido en etanol, en el pH y en la temperatura son las responsables de las distintas tasas de viabilidad de las bacterias lácticas tras la fermentación maloláctica. Así, un pH más alto, concentración de SO_2 molecular más baja, un contenido en etanol inferior, y una temperatura de conservación algo más baja, explican la mayor viabilidad de bacterias lácticas en Macabeo respecto a Garnacha tras la fermentación maloláctica.

Sin embargo, no encontramos explicación alguna al hecho de que en Bobal la disminución de la población láctica fuera tan drástica y rápida tras la fermentación maloláctica, a menos que este depósito se hubiera

trasegado previamente a la toma de la muestra correspondiente a la Fase V, sin que tuviésemos conocimiento de ello. Este hecho parece confirmarse si observamos el número de levaduras obtenido en la Fase V en este depósito (Figura 22).

Las levaduras también sufrían una evolución distinta en el caso de mostos refrigerados o no refrigerados, y dentro de cada uno de los grupos también había diferencias explicables por las distintas características de las vinificaciones realizadas. En el caso de mostos refrigerados observábamos dos dinámicas en la población levaduriforme. Por un lado, en Bobal el mayor número de células viables se alcanzaba en la Fase III, que se correspondía con la última etapa de la fermentación tumultuosa, para luego disminuir progresivamente hasta la finalización de la fermentación alcohólica. Esta dinámica, a falta de los datos correspondientes a mostos recién estrujados, nos indica que la consecución de la población máxima en mostos sin SO₂ estaba retrasada respecto a las vinificaciones con SO₂ y sin control de temperatura. Esto podía deberse a que al no existir la presión selectiva originada por el SO₂, especies "acompañantes", como *Candida stellata*, impidieran el establecimiento rápido de *Saccharomyces cerevisiae*. Por otra parte, la baja temperatura a la que se vinificó este mosto disminuía todos los procesos bioquímicos incluyendo el crecimiento celular [240].

En Tempranillo, fermentado a 19°C, observamos que la población máxima de células se alcanzaba al final de la fermentación alcohólica, es decir, a lo largo de toda la fermentación las levaduras habían ido creciendo progresivamente sin que se observase pérdida de viabilidad hacia el final de la fermentación tumultuosa, como sucedía en el resto de los casos. Tanto en Garnacha como en Tempranillo vinificadas ambas con 7 mg/l de SO₂ y tratadas con bentonita (Tabla 2) se alcanzaba el mismo número máximo de levaduras, pero esto sucede en distintos momentos de la fermentación. Esto

podía ser debido al efecto de la temperatura de vinificación. Una temperatura de vinificación más baja hacía que el crecimiento de las levaduras se viera frenado y por otro lado reducía el efecto negativo del etanol. De aquí que en Tempranillo se alcanzaran poblaciones tan altas cuando la concentración de etanol era casi del 12% en volumen, mientras que en Garnacha se observaba pérdida de viabilidad por encima de los 10% (v/v). Este efecto sinérgico de etanol y temperatura ya ha sido comentado al tratar las ventajas del sistema BIDONE sobre el tradicional.

3.2.3.- CONSIDERACIONES ACERCA DE LA CLASIFICACION DE LEVADURAS.

Desde la primera clasificación de levaduras realizada por HANSEN en 1904 que distinguía entre levaduras esporógenas y no esporógenas, los trabajos sobre taxonomía de estos microorganismos han sido muy numerosos llevándose a cabo clasificaciones cada vez más precisas y exhaustivas [282].

STELLING-DEKKER en 1931 realizó la primera monografía sobre levaduras esporógenas mientras que LODDER en 1934 y DIDDENS y LODDER en 1942 realizaban el primer compendio sobre levaduras no esporógenas [165]. Fue en 1970 cuando LODDER recogió toda la información existente sobre levaduras y publicó su obra "The yeast: a taxonomic study" [201] en la cual se contemplan conjuntamente las levaduras esporógenas, no esporógenas y las formadoras de teliosporas.

Desde la edición de 1970 la taxonomía de levaduras se ha desarrollado mucho. Se han descrito nuevas especies a partir de nuevos y antiguos hábitats, se ha incrementado el número de aquellas que presentan fase sexual. Por otro lado se han establecido nuevos criterios de clasificación y se ha reevaluado el valor de los antiguos. Todos estos hechos han

propiciado la publicación de dos importantes obras taxonómicas: "The yeast: characteristics and identification" [18] y "The yeast: a taxonomic study" [165].

En estas dos obras se ha dado paso a la descripción de dos grupos cuyo conocimiento es reciente: las *Filobasidiaceae*, levaduras cuya fase sexual no está representada por teliosporas sino por un basidio o cuerpo fructífero, y los hongos basidiomicetos con una fase unicelular en su ciclo de vida. Estos dos grupos no habían sido descritos por LODDER en 1970. Resumiendo, en el actual estado de conocimientos, dentro de las levaduras distinguimos tres grandes grupos en Eumycota:

- a) Levaduras ascomicetas: presentan fase sexual. Forman esporas sexuales en ascas.
- b) Levaduras basidiomicetas: presentan fase sexual. Forman teliosporas o basidios como estructuras sexuales.
- c) Levaduras imperfectas: no se les conoce fase sexual. Comprenden las familias *Cryptococcaceae* (ya descrita por LODDER en 1970) y *Sporobolomycetaceae* en la cual se incluyen aquellos géneros formadores de ballistosporas.

Las diferencias entre las monografías de BARNETT *et al.* [18] y KREGER-VAN RIJ [165] es que en la primera se da predominancia a los criterios bioquímicos, mientras que la segunda se basa (sobre todo a nivel de géneros) en criterios morfológicos.

La identificación de las especies de levaduras es un trabajo arduo si se quiere realizar con el necesario rigor. Ello se debe a la cantidad de pruebas que deben realizarse, a la tardanza en la obtención de resultados y en la gran cantidad de cepas con las que se enfrenta el investigador tras varios aislamientos.

Muchas veces, investigadores que aíslan estos microorganismos de hábitats industriales incluyen como características taxonómicas aquéllas

que las diferencian por su valor tecnológico. Así, RIBÉREAU-GAYON [282] establece como criterios de clasificación la relación entre velocidad de fermentación de la glucosa y de la fructosa, la relación entre el coeficiente respiratorio y el fermentativo, el poder alcohológeno, el rendimiento en productos secundarios de la fermentación o la resistencia al SO_2 . Aunque no negamos la validez de estos criterios a la hora de conocer y seleccionar las cepas más adecuadas para la fermentación, hemos de aceptar que ninguna de estas pruebas tiene valor taxonómico suficiente para separar especies, ya que las respuestas a estos ensayos pueden variar de cepa a cepa dentro de una especie. ROSINI *et al.* [288] establecen que la cantidad de CO_2 producido en 72 horas (velocidad de fermentación) no presenta suficiente variabilidad interespecífica para garantizar una buena discriminación entre *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces italicus*, *Saccharomyces bayanus* y *Saccharomyces uvarum*, mientras que la capacidad de producir determinadas concentraciones de alcohol sí permitía diferenciar las cuatro primeras de la última. Sin embargo, estos mismos autores afirman que la capacidad de producir etanol no puede ser usada como criterio taxonómico. De hecho las especies por ellos nombradas como distintas, actualmente se agrupan todas bajo el nombre de *Saccharomyces cerevisiae*.

Otros puntos de controversia entre los taxónomos y los investigadores que estudian las levaduras del vino es la utilización de determinados medios para la realización de las pruebas de clasificación. Así, mientras LODDER [201], KREGER-VAN RIJ [165] y BARNETT *et al.* [18] propugnan la utilización de medios definidos para evitar descripciones que no puedan compararse entre sí, RIBÉREAU-GAYON aboga por realizar ciertas pruebas en un medio natural, como el mosto de uva [282], sin tener en cuenta que las variaciones en la composición química de este medio puede impedir la obtención de resultados repetibles.

En general, se ha tratado de suavizar el costoso trabajo de identificación de levaduras desde dos frentes:

- a) empleando sistemas miniaturizados de identificación.
- b) utilizando claves simplificadas que disminuyan el número de pruebas a realizar.

Los sistemas miniaturizados descritos en la bibliografía para identificación de levaduras son: la tira API 20 C [78], la tira API 20 C Aux y el Abbott Quantum II Yeast Identification System [92]. Aunque estos métodos pueden ser útiles en un trabajo rutinario de aislamiento, no pueden aplicarse sin riesgo de error a trabajos rigurosos de identificación. Los inconvenientes en la utilización de la tira API 20 C se derivan del reducido número de pruebas sobre utilización oxidativa de fuentes de carbono y de nitrógeno, de la falta de información sobre características morfológicas o culturales y de los reducidos tiempos de lectura de los resultados, ya que en aquellas especies en que la fermentación o asimilación de ciertos compuestos de carbono es lenta, la respuesta en la tira API es negativa, ya que su periodo de lectura es de una semana [78].

En cuanto a la tira API 20 C Aux, ésta aumenta el número de pruebas de asimilación de compuestos de carbono a expensas de las pruebas de fermentación. Esta tira API 20 C Aux parece presentar resultados muy válidos cuando se aplica a la identificación de levaduras de importancia clínica [78] pero no basta, por sí sola, para identificar levaduras procedentes de otros orígenes. El sistema Abbott Quantum II Yeast Identification System coincide con la tira API 20 C Aux en el 78.8% de levaduras frecuentes en clínica, y sólo muestra el 50% de concordancia para levaduras procedentes de otras fuentes [78]. Estas razones invalidan, a nuestro parecer, el uso de estos sistemas a la hora de realizar un estudio ecológico y fisiológico de las levaduras del vino.

Otra forma de reducir el arduo problema de la identificación es, como comentábamos antes, la utilización de claves simplificadas. Varios autores han abordado la confección de estas claves bajo distintos puntos de vista. Así, BEECH *et al.* [23] establecieron dos esquemas para la identificación de levaduras. El primer esquema utiliza una clave morfológica basada en la apariencia de las colonias sobre agar, el segundo es una clave bioquímica cuyo uso requiere realizar seis pruebas de fermentación, una de asimilación de nitrato, cinco de asimilación de compuestos de carbono, y además observaciones morfológicas sobre reproducción vegetativa, características culturales, pseudomicelio, cápsula y presencia de color en las colonias. Con los resultados de estas pruebas, BEECH *et al.* [23] establecen una serie de combinaciones posibles que llevan a la identificación a nivel de especie. El problema que presenta este sistema es que muchas veces no se llega a una única especie sino a varias, por lo que hay que aumentar el número de pruebas a realizar a fin de diferenciarlas. Además, esta clave se ha quedado obsoleta, al variar la adscripción de varias especies en los sistemas actuales de clasificación.

BARNETT [17] también estableció un sistema que simplificaba la identificación de levaduras descritas en la monografía de LODDER [20] al obviar ciertas características difíciles de observar, como por ejemplo la producción de ascosporas. En este sistema BARNETT desarrolló una clave binaria en la cual se comenzaba seleccionando aquella prueba que mejor dividiera a las levaduras en dos grupos iguales; en cada subgrupo establecido se observaba qué pruebas dividían cada uno de los subgrupos en otros dos iguales, y así sucesivamente hasta que se llegaba a grupos que contenían una sola especie o un grupo de especies que no pudiesen distinguirse mediante las pruebas de uso corriente. La utilidad de cada prueba viene dada por una expresión matemática que hace cuantificable cada característica [17]. Los ensayos más válidos son aquéllos que separan

grandes grupos de especies. El problema de aplicar este sistema de clasificación es que está construido para un grupo determinado de levaduras, en concreto aquéllas aisladas de frutas; sin embargo para levaduras pertenecientes a otros hábitats puede cambiar la utilidad de las pruebas definidas para esta clasificación. En el trabajo de BARNETT [17] se da la primicia de lo que será más tarde el criterio en la selección de ensayos para la clasificación de levaduras en la obra "Yeasts: characteristics and identification" [18].

A pesar de que en nuestras investigaciones ensayamos el sistema miniaturizado API 20 C Aux y la clave simplificada de BEECH *et al.* [23], los problemas que conllevaban nos hicieron decidir por realizar las pruebas según los esquemas tradicionales y las claves utilizadas en las últimas obras de taxonomía de levaduras [18, 165]. A lo largo de este trabajo se aislaron e identificaron 277 cepas de levaduras por el procedimiento descrito por KREGER-VAN RIJ [165].

3.2.4.- EVOLUCION DE LAS LEVADURAS A LO LARGO DE LA VINIFICACION.

Las levaduras presentes en los mostos tienen dos orígenes: uno es el propio fruto, donde encontramos una variada microflora [175], y el otro es la maquinaria de bodega, sobre la cual se desarrollan determinados tipos de levaduras, que son transferidas a los mostos cuando éstos pasan a través de esa maquinaria.

Las diferencias encontradas en la microflora de viñedos distintos se deben a factores específicos tales como edad del viñedo, clima, variedad de uva, localización geográfica y prácticas de cultivo. La influencia que tiene la localización geográfica sobre las especies y números de levaduras en los frutos ha sido investigada por varios autores [141, 258]. También el

tiempo influye sobre la representación de especies en un mismo viñedo. POULARD [258] estudiando la influencia de ciertos factores sobre la variabilidad de la microflora de los mostos encontró que los parámetros climáticos tienen relación con el tipo de levaduras presentes en los mostos, en particular con el grupo de especies de alto poder fermentativo. DAVENPORT [88] realizó un estudio sobre las levaduras presentes en un viñedo inglés encontrando una gran variedad de géneros asociados a la rizosfera y la filosfera, mientras que el número de géneros aislados a partir de la atmósfera era mucho menor. Por otro lado en la atmósfera predominaban los géneros pigmentados con carotenoides mientras que en las hojas predominaban las especies del género *Aureobasidium* y en la rizosfera especies del género *Trichosporon*. POULARD et al. [261] aislaron a partir de suelo de viñedos de la región de Nantes (Francia) *M. pulcherrima*, *S. chevalieri*, *Saccharomyces rosei*, *Kloeckera apiculata*, *Rhodotorula rubra* y *Aureobasidium pullulans*, mientras que CUINIER en 1980 encontró que las especies *Kloeckera apiculata*, *Kloeckera javanica* var. *lafarii*, *Hansenula saturnus* var. *saturnus*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces rosei* y *Candida vini* eran las que colonizaban los suelos de los viñedos de Tourain (Francia). Es de suponer que las especies aisladas de los suelos de los viñedos serán las que aparezcan sobre la superficie de los frutos. Sin embargo, CUINIER [75] no encontró sobre las uvas ninguna de las especies presentes en el suelo del viñedo.

Las especies que se aíslan generalmente sobre la superficie de los frutos son *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Torulopsis stellata*, *Kluyveromyces veronae*, *Hanseniaspora osmophila*, *Lodderomyces elongisporus*, *Pichia minuta*, *Candida* sp., *Rhodotorula* sp., *Cryptococcus* sp. y *Saccharomyces cerevisiae* [236, 237, 287, 304, 320]. En general la presencia de *Saccharomyces cerevisiae* sobre las uvas o es muy baja [236, 304] o no se detecta [237, 287, 320]. A pesar de que existen diferencias en

las asociaciones de especies de levaduras en distintas localidades, la bibliografía consultada nos muestra que sobre la uva predominan especies poco alcohológenas: *Hanseniaspora* sp., *Pichia* sp., *Torulopsis stellata* y *Metschnikowia pulcherrima*, y las de metabolismo totalmente oxidativo como *Rhodotorula* sp., mientras que *Saccharomyces cerevisiae* se presenta mayoritariamente asociada a material de bodega [237]. Esta microflora presente sobre las uvas es la que luego pasa al mosto al ser éstas estrujadas o prensadas. En el mosto además pueden encontrarse otras especies cuyo origen es la bodega.

Los datos de las Figuras 26 a 24, 39 a 43 y los de la Tabla 22 muestran que en la fase correspondiente a mostos recién sangrados sin SO_2 , la presencia de *Saccharomyces cerevisiae* no es evidente en todas las muestras, ya que se detecta en once de los dieciseis mostos. La causa de que en cinco de estos depósitos no se aislase esta especie, puede ser que se encuentre en muy baja concentración y no se viese representada en las diluciones empleadas para los recuentos y aislamientos. En aquellos depósitos en los que sí se detectaba estaba en una frecuencia igual o inferior al resto de especies, alcanzando valores de 10^4 a 10^6 ufc/ml. En general los autores encuentran en España un gran número de *Saccharomyces cerevisiae* en los mostos al inicio de la fermentación, y una baja representación del resto de especies [219, 220, 318]. Por otro lado en otros países se ha observado que *Saccharomyces cerevisiae* es minoritaria frente al resto de especies acompañantes [75, 115, 140, 142, 219, 220, 224, 236, 237, 289, 318, 320]. Nuestros resultados muestran que esta especie se presenta en general, en números más bajos o iguales (Figuras 26 a 34 y 39 a 43) a los de especies tales como *C. pulcherrima*, *C. stellata* y *Kloeckera apís*. Esta discordancia en los resultados puede deberse a que los mostos en los que *Saccharomyces cerevisiae* predomina fueran muestreados en momentos más avanzados de la fermentación alcohólica.

Deposito "A"

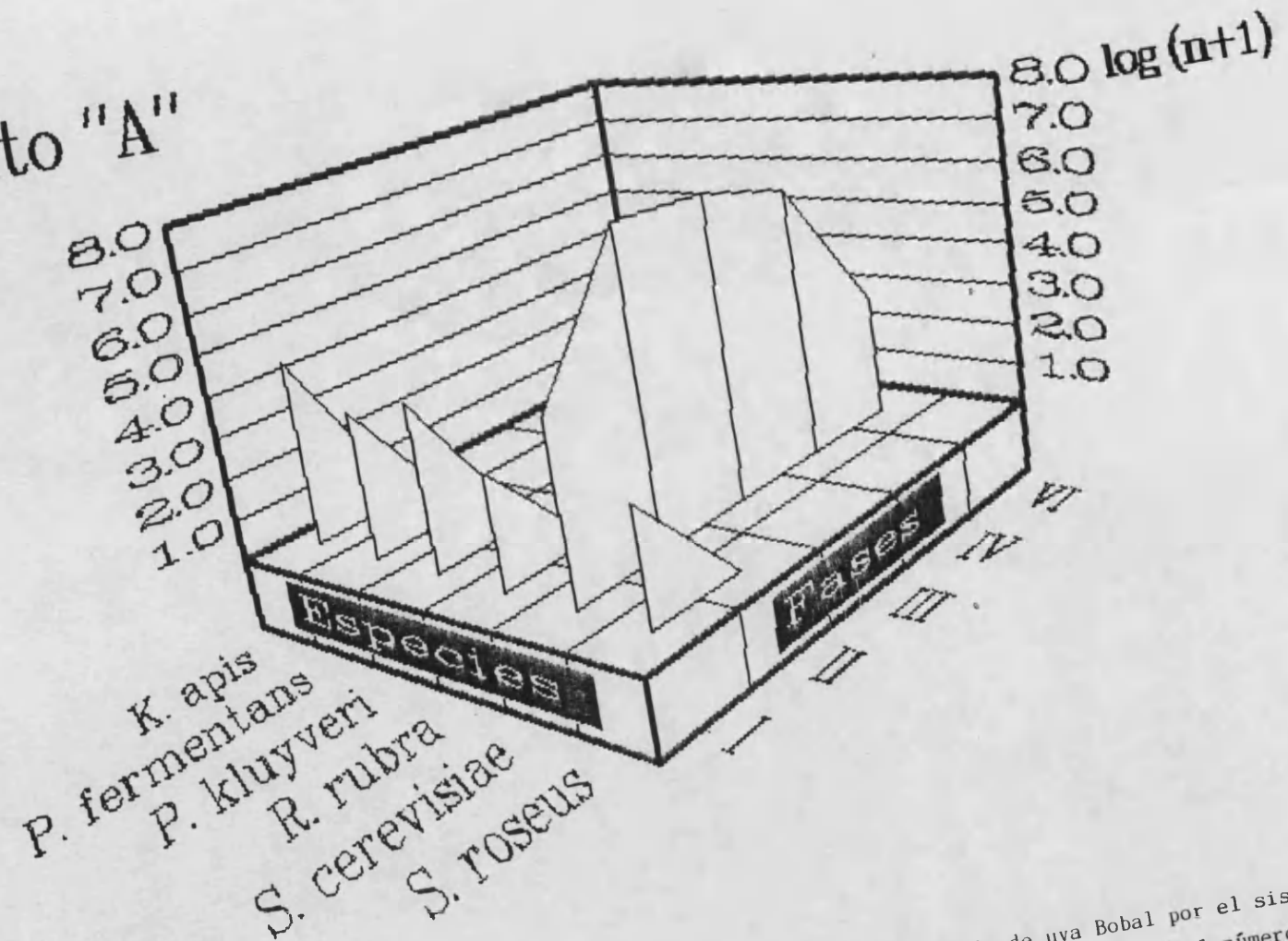


Figura 26.- Evolución de las especies levaduriformes en el depósito A. Vinificación de uva Bobal por el sistema tradicional. (Cooperativa San Pedro), campaña 1982. Los recuentos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml.

Deposito "B"

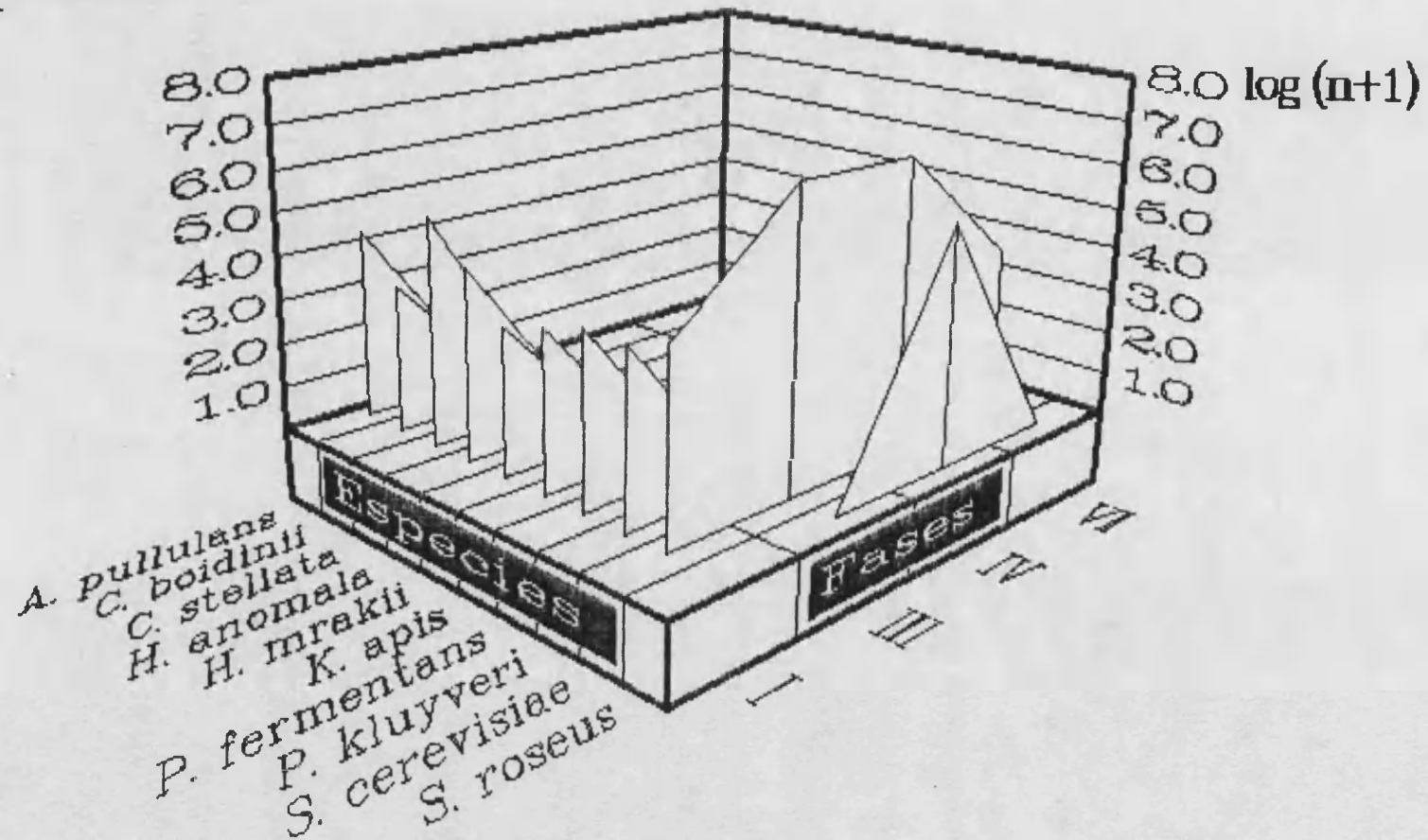


Figura 27.- Evolución de las especies levaduriformes en el depósito B. Vinificación de uva Bobal por el sistema tradicional. (Cooperativa San Pedro), campaña 1982. Los recuentos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. *A. pullulans* no está considerada levadura en las actuales obras de taxonomía de levaduras.

Deposito "C"

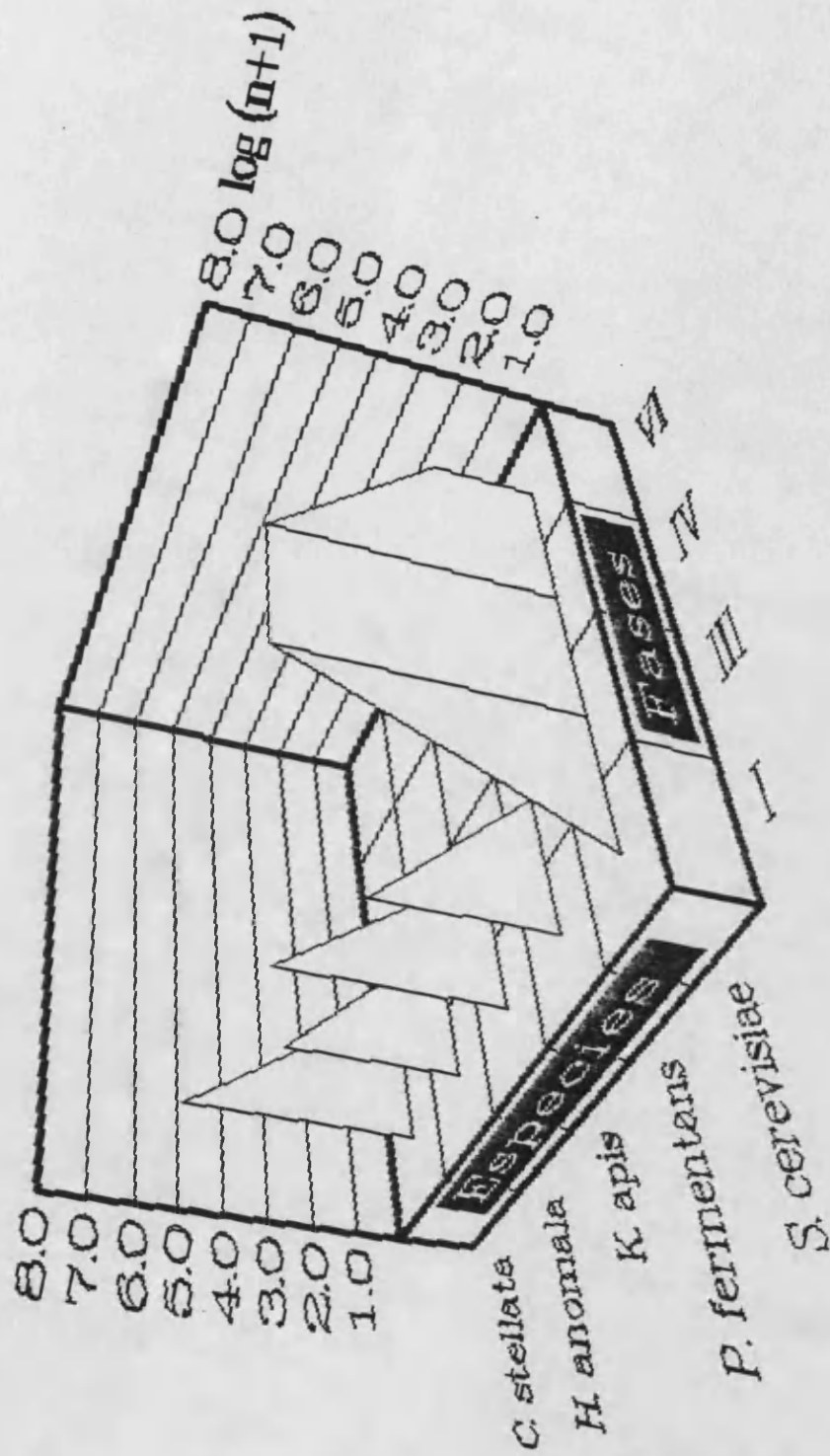


Figura 28.- Evolución de las especies levaduriformes en el depósito C. Vinificación de uva Bobal por el sistema tradicional. (Cooperativa San Pedro), campaña 1982. Los recuentos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml.

Deposito "D"

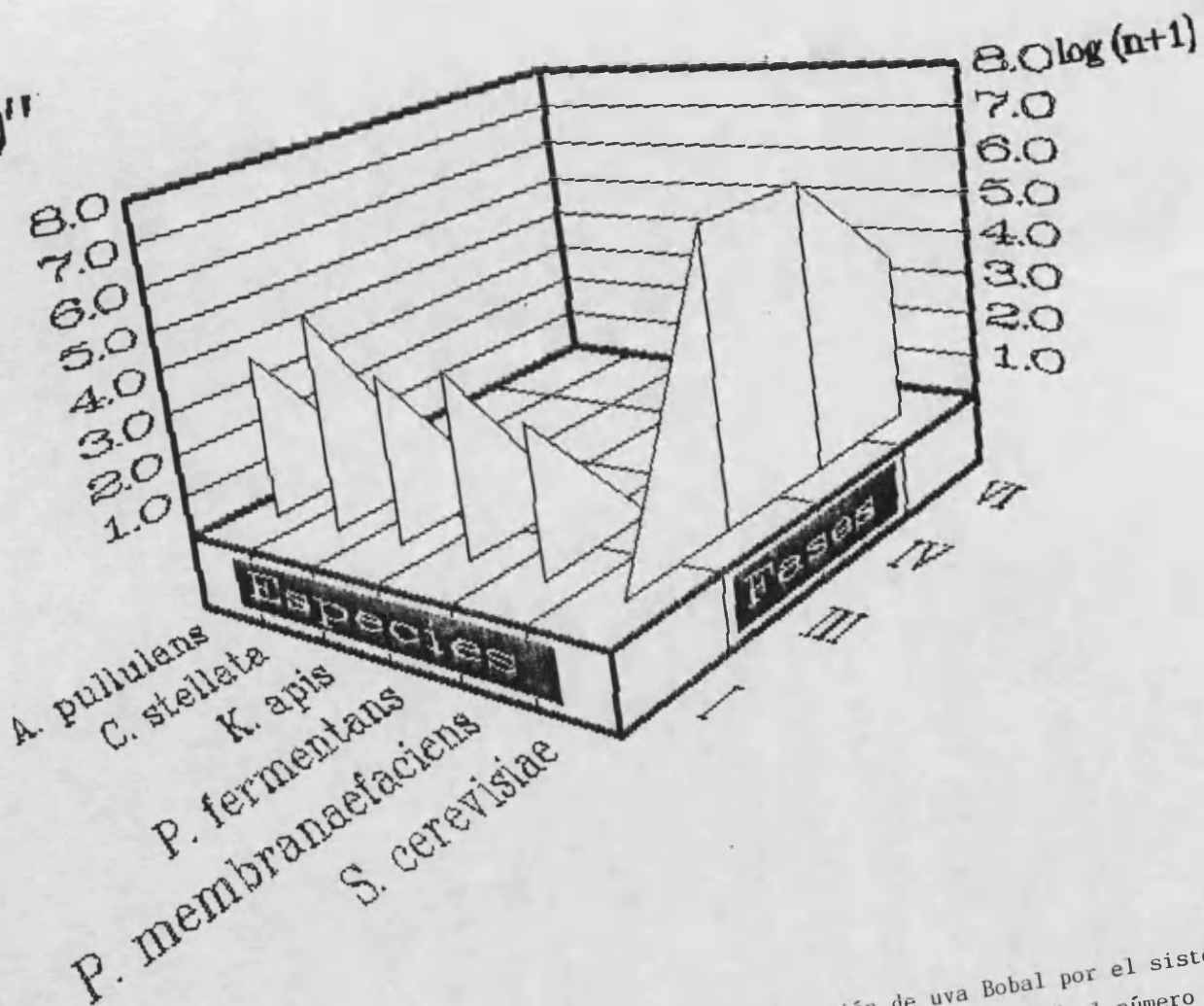


Figura 29.- Evolución de las especies levaduriformes en el depósito D. Vinificación de uva Bobal por el sistema tradicional. (Cooperativa San Pedro), campaña 1982. Los recuentos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. *A. pullulans* no está considerada levadura en las actuales obras de taxonomía de levaduras.

Deposito "E"

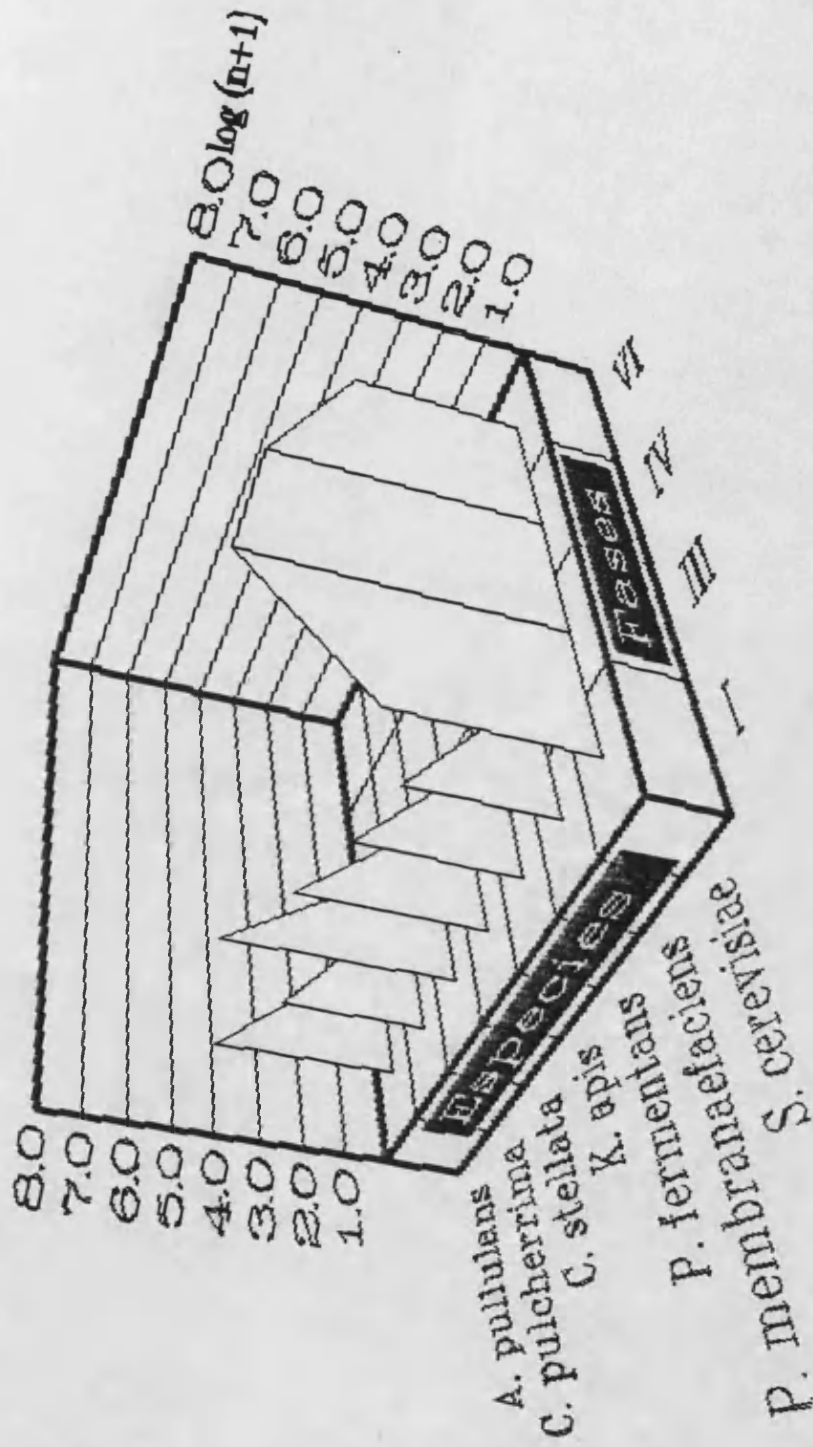


Figura 30.- Evolución de las especies levaduriformes en el depósito E. Vinificación de uva Bobal por el sistema tradicional. (Cooperativa San Pedro), campaña 1982. Los recuentos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. A. pullulans no está considerada levadura en las actuales obras de taxonomía de levaduras.

Deposito "F"

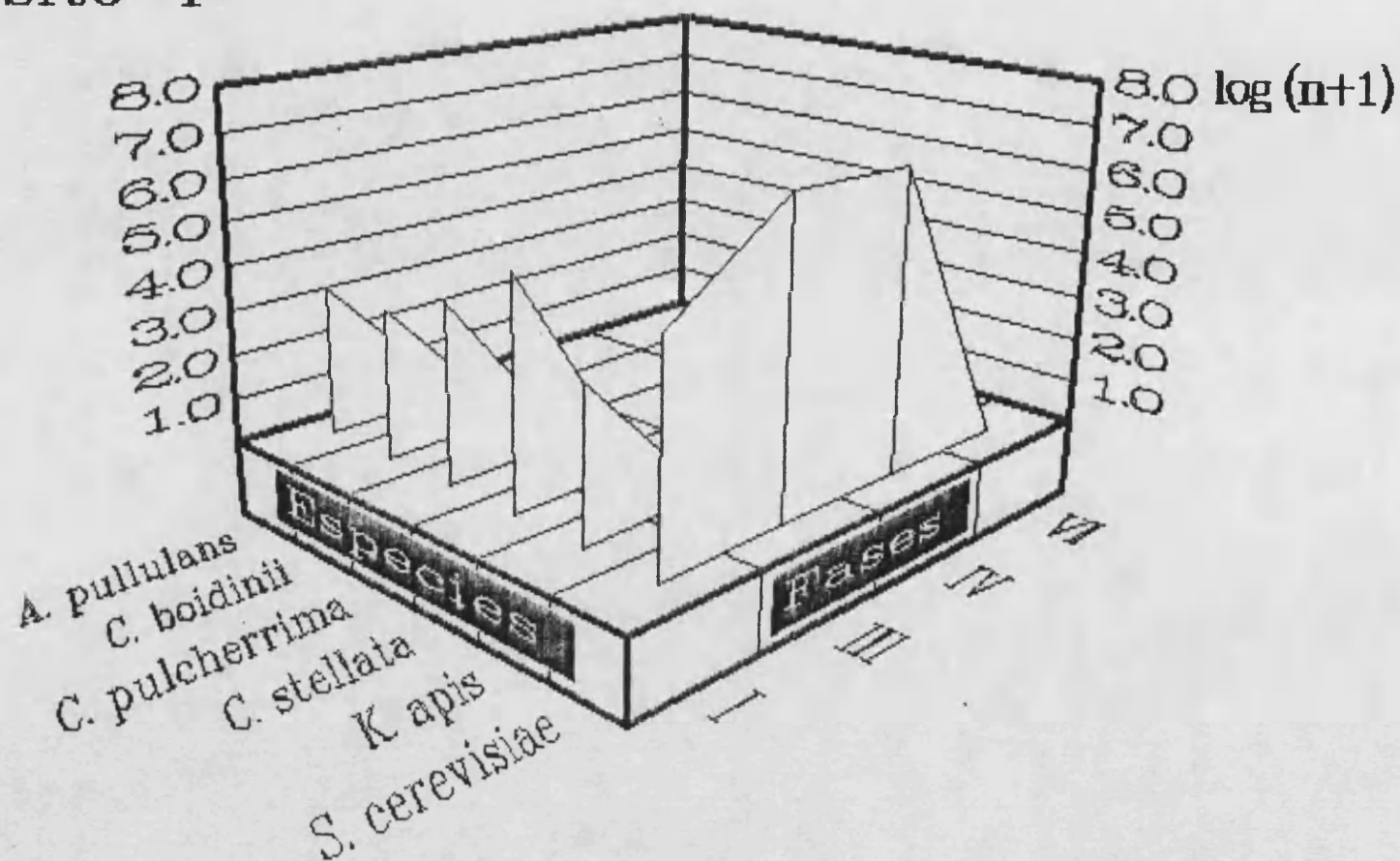


Figura 31.- Evolución de las especies levaduriformes en el depósito F. Vinificación de uva Bobal por el sistema tradicional. (Cooperativa San Pedro), campaña 1982. Los recuentos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. *A. pullulans* no está considerada levadura en las actuales obras de taxonomía de levaduras.

Deposito "G"

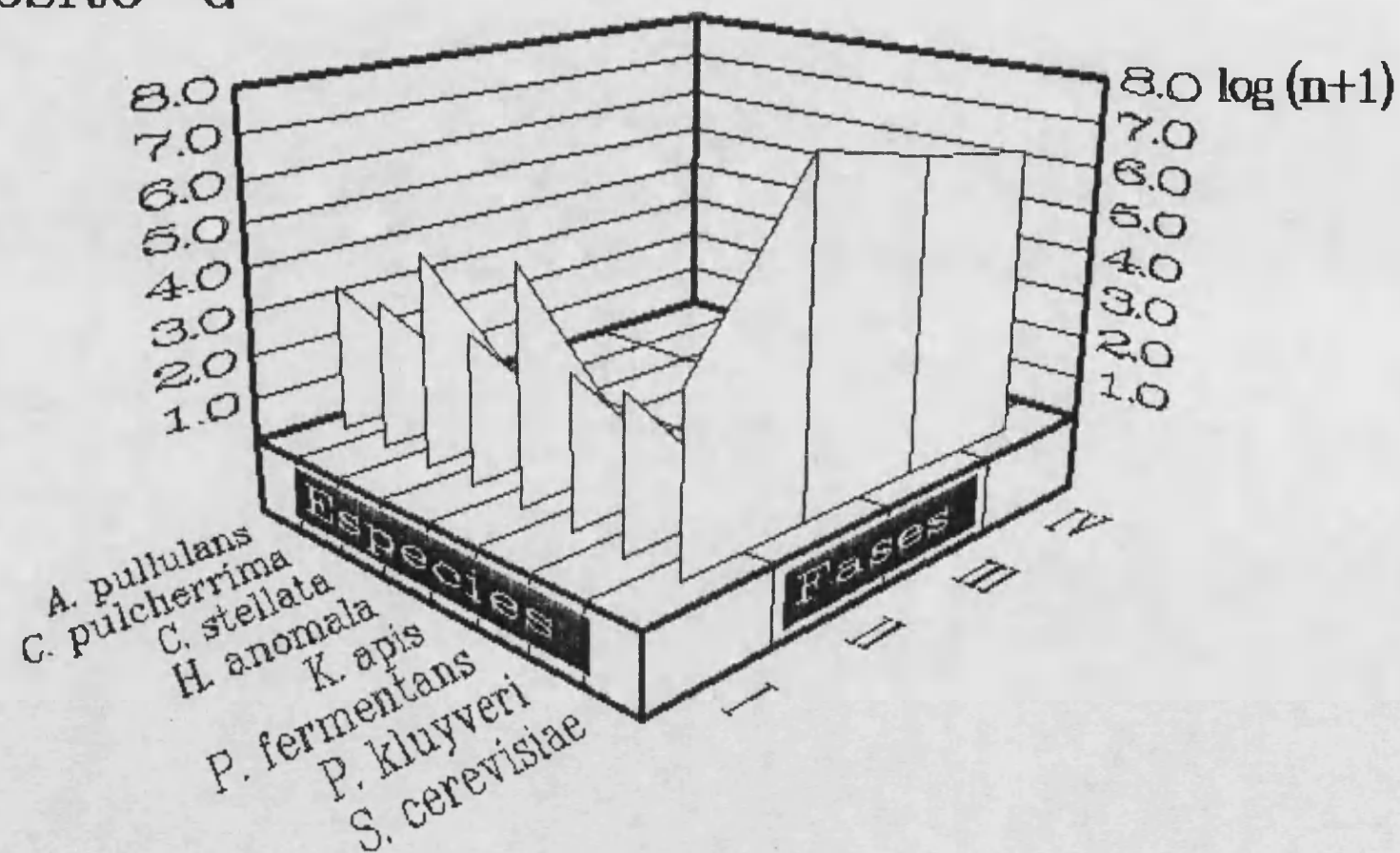


Figura 32.- Evolución de las especies levaduriformes en el depósito G. Vinificación de uva Bobal por el sistema tradicional. (Cooperativa San Pedro), campaña 1982. Los recuentos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. A. pullulans no está considerada levadura en las actuales obras de taxonomía de levaduras.

Medias Coop. 1982

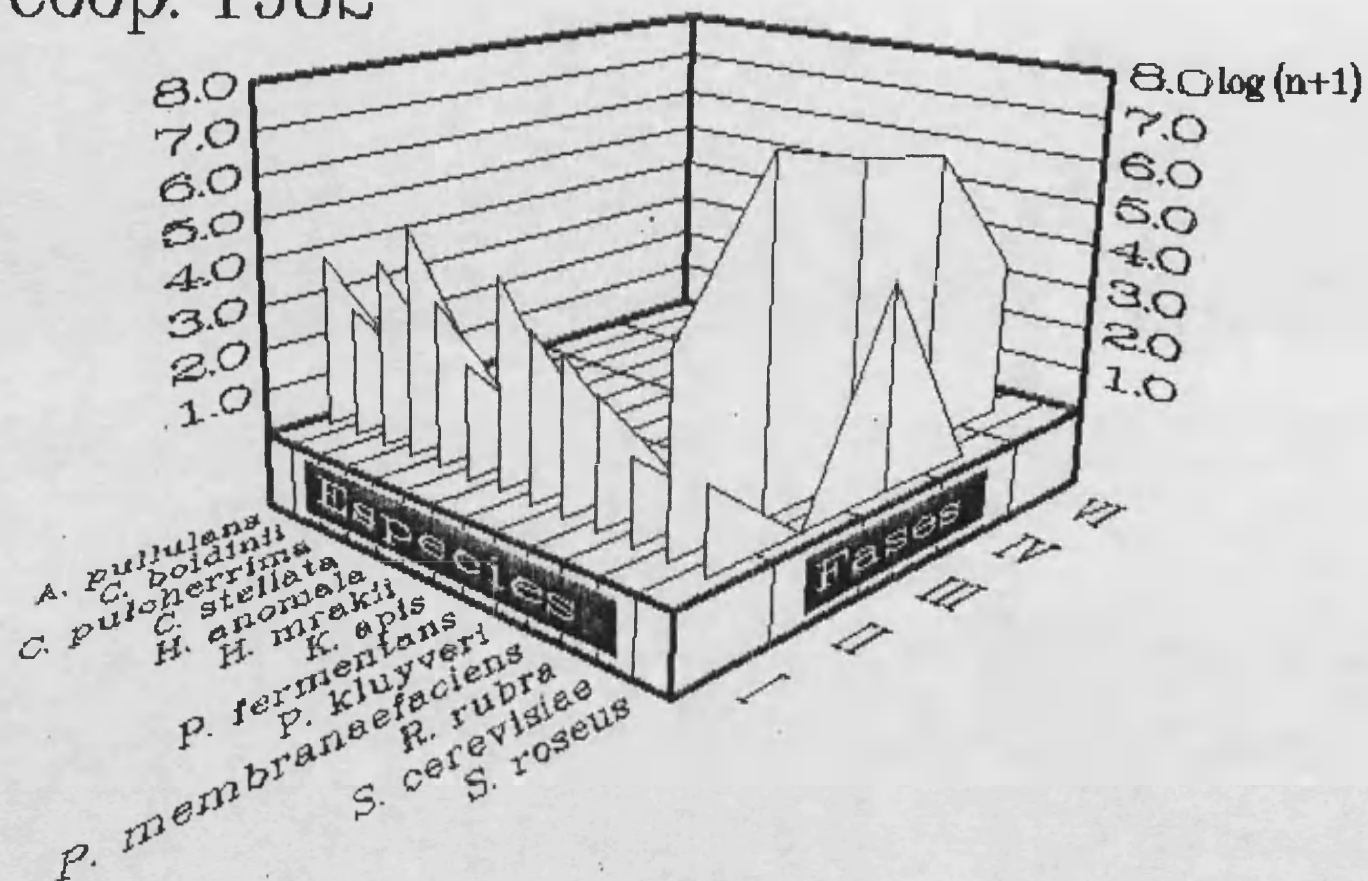


Figura 33.- Evolución de las especies levaduriformes durante la vinificación tradicional. (Cooperativa San Pedro), campaña 1982. Los datos de la figura representan las medias de los valores obtenidos a partir de los depósitos muestreados en cada fase. Los recuentos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. A. pullulans no está considerada levadura en las actuales obras de taxonomía de levaduras.

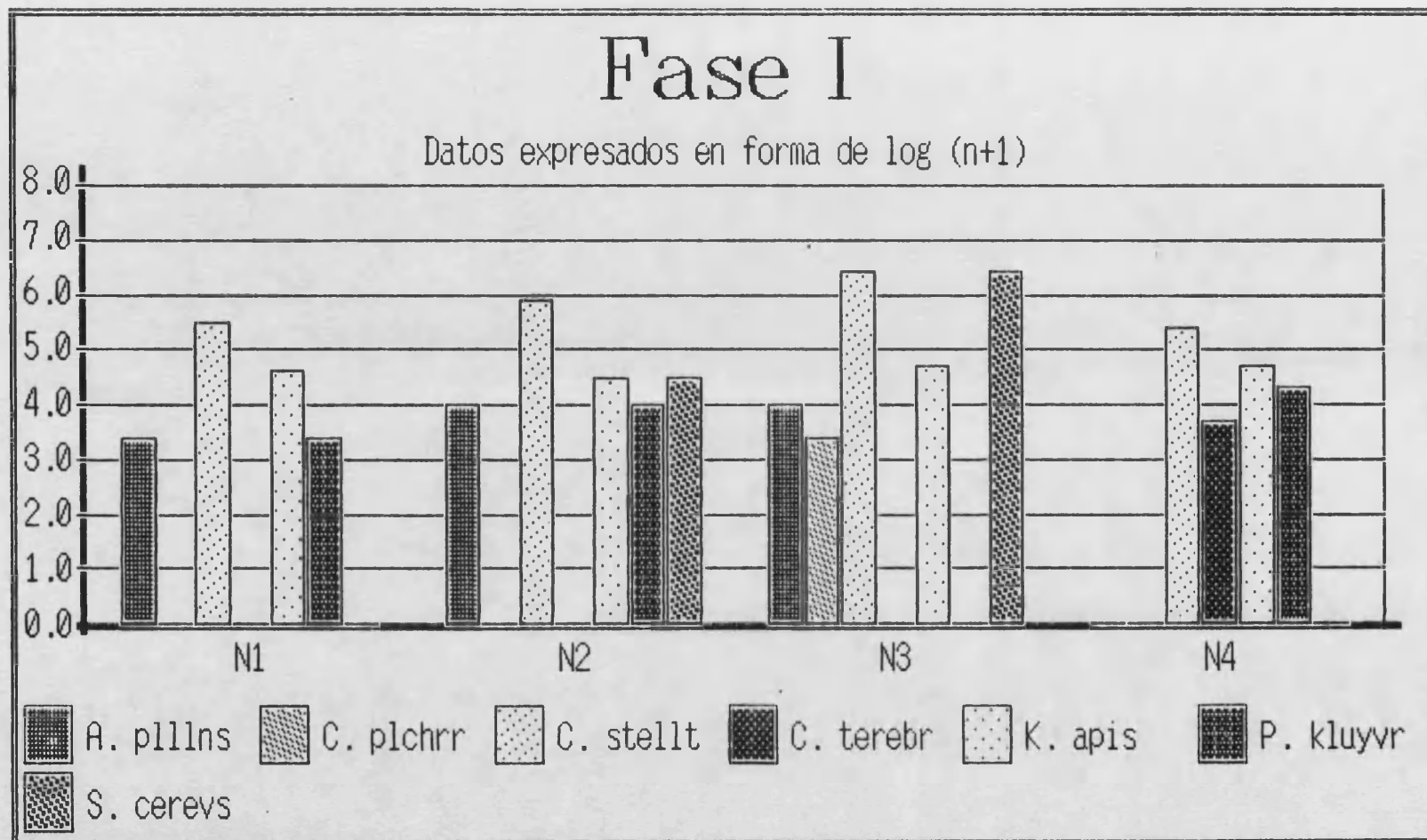


Figura 34.- Especies levaduriformes asociadas a mostos sin sulfitar (Fase I). Vinificación de uva Bobal sistema Bidone. (Cooperativa San Pedro), campaña 1983. Los recuentos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. "A. plllns" es *Aureobasidium pullulans* (que no es considerada levadura por las actuales obras de taxonomía de levaduras). "C. plchrr" es *Candida pulcherrima*. "C. stellt" es *Candida stellata*. "C. terebr" es *Candida terebra*. "K. apis" es *Kloeckera apis*. "P. kluyvr" es *Pichia kluyveri* y "S. cerevs" es *Saccharomyces cerevisiae*.

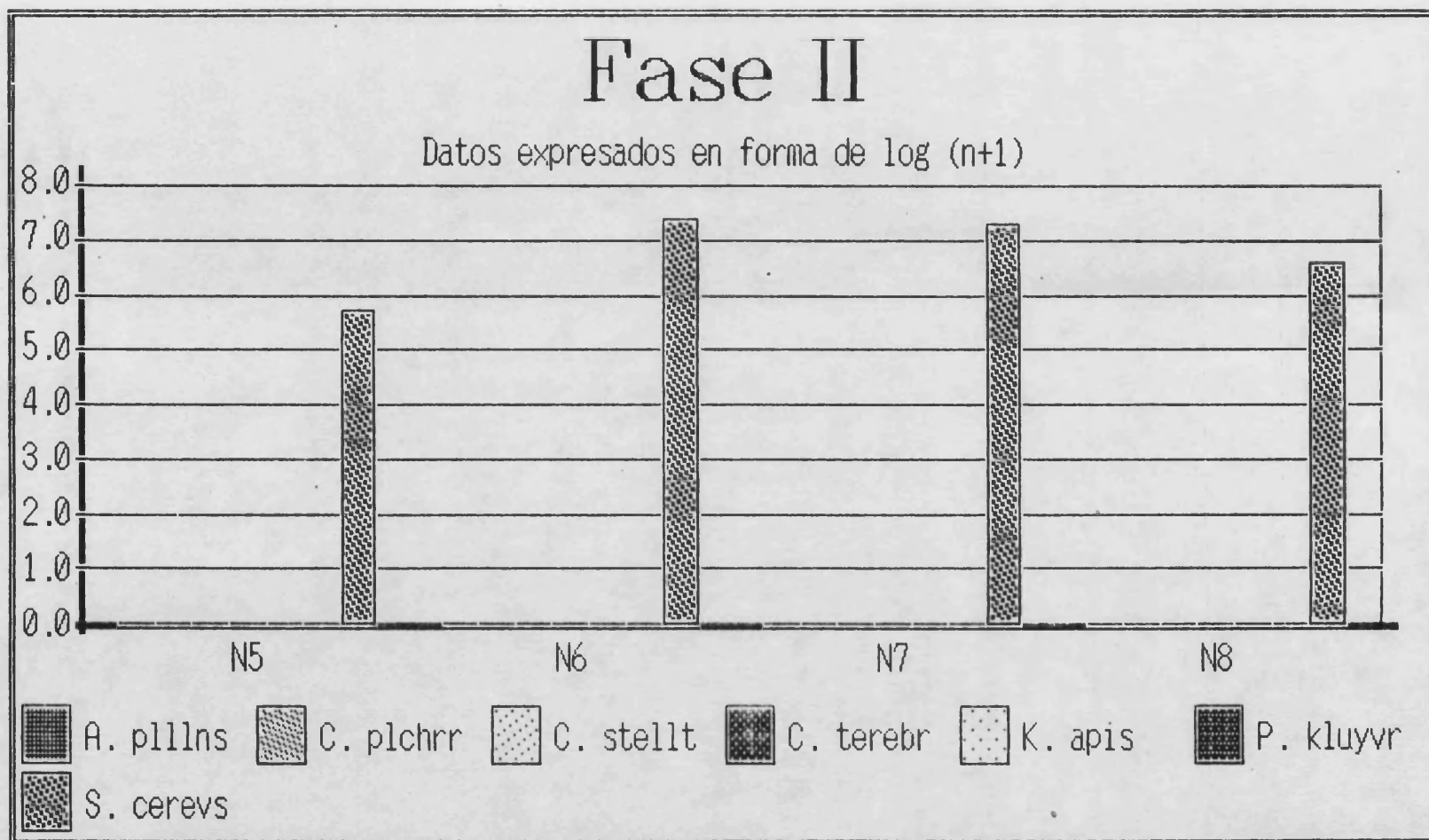


Figura 35.- Especies levaduriformes asociadas a mostos en plena fermentación (Fase II). Vinificación de uva Bobal sistema Bidone. (Cooperativa San Pedro), campaña 1983. Los recuentos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. Las abreviaturas de esta tabla están definidas en el pie de la figura 34.

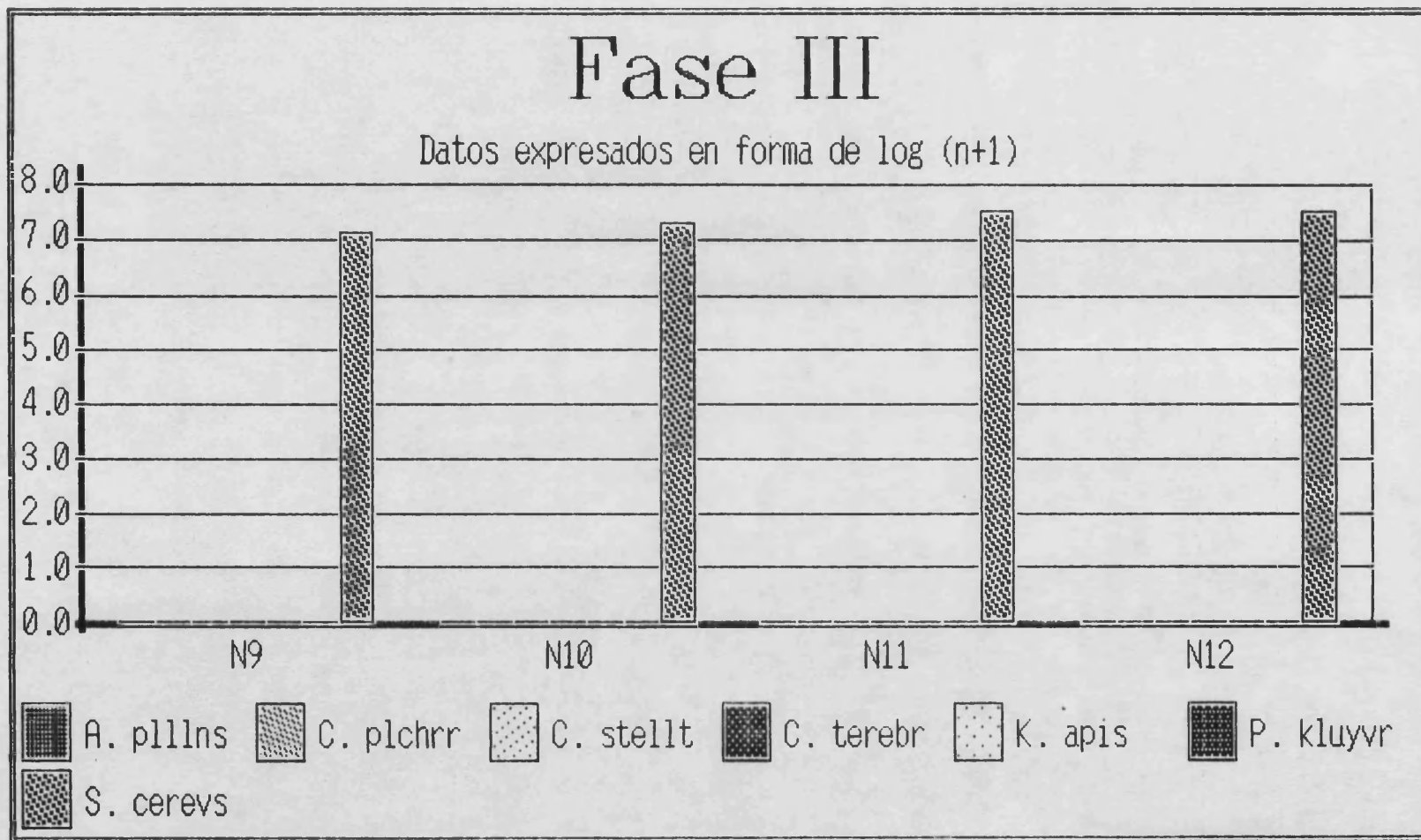


Figura 36.- Especies levaduriformes asociadas con el final de la fermentación tumultuosa (Fase III). Vinificación de uva Bobal sistema Bidone. (Cooperativa San Pedro), campaña 1983. Los recuentos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. Las abreviaturas de esta tabla están definidas en el pie de la figura 34.

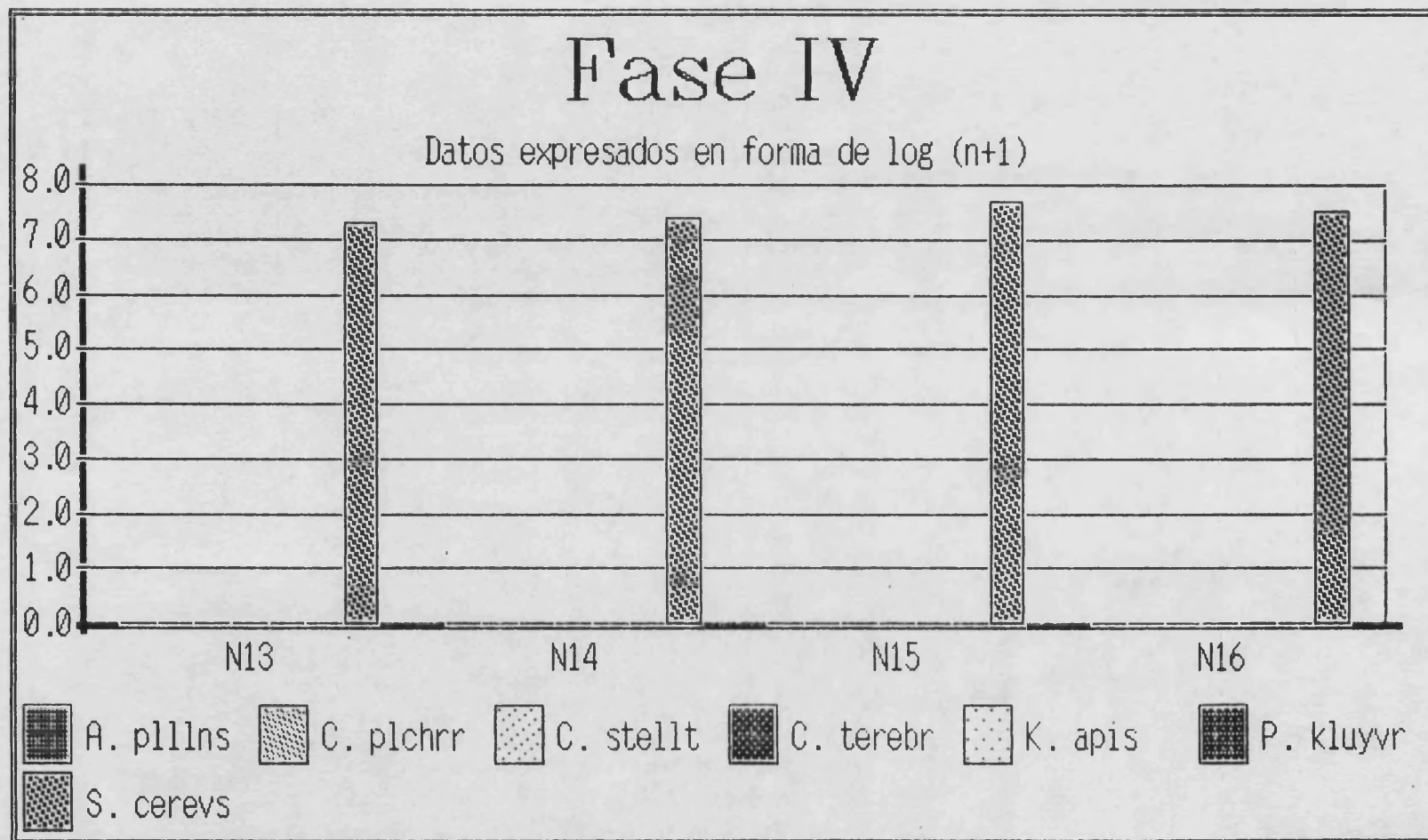


Figura 37.- Especies levaduriformes asociadas con el final de la fermentación alcohólica (Fase IV). Vinificación de uva Bobal sistema Bidone. (Cooperativa San Pedro), campaña 1983. Los recuentos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. Las abreviaturas de esta tabla están definidas en el pie de la figura 34.

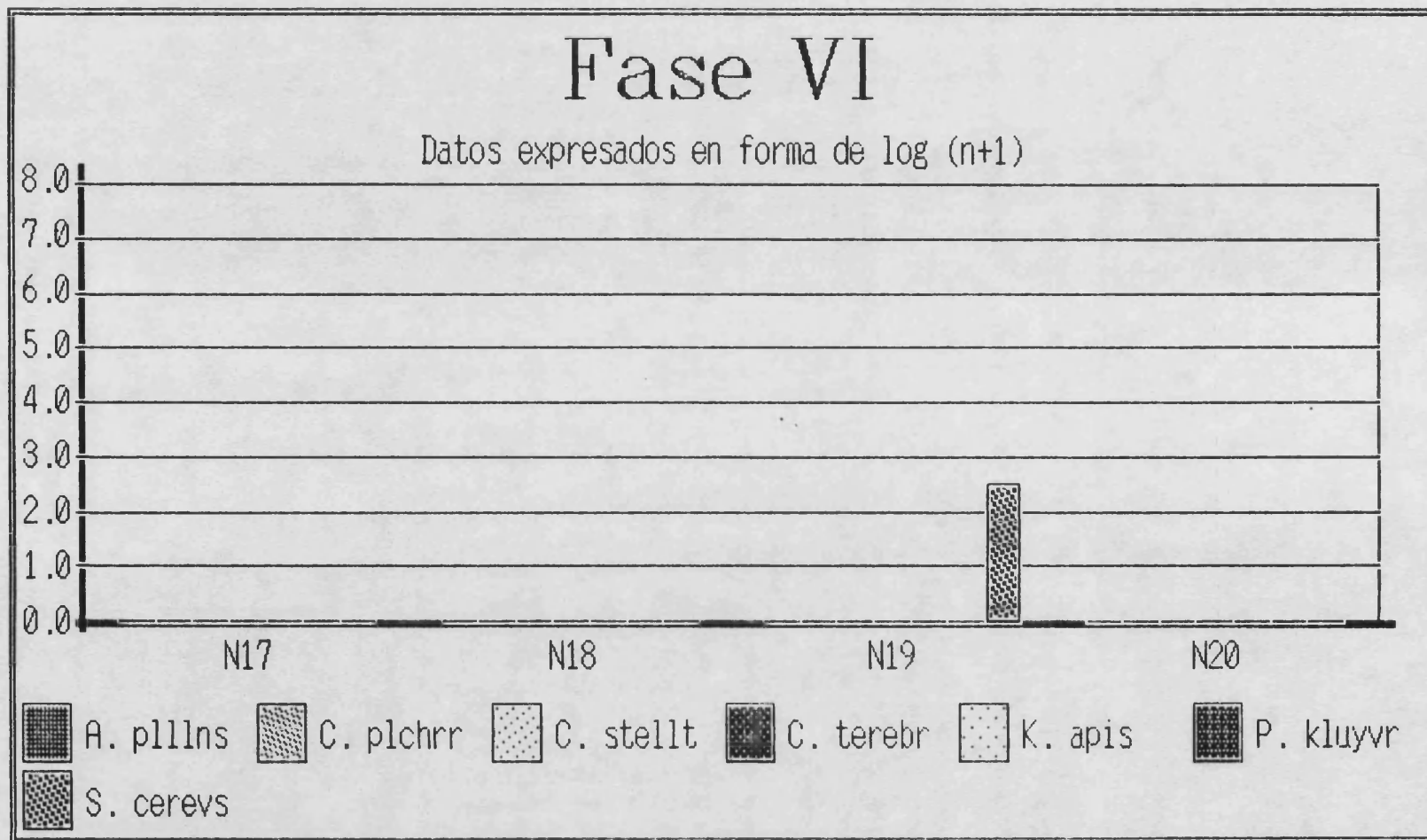


Figura 38.- Especies levaduriformes halladas tras el primer trasiego (Fase VI). Vinificación de uva Bobal sistema Bidone. (Cooperativa San Pedro), campaña 1983. Los recuentos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. Las abreviaturas de esta tabla están definidas en el pie de la figura 34.

Medias Coop. 1983

Datos expresados en forma de $\log(n+1)$

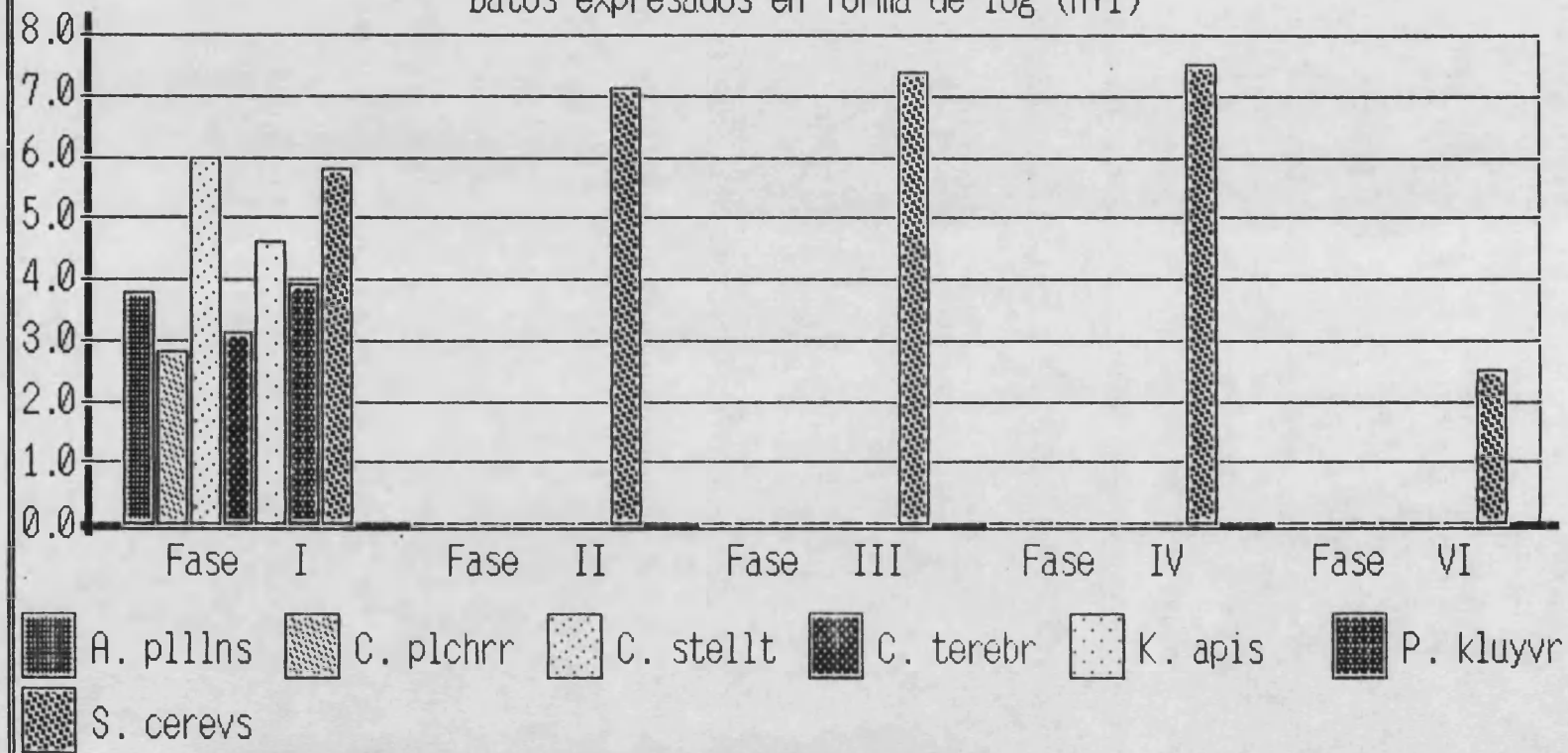


Figura 39.- Evolución de las especies levaduriformes durante la vinificación por el sistema Bidone. (Cooperativa San Pedro), campaña 1983. Los datos de la figura representan las medias de los valores obtenidos a partir de los depósitos muestreados en cada fase. Los recuentos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. Las abreviaturas de esta tabla están definidas en el pie de la figura 34.

Bobal

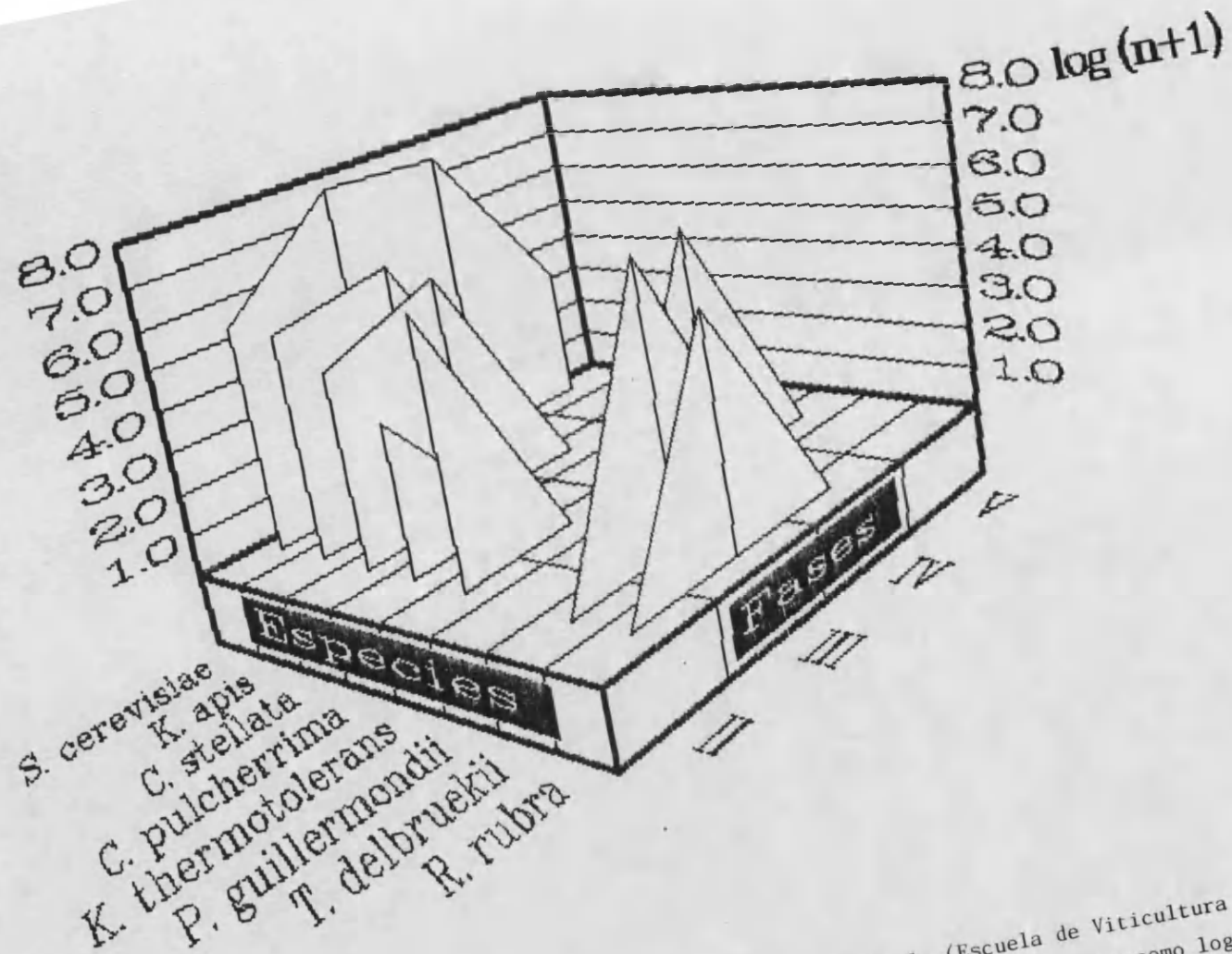


Figura 40. - Evolución de las especies levaduriformes en la vinificación de Bobal. (Escuela de Viticultura y Enología), campaña 1983. Condiciones de vinificación especificadas en la Tabla 2. Los recuentos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml.

Macabeo

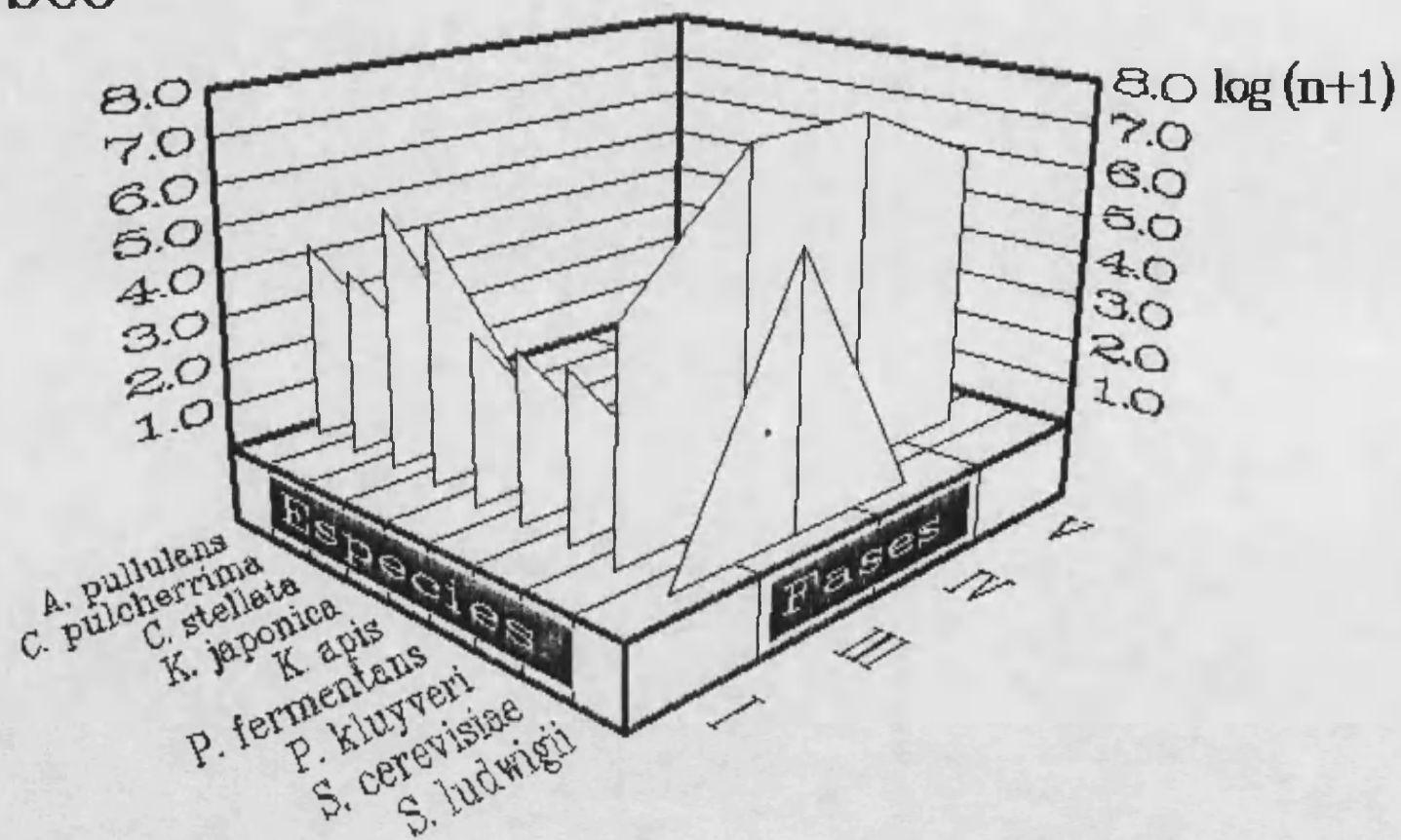


Figura 41.- Evolución de las especies levaduriformes en la vinificación de Macabeo. (Escuela de Viticultura y Enología), campaña 1983. Condiciones de vinificación especificadas en la Tabla 2. Los recuentos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. *A. pullulans* no se considera levadura en las actuales obras de taxonomía de levaduras.

Garnacha

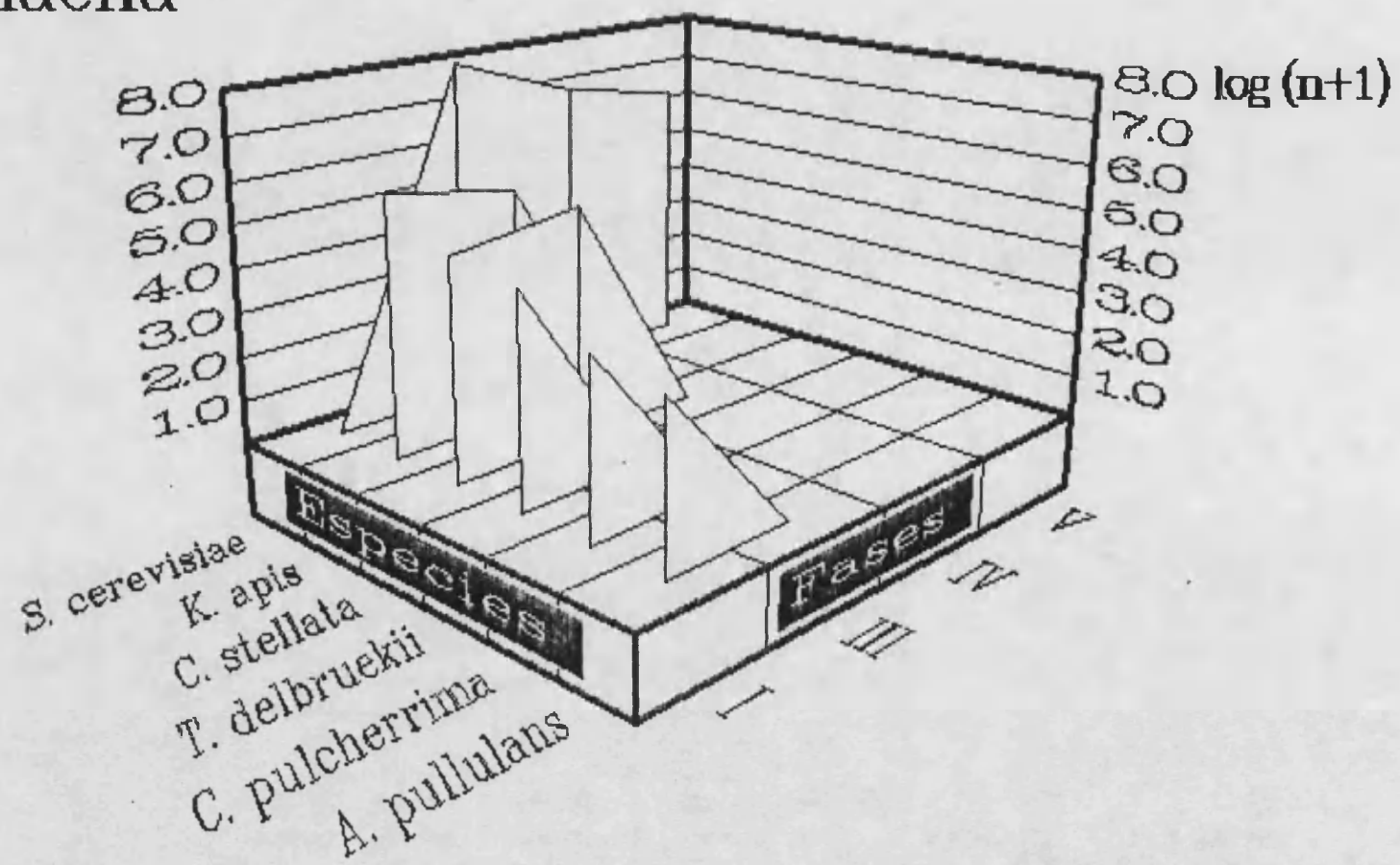


Figura 42.- Evolución de las especies levaduriformes en la vinificación de Garnacha. (Escuela de Viticultura y Enología), campaña 1983. Condiciones de vinificación especificadas en la Tabla 2. Los recuentos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. *A. pullulans* no se considera levadura en las actuales obras de taxonomía de levaduras.

Tempranillo

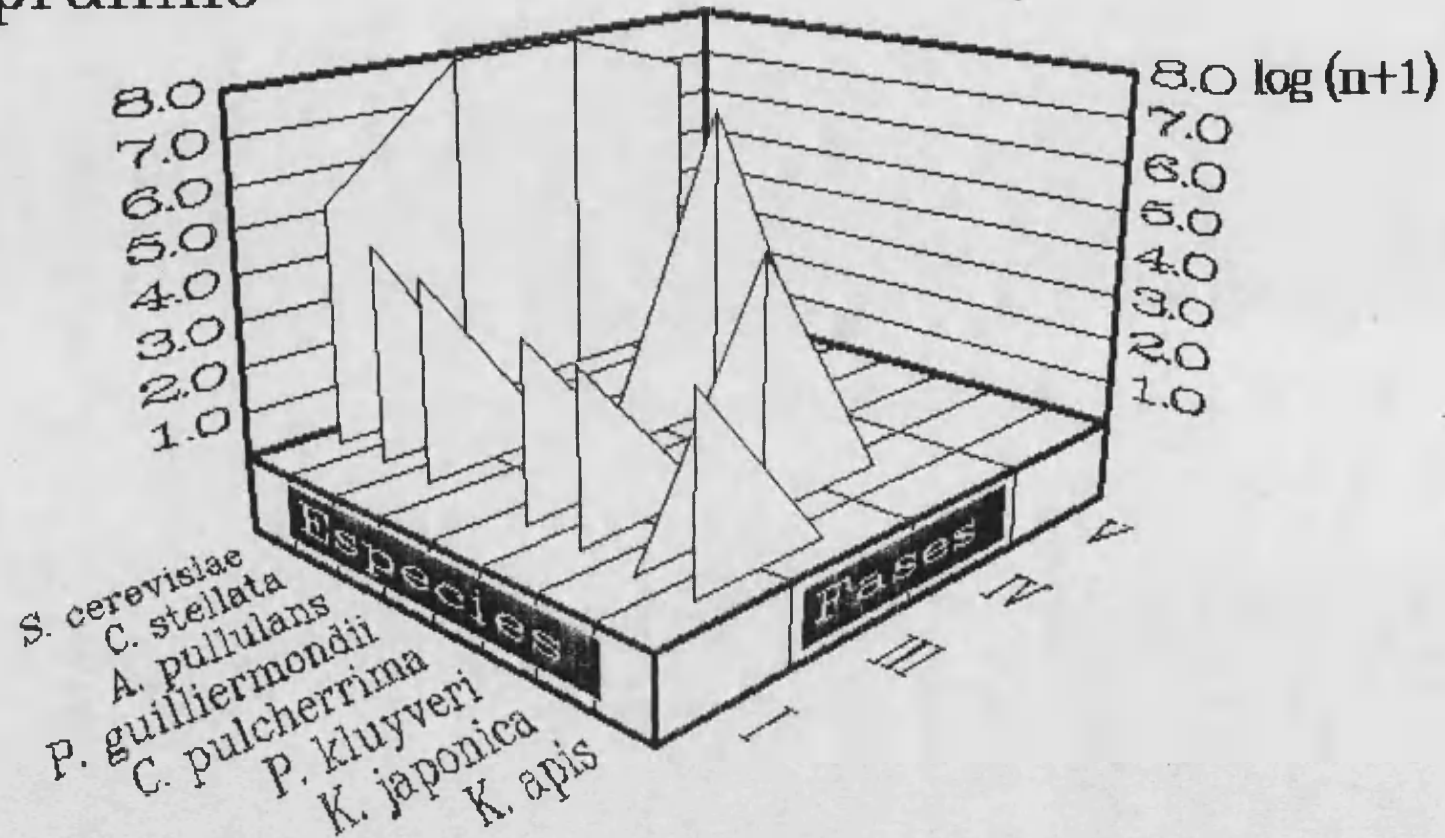


Figura 43.- Evolución de las especies levaduriformes en la vinificación de Tempranillo. (Escuela de Viticultura y Enología), campaña 1983. Condiciones de vinificación especificadas en la Tabla 2. Los recuentos se expresan como $\log(n+1)$, siendo "n" el número de ufc/ml. *A. pullulans* no se considera levadura en las actuales obras de taxonomía de levaduras.

	1982							1983							Mac	Gar	Tem	C-S	TOTAL
	A	B	C	D	E	F	G	N1	N2	N3	N4								
<i>A. pullulans</i> [*]	0	2.5x10 ⁴	0	7.5x10 ³	1.5x10 ⁴	2.5x10 ³	2.5x10 ³	2.5x10 ³	1.0x10 ⁴	1.0x10 ⁵	0	2.3x10 ⁴	5.0x10 ³	2.3x10 ⁴	1.7x10 ⁵	3.9x10 ⁵			
<i>C. boidinii</i>	0	2.5x10 ³	0	0	0	2.5x10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.0x10 ³			
<i>C. pulcherrima</i>	0	0	0	0	2.0x10 ³	1.0x10 ⁴	2.5x10 ³	0	0	2.5x10 ³	0	1.3x10 ⁴	1.0x10 ⁴	7.5x10 ³	1.3x10 ⁴	6.1x10 ⁴			
<i>C. stellata</i>	0	1.5x10 ⁵	2.0x10 ⁵	1.4x10 ⁵	2.1x10 ⁵	1.4x10 ⁵	5.8x10 ⁴	1.1x10 ⁵	1.2x10 ⁵	2.6x10 ⁶	2.8x10 ⁵	6.4x10 ⁵	1.1x10 ⁵	7.0x10 ⁴	0	4.8x10 ⁶			
<i>H. anomala</i>	0	2.3x10 ⁴	7.5x10 ³	0	0	0	2.5x10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0	3.3x10 ⁴			
<i>H. mrakii</i>	0	2.5x10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.5x10 ³			
<i>K. apis</i>	3.3x10 ⁴	5.0x10 ³	1.1x10 ⁵	7.5x10 ³	2.0x10 ⁴	2.5x10 ³	2.0x10 ⁵	4.3x10 ⁴	3.5x10 ⁴	4.5x10 ⁴	5.5x10 ⁴	5.0x10 ³	9.1x10 ⁵	1.3x10 ⁴	1.4x10 ⁵	1.6x10 ⁶			
<i>K. japonica</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.9x10 ⁵	0	0	0	3.9x10 ⁵			
<i>P. fermentans</i>	3.0x10 ³	1.0x10 ⁴	9.0x10 ³	1.5x10 ⁴	5.0x10 ³	0	2.5x10 ³	0	0	0	0	5.0x10 ³	0	0	0	5.0x10 ⁴			
<i>P. kluyveri</i>	9.8x10 ³	1.0x10 ⁴	0	0	0	0	2.5x10 ³	2.5x10 ³	1.0x10 ⁴	0	2.0x10 ⁴	5.0x10 ³	0	5.0x10 ³	0	6.5x10 ⁴			
<i>P. membranacefaciens</i>	0	0	0	2.5x10 ³	2.5x10 ³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.0x10 ³			
<i>R. rubra</i>	5.0x10 ²	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0x10 ¹	5.1x10 ²			
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i>	1.5x10 ⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.5x10 ⁴			
<i>capensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.8x10 ⁴	0	0	0	7.8x10 ⁴			
<i>cerevisiae</i>	0	0	0	0	3.0x10 ⁴	5.0x10 ⁴	7.5x10 ³	0	3.3x10 ⁴	1.4x10 ⁵	0	0	0	2.5x10 ⁵	0	5.1x10 ⁵			
<i>chevalieri</i>	0	0	0	0	0	2.5x10 ⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.5x10 ⁴			
<i>uvarum</i>	0	2.0x10 ⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.0x10 ⁴			
<i>S. roseus</i>	5.0x10 ²	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.0x10 ²			
<i>I. delbrueckii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.0x10 ⁴	0	1.4x10 ⁵	2.0x10 ⁵			
TOTAL	6.2x10 ⁴	2.5x10 ⁵	3.3x10 ⁵	1.7x10 ⁵	2.8x10 ⁵	2.3x10 ⁵	2.8x10 ⁵	1.6x10 ⁵	2.1x10 ⁵	2.9x10 ⁶	3.6x10 ⁵	1.2x10 ⁶	1.1x10 ⁶	3.7x10 ⁵	4.6x10 ⁵	8.3x10 ⁶			

Tabla 22.- Especies de levaduras asociadas a mostos sin sulfitar recién sangrados (Fase I). Los números expresan la cantidad de células viables en forma de ufc/ml.

^{*}Esta especie no está considerada levadura en las actuales obras de taxonomía de levaduras.

Las especies que siempre aislábamos independientemente de la localización del viñedo de origen, del año o de la variedad (Tabla 22) eran *Kloeckera apis*, *Candida pulcherrima* y la "levadura negra" *Aureobasidium pullulans*. *Candida stellata* aparece en trece de los mostos muestreados y en la única variedad en la que no se ha detectado es en Cabernet-Sauvignon, a pesar de que este tipo de vid se cultivó en el mismo viñedo que las variedades Macabeo, Garnacha, Tempranillo y Bobal vinificadas en la Escuela de Viticultura y Enología de Requena. Las especies que aparecen más frecuentemente en los aislamientos son las cuatro anteriormente nombradas seguidas por *Pichia kluyveri*, *Pichia fermentans* y *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae*. *Pichia kluyveri* no se aisló en Garnacha ni Cabernet-Sauvignon, *Pichia fermentans*, muy frecuente en los aislamientos de 1982 en la Cooperativa, no se aisló en 1983 en esta bodega y sólo se aisló en la variedad Macabeo de la Escuela de Viticultura y Enología de Requena *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae* no aparece en todos los casos pero esto puede deberse a su baja concentración en distintos depósitos, según apuntábamos anteriormente.

Un hecho notable que se desprende de los datos de la Tabla 22 es la abundancia de especies distintas en los mostos frescos vinificados en la Cooperativa San Pedro en 1982, en comparación con los muestreados en 1983. En 1982 se aislaron 13 especies y 3 variedades de *S. cerevisiae* distintas. Sin embargo al año siguiente sólo se encontraron seis especies distintas en la misma bodega, mientras que en las variedades procedentes de la Escuela de Viticultura y Enología de Requena ese año 1983 se aislaron 9 especies y dos variedades de *S. cerevisiae*. Las razones de esta disminución de especies en 1983 pueden ser varias. En 1982 se trabajó con tres medios de cultivo en placa para el recuento de levaduras, uno para el recuento de mohos y dos para el recuento de bacterias acéticas. En 1983 se eligió el medio MB con difenilo a pH 5.5 para el recuento de levaduras ya que era en

el que mayor número de especies distintas aparecían (Tabla 21). Por otro lado se abandonó el recuento de bacterias lácticas por lo cual dejaron de utilizarse los medios AM y MC. Si estudiamos la Tabla 21 observaremos que algunas de las especies no fueron aisladas sobre MB, sino sobre ASD y MC como es el caso de *Candida boidinii* y *Hansenula mrakii*. *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* se aisló en MB acidificado con ácido cítrico pero no en MB con difenilo a pH 5.5. De ahí que éstas no aparezcan en los aislamientos realizados en 1983. *Saccharomyces uvarum* (actualmente *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum*) se ha aislado esporádicamente en mostos de alguna región francesa [237]; también en Checoslovaquia [224] y en España en Valladolid [161], Galicia [262] y en mostos sulfitados de la D.O. Utiel-Requena [220].

Otras especies detectadas en mostos de la Cooperativa San Pedro en 1982 pero no en 1983, son *Hansenula anomala*, *Pichia membranaefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri* y *Sporobolomyces roseus*. Consultando la bibliografía relacionada con la aparición de estas especies hemos comprobado que en Francia [75, 75, 77, 237, 261, 304] *Pichia membranaefaciens* se asocia a uvas, material de vendimia, a bodegas y a mostos; en este último caso la aparición de esta especie es muy baja y no se aísla todos los años [304]. *Hansenula anomala* se ha aislado en manos y tijeras de vendimiadores y en mosto, pero siempre en bajo número y muy esporádicamente [237]. *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* (antiguamente *Saccharomyces bayanus*) no se aislaba frecuentemente en los mostos [77, 261], pero a veces se presentaba de forma esporádica en algunas regiones [75, 77]. En Italia ROSINI et al. encontraron *Pichia membranaefaciens* y *Saccharomyces bayanus* sobre uvas [287], si bien ROSINI y PASQUALI [289] no encuentran en mostos ninguna de las especies aisladas por nosotros. En Grecia [320], al igual que nosotros en España, se han aislado *Hansenula anomala* y *Saccharomyces bayanus*, mientras que en Checoslovaquia

MINARIK [224] aisló *Hansenula anomala* y *Pichia membranaefaciens*, ésta última en baja frecuencia. En Estados Unidos PARISH y CARROLL [236] aislaron *Pichia membranaefaciens* en algunos de los mostos muestreados, pero no describen la presencia de otras especies aisladas por nosotros. En Japón, GOTO y OGURI [141] encontraron *Pichia membranaefaciens* y *Saccharomyces bayanus* en mostos sin sulfitar, así como *Torulopsis stellata* y *Saccharomyces rosei* (actualmente *Candida stellata* y *Torulaspora delbrueckii* respectivamente) también detectadas por nosotros.

En España, la especie *Pichia membranaefaciens* se ha aislado con bajas frecuencias de aparición tanto en mostos [262] como en velos de vinos [317]; también se ha detectado durante la vinificación de mostos de Jerez [131], aunque en un número bajo y variable dependiendo del año. *H. anomala* se ha descrito en algún mosto en fermentación [131, 318], pero su presencia era muy escasa. *Saccharomyces bayanus* también se ha aislado esporádicamente en Galicia [262], en la región levantina [220, 318], y en Jumilla [22]. La especie *Saccharomyces chevalieri* (actualmente *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri*) aparece en mostos de Jerez en un porcentaje que varía entre el 2.7 y el 8.2% del total, dependiendo de los años. *Sporobolomyces roseus* no ha sido descrita como especie asociada a los mostos en ninguno de los trabajos consultados realizados en España [22, 131, 161, 219, 220, 262, 298, 317, 318], aunque QUECEDO [262] aisló una especie de este género, distinta de *S. roseus*, en mostos gallegos.

Toda esta revisión nos informa que *H. anomala*, *P. membranaefaciens*, *S. cerevisiae* var. *bayanus*, *S. cerevisiae* var. *chevalieri*, y *S. roseus*, aisladas por nosotros sólo en 1982 son de distribución geográfica amplia, pero su ocurrencia en mostos no es constante ni en el espacio, ni en el tiempo, ni tampoco se presentan en número elevado. Esta quizá sea la razón que explique su aparición restringida a unas pocas fermentaciones y sólo a un año. Posiblemente las condiciones climáticas de 1982 eran más favorables

al desarrollo de estas especies que las de 1983. La presencia esporádica de *Kloeckera japonica*, *Rhodotorula rubra*, y *Saccharomyces cerevisiae* var. *capensis* en mostos recién sangrados sin sulfitar de la Escuela de Viticultura y Enología, puede tener la misma explicación que la aparición de las especies antes citadas, puesto que los aislamientos de estos microorganismos son raros en general. *Torulaspota delbrueckii* (denominada anteriormente *Saccharomyces rosei*) también es una especie que aparece raramente en mostos de la D.O. Utiel-Requena. No se ha hallado nunca en mostos vinificados en la Cooperativa San Pedro, aunque en los vinificados en la Escuela de Viticultura y Enología de Requena sí se detectó su presencia en dos de ellos y en números bastante elevados. Esta especie fue encontrada en baja frecuencia en la D.O. Utiel-Requena por MATEOS *et al.* [219].

Un aspecto en el que nuestros datos difieren de los de MATEOS *et al.* [219, 220] se refiere a la presencia de las especies *Kloeckera apiculata* y *Kloeckera javanica*. En nuestros aislamientos la mayor parte de las cepas pertenecientes al género *Kloeckera* se han clasificado como *Kloeckera apis* puesto que crecen a 37°C y no asimilan maltosa [165]. Sólo dos cepas se han clasificado como *Kloeckera japonica* debido a que no asimilaron maltosa, no crecieron a 37°C y no asimilaron el 2-cetogluconato [165].

En este trabajo se han considerado cepas de *Saccharomyces cerevisiae* a todas aquéllas que perteneciendo a este género no asimilaban ni cadaverina ni etilamina como fuente de nitrógeno, no crecían con 100 ppm de cicloheximida y presentaban esporas de superficie lisa [165]. Hemos evitado el empleo de la nomenclatura antigua en este género, a pesar de que la mayoría de autores la sigue utilizando. Sin embargo, creemos que es innecesario complicar el panorama con una gran cantidad de especies. Los estudios de homología entre antiguas especies tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces coreanus*, etc. han

establecido un coeficiente muy alto de homología entre ellas por lo que se han considerado la misma especie [165]. KREGER-VAN RIJ ha establecido una serie de razas o variedades dentro de esta especie en función de los patrones de fermentación de azúcares. BARNETT et al. [18] no consideran estas razas en su obra. Como se desprende de la representación de los datos en las Figuras 26 a 43 hemos considerado conjuntamente todas las razas de *Saccharomyces cerevisiae* al representar la evolución de la población levaduriforme a lo largo de la fermentación. Sin embargo, hemos desglosado las razas en las Tablas 22 a 27, a fin de que se pueda apreciar la aparición de las mismas durante la fermentación.

En resumen, los aislamientos realizados en 1982 y 1983 nos muestran una mayor variedad de especies asociadas a los mostos del primer año, algunas de estas especies no aparecían en 1983 al eliminar medios de aislamiento (*Candida boidinii*, *Hansenula mrakii* y *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum*); otras no aparecen porque su presencia en los mostos es bastante aleatoria como es el caso de las especies del género *Pichia*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus*, *Hansenula anomala* y *Sporobolomyces roseus*. Otras especies se presentan de forma más o menos constante constituyendo la flora levaduriforme más característica de los mostos no sulfitados de esta zona. Estas especies son *Aureobasidium pullulans*, *Candida stellata*, *Kloeckera apis*, *Candida pulcherrima*, *Pichia kluyveri* y *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae*. Otras especies como *Torulaspora delbrueckii*, *Kloeckera japonica* o *Saccharomyces cerevisiae* var. *capensis* aparecen sólo en las muestras de 1983, sin embargo no son especies frecuentemente aisladas en esta D.O. [220, 219].

Si estudiamos la dinámica de las levaduras a lo largo de la vinificación, observamos la caída brutal del número de especies tras la sulfitación de los mostos (Figuras 26 a 43). Así, en la Fase II que se

Especies	Escuela Viticultura y Enología 1983				TOTAL
	Bo	Mac	Gar	Tem	
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i>	2.3x10 ³	0	0	0	2.3x10 ³
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>cerevisiae</i>	0	2.0x10 ⁶	2.3x10 ⁶	9.2x10 ⁶	1.4x10 ⁷
TOTAL	2.3x10 ³	2.0x10 ⁶	2.3x10 ⁶	9.2x10 ⁶	1.4x10 ⁷

Tabla 26 - Especies de levaduras asociadas a vinos ya terminados. La muestra se tomó previamente al trasiego que se realiza tras la fermentación alcohólica (Fase V). Los números expresan la cantidad de células viables en forma de ufc/ml. Se especifican solamente los depósitos muestreados en esta fase. "Bo" Bobal, "Mac" Macabeo, "Gar" Garnacha, "Tem" Tempranillo.

Especies	Cooperativa San Pedro						EVE	TOTAL
	1982		1983					
	A	G	N5	N6	N7	N8		
<i>Candida pulcherrima</i>	0	0	0	0	0	0	5.0x10 ³	5.0x10 ³
<i>Candida stellata</i>	0	0	0	0	0	0	5.0x10 ⁴	5.0x10 ⁴
<i>Kloeckera apis</i>	0	0	0	0	0	0	2.3x10 ⁶	2.3x10 ⁶
<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	0	0	0	0	0	0	1.6x10 ⁶	1.6x10 ⁶
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i>	1.0x10 ⁶	2.8x10 ⁷	0	0	0	0	0	2.8x10 ⁷
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>cerevisiae</i>	2.0x10 ⁷	2.3x10 ⁷	0	2.5x10 ⁷	1.9x10 ⁷	4.4x10 ⁶	0	9.1x10 ⁷
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>chevalieri</i>	0	0	3.4x10 ⁴	0	1.0x10 ⁶	0	3.0x10 ⁶	4.3x10 ⁶
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>steineri</i>	0	0	4.8x10 ⁶	0	0	0	0	4.8x10 ⁶
TOTAL	2.0x10 ⁷	5.1x10 ⁷	5.1x10 ⁶	2.5x10 ⁷	1.9x10 ⁷	4.4x10 ⁶	2.2x10 ⁶	1.2x10 ⁸

Tabla 23.- Especies de levaduras que aparecen en plena fermentación tumultuosa de los mostos (Fase II). Los números expresan la cantidad de células viables en forma de ufc/ml. Sólo se especifican aquellos depósitos que fueron muestreados en esta fase. "EVE" Escuela de Viticultura y Enología de Requena.

ESPECIES	Cooperativa San Pedro								Escuela Viticultura y Enología							
	1982				1983											
	A	B	C	D	E	F	G	N9	N10	N11	N12	Bo	Mac	Gar	Tem	TOTAL
<i>C. stellata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.5x10 ⁵	0	2.5x10 ⁵	0	8.0x10 ⁵
<i>K. apis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.5x10 ⁵	0	2.5x10 ⁵	0	1.0x10 ⁶
<i>K. japonica</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.5x10 ⁵	2.5x10 ⁵
<i>B. rubra</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.5x10 ⁵	0	0	0	2.5x10 ⁵
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i>	0	2.0x10 ⁵	0	0	0	4.3x10 ⁵	4.8x10 ⁵	0	5.0x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	9.8x10 ⁶
<i>capensis</i>	0	0	0	0	0	0	2.5x10 ⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	2.5x10 ⁴
<i>cerevisiae</i>	1.4x10 ⁷	6.0x10 ⁵	3.3x10 ⁵	3.9x10 ⁵	9.8x10 ⁵	4.1x10 ⁵	5.3x10 ⁵	1.5x10 ⁵	0	3.0x10 ⁷	3.2x10 ⁷	0	0	0	0	1.1x10 ⁸
<i>chevalieri</i>	0	0	0	0	7.8x10 ⁵	0	0	1.2x10 ⁷	1.8x10 ⁷	0	0	5.7x10 ⁷	5.2x10 ⁷	1.0x10 ⁸	0	2.5x10 ⁸
<i>steineri</i>	0	0	3.5x10 ⁵	0	0	2.5x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	9.3x10 ⁷	9.4x10 ⁷
<i>S. ludwigii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7.5x10 ⁵	0	0	7.5x10 ⁵
<i>S. roseus</i>	0	2.9x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.9x10 ⁵
<i>I. delbrueckii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.0x10 ⁶	0	0	0	3.0x10 ⁶
TOTAL	1.4x10 ⁷	6.5x10 ⁵	3.7x10 ⁵	3.9x10 ⁵	1.8x10 ⁷	8.7x10 ⁵	1.0x10 ⁷	1.2x10 ⁷	1.9x10 ⁷	3.0x10 ⁷	3.2x10 ⁷	6.2x10 ⁷	5.3x10 ⁷	1.0x10 ⁸	9.3x10 ⁷	4.7x10 ⁸

Tabla 24 .- Especies de levaduras asociadas a los últimos momentos de la fermentación tumultuosa (Fase III). Los números expresan la cantidad de viables en forma de ufc/ml.

ESPECIES	Cooperativa San Pedro								Escuela Viticultura y Enología							
	1982								1983							
	A	B	C	D	E	F	G	N13	N14	N15	N16	Bo	Mac	Gar	Tem	TOTAL
<i>P. guilliermondii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.0x10 ⁶	0	0	0	1.0x10 ⁶
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i>	0	0	0	2.2x10 ⁶	0	2.4x10 ⁶	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.6x10 ⁶
<i>capensis</i>	0	0	2.5x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.5x10 ⁵
<i>cerevisiae</i>	2.0x10 ⁶	4.5x10 ⁶	2.7x10 ⁶	1.3x10 ⁶	1.8x10 ⁶	3.3x10 ⁶	3.5x10 ⁶	5.0x10 ⁵	2.5x10 ⁷	4.5x10 ⁷	3.1x10 ⁷	4.4x10 ⁷	0	8.9x10 ⁶	1.0x10 ⁸	2.7x10 ⁸
<i>chevalieri</i>	0	0	0	0	3.8x10 ⁵	0	0	2.0x10 ⁷	0	5.0x10 ⁵	3.1x10 ⁷	0	5.3x10 ⁷	0	0	7.4x10 ⁷
TOTAL	2.0x10 ⁶	4.5x10 ⁶	3.0x10 ⁷	3.5x10 ⁶	2.2x10 ⁶	5.7x10 ⁶	3.5x10 ⁶	2.1x10 ⁷	2.5x10 ⁷	4.6x10 ⁷	3.2x10 ⁷	4.5x10 ⁷	5.3x10 ⁷	8.9x10 ⁶	1.0x10 ⁸	3.6x10 ⁸

Tabla 25.- Especies de levaduras asociadas a los momentos finales de la fermentación (Fase IV). Los números expresan células viables en forma de ufc/ml.

Especie	Cooperativa San Pedro									
	1982					1983				
	A	B	C	D	E	N17	N18	N19	N20	Total
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>bayanus</i>	0	0	0	0	0	0	0	3.3x10 ²	0	3.3x10 ²
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>cerevisiae</i>	7.5x10 ²	8.5x10 ³	2.5x10 ²	6.3x10 ³	1.0x10 ⁴	0	0	0	0	2.6x10 ⁴
Total	7.5x10 ²	8.5x10 ³	2.5x10 ²	6.3x10 ³	1.0x10 ⁴	0	0	3.3x10 ²	0	2.6x10 ⁴

Tabla 27.- Cepas de levaduras asociadas a vinos terminados y trasegados (Fase VI). Los números expresan la cantidad de células viables en forma de ufc/ml. Se especifican solamente los depósitos muestreados en esta Fase.

corresponde con el apogeo de la fermentación alcohólica, sólo encontramos la especie *Saccharomyces cerevisiae* en la mayoría de las vinificaciones seguidas. Las excepciones se comentarán más tarde. Las causas de este descenso brusco del número de especies que aparecen en mostos frescos sin sulfitar son la progresiva anaerobiosis del medio de fermentación, la competencia por los sustratos entre las levaduras, el efecto selectivo del SO_2 y la inhibición de determinadas cepas por el etanol. De todas estas causas las más documentadas se refieren al efecto del SO_2 y del etanol.

Sobre el efecto antiséptico del SO_2 en relación con las levaduras, se han escrito muchos trabajos [8, 306, 326]. La influencia del SO_2 depende de la especie y de la cepa. Particularmente importante es la actividad del SO_2 sobre las levaduras salvajes (entendiendo como salvajes aquellas especies distintas de *Saccharomyces cerevisiae*) [43]. CANTARELLI [51] establece una serie de experiencias que demuestran que especies del género *Kloeckera* y *Hanseniaspora* son más sensibles al SO_2 que *Saccharomyces*. La constatación de que los microorganismos aerobios son más sensibles al SO_2 que los fermentativos no tiene muchas explicaciones. Se ha apuntado que el SO_2 actúa captando el O_2 que es el aceptor final de electrones en la respiración aerobia [24]. También se ha observado que el $\text{SO}_3^{\cdot-}$ causa la peroxidación de los lípidos en las mitocondrias y además modifica las ATPasas mitocondriales inhibiendo su actividad [24]. En general, el efecto negativo del SO_2 implica varias acciones. Una de ellas tiene lugar en el exterior de la célula. Aquí el SO_2 se combina con numerosos compuestos y los hace inutilizables por las levaduras; además la presencia de SO_2 provoca la disminución de factores de crecimiento en el vino, tales como ácidos grasos insaturados, sustancias esenciales para el desarrollo anaeróbico de las levaduras [24]. El SO_2 también actúa sobre la superficie celular. ANACLETO y VAN UDEN [8] han establecido tres etapas en el ataque del SO_2 a la célula: primero se combina con receptores de la superficie de

la membrana celular, después se producen daños en la misma debido a un cambio de la actividad del complejo receptor-SO₂; por último, la célula pierde viabilidad. Esta pérdida de viabilidad puede estar ocasionada por varias causas. SCHIMZ y HOLZER proponen un mecanismo según el cual el receptor de la membrana celular sería una ATPasa unida a membrana que cuando fija el SO₂ hidroliza el ATP intracelular de forma incontrolada, agotándolo completamente [8]. Otro mecanismo posible es que el complejo receptor-SO₂ puede sufrir desnaturalización térmica. El SO₂ actuaría como catalizador disminuyendo la energía libre de activación del proceso de desnaturalización. Como consecuencia la membrana se vuelve permeable dejando escapar moléculas del interior celular y haciendo morir de este modo a la célula [8]. Por último, hay que considerar el efecto intracelular del SO₂. El SO₂ impide la formación de ATP al combinarse con productos intermedios de la vía Embden-Meyerhof, tales como el piruvato y el acetaldehído. Esto bloquea la producción de etanol y la regeneración de NAD⁺ a partir de NADH+H⁺. También inhibe el ciclo de los ácidos tricarbónicos al combinarse con el oxalacetato y con el ácido glutámico. Por otro lado, numerosos sistemas enzimáticos se ven inhibidos por el SO₂, bien por provocar cambios conformacionales bien por la destrucción de coenzimas [306]. También se pueden producir daños estructurales al afectar a proteínas estructurales o a lípidos de membrana (peroxidación de lípidos), y daños a los ácidos nucleicos.

Hay especies como *Saccharomyces ludwigii* y *Zygosaccharomyces bailii* capaces de soportar hasta 500 mg/l de SO₂. La capacidad de tolerar SO₂ puede clasificarse en inherente e inducible. La naturaleza del primer tipo de resistencia parece estar relacionada con la existencia de diferentes receptores del SO₂ para cada especie. Las variaciones en la tolerancia pueden deberse a diferencias en la conformación del receptor, o a distintas tasas de asimilación del mismo [24]. Además los microorganismos pueden

eliminar el SO_2 mediante su oxidación a sulfato o reducción a H_2S [24, 35]. Otra forma de evitar su efecto es la producción de sustancias capaces de combinarse con él y de esta forma inactivarlo [176]. Esto último constituye el mecanismo de tolerancia inducible.

El etanol es otro de los productos responsables de la desaparición de numerosas levaduras durante los primeros momentos de la fermentación. La resistencia a este producto es también variable según la especie. Dentro de *Saccharomyces* podemos observar que la tolerancia de las levaduras del sake es mayor que la de las del vino; la tolerancia de éstas es a su vez mayor que la de las de destilería, y la de éstas mayor que la de las de cervecería [59]. El etanol influye en la tasa de crecimiento, en la tasa de fermentación y en la viabilidad de las células. La tasa de crecimiento es la primera en mostrar sensibilidad, luego la viabilidad y en último lugar la tasa de fermentación [59]. El etanol parece inhibir ciertas enzimas de la vía glucolítica tales como la hexoquinasa o la alcohol deshidrogenasa, disminuyendo la velocidad global del proceso. También influye en la captación de nutrientes al afectar al potencial de membrana (provoca un aumento del flujo pasivo de electrones). El etanol induce además la lipólisis de fosfolípidos celulares, pero esto sólo ocurre a concentraciones de etanol superiores a 10% (v/v) [59].

La tolerancia al etanol es de naturaleza genética, y en ella deben estar implicados varios genes [98]. Se ha asociado esta tolerancia con el contenido en lípidos de la membrana celular. Dado que tanto los lípidos de membrana como el etanol son moléculas anfipáticas, éstas pueden interaccionar entre sí durante la fermentación produciendo cambios en la membrana [59]. Tales cambios pueden modificar la tolerancia de la levadura hacia el etanol. NOVAK *et al.* [228] han expuesto que la levadura es menos tolerante al alcohol que ella misma produce, que al etanol añadido exógenamente. La explicación de este fenómeno según estos autores es que la

permeabilidad del etanol hacia el exterior de la célula es muy baja. Sin embargo CASEY e INGLEDEW [59] critican estos resultados y citan que la difusión del etanol a través de la membrana es fácil, rápida y pasiva a favor de gradiente de concentración; esto supondría que la permeabilidad al etanol sería la misma en ambos sentidos.

Una vez explicados los modos de actuación de dos de los principales inhibidores de las levaduras salvajes, vamos a estudiar qué ocurre durante la fermentación alcohólica. Si estudiamos las Figuras 26 a 43 podemos observar la desaparición temprana de especies eminentemente respiratorias como *Aureobasidium pullulans*, *Sporobolomyces roseus* y *Rhodotorula rubra*; este hecho puede achacarse a la anaerobiosis del mosto en plena fermentación, así como a su mayor sensibilidad al SO_2 . Otras especies sensibles a este antiséptico y a pequeñas cantidades de alcohol son *Candida pulcherrima* y las pertenecientes al género *Kloeckera* [31]. *Candida stellata* tolera algo mejor el SO_2 [31] y el etanol [282], pero sin embargo también desaparece tras los primeros momentos de la fermentación. La causa de esta desaparición hay que buscarla en la competencia que establece con *Saccharomyces cerevisiae*, que es de metabolismo más activo y por ello se ve favorecida en la competencia por los nutrientes.

Otras especies que desaparecían tempranamente en la fermentación eran las pertenecientes a los géneros *Pichia* y *Hansenula*. Estos géneros son de metabolismo respiratorio y su resistencia al etanol y al SO_2 depende de la especie [31]. Por ejemplo, mientras que *Pichia membranaefaciens* es tan sensible al SO_2 como *Kloeckera*, *Pichia fermentans* tolera mejor al etanol y resiste concentraciones más elevadas de SO_2 . Al ser levaduras eminentemente aerobias, su presencia durante la fermentación alcohólica no es normal, aunque pueden encontrarse sobre la superficie del sombrero de orujos en vinificación en tinto, al inicio de la fermentación. También pueden presentarse sobre la superficie de vinos ya hechos y en las paredes de

barriles de madera impregnados de vino. *Kluyveromyces thermotolerans* desaparecía rápidamente en los primeros momentos de la vinificación de Bobal (Figura 40), no por su sensibilidad al SO_2 o al etanol sino porque su lento crecimiento y escasa capacidad fermentadora le impedían competir con otras levaduras más activas que colonizaban rápidamente el medio [282]. Algo semejante ocurrió en este mosto con *Torulaspota delbrueckii* [31, 175]. Esta especie denominada por BENDA [31] *Saccharomyces rosei*, presenta una tolerancia al etanol que va de débil a intermedia, aunque ésta no es la causa de su rápida desaparición en la vinificación de Bobal, ya que en la segunda fase sólo había 0.95% de etanol y *T. delbrueckii* ya había desaparecido.

En las vinificaciones realizadas en la Cooperativa San Pedro, la única especie que aparecía a partir de la Fase II era *Saccharomyces cerevisiae* con una sola excepción: en el depósito B vinificado en 1982 aparecía *Sporobolomyces roseus* en la Fase III. La presencia de esta especie a estas alturas de la fermentación no puede explicarse a menos que se trate de una contaminación, ya que es respiratoria y por tanto no tiene ningún papel en la fermentación. La mayoría de los autores consultados [22, 75, 77, 131, 140, 161, 219, 224, 236, 258, 289, 298, 304, 317, 318, 320, 327] no describen ni ésta ni ninguna otra especie con este tipo de metabolismo durante la fermentación alcohólica. MATEOS et al. [220] describen *Sporobolomyces pararoseus* al inicio de la fermentación pero luego desaparece. QUECEDO et al. [262] también hallan *Sporobolomyces pararoseus* en mostos gallegos en fermentación, pero sólo en uno de los muestreados y con carácter puntual. También POULARD et al. [261] encuentran *Aureobasidium pullulans*, levadura también aerobia, hasta una vez bien establecida la fermentación. El carácter esporádico de estos aislamientos confirma la idea de que la presencia de microorganismos respiratorios durante la fermentación tiene carácter de contaminación, y no son levaduras asociadas

al proceso de fermentación.

Ya hemos comentado que la especie mayoritariamente aislada en la Fase II fue *Saccharomyces cerevisiae*; si observamos la Tabla 23 veremos la distribución de las diferentes variedades o razas de esta especie que encontramos en los distintos mostos. En las dos vinificaciones que se muestrearon en esta Fase durante 1982 en la Cooperativa San Pedro (Tabla 23), aparecieron las variedades *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* y *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae*; en las del año siguiente no apareció *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* pero sí la variedad *cerevisiae*, encontrándose además la variedad *chevalieri* en dos de los cuatro mostos en fermentación y la variedad *steineri* solamente en uno. En la variedad Bobal vinificada en la Escuela de Viticultura y Enología en 1983 encontramos únicamente la variedad *chevalieri*. En cuatro de los depósitos muestreados en esta Fase coexisten dos de estas variedades, a veces en distinta proporción (depósitos A, N5 y N7) y a veces en proporción muy semejante (depósito G). La variedad más frecuente es *cerevisiae*, seguida de *chevalieri*, *bayanus* y *steineri*.

Los muestreos de la Fase III (Tabla 24) denotan que la variedad *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae* seguía siendo la más frecuente en las vinificaciones de la Cooperativa San Pedro, tanto en 1982 como 1983; le siguen por orden de importancia *bayanus*, *chevalieri*, *steineri* y *capensis*, ésta última aparecía en bajo número y sólo en uno de los depósitos muestreados. También en esta Fase encontramos que en determinados depósitos se producía una asociación de dos variedades, mientras que en otros una sola variedad dominaba la fermentación. A veces se encontraron dos variedades en distintas proporciones, superando la más abundante a la minoritaria y haciéndola desaparecer. Esto sucedió en el depósito A (Tablas 23 a 26) mientras que en otros casos en los que la representación de dos variedades era semejante (depósito G), eran ambas las que realizaban la

fermentación alcohólica (Tablas 23 a 26). En los restantes depósitos (B, C, D, E, F) al no poderlos muestrear en la Fase II, desconocemos la evolución que las variedades siguieron en esta parte de la fermentación. A partir de los datos de 1983 de la Cooperativa San Pedro, no podemos establecer la evolución de las variedades dentro de un mismo depósito de fermentación, pero sí en el conjunto de los mismos. Observamos que mientras en la Fase II (Tabla 23) aislábamos las variedades *cerevisiae*, *chevalieri* y *steineri*, en la Fase III (Tabla 24), *steineri* no apareció y se aisló *bayanus*.

En la Fase IV (Tabla 25), que se corresponde con el final de la fermentación alcohólica, encontramos que la variedad *cerevisiae* sigue siendo la que más se aísla, seguida por *chevalieri* y *bayanus*. En uno de los depósitos se detectó la variedad *capensis*.

La evolución de variedades por depósitos (año 1982) fue como sigue: en el depósito A la variedad *cerevisiae* llevó a cabo toda la fermentación alcohólica una vez hubo desplazado a *bayanus* en los primeros momentos de la fermentación. En el depósito B, *bayanus* coexistió con *cerevisiae* hasta la mitad de la fermentación, pero poco después fue sobrepasada por esta última, siendo *cerevisiae* la que terminó la fermentación. En el depósito C *steineri* y *cerevisiae* estuvieron presentes en la fermentación tumultuosa, pero hacia el final de la fermentación alcohólica *steineri* fue sustituida por *capensis*. En el D, *cerevisiae* se encontró sola durante la fermentación tumultuosa pero hacia el final de la fermentación se estableció *bayanus*. En el depósito E *cerevisiae* y *chevalieri* realizaron toda la fermentación alcohólica, encontrándose sólo *cerevisiae* tras el trasiego. De las tres variedades que coexistieron en el depósito F durante la fermentación tumultuosa, sólo persistieron dos al final de la fermentación alcohólica: *bayanus* y *cerevisiae*. En el depósito G las variedades *bayanus* y *cerevisiae* fueron las mayoritarias durante la fermentación, mientras que *cerevisiae* únicamente se encontró al final de la fermentación alcohólica. La

evolución de variedades a lo largo de las vinificaciones estudiadas en 1983 fue la siguiente: *cerevisiae* y *chevalieri* se encontraron asociadas a lo largo de toda la fermentación, *bayanus* se detectó al final de la fermentación tumultuosa pero luego desapareció. Tras el trasiego sólo se aisló *cerevisiae*.

A partir de los datos obtenidos de las vinificaciones seguidas en la Cooperativa San Pedro durante los dos años observamos que *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae* es la que llevó el peso de la fermentación en todos los casos estudiados. Se presentaba muy asociada a *bayanus* durante 1982 y a *chevalieri* en 1983. Estas dos últimas variedades no se encontraron tras el primer trasiego.

En la evolución de las variedades a lo largo de la fermentación no podemos establecer ninguna tendencia que asocie ciertas variedades a fases concretas de la fermentación (cepas más o menos resistentes al etanol). En los trabajos realizados por MATEOS et al. [219, 220] se observa igualmente que *Saccharomyces ellipsoideus* (actualmente *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae*) es dominante a lo largo de la fermentación, pero también aíslan *Saccharomyces bayanus* (actualmente *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus*) y *Saccharomyces chevalieri* (*Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri*). Una especie aislada por ellos muy frecuentemente es *Saccharomyces italicus*; al comparar las características bioquímicas de esta especie, tal como la describen RIBÉREAU-GAYON et al. [282], con las de *Saccharomyces cerevisiae*, encontramos que *Saccharomyces italicus* se corresponde con la variedad *Saccharomyces cerevisiae* var. *steineri* descrita por KREGGER-VAN RIJ [165]. *Saccharomyces italicus* también ha sido aislada por SOMAVILLA et al. [318] en un estudio realizado en mostos de la región levantina que incluía la D.O. Utiel-Requena. En este estudio [318] *Saccharomyces steineri* resultó ser la especie que en mayor número de casos conducía la fermentación, seguida de *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces chevalieri* y

Saccharomyces fructum (sinónimo de *Saccharomyces chevalieri* según LODDER [201]). Al observar la capacidad alcohólogena de las antiguas especies *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces italicus* y *Saccharomyces oviformis* (sinónimo de *Saccharomyces bayanus* según LODDER [201]), observamos que es muy semejante en todas ellas, y más alta que la de otras especies del género *Saccharomyces* [282].

A pesar de que RIBÉREAU-GAYON *et al.* [282] establecen una sucesión de especies en función de la resistencia de las mismas al etanol, nosotros no hemos podido comprobar esa sucesión, ya que *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* (antiguamente *Saccharomyces oviformis*) más resistente al etanol que *Saccharomyces ellipsoideus*, según RIBÉREAU-GAYON [282], aparecía tanto en estadios tempranos de la fermentación como tardíos, siendo en todos los casos la variedad *cerevisiae* la que se hallaba en vinos ya terminados. La variedad *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri* también se encontraba durante toda la fermentación, por lo cual nos atrevemos a formular que las pretendidas resistencias al etanol no dependen de la variedad ni de la especie sino de las cepas. La supremacía de la variedad *cerevisiae* en la mayoría de los depósitos y de las Fases puede deberse a una mayor tasa de crecimiento [282], lo que la hacía colonizar rápidamente el mosto en fermentación. La asociación de las variedades de *Saccharomyces cerevisiae* (*bayanus*, *chevalieri* y *cerevisiae*) se halla documentada por muchos autores: POULARD *et al.* [261], GARCIA MAIQUEZ [131], SOUFLEROS *et al.* [320] y CUINIER [75]. Estos investigadores también encuentran las variedades *steineri* (llamada por ellos *Saccharomyces italicus*) y *capensis* (denominada *Saccharomyces capensis*) asociadas a cualquier momento de la fermentación, aunque se presentan más esporádicamente. En la mayor parte de los trabajos consultados es *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae* la que lleva a cabo la mayor parte de la fermentación alcohólica, encontrándose incluso en aislamientos de soleras [317].

No hemos comentado hasta ahora la evolución de las especies en los mostos vinificados en la Estación de Viticultura y Enología por las especiales características de los mismos. Son de distinto origen y han sido vinificados de distinta forma a los de la Cooperativa San Pedro (Tabla 2). Fue en Macabeo donde observamos la dinámica de especies más parecida a las que se desarrollaron en la Cooperativa San Pedro. Al mosto de Macabeo se le añadieron 100 mg/l de SO_2 y se fermentó tradicionalmente sin control de temperatura. Si estudiamos la Figura 41 observaremos que durante la fermentación tumultuosa no aparece ninguna de las especies "salvajes" aisladas en mostos sin sulfitar, y sólo se encuentra *Saccharomyces cerevisiae*. Observaremos también que está presente *Saccharomycodes ludwigii*, levadura considerada perjudicial por muchos autores [31, 175, 282] ya que es fuertemente cetogénica. Esta característica hemos podido comprobarla ya que los datos físico-químicos de este mosto nos muestran un incremento agudo de la acidez volátil en correspondencia con la aparición de esta especie. Respecto a las variedades de *Saccharomyces cerevisiae* halladas en esta vinificación, encontramos que en mostos sin sulfitar está presente la variedad *capensis*, en plena fermentación esta variedad da paso a *chevalieri*, que es la más común en las fermentaciones de la Estación de Viticultura y Enología. La variedad *cerevisiae* se encontró en vinos acabados. Como ya hemos señalado, la vinificación de mostos blancos de Macabeo presenta muchas características en común con los de mostos rosados de la Cooperativa San Pedro, en cuanto a dinámica de levaduras.

En un segundo nivel tenemos las vinificaciones de Garnacha y Tempranillo que se alejan un poco de la tendencia general observada hasta ahora. Estos mostos fueron sulfitados con 70 mg/l de SO_2 y a uno de ellos se le sometió a control de temperatura (Tabla 2). En la vinificación de Garnacha (Figura 42) pudimos observar que en la Fase III especies tales como *Candida stellata* y *Kloeckera apis*, no aisladas hasta entonces en momentos tan

tardíos de la fermentación, estaban presentes en una concentración semejante a la que tenían en mostos sin sulfitar. Es posible que la sulfitación que habían sufrido estos mostos no fuera suficiente para eliminar totalmente a estas especies. Por otro lado, el hecho de que no hayan aumentado o disminuído su número nos hace pensar que permanecían viables pero no proliferantes en el medio. En el caso de Garnacha aislamos *Torulaspóra delbrueckii* en la primera Fase, pero luego no volvimos a encontrarla. Es posible que su lento crecimiento [175] más que su sensibilidad al etanol fueran la causa de su rápida desaparición en las fermentaciones [31]. *T. delbrueckii* es una levadura interesante en enología por su baja producción de ácido acético [282]. La variedad de *Saccharomyces cerevisiae* encontrada durante toda la fermentación en este mosto fue *cerevisiae*.

El mosto obtenido de uvas Tempranillo (Figura 43) presentaba una evolución de especies intermedia entre la de Macabeo y la de Garnacha. En este caso la disminución de especies salvajes fue bastante drástica, desapareciendo *Candida stellata* y *Kloeckera apis* en los primeros momentos de la fermentación alcohólica, mientras que aparecía *Kloeckera japonica*. Dado que tanto Tempranillo como Garnacha fueron sulfitadas con 70 mg/l de SO₂, el hecho de que no aparecieran en el primero *Kloeckera apis* y *Candida stellata* no es fácil de explicar. Podríamos pensar que son más sensibles a las bajas temperaturas, pero éste no es el caso ya que aparecieron durante la fermentación de Bobal (Figura 40) que se llevó a cabo a 19°C (igual que ocurrió en Tempranillo). La única hipótesis que nos permite justificar la ausencia de estas especies en Tempranillo es que el efecto combinado de las bajas temperaturas y de un mayor contenido en SO₂ libre (Tablas 19 y 20) provoquen la eliminación de las mismas. La presencia esporádica de *Kloeckera japonica* en mostos de Tempranillo pudo ser consecuencia de una contaminación externa sin mayor relevancia, ya que no se volvió a detectar.

En Tempranillo las variedades de *Saccharomyces cerevisiae* que condujeron la fermentación fueron *cerevisiae* y *steineri*, encontrándose *cerevisiae* en vinos acabados, como en la mayor parte de las fermentaciones estudiadas.

Por último hemos de comentar la evolución de especies en los mostos de Bobal. Esta vinificación se llevó a cabo sin adición de SO_2 y a temperatura controlada (Tabla 2). Carecemos de datos referentes a la Fase I de esta vinificación: la primera muestra la conseguimos cuando este mosto ya había empezado a fermentar, aunque su concentración en etanol era muy baja. Las razones de esta baja eficiencia de fermentación ya se comentaron en el apartado 3.1.2 de este Capítulo. La muestra correspondiente a la Fase II mostró la presencia de especies tales como *Candida pulcherrima*, *Candida stellata*, *Kloeckera apis*, *Kluyveromyces thermotolerans* y *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri*. La existencia de estas especies en el mosto en fermentación constituye un fiel reflejo de la microflora típica de mostos frescos sin sulfitar. Esto nos permite afirmar que en ausencia de SO_2 las especies "salvajes" pueden persistir durante varios días en el mosto. GOTO [140] informa que hasta después de 48 días pueden encontrarse especies de *Kloeckera* y *Torulopsis*, y *Metschnikowia pulcherrima* en cantidades apreciables en mostos sin sulfitar. MATEOS et al. [220] en los estudios realizados sobre la influencia del SO_2 en la microflora fermentativa también observaron que en mostos sin SO_2 la flora salvaje persistía más tiempo que en los sulfitados.

Conforme avanzaba la fermentación, el número de especies salvajes en el mosto de Bobal sin SO_2 disminuía; así desaparecían *Candida pulcherrima* y *Kluyveromyces thermotolerans* pero sobrevivían *Candida stellata* y *Kloeckera apis*, apareciendo "de novo" *Rhodotorula rubra* y *Torulaspora delbrueckii*. *Kluyveromyces thermotolerans* desapareció posiblemente a causa de su lento crecimiento. La aparición de *Rhodotorula rubra* durante la fermentación tumultuosa se debió probablemente a una contaminación externa; esta

contaminación pudo proliferar debido a que el depósito donde se vinificó Bobal presentaba una gran superficie en contacto con el aire, lo cual le permitiría desarrollar su metabolismo respiratorio. En la fermentación de mostos de Bobal la variedad *chevalierí* produjo los primeros grados alcohólicos, cediendo paso a *cerevisiae* y ésta a *bayanus*, que fue la que encontramos en vinos terminados.

Es notable el hecho de que se haya aislado la levadura *Pichia guilliermondii* al final de la fermentación alcohólica en los dos mostos vinificados a baja temperatura. Las levaduras del género *Pichia* son consideradas perjudiciales para el vino, ya que forman grandes cantidades de acetaldehído, ácido acético y ésteres del ácido acético [31]. Sin embargo, al menos en Tempranillo no aumentó sensiblemente la cantidad de ácido acético (Tabla 20).

El mayor grado de contaminación externa que presentaban los mostos de Tempranillo y Bobal se pudo deber a que fueron vinificados en recipientes más expuestos al aire que el resto de variedades, y en el caso de Bobal a la falta de SO₂.

3.2.5.- CONSIDERACIONES ACERCA DEL AISLAMIENTO, CLASIFICACION Y CARACTERIZACION DE LAS BACTERIAS LACTICAS.

El método empleado en este trabajo para el aislamiento de bacterias lácticas fue el de enriquecimiento en medio líquido. Este método, utilizado por numerosos autores [120, 126, 179, 211, 212, 213], se consideró el más adecuado dada la baja concentración en que las bacterias lácticas suelen encontrarse [344]. A partir de los recuentos mediante el sistema del N.M.P., obtuvimos una dinámica de la población bacteriana total que ya ha sido comentada en el Apartado 3.2 de este Capítulo. Durante 1982 no se

realizó mas que un recuento de la flora láctica, sin embargo en 1983 realizamos aislamientos de las mismas a fin de conocer la evolución de las especies a lo largo de la fermentación. Otro objetivo que perseguíamos al aislar las bacterias lácticas era el seleccionar aquellas cepas más adecuadas para su posterior aplicación práctica en bodega. A partir de los tubos del N.M.P. crecidos (ver Apartado 2.10) realizamos aislamientos en placas de agar MRS y posteriormente las cepas se conservaron sembradas por picadura en agar MRS semisólido. La técnica de siembra en picadura favorece netamente el crecimiento de las bacterias lácticas respecto a la técnica de siembra en agar inclinado (aunque la incubación se realice en atmósfera enriquecida en CO₂) [99]. Al ensayar la viabilidad de los cultivos mantenidos en picadura a 4°C observamos que la viabilidad de algunas de estas bacterias era bastante baja tras un corto periodo de tiempo. Así, al cabo de un mes perdían completamente la viabilidad, quizás debido a su rápido crecimiento y a la abundante producción de ácido en el medio, que producía la muerte del cultivo. Las resiembras de estas cepas se tenían que realizar cada mes, mientras que el resto se resembraba cada tres meses, tal y como recomendaba la bibliografía consultada [99, 117, 147, 155]. Para evitar el exceso de trabajo que suponían las frecuentes resiembras, se ensayó el sistema de liofilización. Esta técnica resultó ser muy ventajosa respecto al mantenimiento en picadura, ya que evitaba el problema de la falta de viabilidad, disminuía el trabajo de laboratorio y permitía almacenar gran cantidad de biomasa de cada cepa en un pequeño espacio. Este sistema ha permitido la obtención de cultivos viables después de 4 años de mantenimiento en forma liofilizada. La liofilización como método de mantenimiento es utilizado por numerosos autores [126, 147, 166] e incluso las firmas comerciales utilizan este sistema para conservación y uso de las cepas seleccionadas destinadas a la inoculación del vino. Los problemas de falta de actividad que a veces presentan las cepas liofilizadas, no se debe

a la disminución de la viabilidad por liofilización, sino al empleo de métodos de reactivación no adecuados [96, 178, 337].

Mientras que la clasificación de levaduras no presenta excesivos problemas si se sigue la metodología adecuada [18, 165], la identificación de bacterias lácticas sí lo hace. Las causas de estos problemas son las siguientes: en principio la heterogeneidad existente entre las bacterias lácticas hace que cada grupo se clasifique en base a claves diferentes; por otro lado, la metodología para realizar estas pruebas no está tan estandarizada como en el caso de las levaduras. Es por esta causa que la puesta a punto de un sistema de identificación adecuado representó una labor de investigación en sí misma cuyos resultados exponemos a continuación.

RIBÉREAU-GAYON *et al.* [282] y LAFON-LAFOURCADE [175] señalan que la clasificación de las bacterias lácticas propuesta por la 7ª y 8ª ediciones del "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" [46, 47] se hace en base a pruebas que carecen de interés enológico. Esta afirmación tiene relación con el hecho de que las cepas utilizadas para definir las distintas especies de bacterias lácticas en estos textos, han sido aisladas de medios animales ricos en proteínas, con pH neutro y con temperaturas elevadas. RIBÉREAU-GAYON *et al.* [282] y LAFON-LAFOURCADE [175] afirman que los microorganismos se hallan adaptados a su hábitat, y aquellos que se aíslan de vino difícilmente pueden encuadrarse en las clasificaciones anteriormente citadas.

A pesar de estas críticas nosotros basamos la clasificación de nuestras cepas en el "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" [47] y el "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" [316], así como en los criterios propuestos por SHARPE [307]. Los resultados obtenidos siguiendo esta metodología fueron satisfactorios, en contra de lo argumentado por RIBÉREAU-GAYON *et al.* [240] y LAFON-LAFOURCADE [175]. Además hemos

realizado otra serie de pruebas que ciertos autores han considerado importantes para conocer el valor enológico de las bacterias lácticas aisladas de vinos [19, 27, 79, 133, 211, 246, 248, 253]. De las 47 cepas aisladas por nosotros, 8 no han podido adscribirse a ninguna especie siguiendo las claves de identificación de bacterias lácticas usuales [47, 307, 316]. Por otro lado, las pruebas propuestas por RIBÉREAU-GAYON *et al.* [282] no difieren en absoluto de las señaladas en los textos antes citados, aunque les dan distinto valor taxonómico a la hora de separar especies. El intento de clasificar nuestras 8 cepas indeterminadas por el sistema de RIBÉREAU-GAYON *et al.* [282] no tuvo éxito.

La clasificación de las bacterias lácticas comenzaba por determinar si las cepas aisladas cumplían ciertas características propias de las bacterias lácticas, como son el carácter Gram(+) y la ausencia de catalasa, de movilidad y de esporas. Nosotros sólo aislamos como bacterias lácticas aquellas colonias que cumplían estas condiciones. Posteriormente se pasó a la determinación de la morfología celular y a la observación de las agrupaciones que formaban (parejas, tétradas, cadenas, etc.). En nuestros aislamientos detectamos tanto formas coccoides dispuestas en parejas o cadenas, como formas bacilares agrupadas de igual forma. A las primeras se les incluyó en la familia *Streptococcaceae* y a las segundas en *Lactobacillaceae* [307, 316].

Aunque la observación microscópica parece una práctica sencilla, las interpretaciones finales de las características morfológicas pueden llevarnos a resultados indeterminados y por tanto, poco concluyentes. La determinación de la morfología celular presenta un problema y es que tanto la forma como el tamaño celular varían marcadamente como resultado de repicajes sucesivos y de las técnicas de mantenimiento de la cepas [213]. Frecuentemente encontramos cepas a las cuales se les había asignado unas características morfológicas determinadas y que al cabo del tiempo, y

después de haberlas cultivado en medios sintéticos, poseían otras. Esto nos llevó a pensar que se trataba de contaminaciones. La constatación continuada de que las pretendidas "contaminaciones" poseían las mismas características bioquímicas y fisiológicas que las cepas originales nos hizo pensar que los cambios de morfología eran bastante normales. Según STAMER [323] las especies de bacterias lácticas aisladas de alimentos pueden sufrir una adaptación a las condiciones de laboratorio, adoptando morfologías considerablemente diferentes de las que poseían en el momento de su aislamiento. Por otro lado; existe una gran dificultad a la hora de definir ciertas morfologías; así encontramos palabras tan indeterminadas como "cocobacilo" [307] o "cocoide", utilizadas frecuentemente para describir la morfología de las bacterias lácticas.

A la vista de estas circunstancias, se puede concluir que la observación microscópica, de por sí, no siempre resuelve el problema de adscribir una cepa a una familia concreta. La mayoría de las veces se precisan otras pruebas para llegar a resultados definitivos. La descripción de la morfología colonial sobre placas de agar también presentaba ciertos problemas. Así observamos que algunas cepas que luego fueron identificadas como *L. hilgardii* presentaban una variación del aspecto dependiendo de la edad de la colonia. La colonia joven de estas cepas era rugosa y transparente mientras que la colonia madura era lisa y de color blanco amarillento; a menudo se encontraban presentes en la misma placa ambas morfologías, haciéndonos pensar en la existencia de contaminaciones accidentales. Tras realizar varias veces la purificación de las distintas colonias, observamos que ambas morfologías producían a su vez colonias rugosas y lisas.

Las bacterias lácticas se pueden separar en dos grupos según los productos finales obtenidos de la fermentación de la glucosa. Así son homofermentativos si producen el 85% o más de ácido láctico a partir de la

glucosa, y heterofermentativos si producen alrededor de un 50% de ácido láctico y además etanol, ácido acético, glicerol y CO₂ [282, 325]. El carácter homo o heterofermentativo constituye uno de los criterios fundamentales en la clasificación de bacterias lácticas. Dentro de la familia *Streptococcaceae* encontramos géneros homofermentativos, como *Pediococcus*, y géneros heterofermentativos como *Leuconostoc*, por señalar aquellos que generalmente aparecen en el vino. La familia *Lactobacillaceae* se encuentra dividida en tres subgéneros propuestos por BUYZE et al. [48] y que permanecen vigentes en los estudios más actuales [160, 202, 316]:

- a) Los **obligatoriamente homofermentativos**, que poseen el enzima fructosa difosfato aldolasa, pero carecen de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa. A este grupo pertenecen las especies *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus leichmannii*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus* [160, 316].
- b) Los **homofermentativos facultativos** que poseen las dos deshidrogenasas de las que carecen las anteriores, pero que preferentemente asimilan la glucosa según la vía Embden-Meyerhof. A este grupo pertenecen las especies *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sake* y *Lactobacillus bavaricus*. A diferencia del grupo anterior, estas especies pueden fermentar la ribosa, y en muchos casos otras pentosas, produciendo ácido acético y láctico mediante una fosfocetolasa inducible. Las hexosas son fermentadas formando ácido láctico, pero bajo condiciones aerobias el ácido láctico puede ser degradado a etanol, ácido acético, ácido fórmico y CO₂ [159].
- c) Las **especies heterofermentativas** se caracterizan por su capacidad de formar CO₂, ácido acético, etanol y ácido DL-láctico, a partir de

hexosas. La fermentación de las pentosas da lugar a ácido acético y a DL-láctico. Las especies que pertenecen a este grupo son: *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus sanfrancisco* y *Lactobacillus viridescens* [160].

Para determinar si nuestras cepas pertenecían al grupo de las homo o heterofermentativas seguimos el método de GIBSON y ABD-EL MALEK [9, 147]. Este método ha sido utilizado por otros autores anteriormente [133, 324] y es el que recomiendan SHARPE [307] y HARRIGAN y McCANCE [147]. Para la mayoría de cepas ensayadas, los resultados obtenidos fueron satisfactorios, únicamente se encontraron problemas en 8 de las 47 cepas ensayadas. Estas cepas dieron un resultado negativo cuando se ensayaron en este medio, al no poder ser clasificadas en ninguna especie homofermentativa repetimos la prueba de homoheterofermentatividad en el mismo medio y esta vez aparecieron pequeñas burbujas de gas tras un largo periodo de incubación (20 días). Se repitió la prueba por tercera vez obteniéndose resultados negativos nuevamente. Ante tal situación, decidimos cambiar el método de determinación del carácter homo o heterofermentativo, al considerar que posiblemente no era un sistema adecuado para evidenciar la producción de CO₂ por parte de estas cepas. El nuevo método consistió en la siembra de los microorganismos en medio MRSF al que añadimos un 0.5% de glucosa, tal y como establecía el protocolo de utilización. La producción de gas se observó por la presencia del mismo en la campana DURHAM. Para comprobar la validez del método se sembraron además 3 cepas de colección: *L. oenos* ML-34, *L. brevis* CECT216 (ambas heterofermentativas), y *L. plantarum* CECT220 (homofermentativa). Los resultados obtenidos al cabo de 14 días de incubación no fueron satisfactorios ya que sólo dos de las cepas ensayadas, 31 y C45, mostraban una pequeña burbuja en uno de los dos tubos sembrados.

El tamaño de la burbuja producida por estas dos cepas era similar a la formada por *L. oenos* ML-34, pero mucho más pequeña que la liberada por *L. brevis*. Esto nos da idea de que esas cepas tienen un carácter fermentativo débil. De cualquier forma la ambigüedad del resultado (sólo aparecía burbuja en una de las dos repeticiones) no resolvió la duda sobre su carácter homo o heterofermentativo. El hecho de que se obtuviesen resultados variables en el medio HFM, empleado en el método de GIBSON y ABD-EL MALEK [147], puede estar en relación con el volumen de inóculo utilizado o con su estado fisiológico. En este sentido SHARPE [370] señala que la siembra del medio HFM debe realizarse con un fuerte inóculo extraído de un cultivo joven que se encuentre creciendo vigorosamente. Las débiles respuestas positivas que se obtuvieron con el medio MRSF pueden deberse a la baja concentración de glucosa que en este medio se emplea, ya que la mayoría de métodos utilizan concentraciones de glucosa que oscilan entre 2 y 3 g/l [211, 296], siendo del 5% en el de GIBSON y ABD-EL MALEK [147].

La naturaleza del isómero del ácido láctico producido a partir de la glucosa es una prueba de interés taxonómico utilizada ya desde ORLA-JENSEN (1919) para la clasificación de las bacterias lácticas. El tipo de isómero formado es común en todas las cepas de una misma especie, e incluso en todas las especies dentro de un mismo género como es el caso de *Leuconostoc* [159].

Los lactobacilos estrictamente homofermentativos producen el isómero L(+) o mezclas de D(-) y L(+); Los lactobacilos facultativamente homofermentativos producen D(-) lactato y mezclas de D(-) y L(+)-lactato; Los lactobacilos heterofermentativos producen mezcla de D(-) y L(+)-lactato [202]. Dentro de la familia *Streptococcaceae* los dos géneros que se hallan presentes en vinos, *Pediococcus* y *Leuconostoc*, poseen comportamientos diferentes: *Pediococcus* produce DL-lactato, mientras que *Leuconostoc* produce solamente D(-) lactato. Esta prueba resulta de interés para

diferenciar los cocos heterofermentativos de los bacilos heterofermentativos, ya que a veces la observación microscópica no resuelve suficientemente la morfología cocácea o bacilar de las cepas. La gran mayoría de los autores que han hecho identificación de bacterias lácticas incluyen esta prueba en su metodología [19, 27, 79, 99, 133, 155, 211, 253] dada la importancia sistemática que presenta [47, 307, 316], a pesar de que PEYNAUD *et al.* [98] discrepan de esta opinión. El método que seguimos en este estudio para la determinación del isómero del ácido láctico producido a partir de la glucosa se detalla en el Apartado 2.13.2.1 de este Capítulo. Este método ha sido descrito por sus autores como rápido, preciso y sensible ya que es capaz de detectar de 1 a 10 µg/ml de ácido láctico total [252]. Muchos autores lo han utilizado en sus estudios [79, 155, 253] comprobando la validez del mismo. Esta prueba nos sirvió para confirmar la adscripción de las cepas a especies determinadas, como ocurrió con las cepas pertenecientes a *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. hilgardii*, *L. fructivorans*, *L. oenos* y *L. paramesenteroides*. Así los lactobacilos homo y heterofermentativos producían mezclas de D(-) y L(+)-lactato, mientras que las cepas pertenecientes al género *Leuconostoc* formaban solamente D(-)-lactato. Estos resultados concuerdan con los hallados por la mayoría de autores consultados, excepto con los de PEYNAUD *et al.* [247] y BARRE [19], quienes encontraron cepas de lactobacilos heterofermentativos que producían solamente D(-)-láctico a partir de la glucosa. Por otro lado PEYNAUD *et al.* [247] también encuentran que algunos cocos heterofermentativos (*Leuconostoc* sp.) pueden sintetizar del 2 al 5% de ácido L(+)-láctico. Este hallazgo no ha sido confirmado por ningún otro autor. En este sentido, GARVIE [132] señala que no es probable que existan cepas del género *Leuconostoc* que produzcan también L(+)-lactato, y duda que si lo producen pertenezcan a ese género. Esta autora afirma que todas las especies de *Leuconostoc* forman sólo D(-)-lactato, ya que no poseen L(+)-

láctico-deshidrogenasa [B172].

De las 50 cepas ensayadas para este carácter (47 son aisladas de vinos por nosotros y tres son de colección), 37 resultaron formadoras de D-lactato, pero sólo 6 de ellas produjeron un 50% de cada uno de los estereoisómeros. La producción de cantidades semejantes de ambos isómeros es bastante infrecuente, normalmente hay mayor cantidad de uno de ellos [247]. Una de las causas de esta desigualdad puede ser la que apunta GARVIE [135], quien señala que la proporción de ambos isómeros puede variar a lo largo del crecimiento de cepas en cultivos sin control de pH. Así, *Pediococcus cerevisiae* y los lactobacilos homofermentativos (excepto *L. plantarum*) producen una elevada proporción de L(+)-lactato al principio del crecimiento y forman D(-)-lactato cuando el pH ha bajado a causa del metabolismo celular. Otra explicación respecto a la desigualdad en la proporción de los dos estereoisómeros es que una láctico-deshidrogenasa se halla en exceso respecto a la otra, como ocurre con *L. viridescens* [135]. De entre las 8 cepas no clasificadas (Tabla 28), una de ellas (la cepa 31) produce L(+)-lactato; esto podría hacernos a pensar que se trata de *L. casei* (productora de muy bajas cantidades de D(-)-lactato) o de *L. bavaricus* (cosa bastante improbable ya que su hábitat natural es la col fermentada o "sauerkraut"); sin embargo el patrón de fermentación de azúcares de esta cepa no es, en absoluto, semejante a ninguna de estas dos especies. Dos de las cepas (B32 y B44) producían el isómero D(-)-láctico, por lo que se podría pensar que si fueran heterofermentativas estarían incluidas en el género *Leuconostoc* (Tabla 28). El resto de las cepas no identificadas (C43, C45, B24, B31 y M12) son formadoras de DL-lactato, algunas de las mismas (C43 y B24) producen una mezcla racémica de ambos isómeros (Tabla 28).

La producción de manitol a partir de la fructosa está encaminada a esclarecer el carácter homo-heterofermentativo de una cepa, ya que las

Carbohidrato	Cepa							
	31	C43	C45	B24	B31	B32	B44	M12
Amigdalina	-	d	d	-	-	-	-	-
D-Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiosa	-	d	+	-	-	-	-	-
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructosa	+	+	+	+	+	+(g)	+(g)	+(g)
Galactosa	+	-	-	d	-	-	-	-
Gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucosa	+	+	+	+	+	+(g)	+(g)	+(g)
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltosa	d	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	-	-	+	d	+	+(g)	-
Manosa	+	+	+	+	+	+(g)	+(g)	+(g)
Melecitosa	+	-	-	-	-	-	-	-
Melibiosia	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribosa	+	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	+	-	+	+(g)	+
Salicina	+	-	+	+	+	+	+(g)	+
Sorbitol	+	-	-	-	-	-	-	-
Trehalosa	+	-	+	+	+	+	+(g)	+
Xilosa	+	-	-	-	-	-	+(g)	-
Homo/heterof ^a	?	?	?	?	?	?	?	?
Prod. NH ₃ ^b	-	-	-	-	-	-	?	-
Crecimiento a:								
10% etanol	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 5.5	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.8	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 4.2	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 3.7	+	+	+	+	+	+	+	+
45°C	+	-	-	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+
25°C	+	+	+	+	+	+	+	+
15°C	+	+	+	+	+	+	+	+
10°C	+	+	+	+	+	+	+	+
LT ^c	A	-	-	-	-	-	-	-
LTGE ^d	ARC	A	ARC	ARC	ARC	AC	AC	ARC(g)
Isó. láctico ^e	L	DL	DL	DL	DL	D	D	DL
Morfología	B	Co	Co	B	Cb	Cb	B	Cb
Agrupación	P	P	P	P	Pc	Pc	Pc	Pc

Tabla 28.- Resultados de las pruebas realizadas para la identificación de las cepas de clasificación incierta. ^aCarácter homo o heterofermentativo de las cepas. ^bProducción de NH₃ a partir de arginina. ^cCrecimiento en medio LT. ^dCrecimiento en medio LTGE. ^eIsómero del ácido láctico producido a partir de la glucosa. "+" resultado positivo. "-" resultado negativo. "d" reacción débil. "?" resultado dudoso. "g" producción de gas. "A" acidificación. "C" coagulación. "R" reducción. "L" isómero L(+) producido. "D" isómero D(-) producido. "DL" ambos isómeros L(+) y D(-) sintetizados. "B"

bacterias heterofermentativas producen manitol a partir de la fructosa, mientras que las homofermentativas no lo hacen [282]. Esta prueba ha sido considerada de mucha utilidad para la separación de estos dos tipos de bacterias [47, 88, 282, 316], sobre todo cuando la prueba de homo-heterofermentatividad no ha ofrecido resultados claros [166]. Muchos autores que han aislado bacterias lácticas del vino incluyen esta prueba en su metodología de identificación [19, 27, 79, 120, 166, 253, 282]. En lo que muchos investigadores difieren es en el método a seguir para la observación de la producción de manitol a partir de fructosa. El método tradicional consiste en la visualización de rosetas de cristales de manitol formadas cuando el medio de cultivo se evapora [27, 120, 166, 253, 282]. El procedimiento seguido por nosotros en el presente trabajo fue propuesto por CHALFAN et al. [80], y se basa en la detección del manitol por cromatografía en capa fina. Nosotros realizamos esta prueba a fin de dilucidar en qué grupo debíamos incluir aquellas bacterias lácticas que no habían dado resultados claros en la prueba de homo-heterofermentatividad, y que además tampoco podían clasificarse con ninguna de las otras pruebas realizadas. En este ensayo se incluyeron también las cepas de colección *Leuconostoc oenos* ML-34, *Lactobacillus brevis* CECT216 y *L. plantarum* CECT220. El revelador de permanganato potásico (ver Apartado 2.13.2.2) no dio buenos resultados, ya que las supuestas manchas de manitol, en teoría las únicas manchas que debían aparecer en la cromatografía, quedaban enmascaradas por compuestos residuales del medio, y era imposible distinguir la producción de este compuesto. Se comprobó que la hidrólisis de la fructosa mediante HCl sí que tenía lugar, por lo que se descartó que fuera ésta la que falseaba los resultados. La utilización de la solución reveladora de nitrato de plata tampoco mostró resultados concluyentes, ya que sólo aparecían manchas en las carreras de las muestras tratadas con HCl, pero no en las que se pusieron soluciones controles de fructosa y

manitol sin HCl. En resumen, la utilización de dos reveladores distintos al propuesto por CHALFAN *et al.* [80] no proporcionó resultados satisfactorios en la detección de cepas productoras de manitol a partir de la fructosa. Queda pendiente para posteriores experiencias la búsqueda de un revelador sustitutivo del de CHALFAN *et al.* [80] que sea adecuado para este fin.

La determinación de si nuestras cepas eran capaces de producir manitol a partir de la fructosa, además de interés taxonómico tenía un interés práctico, ya que este fenómeno da lugar a una alteración del vino denominada la "vuelta manítica" [3, 270, 277]. La formación de manitol confiere un sabor amargo al vino. Este fenómeno se conoce desde hace mucho tiempo, considerándose que era una bacteria concreta la que producía manitol. Esta bacteria se describía como un bacilo corto distinto del resto de bacterias lácticas del vino, y daba lugar a la "vuelta" ("tournée") o a la "vuelta con gas" ("pousse"). Se le denominó "fermento manítico" ("ferment manitique") [3]. Hoy en día se sabe que un gran número de especies de bacterias lácticas son heterofermentativas y por tanto producen manitol a partir de fructosa. Para algunos autores el hecho de que las bacterias heterofermentativas sean capaces de realizar este fenómeno las hace particularmente indeseables frente a las homofermentativas [277]. En este sentido DELFINI [99] propone como bacteria maloláctica ideal, aquella que entre otros caracteres, fermente homolácticamente la fructosa.

Otra de las pruebas que realizamos en la clasificación de las bacterias lácticas aisladas de vinos fue la producción de amoníaco a partir de la arginina. Esta prueba es de utilidad para diferenciar los lactobacilos heterofermentativos (no productores de amoníaco) de los *Leuconostoc* (productores de amoníaco) cuando sus morfologías son tan similares que es difícil distinguir si se trata de un coco o un bacilo [93, 282, 307]. Esta dificultad ya ha sido comentada por MARET y SOZZI [213] al señalar que *Leuconostoc oenos* muestra una morfología cocácea en medio

sintético, mientras que en vino se presenta como cocos y bacilos.

Aunque esta prueba sirve como confirmación del carácter homo o heterofermentativo de las bacterias lácticas, y de hecho la utilizan muchos autores con este fin [27, 79, 99, 132, 133, 211, 246, 253, 292, 307], no presenta un valor taxonómico absoluto [282], ya que tanto los homofermentadores *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactobacillus leichmannii* producen amoniaco a partir de la arginina [47]. Corroborando esta idea, PEYNAUD y DOMERCQ [247] en un estudio realizado con 400 cocos heterolácticos aislados del vino, demuestran que un 15% de los cocos heterofermentativos dan una respuesta negativa en esta prueba. En otro estudio CHALFAN et al. [79] encontraron un bacilo homofermentativo que producía amoniaco a partir de arginina. En relación con estos resultados SHARPE et al. [309] señalan que el ensayo de la desaminación de la arginina sirve como prueba confirmatoria para distinguir entre bacilos homo y heterofermentativos. La concentración de glucosa en el medio de realización de esta prueba es importante. Según SHARPE et al. [309] con una elevada cantidad de la misma (alrededor del 2%) sólo las cepas heterofermentativas producen amoniaco, mientras que si se utilizan concentraciones menores, algunas cepas de *Lactobacillus plantarum* también pueden producir amoniaco. Los medios utilizados para la realización de esta prueba generalmente contienen un 2% de glucosa. CHALFAN et al. [79] también usaron esta concentración en su trabajo de caracterización de bacterias lácticas aisladas de vinos israelíes, por ello el hecho de que obtuviesen bacilos homofermentativos capaces de producir amoniaco a partir de la arginina nos hace pensar que existen cepas homofermentadoras capaces de dar esta reacción por encima del umbral de concentración de glucosa que establecen SHARPE et al. [309]. A la vista de estos resultados INGRAM [152] propone la existencia de un rango de producción de amoniaco a partir de la arginina y que para que la prueba resulte confirmatoria, se debe escoger de antemano

una concentración de glucosa en el medio que separe claramente las cepas homo de las heterofermentativas.

Nosotros llevamos a cabo este ensayo siguiendo el método propuesto por HARRIGAN y McCANCE [147] (ver Apartado 2.13.2.3) obteniéndose buenos resultados en todas las cepas aisladas. Las 8 cepas que no se pudieron incluir en ninguna especie no producían amoniaco a partir de arginina (Tabla 28).

El crecimiento a diversas temperaturas es una de las pruebas más importantes según varios autores para determinar la inclusión de cepas en grandes grupos. Ya ORLA-JENSEN en 1919 señaló la importancia de la temperatura a nivel taxonómico [202]. El "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" [47] incluye el crecimiento a 15 y 45°C a fin de separar distintos grupos dentro de la familia *Lactobacillaceae*. RIBÉREAU-GAYON *et al.* [282] y HARRIGAN y McCANCE [147], también consideran estas dos temperaturas para la clasificación de lactobacilos. Por otro lado, SHARPE [307] incluye en sus claves de identificación para bacterias lácticas el crecimiento a 37°C para los géneros *Pediococcus* y *Leuconostoc* y 15 y 25°C para el género *Lactobacillus*. El "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" [316] no da tanta importancia a las temperaturas, y sólo las incluye como una característica más entre el resto que define una especie.

En el presente trabajo se estudió el crecimiento de las cepas a 15 y 45°C, siguiendo los criterios del "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" [47], pero además se incluyó la determinación del crecimiento a 10°, 25° y 37°C [79, 307]. Otros autores emplean en sus clasificaciones otras temperaturas, aunque todas ellas se hallan en el rango comprendido entre 10° y 48°C. Así BARRE [19] utilizó 25°, 30° y 35°C, ROSSI *et al.* [292] empleó 15°, 45° y 48°C en sus experiencias, MARET y SOZZI observaron el crecimiento de *Pediococcus* y *Lactobacillus* a 10°, 30° y 45°C [211, 212] y GARVIE [133] prueba 37.5° y 10°C.

En nuestros estudios ninguna de las cepas heterofermentativas fue capaz de crecer a 45°C. Esto concuerda con lo obtenido por los autores consultados [47, 79, 160, 307, 316]. En estos trabajos no se describe ninguna bacteria heterofermentativa capaz de crecer a 45°C excepto *L. fermentum* [47] y *L. reuteri* [160] y *L. cellobiosus* [47], la cual posee crecimiento variable a esta temperatura. Las únicas cepas que crecieron a 45°C fueron las de *L. plantarum* y lo hicieron a una velocidad mayor que en el resto de temperaturas a las que fueron ensayadas. Este resultado coincide con las afirmaciones de varios autores que señalan un crecimiento variable de *L. plantarum* a 45°C [47, 147, 307, 316]. En el sentido opuesto RIBÉREAU-GAYON *et al.* [282] señalan que ninguna bacteria aislada de vinos se desarrolla a 45°C y que a 40°C sólo algunos bacilos homolácticos se multiplican débilmente durante las primeras 24 horas. BARRE [19] observa que las temperaturas óptimas jamás fueron superiores a 35°C. Todas las cepas aisladas de las fermentaciones investigadas por nosotros, son capaces de crecer a 10°C aunque más lentamente que a temperaturas superiores. Sin embargo otros autores como CHALFAN *et al.* [79] encuentran en sus vinos unas especies que crecen y otras que no, y MARET y SOZZI [211, 212] hallan que el crecimiento a 10°C no es dependiente de la especie sino de la cepa. El crecimiento de nuestras cepas al resto de temperaturas ensayadas es positivo y coincide con lo observado por autores que han aislado las mismas especies que nosotros [47, 79, 160, 211, 212, 282, 307, 316].

El crecimiento a distintos pH nos informa acerca del nivel de acidofilia que soportan las bacterias lácticas. GARVIE [133] separó a *Leuconostoc oenos* de otras especies del género *Leuconostoc* por su capacidad de crecer en un medio con pH inicial de 4.2 o menor. FLORENZANO y BALLONI [117] también señalan esta característica como propia de *Leuconostoc oenos*. Esta prueba presenta un valor taxonómico importante según el "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" [47] y SHARPE [307]. La investigación

del crecimiento a diversos pHs ha sido realizada por la mayor parte de los autores que investigan las bacterias lácticas del vino [79, 155, 211, 212, 246, 253].

Los valores de pH a los cuales ensayamos el crecimiento de nuestras cepas son los que definieron PILONE y KUNKEE [253]. Esta prueba resultó muy útil para la separación de dos cepas de cocos heterolácticos, M11 y C11, de *Leuconostoc oenos*. Su incapacidad de crecer a 4.2 las excluyeron de esta especie, mientras que el resto de pruebas fisiológicas las definió como *Leuconostoc paramesenteroides*. El resto de cepas aisladas durante las vinificaciones crecen a pH 3.7, 4.2, 4.8 y 5.5, observándose una disminución progresiva de la velocidad de crecimiento conforme descendía el pH.

Otra prueba que permite distinguir las cepas de *Leuconostoc oenos* de las otras especies de este género es la capacidad de crecimiento en 10% de etanol. *Leuconostoc oenos* es capaz de crecer en estas condiciones mientras que otras especies no [27, 47, 133, 155, 253, 307, 316]. Sin embargo esta prueba carece de interés taxonómico en el caso del género *Lactobacillus*; no obstante, nosotros realizamos también la prueba de crecimiento en 10% de etanol con los bacilos a fin de caracterizarlos para su posterior utilización como cepas seleccionadas, y también para observar si existía correlación entre la tolerancia al etanol y el momento de la fermentación en el que se aíslan las cepas. En este sentido casi todas las cepas de lactobacilos aisladas por MARET y SOZZI [211, 212] y todas las aisladas por CHALFAN et al. [79] son resistentes a un 10% de etanol e incluso a más, aunque hubiesen sido aisladas de mostos [211, 212]. En nuestro caso, todas las cepas de *L. oenos*, de *L. cellobiosus*, de *L. fructivorans* y de *L. plantarum* eran capaces de crecer con un 10% de etanol en el medio. Dentro de *L. brevis* había mucha heterogeneidad: unas cepas mostraban buen crecimiento, otras eran de crecimiento débil, y otras no crecían en

absoluto. En cuanto a *L. hilgardii*, MARET y SOZZI la señalan como especie muy resistente a las concentraciones de etanol que se dan en el vino. Nosotros aislamos una cepa de esta especie en mostos sin sulfitar (cepa 32) capaz de crecer con el 10% de etanol en el medio, pero también aislamos cepas durante la fermentación alcohólica y en vinos acabados (cepas 91, 161, B22, G1 y G7) que eran incapaces de crecer con esta concentración de etanol. Esta aparente incongruencia puede ser explicada si consideramos que las cepas incapaces de crecer en 10% de etanol y que han sido aisladas de un medio alcoholizado se encuentran como población residual no proliferante, pero activa. Las cepas menos resistentes al etanol se irán inactivando durante la fermentación alcohólica y serán rápidamente superadas por cepas o especies más resistentes a este agente.

Una de las pruebas más generalizadas a la hora de clasificar cualquier tipo de microorganismo es la de utilización de diversas fuentes de carbono. Las bacterias lácticas poseen un metabolismo fermentativo de los carbohidratos, produciendo ácido láctico a partir de los mismos [47, 152]. En el vino las bacterias lácticas utilizan los azúcares residuales como fuente de energía y de carbono [282].

El estudio de la capacidad fermentativa de carbohidratos que tienen las bacterias lácticas del vino presenta un doble interés. Por un lado está el taxonómico, ya que la adscripción de las cepas a especies se haya sustentada por esta capacidad, y por otro lado presenta un interés práctico ya que el metabolismo de ciertos glúcidos presentes en el vino puede producir determinadas alteraciones en el mismo. En relación con esta cuestión MELAMED [222] observó descensos en la cantidad de azúcares en vinos secos tras el crecimiento de bacterias lácticas. Los descensos más acusados eran los de glucosa y arabinosa. Otros autores han demostrado que tanto ribosa como arabinosa son fermentadas más vigorosamente que las hexosas por las bacterias lácticas [5]. KUNKEE [166] señala que a pesar de

esa preferencia en la fermentación de las pentosas, éstas se hallan en cantidades tan insignificantes en el vino que las bacterias lácticas son incapaces de aprovecharlas como fuente de energía, y por tanto son incapaces de crecer a partir de ellas en este medio. El tipo de azúcar fermentado en el vino tiene mucha importancia, así la fermentación de pentosas rinde mayor cantidad de ácido acético que la de hexosas [5, 31, 175]. La fermentación de fructosa por parte de las bacterias lácticas heterofermentativas da lugar a manitol [3, 5, 124, 277] cuyos efectos perjudiciales ya han sido comentados anteriormente.

Durante los últimos años se han venido multiplicando los estudios sobre metabolismo de carbohidratos en el vino por parte de las bacterias lácticas [90, 91]. Estos trabajos tienen como meta el averiguar qué fuentes de carbono sustentan el crecimiento de las bacterias lácticas y el establecer qué efectos provoca la utilización de determinados carbohidratos.

Se ha estimado la capacidad de fermentar diversos carbohidratos por parte de nuestras cepas. Para ello se ha empleado un método miniaturizado (la tira API 50 CHL [11]) en la mayoría de los casos, y el método tradicional de GARVIE [133] en aquellos casos en los que observamos respuestas poco claras al utilizar la tira API.

El uso de la tira API 50 CHL proporcionó resultados muy satisfactorios con las cepas B11, B12, B13, 22, 24, 25, 27, G14, G15 y G16. Estas cepas mostraban un perfil claramente coincidente con la especie *L. plantarum*, según la definen el "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" [47] y el "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" [316]. De las 10 cepas de *L. plantarum*, 9 fermentaban la arabinosa, y una (G16) la xilosa y ribosa pero no la arabinosa. El resto de carbohidratos fermentados por esta especie se especifica en la Tabla 29. *L. plantarum* pertenece al grupo *Streptobacteria* propuesto por ORLA-JENSEN. Se trata de bacterias

homofermentadoras facultativas, que pueden degradar el ácido láctico (producto final de la fermentación de carbohidratos) a etanol, ácido acético y ácido fórmico en condiciones aerobias [159]. KANDLER [160] señala que *L. plantarum* incluye varios genotipos y fenotipos. Algunos de ellos se les ha dado diferentes nombres como *Lactobacillus pentosus* o *Lactobacillus arabinosus*, en función del tipo de pentosa que era capaz de degradar; sin embargo ninguno de estos nombres se acepta como especie distinta en la nomenclatura actual [47, 160, 319].

La tira API50 CHL también fue muy efectiva para la clasificación de las cepas 32, 39, 91, 93, 161, 162, 163, B22, 61 y 67. Los patrones de fermentación de estas cepas coincidían con el de *Lactobacillus hilgardii* (Tabla 29). Esta especie no presentaba actividad frente a muchos de los carbohidratos ensayados. Este comportamiento ya fue observado por SHARPE [307]. Algunas cepas presentaban una reacción retardada con la glucosa.

Las cepas 33, 35, 36, 38, T11 y T12 también fueron identificadas sin dificultad como *L. brevis* utilizando la tira API 50 CHL. Esta especie se caracterizaba por fermentar todas las pentosas (xilosa, arabinosa y ribosa) y por ello constituía el grupo de lactobacilos heterofermentativos que PEYNAUD y DOMERCQ [248] denominaban P⁺ (pentosas positivo). *L. brevis* se distingue de *L. buchneri* (que aparece en los mismos hábitats que *L. brevis*) en que *L. buchneri* fermenta la melicitosa y *L. brevis* no [160, 307]. Dada esta ínfima diferencia entre las dos especies podría ponerse en duda que constituyesen especies separadas, sin embargo la realización de pruebas de hibridación DNA-DNA ha mostrado una homología de sólo el 25% [160]. De entre las seis cepas clasificadas como *L. brevis*, dos fermentaban la rafinosa; la respuesta a la fermentación de este azúcar por *L. brevis* es calificada por el "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" [47] como débil, lenta o negativa. Sin embargo, BARRE [19] encontró una cepa de esta especie que fermentaba vigorosamente la rafinosa.

La cepa 34 mostró un patrón de fermentación que se ajustaba perfectamente al de *Lactobacillus cellobiosus* [47, 307, 316] (Tabla 29). Aunque no se trata de una especie muy extendida en vinos, ciertos autores [9, 72, 90] la han aislado en diferentes fases de la vinificación y otros llegan a describirla como especie típica del vino [5].

También las cepas B49 y M43 pudieron ser convenientemente identificadas como *L. fructivorans* mediante el sistema API 50 CHL. Esta especie se caracterizaba por no fermentar las pentosas (Tabla 29). KANDLER [160] define a esta especie como incapaz de fermentar otros carbohidratos distintos de fructosa y glucosa y ocasionalmente maltosa y/o sacarosa, mientras que PEYNAUD y SAPIS-DOMERCQ [248] afirman que sólo fermenta la fructosa y sacarosa.

Las cepas identificadas como *Leuconostoc paramesenteroides* han podido ser clasificadas utilizando la tira API 50 CHL. Entre las dos cepas existía bastante heterogeneidad. Fueron introducidas dentro del género *Leuconostoc* por su morfología cocácea, su carácter heterofermentativo, por la incapacidad de producir amoniaco a partir de arginina y por la producción de D(-)lactato a partir de glucosa. Se diferencian de *L. oenos* por su incapacidad de crecer a pH 4.2. Otra característica que distingue *L. paramesenteroides* de *L. oenos* es su incapacidad de crecer en un 10% de etanol, pero esta característica sólo la cumplía una de las cepas, C11, mientras que M11 sí crecía. Además de los carbohidratos especificados en la Tabla 29, estas dos cepas fermentan D-furanosa, α -metil-D-glucósido y N-acetilglucosamina.

Las cepas 31, G43, G45, B24, B31, B32, B44 y M12 dieron unos patrones de fermentación en la tira API 50 CHL que no nos permitió su inclusión dentro de ninguna de las especies propuestas por el "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" [47] o por el "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" [316]. La repetición de las pruebas de fermentación de

Carbohidrato	Especie						
	<i>L. plantarum</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. hilgardii</i>	<i>L. paramesenteroides</i>	<i>L. oenos</i>	<i>L. cellobiosus</i>	<i>L. fructivorans</i>
Amigdalina	10/10	0/7	0/10	1/2	0/7	1/1	0/2
D-Arabinosa	0/10	0/7	0/10	0/2	0/7	0/1	0/2
L-Arabinosa	9/10	7/7	0/10	1/2	0/7	1/1	0/2
Celobiosa	10/10	0/7	0/10	1/2	0/7	1/1	0/2
Esculina	10/10	4/7	0/10	2/2	7/7	1/1	0/2
Fructosa	10/10	7/7(g)	10/10	2/2(g)	5/7(g)	1/1(g)	2/2(g)
Galactosa	10/10	7/7	4/10	1/2	0/7	1/1	0/2
Gluconato	10/10(g)	6/7(g)	10/10(g)	2/2(g)	0/7	1/1(g)	2/2(g)
Glucosa	10/10	7/7(g)	10/10(g)	2/2(g)	0/7	1/1(g)	2/2(g)
Lactosa	10/10	0/7	0/10	0/2	0/7	1/1	0/2
Maltosa	10/10	7/7(g)	10/10(g)	2/2(g)	0/7	1/1(g)	0/2
Manitol	9/10	0/7	0/10	0/2	0/7	0/1	0/2
Manosa	10/10	0/7	0/10	2/2	0/7	1/1	0/2
Melecitosa	9/10	0/7	0/10	0/2	0/7	0/1	0/2
Melibiosa	10/10	4/7	4/10	2/2	0/7	1/1	0/2
Rafinosa	10/10	2/7	0/10	0/2	0/7	1/1	0/2
Ribosa	10/10	7/7	10/10	2/2	0/7	1/1	0/2
Sacarosa	10/10	1/7	0/10	2/2	0/7	0/1	0/2
Salicina	10/10	0/7	0/10	1/2	0/7	1/1	0/2
Sorbitol	8/10	0/7	0/10	2/2	0/7	1/1	0/2
Trehalosa	10/10	0/7	0/10	2/2	0/7	1/1	0/2
Xilosa	2/10	7/7	10/10	2/2	0/7	1/1	0/2

Tabla 29.- Fermentación de diferentes carbohidratos por parte de las cepas de las especies bacterianas aisladas en el presente estudio, utilizando el método API 50 CHL [11]. El resultado se expresa en forma de número de cepas positivas/número de cepas totales de cada especie. "g" producción de gas. Los carbohidratos expuestos en esta Tabla fueron escogidos en base a la valoración taxonómica que el "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" [47] les confiere. El resto de los resultados se detalla en el texto.

carbohidratos confirmó los primeros resultados por lo que descartamos la posibilidad de error o contaminación. La ambigüedad de su carácter homo o heterofermentativo y la imposibilidad de confirmarlo mediante la prueba de producción de manitol a partir de arginina nos han impedido incluir estas cepas en alguna especie.

En general, podemos concluir que la tira API 50 CHL dio buenos resultados en la clasificación de las bacterias lácticas que aislamos durante la vinificación, con excepción de *L. oenos*. Las características fermentativas de cada especie obtenidas por este método se muestran en la Tabla 29. Estas características permiten la clasificación a nivel de especie de la mayoría de cepas aisladas, el resto de pruebas realizadas con las cepas sirvió para confirmar su pertenencia a la especie a la que fue adscrita mediante la tira API 50 CHL. Sin embargo, este sistema no dio buenos resultados con las cepas 171, 172, G41, T46, M41, M42 y G6. Estas siete cepas se incluyeron en la especie *L. oenos* por su morfología cocácea, su heterofermentatividad, producción del isómero D(-)lactato a partir de glucosa, incapacidad de desaminar la arginina, crecimiento lento a pH 4.2 y estimulación por la adición de cisteína al medio de cultivo [133]. Cuando estas cepas se sembraron en la tira API 50 CHL sólo obtuvimos fermentación en dos de los carbohidratos ensayados, la esculina y la fructosa. Estos resultados no nos permiten incluirla con seguridad en *L. oenos*, ya que esta especie según GARVIE [133] es más activa frente a los carbohidratos. Nos planteamos entonces que quizás la utilización de este sistema no fuera adecuado para aquellas cepas de metabolismo poco activo y crecimiento lento. Escogimos como alternativa el método de GARVIE [133] que ha sido ampliamente utilizado en la identificación de bacterias lácticas [19, 27, 79, 99, 120, 132, 133, 213, 253, 292]. La ventaja de este método es que permite una incubación más larga de las pruebas y por ello es más adecuada para cepas lentas. Se incluyó entre las cepas ensayadas por el método de

GARVIE [133] una cepa de colección *L. oenos* ML-34 a fin de poder comparar con unos resultados de referencia. Los resultados obtenidos con este método se exponen en la Tabla 30 y se pueden comparar con los obtenidos al utilizar la tira API 50 CHL (Tabla 29). El sistema API 50 CHL mostraba un patrón de fermentación muy pobre y semejante en todas las cepas ensayadas, mientras que con el sistema de GARVIE se observó mayor cantidad de carbohidratos fermentados y mayor variación en el patrón de fermentación de las distintas cepas. Los resultados obtenidos con este método fueron muy buenos tanto para las cepas aisladas por nosotros como *L. oenos* ML-34. El patrón de fermentación de esta cepa de referencia coincidía perfectamente con el que hallaron otros autores que han trabajado con esta misma cepa [27, 79, 253]. Las dificultades que presentaba la tira API 50 CHL para la clasificación de *L. oenos* han sido señaladas por MARFT et al. [213], sin embargo, otros autores no han tenido problemas con esta especie utilizando los sistemas API 50 CHL y API 50 L [72, 90, 115, 179, 183]. El hecho de que las cepas clasificadas por nosotros como *L. oenos* no respondan adecuadamente al sistema 50 CHL puede deberse a que el medio de cultivo utilizado por dicho método no sea el más adecuado para esta especie [213]. Recordemos que *L. oenos* es muy difícil de cultivar debido a sus numerosos requerimientos nutricionales. Otra posible razón que explique el fracaso del sistema 50 CHL con esta especie sería el tiempo de incubación de las pruebas ya que el sistema API 50 CHL tiene un tiempo máximo de lectura de 48 horas, tiempo demasiado corto para unos microorganismos tan lentos como *L. oenos*. No obstante, esta explicación está descartada ya que nosotros alargamos la incubación de la tira API 50 CHL hasta 14 días sin que observásemos cambios; es más, azúcares que en 2-3 días eran fermentados en tubo según el sistema de GARVIE no daban resultados positivos tras dos semanas de incubación en la tira API 50 CHL. La razón de que este último sistema no presente problemas a otros autores que han aislado *L. oenos*

Carbohidrato	Cepa							
	M41	M42	641	171	172	T46	66	ML-34
D-Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinosa	+	+	-	+	+	+	-	-
Celobiosa	-	-	-	d	-	+	-	+
Dextrina	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactosa	-	-	-	-	-	d	d	-
Glucosa	d	d	+	d	+	+	d	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Manosa	-	-	-	-	-	+	-	-
Melecitosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiosia	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	d	-	-	d
Sorbosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Trehalosa	-	-	+	-	+	+	+	+
Xilosa	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 30.- Fermentación de diferentes carbohidratos por parte de las cepas pertenecientes a *Leuconostoc oenos* empleando el método propuesto por GARVIE [133]. "+" resultado positivo. "-" resultado negativo. "d" resultado dudoso.

puede deberse a que esta especie es muy heterogénea. Esta heterogeneidad no sólo se pone de manifiesto en los patrones de fermentación de carbohidratos sino también en la facilidad de cultivo que poseen algunas cepas frente a otras [79, 115, 133, 179, 213, 259]. Abundando en el tema de la heterogeneidad entre cepas, algunas de éstas fermentan rápidamente la glucosa, T46 y ML-34 lo hacen a los cinco días, mientras que otras, 172, no lo hace hasta después de 16 días (Tabla 30). Incluso algunas cepas mostraron un resultado dudoso al cabo de 21 días de incubación. Se ha sugerido que la fermentación de carbohidratos no es necesaria para la clasificación de los *Leuconostoc* aislados de vino (*L. oenos*) ya que su tolerancia al etanol, así como a los pH bajos los diferencian suficientemente del resto de especies del mismo género [133, 253].

Hemos hablado al principio de este Apartado de la controversia establecida entre los autores de la taxonomía "oficial" [49, 133, 307, 316] y los de la taxonomía "enológica" [282]. Estos últimos dan un gran peso a la capacidad de fermentar las pentosas (xilosa y arabinosa) en la clasificación de las especies. Según PEYNAUD y DOMERCQ [242] la clasificación basada en la fermentación de las pentosas posee, además de valor taxonómico, un interés enológico del cual carecen otros sistemas de clasificación. PEYNAUD y DOMERCQ [246] justifican este sistema de clasificación de la siguiente manera: "La fermentación de las pentosas por las bacterias lácticas del vino es el único carácter fermentativo de interpretación clara. Por otra parte no se trata de un carácter adaptativo sino estable. La fermentación de las hexosas y de la sacarosa es un carácter débil, y de una cepa a otra aparecen distintos grados de intensidad de fermentación. Las bacterias lácticas fermentan preferentemente las pentosas produciéndose un crecimiento y acidificación más importantes a partir de ellas. Además la posibilidad de fermentación de las mismas tiene interés tecnológico ya que está en relación con las

alteraciones bacterianas. De hecho, los vinos contienen 1 g/l de pentosas del que la mayor parte está constituido por arabinosa y sólo un poco por xilosa. El ataque a estos azúcares contribuye a explicar la formación de ácido acético que ocurre simultáneamente a la fermentación maloláctica. Una bacteria que no ataque a las pentosas no presenta este problema." Este criterio se encuentra apoyado por ciertos investigadores [31, 175, 282] y se ha utilizado en algunos trabajos de clasificación [211, 212]. Consideramos de interés señalar una serie de observaciones realizadas por otros autores y que están en contraposición con este tipo de clasificación sistemática. Por un lado encontramos que a pesar de que la fermentación de pentosas es un carácter bastante conservativo, la separación de especies en base a su fermentación no siempre es posible, ya que por ejemplo, *L. brevis* y *L. buchneri* tan sólo se diferencian en la fermentación de la melecitosa. Por otro lado, el interés enológico que supone la clasificación en base a las pentosas es relativo. Es cierto que las pentosas son los azúcares a partir de los cuales se produce mayor cantidad de ácido acético y que por ello se consideran peligrosas aquellas cepas capaces de fermentarlas. Sin embargo las cantidades de pentosas en un vino, se encuentran alrededor de 1 g/l [246] y según KUNKEE [166] se precisan concentraciones de al menos un 2% de las mismas para que los enzimas responsables de la fermentación de las pentosas lleven a cabo su degradación. Este umbral de concentración de pentosas parece estar relacionado con la inducción de determinados enzimas implicados en el metabolismo de estos carbohidratos.

Otra de las pruebas realizadas con nuestras cepas ha sido la de fermentación de determinados ácidos orgánicos. El interés de este ensayo es múltiple, por un lado resuelve cuestiones taxonómicas dentro del género *Leuconostoc*, informa sobre la utilización de determinados ácidos orgánicos como fuente de energía y carbono, y por último presenta un aspecto práctico, ya que el metabolismo de los ácidos orgánicos origina importantes

cambios organolépticos en el vino.

En primer lugar consideraremos el papel de los ácidos málico y cítrico en la clasificación de las especies de *Leuconostoc* [27, 133, 155, 253]. De acuerdo con las claves sistemáticas empleadas en el presente estudio [47, 307, 316] *L. oenos* se diferencia del resto de especies del género *Leuconostoc* porque todas sus cepas degradan malato en presencia de glucosa. Según BARRE [B25] la fermentación del ácido cítrico también es una característica propia de esta especie, no sin razón anteriormente se denominaba *Leuconostoc citrovarum* [167]. Por lo que respecta a los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*, las claves consultadas [47, 160, 307, 316] no incluyen la fermentación de estos ácidos como prueba taxonómica. Esto es debido a que la fermentación de ácidos cítrico y málico es una característica que varía de cepa en cepa [31, 86]. Sin embargo PEYNAUD y DOMERCQ [242] proponen como criterio en su clasificación de bacilos homofermentativos la fermentación del ácido cítrico. La mayoría de autores que han aislado bacterias lácticas del vino incluyen la prueba de fermentación de ácido málico y cítrico en el conjunto de pruebas que realizan. Tanto la degradación de estos dos ácidos como la de los ácidos tartárico y fumárico dan una información muy interesante a la hora de seleccionar cepas para su aplicación práctica [19, 79, 99, 211]. Los ácidos orgánicos influyen en el crecimiento de las bacterias lácticas. CHAUVET et al. [84] han demostrado que los ácidos málico y cítrico pueden sustentar el crecimiento de *L. oenos*, bajo determinadas condiciones. Sin embargo, posteriores estudios realizados por estos investigadores [83] han revelado que estos ácidos no son utilizados para la producción de biomasa celular. La vía de degradación del ácido málico a láctico es una vía que no proporciona energía convertible en ATP [166]. Hay autores que afirman que el ácido málico tiene un efecto estimulador del crecimiento bacteriano a concentraciones bajas [83, 175], pero a concentraciones altas se vuelve

inhibitorio [175]. Sin embargo otros autores demuestran que la cantidad de ácido málico añadido a un medio con glucosa no altera significativamente la producción de biomasa [253]. DRINAN *et al.* [106] observaron que la presencia de citrato no tenía ningún efecto sobre la tasa de crecimiento de *Leuconostoc*, aunque la acidez del medio era más elevada cuando las células crecían en presencia de citrato. Estos autores [106] encontraron que el citrato sí aumentaba la tasa de crecimiento de los bacilos heterofermentativos, pero no la de los homofermentativos. Esto podría sugerir que este compuesto es fuente de energía para estos microorganismos; sin embargo se ha demostrado que las bacterias lácticas heterofermentativas son incapaces de crecer en un medio que contenga citrato como única fuente de carbono [106]. El ácido tartárico raramente es metabolizado por las bacterias lácticas [31, 265] (Tabla 32). Según LAFON-LAFOURCADE, el ácido tartárico posee un efecto desfavorable sobre la fermentación maloláctica [172], y bajo ciertas condiciones disminuye la cantidad de biomasa formada [175]. El ácido fumárico estimula el crecimiento de las bacterias lácticas a bajas concentraciones, ya que puede ser descompuesto por el enzima fumarasa dando L(+)-láctico [255]. Se ignora cómo estimula el crecimiento, ya que la degradación de fumárico a lactato no proporciona energía [305]. En tercer lugar hay que considerar los productos finales del metabolismo de estos ácidos (Figura 6). Esto es muy importante a nivel práctico, ya que si se degradan los ácidos orgánicos presentes en el vino ocurrirán una serie de complejas modificaciones organolépticas.

Los resultados obtenidos en los ensayos de fermentación de los ácidos cítrico, fumárico y tartárico se muestran en la Tabla 31. La degradación del ácido málico se comentará en el siguiente Capítulo. Todas las cepas pertenecientes a *L. oenos* degradan el ácido cítrico, mientras que una de las cepas de *L. paramesenteroides* no metabolizó este ácido. PEYNAUD y DOMERCQ [246] encontraron que únicamente dos de las cuatrocientas cepas de

Especie	Cepa	Degradación de ácidos		
		Tartárico	Cítrico	Fumárico
<i>L. oenos</i>	171	-	+(1)	+(5)
	172	-	+(2)	+(5)
	T46	-	+(5)	+(3)
	641	-	+(2)	+(2)
	66	-	+(2)	+(3)
	M41	-	+(1)	+(3)
	M42	-	+(2)	+(3)
<i>L. paramesenteroides</i>	C11	-	-	-
	M11	-	+(14)	+(14)
<i>L. fructivorans</i>	M43	-	-	+(5)
	B49	-	-	+(9)
<i>L. cellobiosus</i>	34	-	-	+(4)
<i>L. brevis</i>	33	-	-	+(7)
	35	-	-	+(4)
	36	-	-	+(4)
	38	-	-	+(7)
	T11	-	+(1)	+(1)
	T12	-	+(1)	+(1)
	32	-	+(1)	+(4)
<i>L. hilgardii</i>	39	-	-	+(4)
	91	-	-	+(7)
	93	-	-	+(7)
	162	-	-	+(4)
	163	-	-	+(4)
	B11	-	nc	+(1)
	B12	-	nc	+(1)
<i>L. plantarum</i>	B13	-	nc	+(1)
	22	-	nc	+(1)
	B44	-	+(1)	+(2)
Sp. no determinada	B31	-	+(1)	+(2)
	B32	-	+(1)	+(2)
	B24	-	+(1)	+(1)
	M12	-	+(1)	+(1)
	31	-	-	+(2)
	C43	-	-	-
	C45	-	-	-

Tabla 31.- Capacidad de degradación de distintos ácidos orgánicos por parte de las bacterias lácticas aisladas en el presente trabajo. "+" degradación total; entre paréntesis el tiempo en días que tarda la cepa en degradar. "nc" degradación no completa al cabo de 36 días de incubación. "-" no degradación.

cocos heterofermentativos aisladas por ellos de vinos eran incapaces de degradar el ácido cítrico. En un amplio estudio sobre el género *Leuconostoc* realizado por GARVIE [133], se señala que sólo una cepa de las ocho pertenecientes a *L. paramesenteroides* metabolizaba el ácido cítrico. Los resultados obtenidos con nuestras cepas en la fermentación de este ácido (Tabla 31) concuerdan con lo que han observado otros autores [27, 79, 155, 253]. Las cepas de *L. plantarum* degradaron parte del ácido cítrico del medio. La degradación del citrato por esta especie también ha sido observada por CHALFAN *et al.* [79] y por BARRE [19]. La degradación del ácido cítrico, tanto en *L. brevis* como en *L. hilgardii*, es un carácter asociado a pocas cepas. Tanto *L. fructivorans* como *L. cellobiosus* se muestran incapaces de metabolizar este ácido, y entre el grupo de cepas no identificadas las cepas 31, C43 y C45 no lo utilizan, pero el resto sí. La degradación del citrato por las bacterias lácticas trae como consecuencia la formación de ácido acético, acetoína y diacetilo. DAVIS *et al.* [89] han informado de la producción de 2,3-butanodiol a partir de estos dos últimos compuestos en vinos inoculados con *L. hilgardii* y con *L. brevis*. Estos productos finales de la fermentación del cítrico pueden mejorar la complejidad organoléptica de un vino, siempre que no sobrepasen ciertos límites. Sin embargo, muchos autores advierten del peligro que supone la producción de ácido acético a partir del cítrico, ya que éste es el responsable del aumento de acidez volátil tras la fermentación maloláctica. En condiciones prácticas, un mol de ácido cítrico se convierte en un mol de ácido acético. Las experiencias realizadas por SHIMAZU *et al.* [311] muestran que el principal producto de degradación del ácido cítrico es el ácido acético, seguido en importancia por acetoína y diacetilo. Las cantidades relativas de estos productos finales varían según la fase de crecimiento en que se hallen las bacterias, y según las condiciones del medio donde crezcan. Así, se produce un aumento de acetoína y diacetilo a

expensas de la disminución de ácido acético cuando las condiciones son desfavorables [206], tal como sucede en vino.

Según RIBEREAU-GAYON [282] solamente dos tercios de las bacterias lácticas del vino son capaces de degradar el ácido cítrico. Esta observación concuerda bastante bien con lo hallado por nosotros, ya que de las 36 cepas ensayadas 20 atacan, total o parcialmente, dicho ácido. Los bacilos heterofermentativos son los que han resultado más inactivos frente al citrato. PEYNAUD y DOMERCQ [246] señalan que únicamente un 20% de este tipo de bacterias lácticas ataca a este ácido; en nuestro caso sólo 3 de las 15 cepas aisladas llegaron a metabolizarlo (Tabla 31).

Ninguna de las cepas aisladas por nosotros fue capaz de degradar el ácido tartárico. Esta es una observación que generalmente hacen los investigadores de las bacterias de vino [31, 175, 265]. La fermentación de este ácido es una característica propia de la cepa, no de la especie [19, 31]. Pocos autores incluyen esta prueba en sus identificaciones y caracterizaciones pero nosotros, al igual que BARRE [19], pensamos que tendría repercusión a la hora de seleccionar bacterias lácticas de interés en enología. La importancia que tiene la degradación de este ácido es que da lugar a ácido acético, y como consecuencia en los vinos se observa una disminución de la acidez total y un aumento de la acidez volátil, lo que hace que estos aparezcan avinagrados y planos. A esta alteración se le denomina "tournée" del vino [175, 277]. Algunos autores [282] señalan que la degradación del ácido cítrico es más peligrosa que la del tartárico; pero hay que tener en cuenta que aunque la cantidad de ácido acético producida a partir del ácido tartárico sea menor que a partir del ácido cítrico [265], el ácido tartárico es más abundante en el vino. De esta forma si en el vino existe una bacteria capaz de degradarlo, el riesgo será más acusado que si ataca al cítrico.

El ácido fumárico fue degradado por la casi totalidad de las cepas ensayadas. Tan sólo tres cepas (Tabla 32) fueron incapaces de metabolizarlo: una de ellas pertenecía a *L. paramesenteroides* y las otras no han podido ser identificadas. Probablemente no se trata de un carácter ligado a la especie, ya que ninguna clave sistemática considera la fermentación del ácido fumárico como prueba de clasificación [47, 316, 333]; sin embargo, algunos autores la realizan a fin de conocer mejor el metabolismo de sus cepas [79]. CHALFAN *et al.* [79] encuentran cepas de *L. oenos* capaces de degradar este ácido, pero también cepas incapaces de hacerlo. Ya hemos hablado antes de que este ácido tiene un efecto estimulante por debajo de 600 mg/l [175, 249], pero inhibidor si se supera este límite. Su uso como supresor de la fermentación maloláctica esta muy extendido en California [255]. Los productos finales de degradación de este ácido pueden observarse en la Figura 6. -

3.2.6.- EVOLUCION DE LAS ESPECIES DE BACTERIAS LACTICAS DURANTE LA VINIFICACION.

Ya hemos hablado en el Apartado 3.2 de este Capítulo de la evolución del número de bacterias a lo largo de las distintas vinificaciones; asimismo hemos observado la influencia que determinadas prácticas de bodega tienen sobre la dinámica de la población láctica. Para completar este Capítulo vamos a definir cuál fue la sucesión de las distintas especies de bacterias durante la elaboración del vino. Otros muchos autores han realizado estudios sobre la evolución del número y especies de estas bacterias a lo largo de la fermentación [72, 79, 115, 179, 211, 212, 213, 292]. Si observamos los resultados de la Tabla 32 veremos que al igual que ocurría en levaduras, es en mostos recién sangrados y sin sulfitar (Fase 1)

Cepa	Especie	Fase	Variedad Uva	Procedencia
22	<i>L. plantarum</i> Ara+	I	Bobal	CSP
24	<i>L. plantarum</i> Ram+	I	Bobal	CSP
25	<i>L. plantarum</i> Ara+	I	Bobal	CSP
27	<i>L. plantarum</i> Ara+	I	Bobal	CSP
31	N.I.	I	Bobal	CSP
32	<i>L. hilgardii</i> Mel+	I	Bobal	CSP
33	<i>L. brevis</i> Gal+ Mel+	I	Bobal	CSP
34	<i>L. cellobiosus</i>	I	Bobal	CSP
35	<i>L. brevis</i>	I	Bobal	CSP
36	<i>L. brevis</i>	I	Bobal	CSP
37	<i>L. brevis</i> Gal+ Mel+	I	Bobal	CSP
38	<i>L. brevis</i>	I	Bobal	CSP
39	<i>L. hilgardii</i>	I	Bobal	CSP
C11	<i>L. paramesenteroides</i>	I	Cabernet-Sauvignon	EVE
G14	<i>L. plantarum</i> Ara+	I	Garnacha	EVE
G15	<i>L. plantarum</i> Ara+	I	Garnacha	EVE
G16	<i>L. plantarum</i> Ara+	I	Garnacha	EVE
M11	<i>L. paramesenteroides</i>	I	Macabeo	EVE
M12	N.I.	I	Macabeo	EVE
T11	<i>L. brevis</i> Gal+	I	Tempranillo	EVE
T12	<i>L. brevis</i>	I	Tempranillo	EVE
B11	<i>L. plantarum</i> Ara+	II	Bobal	EVE
B12	<i>L. plantarum</i> Ara+ Sor-	II	Bobal	EVE
B13	<i>L. plantarum</i> Ara+	II	Bobal	EVE
91	<i>L. hilgardii</i>	III	Bobal	CSP
92	<i>L. hilgardii</i>	III	Bobal	CSP
B22	<i>L. hilgardii</i>	III	Bobal	EVE
B24	N.I.	III	Bobal	EVE
161	<i>L. hilgardii</i>	IV	Bobal	CSP
162	<i>L. hilgardii</i>	IV	Bobal	CSP
163	<i>L. hilgardii</i>	IV	Bobal	CSP
B31	N.I.	IV	Bobal	EVE
B32	N.I.	IV	Bobal	EVE
B44	N.I.	V	Bobal	EVE
B49	<i>L. fructivorans</i>	V	Bobal	EVE
C43	N.I.	V	Cabernet-Sauvignon	EVE
C45	N.I.	V	Cabernet-Sauvignon	EVE
G41	<i>L. oenos</i>	V	Garnacha	EVE
M41	<i>L. oenos</i>	V	Macabeo	EVE
M42	<i>L. oenos</i>	V	Macabeo	EVE
M43	<i>L. fructivorans</i>	V	Macabeo	EVE
T46	<i>L. oenos</i>	V	Tempranillo	EVE
171	<i>L. oenos</i>	VI	Bobal	CSP
172	<i>L. oenos</i>	VI	Bobal	CSP
61	<i>L. hilgardii</i>	VI	Bobal	CVL
66	<i>L. oenos</i>	VI	Bobal	CVL
67	<i>L. hilgardii</i> Mel+	VI	Bobal	CVL

Tabla 32.- Aparición de especies de bacterias lácticas a lo largo de la vinificación de las diferentes variedades de uva estudiadas. "N.I." no identificada. "CSP" Cooperativa San Pedro de los Corrales de Utiel. "EVE" Escuela de Viticultura y Enología de Requena. "CVL" Cooperativa Virgen de Loreto de las Cuevas de Utiel.

donde mayor número de especies se hallan. Así, entre las 22 cepas aisladas en esta Fase, 7 pertenecen a *L. plantarum*, 7 a *L. brevis*, 2 a *L. hilgardii*, 2 a *L. paramesenteroides*, 1 a *L. cellobiosus* y 2 cepas (31 y M12) no pudieron ser identificadas. LAFON-LAFOURCADE *et al.* [179] encontraron las especies *L. plantarum*, *L. hilgardii* y *L. mesenteroides* sobre las uvas y mostos. COSTELLO *et al.* [72] aislaron de mostos las especies *L. plantarum* y *L. oenos*. MARET y SOZZI [211] encuentran *L. casei*, *L. plantarum* y *L. brevis* en mostos suizos, mientras que FLEET *et al.* [115] aíslan *Pediococcus cerevisiae* y *L. mesenteroides* en mostos frescos de Burdeos. La presencia de la especie *L. plantarum* en mostos parece bastante generalizada en las distintas zonas vitícolas mundiales. Con una frecuencia menor, todos estos autores encuentran *L. brevis* y *L. hilgardii*; estas tres últimas especies también las hemos hallado nosotros en mosto. Sin embargo la especie *L. paramesenteroides*, aislada en mostos de las variedades Cabernet-Sauvignon y Macabeo, no ha sido descrita en mostos por estos mismos investigadores.

Si estudiamos la Tabla 31 observaremos un hecho curioso, y es que en los aislamientos del depósito N2 de la Cooperativa San Pedro y en los mostos de Garnacha de la Estación de Viticultura y Enología sólo se aisló la especie *L. plantarum*, mientras que en el resto de depósitos muestrados en esta Fase se hallaron dos o más especies. Estas diferencias en los aislamientos de especies a partir de distintos depósitos con mostos procedentes de los mismos viñedos pueden deberse al sistema de detección utilizado. Si se realiza el aislamiento de bacterias lácticas por el método de enriquecimiento, en los tubos de medio nutritivo crecerán preferentemente las especies más activas. Esto no quiere decir que en la muestra inoculada no existan otras especies, pero éstas no pueden desarrollarse si el medio es colonizado rápidamente por una cepa de rápido crecimiento. Esto es lo que debe ocurrir en nuestro caso, ya que *L. plantarum* es la especie de crecimiento más rápido entre las que hemos aislado. En el caso de existir

ésta en las muestras de mostos inoculadas en el medio de enriquecimiento, crecería rápidamente impidiendo el desarrollo de especies de multiplicación más lenta (*L. brevis*, *L. hilgardii*, *L. paramesenteroides*, etc.). Esto también explicaría la ausencia de *L. oenos* o de *L. fructivorans* en los primeros muestreos, ya que son las cepas más lentas de entre todas las aisladas. El lento crecimiento de estas especies ha sido observado por varios autores [234, 343, 344]. Cuando en la muestra no existía *L. plantarum* sino especies heterofermentativas con actividades metabólicas semejantes, es cuando puede desarrollarse conjuntamente el resto sin que hayan problemas de competencia.

Conforme va avanzando la fermentación alcohólica, el número total de bacterias lácticas desciende hasta poblaciones muy bajas (Figuras 8 a 25). Además de disminuir el número total de bacterias también decrece el número de especies. Así, a partir de la Fase II (Tabla 31) sólo encontramos las especies *L. hilgardii*, *L. fructivorans* y *L. oenos*. Las causas de esta disminución de la población láctica son la adición de SO_2 (producto al cual las bacterias son muy sensibles [24, 119, 306]), el progresivo incremento en etanol que sufre el mosto en fermentación [179, 344], y la competencia con las levaduras [190, 282]. Estas condiciones seleccionan a las cepas más resistente a estos factores. La importancia que tienen el etanol y el SO_2 en la disminución de la población láctica queda ilustrada en la vinificación de Bobal, llevada a cabo en la Estación de Viticultura y Enología (Figura 22). El número de bacterias lácticas hallado en la Fase II fue de 4.6×10^8 células por mililitro, un número muy semejante al que se obtuvo en mostos recién sangrados (Figuras 8 a 25). A pesar de que la fermentación alcohólica ya había empezado, la disminución de la población láctica no había sido tan drástica como en los otros casos debido a la ausencia de SO_2 y al poco etanol en el medio de fermentación (Tabla 17). Podríamos esperar que en ausencia de estos inhibidores las bacterias

lácticas crecerían a expensas de los azúcares del mosto, sobre todo aquéllas de metabolismo más activo como *L. plantarum*. Sin embargo esto no ocurre, y la causa hemos de buscarla en la influencia negativa que las levaduras ejercen sobre el crecimiento de las bacterias lácticas [28, 121, 185, 282]. LAFON-LAFOURCADE [185] afirma que las levaduras, más que eliminar a las bacterias lácticas, lo que hacen es convertirse en dominantes en la población. De esta manera las bacterias sólo pueden desarrollarse cuando las levaduras han agotado los azúcares [185]. Como ya se ha citado, en mostos en fermentación de Bobal, encontramos una población de *L. plantarum* que aunque no es muy elevada se presenta en una concentración poco habitual, ya que esta especie no ha sido aislada de ningún otro depósito en fermentación. Dado que todas las cepas de *L. plantarum* aisladas por nosotros crecían en medio con un 10% de etanol, su ausencia en los muestreos correspondientes a la Fase II (con concentraciones de alcohólicas inferiores) sólo se explica en función de su sensibilidad al SO_2 . De aquí que únicamente halláramos a esta especie en aquella vinificación donde no se utilizó SO_2 . Generalmente esta especie se asocia a los primeros momentos de la vinificación [72, 179]. En este sentido MARET y SOZZI [211, 212] encuentran que *L. plantarum* (especie característica de mostos recién obtenidos) desaparece rápidamente, dejando paso a *L. hilgardii*, *L. casei*, *L. buchneri* y *Pediococcus cerevisiae*. En la vinificación de vino Fendant suizo [212] se cita una evolución de especies que se asemeja mucho a la observada por nosotros: primero aparece *L. plantarum*, y luego ésta es sustituida por *L. hilgardii*. Sin embargo, en estos vinos la fermentación maloláctica la lleva a cabo *L. hilgardii*, mientras que en los mostros la especie mayoritariamente aislada durante este proceso es *L. oenos*, aunque junto a ella también se han aislado *L. hilgardii* y *L. fructivorans*.

Las únicas especies aisladas en los momentos finales de la fermentación alcohólica (Fases III y IV) han sido *L. hilgardii* y 3 cepas que no se han conseguido identificar. *L. hilgardii* es definida por MARET y SOZZI [211, 212] como una especie muy resistente al etanol; sin embargo LAFON-LAFOURCADE [179] dice que esta especie no puede tolerar este producto. Esta disparidad de opiniones se debe al hecho de que la tolerancia al etanol es característica de cada cepa y no de la especie, como ya citamos en el Apartado 3.2.3 de este Capítulo. Así, nosotros hemos aislado cepas de *L. hilgardii* capaces de crecer con un 10% (v/v) de etanol en el medio, y cepas incapaces de crecer en él. La presencia durante la fermentación alcohólica de cepas que no crecen con un 10% de etanol puede parecer incongruente, pero es posible que estas cepas constituyan ejemplos de poblaciones residuales en estado no proliferante, procedentes de etapas anteriores.

L. hilgardii se ha asociado frecuentemente a la fermentación maloláctica de algunos vinos [122, 212, 248, 270], pero también a vinos alterados [151, 282]. *L. fructivorans* es una especie muy resistente al etanol [47, 316], y ha sido aislada de vinos con 20° alcohólicos [270, 344]. RANKINE [270] informa que algunas de estas bacterias son capaces de producir alteraciones tanto en vinos como en mostos. Este autor también describe a la especie *L. trichodes* (actualmente es sinónimo de *L. fructivorans* [160, 316]) como causante de incrementos en la acidez fija y en la acidez volátil, así como de la producción de manitol y CO₂ [270]. KANDLER [160] habla de *L. fructivorans* como especie característica de vinagre estropeado, capaz de crecer a pHs bajos y con elevadas concentraciones de etanol. Esta especie se aisló en vinos de las variedades Bobal y Macabeo vinificados en la Escuela de Viticultura y Enología. La elevada acidez volátil del vino obtenido de uvas Macabeo puede que tenga relación con la presencia de esta especie, aunque no hay que olvidar que en esta vinificación apareció *S. ludwigii*, especie de levadura

también fuertemente cetógena.

La especie *L. oenos* tiene especial significado para la fermentación maloláctica, ya que generalmente la lleva a cabo en muchas zonas vinícolas [91, 108, 115]. Algunos autores han encontrado a esta especie sobre mostos y uvas [108, 179], pero nosotros no logramos aislarla hasta finalizada la fermentación alcohólica. Esta ausencia temporal puede deberse o a que no exista en nuestros mostos, o a que el sistema de enriquecimiento empleado en el aislamiento de las bacterias lácticas no permitiese su detección. Como decíamos anteriormente si en las muestras que inoculábamos en el medio de enriquecimiento existían especies de lento crecimiento, como *L. fructivorans* o *L. oenos*, junto a otras de crecimiento más rápido, *L. plantarum* por ejemplo, las primeras se verían dominadas en la población y al realizar los aislamientos en placa sólo nos aparecerían colonias de la especie dominante. *L. oenos* y *L. fructivorans* pueden crecer y hacerse mayoritarias en la población sólo cuando disminuye en el vino el número de bacterias de crecimiento rápido. La siembra de muestras de fases más tardías en el medio de enriquecimiento permite que se desarrollen estas especies, y entonces es cuando detectamos su presencia.

Es posible además que los medios de cultivo empleados para el recuento y aislamiento de bacterias lácticas (MRSF y agar MRS) sean más adecuados para el desarrollo de lactobacilos que para *L. oenos*. De hecho experiencias posteriores nos mostraron que esta especie crecía mejor en MLO que en MRS o JT, ya que el primero contiene cisteína y jugo de tomate, y se encuentra a pH 4.8, factores todos ellos que favorecen su desarrollo [133, 307, 316]. Las demás cepas de bacterias lácticas aisladas no mostraban grandes diferencias de crecimiento cuando se sembraban en JT, MLO o MRS. A partir de la constatación de que *L. oenos* crecía mejor en MLO, el cultivo de estas cepas se realizó en ese medio y además se decidió el empleo del mismo para posteriores aislamientos de bacterias lácticas del vino.

A pesar de que se aisló *L. oenos* (Tabla 31) de uno de los depósitos de la Cooperativa San Pedro, éste no realizó la fermentación maloláctica. Esto se debió a que el número en que se hallaba esta especie era muy bajo, del orden de 4 células por mililitro (Figura 20). La razón de este bajo número de bacterias se explica si tenemos en cuenta que la muestra se había tomado después del trasiego y tras la adición de 20 mg/l. de SO₂ (Tabla 2). El eventual desarrollo que las bacterias lácticas podían haber tenido tras la fermentación alcohólica quedaba impedido por esta nueva adición de SO₂. Sin embargo, todos los mostos vinificados en la Escuela de Viticultura y Enología realizaron la fermentación maloláctica. En tres de los vinos muestreados se aisló *L. oenos* (Tabla 31) durante la fermentación maloláctica o inmediatamente después de la misma, por lo que pensamos que fue esta especie la responsable del proceso. En otros dos vinos (Bobal y Macabeo) no encontramos *L. oenos* sino *L. fructivorans* y tres cepas que no pudimos identificar. No podemos asegurar la presencia de *L. oenos* durante la fermentación maloláctica de estos últimos vinos, ya que la realizaron en un periodo intermedio entre muestreos. Ignoramos si esta especie tuvo relación con la misma y luego desapareció, dejando paso a otras especies tras la fermentación maloláctica, o incluso si llegó a aparecer. La muerte de *L. oenos* tras la fermentación maloláctica y posterior sucesión por otras especies en el vino ya acabado, ha sido descrita por DAVIS et al. [91] durante la vinificación de Pinot-Noir en Australia.

A modo de resumen diremos que la evolución del número de bacterias durante la vinificación es muy semejante en todos los casos: una población de aproximadamente 10³-10⁴ células por mililitro en mosto sin sulfitar, que desciende durante la fermentación alcohólica (a veces hasta desaparecer) y luego se recupera hacia el final de la misma. Si las condiciones del medio permiten el desarrollo de las bacterias, caso de lo ocurrido en la Estación de Viticultura y Enología, éstas crecen y provocan la fermentación

maloláctica; sin embargo cuando existe un factor inhibidor, como el SO_2 o el descenso de temperatura (caso de la Cooperativa San Pedro), éstas no se desarrollan y por tanto no se realiza la fermentación maloláctica. En muchas ocasiones se ha observado que la fermentación maloláctica se lleva a cabo durante la primavera del año siguiente a las vendimias. Esto se debe a que las temperaturas se incrementan, y a que parte del SO_2 añadido en los meses de Noviembre-Diciembre se pierde a lo largo de todo ese tiempo. Las especies de bacterias lácticas a lo largo de la fermentación también sufren una evolución. Al igual que las levaduras, el mayor número de especies bacterianas se encuentra en mostos sin sulfitar. Cuando se inicia la fermentación alcohólica, el SO_2 , el etanol, y la competencia con las levaduras provocan una selección de especies, eliminando las menos resistentes e impidiendo el crecimiento de las restantes. En esta fase, sólo pudimos aislar *L. hilgardii*, algunas de cuyas cepas eran incapaces de crecer en medio sintético con un 10% de etanol; ésto significaría que estas cepas tienen un carácter de población residual en el vino, ya que no pueden desarrollarse en estas condiciones. Tras la fermentación alcohólica pudimos apreciar la existencia de *L. oenos*, *L. fructivorans* y algunas cepas que no conseguimos identificar. Las especies que no han sido aisladas mas que en los últimos muestreos, es posible que se encontrasen en etapas anteriores pero en números tan bajos que no han podido ser detectadas.

CAPITULO III. La fermentación maloláctica y su control.

1.- INTRODUCCION.

AMERINE [2] definió el vino como una "sinfonía química compuesta por etanol, otros alcoholes, azúcares, otros carbohidratos, aldehídos, cetonas, enzimas, pigmentos, al menos una docena de vitaminas, 15 ó 20 minerales, más de 22 ácidos orgánicos, y otras notas elegantes que todavía no han sido identificadas". Para producir un buen vino, los azúcares, ácidos y taninos de las uvas deben de estar equilibrados de forma apropiada [4]. Sin embargo MILISAVLGEVIC [223] establecía que ningún componente del vino tenía una función tan importante y amplia como la acidez; el aspecto más importante de ésta sería el gusto ácido producido, pero también la acidez tiene una gran influencia sobre el color, brillo y estabilidad de un vino. Además los ácidos en el vino influyen de una forma indirecta sobre la calidad del mismo: p.e. actúan como substratos para el metabolismo microbiano, y de esta forma aumentan la complejidad sensorial del vino.

Sin embargo, el efecto más aparente de la acidez es su influencia en el gusto del vino. Si hay poco ácido en las uvas, los vinos resultan planos o insípidos; demasiada acidez en los vinos dará lugar a un gusto agrio más que a una acidez agradable.

Los vinos obtenidos de viñedos situados en climas cálidos son generalmente algo blandos, suaves, de alto contenido en alcohol y baja acidez. Por otro lado, los vinos obtenidos de zonas frías son a menudo más afrutados, de bajo contenido en alcohol, de acidez más elevada, y más delicados y sutiles en aroma y sabor. En las zonas vitícolas de climas más fríos, las uvas no maduran adecuadamente antes de la vendimia. El contenido

en azúcar puede ser tan bajo o la acidez tan alta que esto impida la obtención de vinos equilibrados.

Bajo el término "acidez de un vino" denominamos al conjunto de ácidos orgánicos presentes en el mismo; estos ácidos son principalmente: tartárico, málico, cítrico y láctico, constituyendo los dos primeros casi el 90% de la acidez total de un vino. Además de los ya nombrados hay un gran número de otros ácidos identificados en las uvas pero éstos se hallan en muy baja concentración; AMERINE y JOSLIN [4] nos han proporcionado una amplia descripción de estos ácidos.

Los factores que influyen sobre la acidez de las uvas son el tipo de variedad, el clima, las prácticas de cultivo, la fertilidad del suelo, las infecciones virales y la irrigación del terreno. Por otro lado, durante la vinificación también se producen cambios en la acidez del mosto. Estos cambios se deben a la producción y consumo de ácidos por parte de las levaduras y de las bacterias lácticas. Las bacterias acéticas pueden por su parte producir grandes cantidades de ácido acético si se desarrollan en el vino, dando lugar a la acetificación del mismo. Se produce en general una pérdida neta de la acidez del mosto cuando éste se transforma en vino [163]. Esta pérdida de acidez va desde el 13.9% al 32.3%, y puede deberse tanto a la realización de la fermentación maloláctica como a la precipitación de sales tartáricas, sobre todo en forma de hidrogenotartrato potásico; esta precipitación se debe a que el aumento de la concentración de alcohol durante la fermentación disminuye la solubilidad del hidrogenotartrato potásico. Las bajas temperaturas aceleran la tasa de precipitación; por el contrario, los polifenoles aumentan la solubilidad de la sal hidrogenotartrárica.

1.1.- METODOS DE CORRECCION DE LA ACIDEZ DE LOS VINOS.

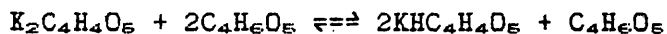
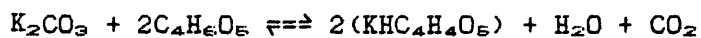
La adición de azúcares a los mostos de uvas inmaduras a fin de corregir su deficiencia, es practicada en muchas áreas vitícolas de climas fríos [6]. Esta práctica no tiene un efecto negativo significativo sobre la calidad del vino, y se puede llevar a cabo fácilmente en la bodega [331]. Sin embargo la reducción de la acidez de un vino es una cuestión más delicada. Existen numerosos métodos de reducir la acidez, y algunos de ellos requieren elevados conocimientos técnicos. También ciertos sistemas de desacidificación pueden producir efectos secundarios sobre la calidad del vino. La disminución de la acidez puede llevarse a cabo por métodos físico-químicos y por métodos biológicos.

La adición de azúcar o soluciones azucaradas a los mostos implica un incremento del contenido en etanol de los vinos, y por tanto la precipitación de hidrogentartratos; de esta forma se consigue reducir la acidez. La adición de soluciones azucaradas disminuye también la acidez por dilución [26].

La neutralización y precipitación del tartrato es el método químico de desacidificación que se emplea más comunmente en Europa para disminuir la acidez de mostos y vinos. La acidez se neutraliza por la adición de una sal mineral, que facilita la precipitación de sales del ácido tartárico. El carbonato cálcico es la sal más empleada para este fin. En presencia de ácido tartárico en exceso, la reacción siguiente se ve desplazada hacia la derecha:



El carbonato potásico o el tartrato potásico también pueden emplearse con el mismo objetivo:



Neutralización y precipitación de una sal doble de ácido tartárico y ácido málico. El principal problema que se deriva de la neutralización de mostos o vinos con carbonato cálcico es que la desacidificación se hace a expensas del ácido tartárico exclusivamente. La mayor parte del malato de calcio formado permanece en solución, y puede dar gusto "a sal" si la concentración es lo suficientemente elevada. Muchos de los problemas asociados con la neutralización química pueden prevenirse utilizando el proceso denominado "desacidificación por doble sal". Este proceso consiste en la adición de carbonato cálcico a una porción del mosto al cual le hemos elevado el pH a 4.5 o más. El mosto se deja en reposo toda la noche y se filtra antes de mezclarlo con la porción no tratada. Para acelerar la reacción se añaden cristales de esta sal doble de málico y tartárico a fin de cebar la nucleación y el crecimiento de los cristales (Figura 44).

Bajo condiciones normales de neutralización con carbonato cálcico e iguales concentraciones molares de ácido málico y de ácido tartárico, se forma una mezcla de tartrato cálcico y sal doble. Una ventaja que presenta la desacidificación por este sistema es la eliminación equimolar de ácidos málico y tartárico, con lo cual no se alteran sus proporciones relativas originales en los mostos.

Intercambio iónico. Las resinas de intercambio iónico se usaron para tratar los vinos en la década de los cincuenta. Uno de los métodos para reducir la acidez es el empleo de resinas intercambiadoras de aniones. Estas resinas tienen un carácter básico débil, y presentan iones hidroxilo. A medida que el vino pasa a través de las resinas, los diversos aniones son reemplazados

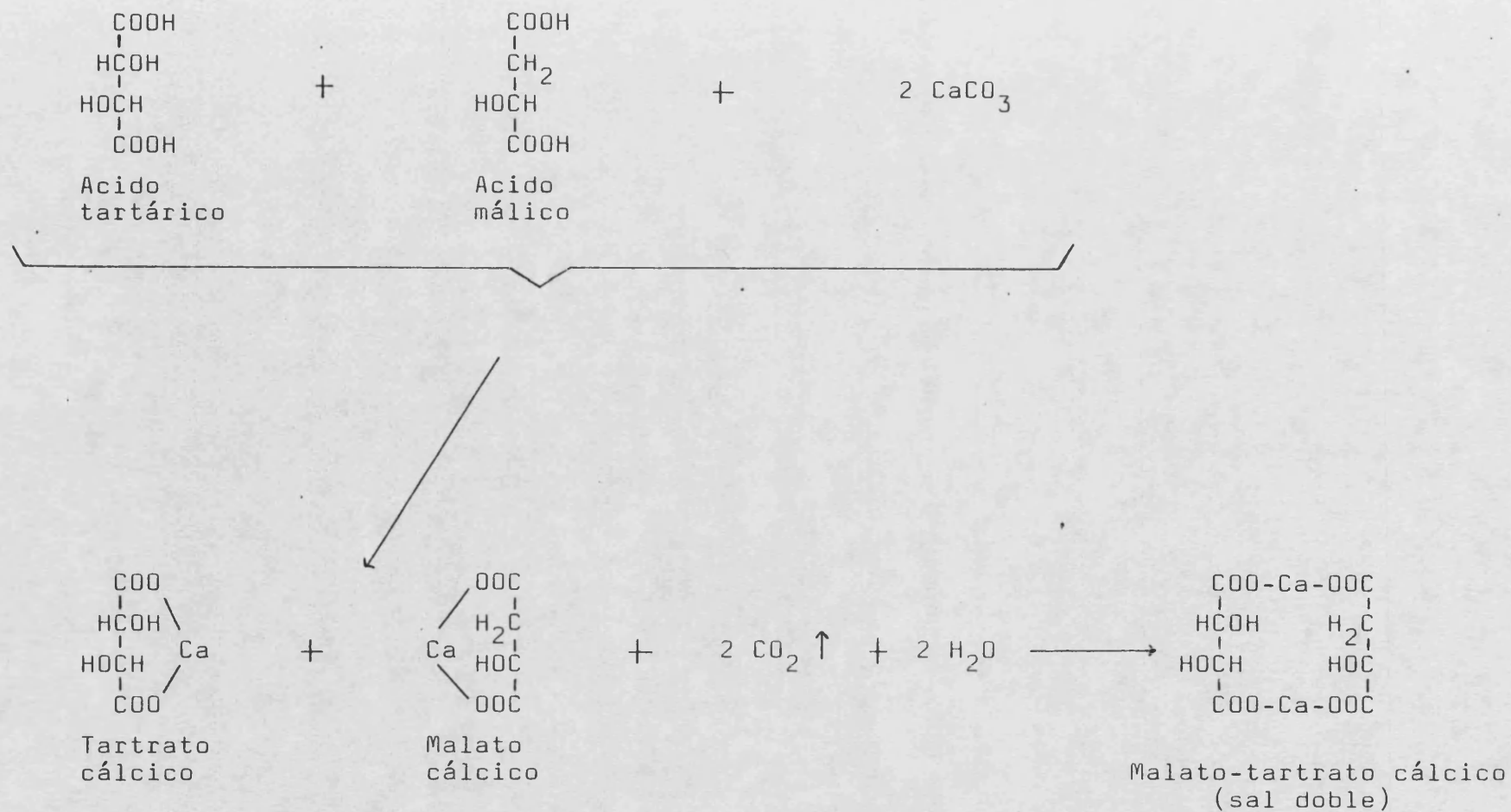
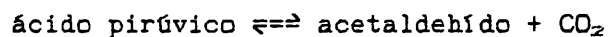
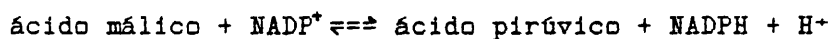


Figura 44- Formación de una sal doble a partir de los ácidos málico y tartárico. (BEELMAN y GALLANDER, 1979, (26))

por los radicales hidroxilo, disminuyendo así la cantidad de ácidos libres en los vinos.

Maceración carbónica. En las células de los granos de uva ocurre una fermentación intracelular cuando la concentración de O_2 en el medio es inferior al 5%, o cuando el CO_2 se incrementa hasta un 50% [26]. Una de las primeras reacciones de esta fermentación intracelular es la degradación de ácido málico a etanol. La degradación del malato da lugar a vinos de acidez total más baja y más elevado pH. Así este proceso tiene un interés industrial al permitir la reducción de la acidez de los vinos procedentes de uvas muy ácidas. De esta forma se desarrolló la técnica de vinificación denominada "maceración carbónica". Este proceso se basa en la maceración de racimos de uvas intactos bajo una atmósfera de CO_2 durante un periodo previo al estrujado o prensado de los mismos.

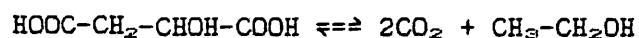
Aunque el mecanismo de la degradación intracelular del ácido málico no se ha dilucidado totalmente, RIBÉREAU-GAYON postula la siguiente secuencia de reacciones [283].



Se ha demostrado que según estas reacciones se puede transformar desde un 15 a un 75% de ácido málico, a lo largo de 10 días y a 35°C [26]. La transformación de ácido málico a ácido pirúvico durante la fermentación intracelular no es completa, y está relacionada con la actividad del enzima que cataliza la primera reacción, probablemente la L-malato NADP^+ oxidoreductasa. La actividad de este enzima es característica de cada

variedad de uva.

Fermentación malolcohólica. Ciertas especies de levaduras, de entre las que destacan las del género *Schizosaccharomyces* [81, 82], son capaces de degradar ácido málico y producir etanol y CO₂ en condiciones aeróbicas. La reacción de degradación del ácido málico en estas condiciones por *Schizosaccharomyces pombe* es:



En el caso de que se produzcan condiciones aeróbicas, el ácido málico se oxida completamente a CO₂ y H₂O [26].

La reducción de la acidez total de los vinos que puede llevarse a cabo por este mecanismo biológico depende de la especie de *Schizosaccharomyces* y de la cepa, pero puede llegar hasta un 45% [26].

Fermentación maloláctica. La fermentación maloláctica es otro proceso de degradación biológica de la acidez de los vinos. Consiste en la conversión del ácido L-málico a L-láctico y CO₂, y es llevado a cabo por las bacterias lácticas, ya comentadas en el Capítulo anterior. Esta transformación aumenta el pH, puesto que se pierde un grupo carboxilo, y reduce la acidez total porque al elevarse el pH se favorece la precipitación de tartrato ácido de potasio [26].

1.2.- FERMENTACION MALOLACTICA.

Las primeras observaciones de una pérdida de acidez total mayor que la que causaba la precipitación de los tartratos se atribuyó a BERTHELOT y DE FLEURIEU [166]. En un vino que analizaron encontraron que la acidez total

disminuía de 10 g/l a 5.8 g/l a pesar de que la pérdida de ácido tartárico fue sólo de 2.5 g/l. Sin embargo no se puede asegurar que esta disminución de la acidez se debiese a la fermentación maloláctica, ya que se producía durante la fermentación alcohólica. ORDONNEAU [166] informó de la pérdida de acidez en vinos añejos, y que ésta se debía a la desaparición de ácido málico; este autor sugirió que el ácido málico se transformaba en otro ácido. PASTEUR [166] probó que el ácido láctico presente en los vinos era producido por bacterias. Asimismo, describió una enfermedad del vino que hacía que adquiriera un sabor plano, y también informó de la liberación de CO_2 durante el desarrollo de la "vuelta". BALARD, antes que PASTEUR, observó la formación de ácido láctico por los microorganismos en vinos sanos [166]. KULISCH fue probablemente el primero en comprobar la naturaleza biológica de la fermentación maloláctica [166]. Para ello tomó dos muestras de sidra, pasteurizó una a 60°C y la otra no; después de 6 meses la sidra tratada había perdido muy poca acidez, mientras que la acidez total de la tratada disminuía del 0.80% a 0.45%. Este autor pensó que la disminución de la acidez se debía a la actividad de una levadura. MÜLLER-THURGAU estableció mediante una serie de experimentos que eran bacterias y no levaduras las responsables de esta disminución de la acidez [166]. KOCK, como ya dijimos en el Capítulo anterior, fue el primero en aislar bacterias lácticas e inducir la fermentación maloláctica por inoculación de estos organismos [166]. KOCK apoyó la idea de que la pérdida de acidez implicaba la desaparición del ácido málico, observó la complejidad nutricional de estas bacterias, y le pareció que éstas obtenían sus factores de crecimiento a partir de la autólisis de las levaduras. MÖSLINGER y SEIFERT establecieron por separado la ecuación completa de la fermentación maloláctica el mismo año. MÖSLINGER verificó asimismo que el ácido láctico se originaba tanto a partir de la fermentación del ácido málico como de otros componentes carbonados como la glucosa.

Informes sobre la consecución de la fermentación maloláctica se reciben de casi todas las zonas vinícolas. Así en Argelia ha sido observada y estudiada por BREMOND [166]. En Australia por COSTELLO *et al.* [72], DAVIS *et al.* [91], FORNACHON [166], RANKINE [273] y RANKINE *et al.* [278]. En Cerdeña DEIANA *et al.* [97] estudiaron la microflora responsable de la fermentación maloláctica espontánea. En España FEDUCHY MARINO [166] e IÑIGO *et al.* [153]. En Estados Unidos IZUAGBE *et al.* [155], KUNKEE *et al.* [171], RICE [285] y RICE y MATTICK [286]. En Francia FERRÉ [282], FLEET *et al.* [115], LAFON-LAFOURCADE *et al.* [179], PEYNAUD [282] y RIBÉREAU-GAYON [282]. En Israel CHALFAN *et al.* [79]. En Italia CASTINO [60], CASTINO y USSEGLIO-TOMASSET [61], DELFINI [99], GANDINI *et al.* [127, 128] y ROSSI *et al.* [292]. En Japón SHIMAZU y WATANABE [312]. En Portugal MARQUES GOMES y DA SILVA [153]. En Sudáfrica DU PLESSIS *et al.* [4]. En Sudamérica ARENA [166], HERNANDEZ *et al.* [166] y POITTEVIN *et al.* [166]. En Suiza MARET *et al.* [213] y MARET y SOZZI [211, 212]. En la URSS SAENKO *et al.* [166]. En Yugoslavia MILISAVLJEVIC [166].

La fermentación maloláctica generalmente es más común en vinos tintos que en blancos. Esto se debe en parte a la mayor acidez y a la mayor concentración de SO_2 que tienen este último tipo de vinos. Es posible que la presencia de material extraído de las pieles durante la maceración de los vinos tintos puede estimular también la fermentación maloláctica [166].

1.2.1.- VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LA FERMENTACION MALOLACTICA.

Las ventajas o desventajas de la fermentación maloláctica son objeto de controversia desde hace dos décadas. En general, el carácter beneficioso o perjudicial de la misma depende de la región vitícola, de la variedad de la uva, de la composición del vino, de las técnicas de vinificación y de la

finalidad que se proponga el bodeguero.

Entre los efectos ventajosos que tiene la fermentación maloláctica

podemos citar:

1.- **La reducción de la acidez.** La fermentación maloláctica es el principal medio de reducir la acidez de los vinos. Esta reducción puede ir de un 0.1 a un 0.3% [62, 125, 170, 251, 254], y puede elevar el pH de 0.1 a 0.3 unidades [62, 118, 254, 276]. La acidez de los vinos producidos en regiones frías como Alemania, norte de Francia y este de los Estados Unidos, hace que sea beneficiosa una reducción de la acidez [26, 168, 175]. En zonas cálidas como Australia, California, España, Italia y Sudáfrica los vinos tienen una acidez más baja, y el desencadenamiento de la fermentación maloláctica puede reducir tanto esta acidez que los vinos resulten planos e insípidos, además de ser susceptibles del ataque por bacterias perjudiciales [274, 277]. Por otro lado, la fermentación maloláctica espontánea se realiza más fácilmente en vino de baja acidez, por lo que su desencadenamiento puede resultar un peligro.

2.- **Modificación del aroma.** El crecimiento bacteriano que tiene lugar previamente a la fermentación maloláctica, se produce a expensas de los componentes del vino. Las cualidades sensoriales del mismo quedan modificadas por los compuestos que han sido eliminados o añadidos al medio por el metabolismo bacteriano. Las bacterias lácticas, aparte de sintetizar ácido láctico como principal producto del catabolismo de los azúcares, producen también compuestos aromáticos tales como acetaldehído, acetoína, ácido acético, diacetilo, etanol y 2,3-butanodiol. El diacetilo, la acetoína y el 2,3-butanodiol son compuestos de importancia considerable en el perfil aromático de un vino, y su producción está muy relacionada con el crecimiento de levaduras y bacterias lácticas. Otros compuestos volátiles que aumentan su concentración durante la fermentación maloláctica son: ácidos volátiles, dietil succinato, numerosos ésteres volátiles, etil

acetato, n-propanol, 2-butanol, n-hexanol, etil lactato y 2,3-butanodiol [89, 100, 122, 254].

Existe una gran controversia sobre si la fermentación maloláctica afecta significativamente o no a las características sensoriales del vino. Así KUNKEE *et al.* [170] observaron que el mismo vino con fermentación maloláctica y sin ella obtenía la misma puntuación en un panel de catadores. RADLER [89] y VAN WIK [89] constataron que de los vinos que ellos ensayaron, un porcentaje entre el 40 y el 58% de los que habían sufrido fermentación maloláctica no lograban mejor calificación que los que no la habían realizado. De esto se desprende que el incremento en calidad no está relacionado necesariamente con el desencadenamiento de la fermentación maloláctica. RANKINE [274] ha informado que los bodequeros no pueden detectar de forma fiable la fermentación maloláctica por cata, salvo en el caso de que la concentración de diacetilo sea lo suficientemente alta como para ser detectable. Por el contrario hay autores que afirman que la fermentación maloláctica sí afecta las cualidades sensoriales del vino. WEBB [89] y PILONE y KUNKEE [251] mostraron que la cepa utilizada en la inducción de la fermentación maloláctica es importante en la caracterización de los vinos. Así, de los experimentos de WEBB se desprende que los vinos fermentados con cepas de *Leuconostoc* eran preferidas sobre los elaborados con *Pediococcus*, y éstos sobre los obtenidos con cepas de *Lactobacillus*. En los trabajos de PILONE y KUNKEE [251] se observa que los vinos inoculados con *Lactobacillus brevis* eran preferidos frente a los inoculados con otras especies. Sólo 3 de los 7 componentes del panel de catadores fueron capaces de diferenciar el vino con fermentación maloláctica del vino control. Sin embargo las experiencias de GIANNAKOPOULOS *et al.* [137] no muestran diferencias en las características de 3 vinos fermentados con 3 cepas distintas de *Leuconostoc oenos*, y estos vinos eran preferidos respecto a los que no llevaban a cabo la fermentación

maloláctica.

En resumen, aunque las bacterias lácticas son capaces de alterar la composición del vino durante la fermentación maloláctica, sobre todo en el caso de los principales compuestos volátiles, estos cambios no siempre son detectados por un panel de catadores. Las cepas de bacterias seleccionadas para inducir la fermentación maloláctica son de importancia crítica, así como la composición del vino y el diseño experimental de los análisis sensoriales.

3.- **Estabilidad microbiológica.** Una de las principales razones esgrimidas en favor de la fermentación maloláctica es que los vinos que la han llevado a cabo son, en sentido microbiológico, más estables que los que no la han realizado [166, 274, 277]. En general pocos bodequeros se arriesgarían a embotellar vinos antes de que la fermentación maloláctica se hubiera completado, ya que estos vinos pueden llevar a cabo la fermentación en la botella, dando lugar a un sedimento, enturbiamiento y presencia de gas, lo cual podría considerarse como alteración perjudicial [277, 282]. Sin embargo la estabilidad microbiológica tras la fermentación maloláctica no es absoluta; el vino contiene todavía nutrientes que pueden ser utilizados para el crecimiento de ciertas bacterias. VESTSCH y MAYER [89] informaron que *Pediococcus cerevisiae* crecía hasta niveles de 10^7 ufc/ml en un vino en el que se había realizado la fermentación maloláctica. COSTELLO *et al.* [72] observaron el crecimiento de especies de *Lactobacillus* y *Pediococcus* en vinos australianos una vez que *Leuconostoc oenos* había completado la fermentación maloláctica. No hay ninguna evidencia de que el crecimiento de *Leuconostoc oenos* durante la fermentación maloláctica altere el vino de manera que impida el crecimiento de bacterias indeseables. Por el contrario, el aumento de pH que supone la fermentación maloláctica hace que el vino presente condiciones más favorables para el desarrollo de especies perjudiciales [277].

Prácticas tales como el trasiego, el empleo de bajas temperaturas, la clarificación, el ajuste de SO_2 , y el mantenimiento de niveles ácidos aseguran la estabilidad del vino tras la fermentación maloláctica.

Entre los efectos perjudiciales de la fermentación maloláctica encontramos los siguientes:

1.- **Cambios sensoriales.** La fermentación maloláctica puede ser realizada por un gran número de especies, y algunas de las cepas capaces de realizarla producen cambios menos deseables que otras en los vinos. Especies pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus* pueden conducir la fermentación maloláctica en vinos de pH algo elevado; sin embargo es general la idea de que estas especies dan lugar a vinos menos aceptables que los que han sido fermentados con *Leuconostoc oenos* [282]. No hay que descartar en principio que algunas cepas de *Lactobacillus* y *Pediococcus* puedan conferir características deseables a un vino.

2.- **Cambios de color.** El color de los pigmentos antociánicos del vino tinto depende del pH y del estado de oxidación. La fermentación maloláctica puede causar una pérdida de color de hasta un tercio en vinos tintos. Parte de la pérdida de color se debe al cambio de pH ocasionado por la fermentación maloláctica; sin embargo VETSCH y LÜTHI [166] sugirieron que era la fermentación del ácido cítrico por bacterias lácticas, más que la del ácido málico, lo que causaba un cambio de color al proporcionar hidrógeno que reducía a los compuestos responsables del color. Más recientemente se ha descrito otro mecanismo de pérdida de color denominado "blanqueamiento" del vino por SO_2 libre. La utilización de compuestos de combinación de SO_2 , tales como el α -cetoglutarato, piruvato y acetaldehído por las bacterias lácticas puede dar lugar a la obtención de SO_2 libre [119]. El SO_2 liberado puede combinarse entonces con los antocianos, lo cual lleva a una reducción de la intensidad colorante del vino [89]. Esta reacción es reversible, y sólo produce una pérdida de color significativa a pH elevado;

a pH bajo los iones bisulfito son menos numerosos. En el caso de que la pérdida de acidez sea tan grande que ocasione un pH muy alto, no sólo se dará una pérdida de color, sino que también cambiará la calidad del mismo, variando del matiz rojo a matices azulados.

3.- **Pérdida adicional de acidez por precipitación de hidrogenotartratos.** El punto medio entre los valores de pK del ácido tartárico es aproximadamente de 3.6. Si el vino está saturado con hidrogenotartrato potásico y el desencadenamiento de la fermentación maloláctica produce un aumento de pH que lo aproxime a pH=3.6, el hidrogenotartrato potásico precipitará. La precipitación a su vez causa turbidez y pérdida adicional de acidez [166].

4.- **Formación de aminas.** La capacidad de las bacterias lácticas para descarboxilar aminoácidos ha sido extensamente investigada [1, 173, 265]. Dentro de las bacterias lácticas, las pertenecientes al género *Pediococcus* son las más importantes productoras de histamina [265]. De esta forma, vinos de pH elevado que soportan el crecimiento de estas especies durante o después de la fermentación maloláctica, son susceptibles de contener elevados e indeseables niveles de histamina [89].

1.2.2.- MECANISMO DE LA FERMENTACION MALOLACTICA.

La vía de transformación del ácido málico en ácido láctico utilizada por las bacterias lácticas podría ser alguna de las observadas en otros seres vivos, o bien otra distinta (Figura 45). Hasta los trabajos de LONVAUD et al. en 1977 [203] se asumía que el ácido L-málico presente en mostos y vinos era metabolizado por las bacterias lácticas mediante un enzima denominado "enzima málico", para distinguirlo de la malato deshidrogenasa que cataliza la oxidación de malato a oxalacetato. OCHOA et al. [265] observaron un enzima málico dependiente del NADP⁺ en hígado de

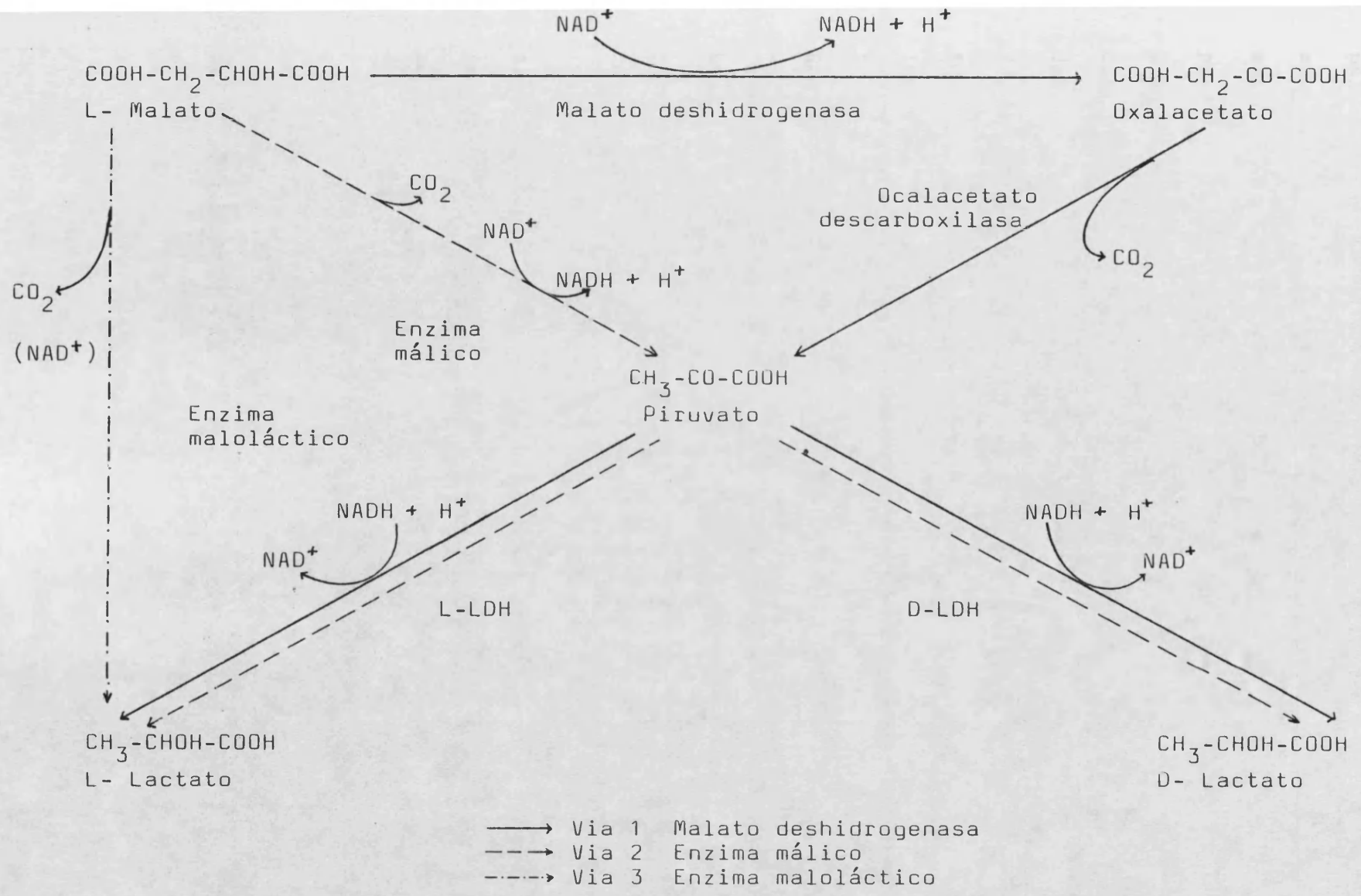


Figura 45- Vías posibles de transformación del ácido málico en ácido láctico. (LONVAUD *et al.*, 1977, (203))

paloma; posteriormente KORKES et al. [265] encontraron un enzima similar aunque dependiente del NAD en *Lactobacillus plantarum*. El modo de acción de este enzima se limita a la transformación de ácido L-málico en ácido pirúvico (Figura 45, vía 2); la reducción de este último a ácido D o L-láctico depende de la presencia eventual de las láctico deshidrogenasas correspondientes. Sin embargo, PEYNAUD [239] observó que ciertas bacterias del vino que poseían las dos láctico deshidrogenasas, y por tanto capaces de formar ácido D y L-láctico a partir de glucosa, sintetizaban exclusivamente ácido L-láctico a partir del ácido L-málico. Parece pues que las láctico deshidrogenasas no están implicadas en el mecanismo de la fermentación maloláctica de los vinos. Esta hipótesis fue confirmada por RADDLER et al. al observar que *Leuconostoc*, *Pediococcus*, y los *Lactobacillus* homo y heterofermentativos producían invariablemente ácido L-láctico a partir del ácido L-málico [265]. Posteriormente SCHUTZ y RADLER emitieron la hipótesis de la existencia de un enzima específico que puede realizar la transformación directa del ácido málico en ácido láctico (Figura 45, vía 3). Los resultados de LONVAUD et al. [203] confirman esta hipótesis. Estos autores denominaron "enzima malo-láctico" al enzima presente en las bacterias lácticas y que cataliza la fermentación maloláctica en vinos.

La purificación de este enzima y el estudio de sus propiedades han sido realizados por LONVAUD-FUNEL y STRASSER DE SAAD [205]. Estas autoras llegaron a la conclusión de que la actividad maloláctica no surgía de una combinación de actividades del enzima málico y de la L-láctico deshidrogenasa, sino que era consecuencia de un complejo enzimático que producía la suma de estas dos reacciones sin catalizar las reacciones parciales. El complejo proteico comprendería una actividad malato descarboxilasa-deshidrogenasa y una L-láctico deshidrogenasa estrechamente asociadas, o bien una actividad malato deshidrogenasa, una actividad

oxalato descarboxilasa y una actividad L-láctico deshidrogenasa. Estudios realizados por KRAUS *et al.* apuntaron la posibilidad de que el oxalacetato y el piruvato pudieran permanecer unidos al complejo maloláctico durante el curso de la reacción, y por ello no aparezcan intermediarios libres [164]. Esta hipótesis queda apoyada por los resultados de la investigación de LONVAUD-FUNEL y STRASSER DE SAAD [205], en la cual observaron que el NAD^+ era esencial para la actividad maloláctica, a pesar de que éste no se reducía. Por otro lado los estudios cinéticos que se realizaron mostraron que el NAD^+ y los iones Mn^{+2} se unían primero al complejo enzimático y posteriormente lo hacía el L-malato. Estas autoras apuntaron la posibilidad de que la proteína del complejo que une al malato fuera oligomérica. El sitio activo de la L-lactato deshidrogenasa del complejo no sería accesible al piruvato o al NADH añadidos al medio, puesto que no se observaba actividad L-láctico deshidrogenasa libre; sólo era accesible en el interior del complejo enzimático a los productos de reacción catalizados bien por el enzima málico o bien por la oxalato descarboxilasa.

El papel de la fermentación maloláctica en el metabolismo de las propias bacterias lácticas es una cuestión no resuelta todavía. Los trabajos de SCHANDERL citados por KUNKEE [166] muestran que la fermentación maloláctica no proporciona energía ni tampoco poder reductor para la célula, por lo cual no habría crecimiento a expensas de esta reacción. Sin embargo esta cuestión está todavía por resolver, ya que hay autores que afirman que es posible que tanto el ácido málico como el cítrico sean sustratos capaces de soportar el crecimiento de *L. oenos* [84]. Otros investigadores aportan datos distintos: PILONE y KUNKEE [253] encuentran que el rendimiento en peso seco por mol de ácido L-málico es de 1.34 g en *Leuconostoc oenos* ML-34 en un medio complejo sin carbohidratos; sin embargo cuando emplean un medio mínimo no observan diferencias en el crecimiento con o sin la adición de L-málico. En esta misma experiencia relatan que no

es significativo el efecto estimulante del ácido málico sobre el crecimiento en presencia de glucosa, ya que los rendimientos que se obtenían en un medio glucosado con o sin ácido málico eran muy semejantes [253]. KANDLER *et al.* también encontraron un comportamiento similar utilizando la cepa de *L. mesenteroides* 39 en un experimento semejante. En resumen: no hay evidencias claras de que el ácido málico produzca un incremento en biomasa en las bacterias lácticas.

Sin embargo, sí que parece que tiene cierta influencia sobre la tasa de crecimiento. En principio se pensó que era debido a un aumento del pH, lo cual mejoraba las condiciones de crecimiento; sin embargo, experiencias llevadas a cabo a pH óptimo en un medio sintético, mostraban un incremento en la tasa de crecimiento cuando en su composición se hallaba presente el ácido málico [168]. Incluso a los pHs bajos del vino, la estimulación es notable, observándose que el crecimiento en un vino al que se añadió ácido L-málico era más rápido que en el vino control cuyo pH era más alto que el que contenía málico. Sin embargo, el incremento del pH parece que sí tiene que ver con el rendimiento, el cual es mayor a pHs más elevados. Estas observaciones muestran una función biológica para la fermentación maloláctica: estimular la tasa de crecimiento. Sin embargo, permanece oscuro el mecanismo según el cual el ácido málico produce este efecto [166].

Se pueden encontrar distintos tipos de enzimas malolácticas en las bacterias lácticas aisladas de vinos [188]. En la mayoría de las cepas el enzima es constitutivo: más del 60% de bacilos homo y heterofermentativos y más del 80% de los cocos homo y heterofermentativos lo presentan constitutivo. El resto tiene enzimas inducibles: el enzima se sintetiza sólo cuando se sitúa a la célula en un medio con ácido málico. La inducción del enzima maloláctico requiere biotina y una fuente de carbono [166]. NATHAN usó la inducción enzimática para purificar el enzima y separarlo de

la oxalacetato descarboxilasa en tres bacterias malolácticas [166]. Ella encontró que el ácido málico inducía ambas actividades; sin embargo el ácido oxalacético sólo inducía la actividad oxalacetato descarboxilasa. Existen ciertas diferencias entre las cepas respecto a la concentración mínima de ácido málico que se requiere para la inducción enzimática. Esto tiene un interés especial para los enólogos. Así, cepas que requieren una alta concentración de ácido málico para la inducción del enzima maloláctico no podrán llevar a cabo la fermentación maloláctica en vinos con bajo contenido en este ácido. La presencia de este tipo de bacterias explicaría las situaciones en que los vinos son biológicamente estables tras una fermentación maloláctica incompleta. Si la bacteria que comenzó la fermentación maloláctica es eliminada por trasiego o filtración antes de acabar este proceso, y posteriormente se instalan bacterias con elevado umbral de ácido málico para la síntesis del enzima, el vino permanecerá estable [166].

1.2.3.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FERMENTACION MALOLACTICA.

Los factores que afectan la fermentación maloláctica son los mismos que afectan al crecimiento de las bacterias lácticas [174]. Así tenemos que el pH, la temperatura, las concentraciones de etanol, de SO_2 , de CO_2 del medio, de ácido málico, de ácido cítrico, de succínico, tartárico, los polifenoles y otras sustancias minerales en el vino, así como la competencia con otros microorganismos, afectan a la conclusión de la fermentación maloláctica, ya que son los que regulan el crecimiento de las bacterias responsables de este fenómeno. Estas bacterias siempre se hallan en el mosto, pero en número tan bajo que si no encuentran condiciones favorables de crecimiento serán incapaces de realizar la fermentación

maloláctica.

LAFON-LAFOURCADE [172, 174] ha estudiado qué factores afectan la actividad maloláctica, definida como tal y no como dependiente del crecimiento bacteriano. Para ello utilizó el método de inoculación con elevadas concentraciones de células no proliferantes. Estas células actuaban como un extracto crudo de enzimas que llevaba a cabo rápidamente la degradación del ácido málico. Según esta aproximación observó que los mismos factores que influyen sobre el crecimiento repercuten en la actividad maloláctica; sin embargo, los umbrales de inhibición o eficacia óptima eran distintos. El pH es uno de los principales factores que influyen en el crecimiento de las bacterias, y sin embargo la fermentación maloláctica puede realizarse a pHs más bajos que aquéllos que inhiben el crecimiento. Así por ejemplo *Leuconostoc gracile* Cf 34 (actualmente *Leuconostoc oenos*) encuentra dificultades en crecer en medio sintético a pH=3.0, y no crece en absoluto en vino; sin embargo sí realiza la fermentación maloláctica a este pH en medio sintético con un porcentaje de degradación de ácido málico de hasta un 90% [174]. En un artículo posterior [172] esta autora encuentra que para bacilos el pH óptimo de la fermentación maloláctica se sitúa entre 3.5 y 4.0. Observa también que un pH=3.0 prácticamente inhiba la fermentación maloláctica, y que pHs superiores a 4.5 suponen una disminución de esta actividad. En cualquier caso el efecto de los distintos pHs sobre la fermentación maloláctica depende de las cepas. Los cocos realizan la fermentación maloláctica a un pH más bajo por término medio que los bacilos; este proceso es por regla general más rápida conforme aumenta el pH en el intervalo de pH de 3.0 a 4.0, y luego disminuye drásticamente. Otro aspecto que hay que tener en cuenta de este factor es la muerte que produce en las células bacterianas inoculadas en vino. A pH más bajo el porcentaje de muerte inmediata de la célula es mayor [344]. No hay información al respecto de cómo el pH

modifica la actividad maloláctica, aunque es de suponer que afecta al funcionamiento de los enzimas implicados en esta reacción.

La influencia que tiene el etanol sobre la fermentación maloláctica es negativa. La tasa de crecimiento disminuye conforme aumenta la concentración de alcohol. Sin embargo el umbral de inhibición depende de la cepa [172, 344], de la composición del medio [174], y de los valores de pH y temperatura [344]. Según LAFON-LAFOURCADE [174] la actividad maloláctica de *L. gracile* en medio sintético no se altera hasta alcanzar un 11% de alcohol. Con 12% de etanol se transforma el 56% de ácido málico, y con el 13% de etanol sólo un 12%. De cualquier manera existen cepas muy activas que sólo presentan niveles de inhibición de la fermentación maloláctica por encima del 13% de etanol. El efecto que el etanol pueda tener sobre la fermentación maloláctica es como en el caso del pH la inhibición de los enzimas de la transformación del ácido málico [344].

La temperatura afecta a la fermentación maloláctica como a cualquier otra reacción bioquímica: a mayor temperatura mayor velocidad de degradación. LAFON-LAFOURCADE [172] encontró que para un mismo periodo de tiempo la degradación de ácido málico a 22°C y a 25°C era del 77%, a 30°C del 93%, y a 35°C del 95%. La temperatura óptima para la fermentación maloláctica se sitúa alrededor de los 35°C, temperatura bastante superior a la temperatura óptima de crecimiento. Sin embargo la temperatura también agrava los efectos negativos del pH y del etanol, con lo cual en un medio alcohólico ácido los efectos negativos que estos tienen sobre la fermentación maloláctica se ven incrementados [243].

Las bacterias lácticas son mucho más sensibles al SO₂, tanto libre como combinado, que las levaduras [189]. La presencia del SO₂ en el vino implica un equilibrio, dependiente del pH, entre la forma molecular y los iones sulfito y bisulfito dentro de la porción libre. A pHs más bajos existe una mayor concentración de SO₂ molecular. A pesar de que todas las

formas en las que se encuentra el SO_2 en el vino tienen actividad antimicrobiana, la más activa es la forma molecular [54, 306]. El SO_2 actúa tanto sobre el crecimiento de las células (10 mg/l de SO_2 libre o 30 mg/l de SO_2 combinado perturban gravemente el desarrollo), como sobre la actividad maloláctica, aunque en este caso se requieren mayores cantidades de SO_2 libre o combinado para inhibirla totalmente. La actividad maloláctica en un medio sintético disminuye en un 13% en presencia de 20 mg/l de SO_2 libre, en un 50% con 50 mg/l, y se inhibe totalmente con 100 mg/l [174]. El umbral de sensibilidad depende de la especie, del pH, y también de la concentración del inóculo: a mayor concentración celular, la fermentación maloláctica se ve menos inhibida [172]. El mecanismo de inhibición de las bacterias lácticas parece ser la oxidación de los grupos disulfuro del enzima málico por parte del SO_2 libre. El ion bisulfito inhibiría indirectamente la fermentación maloláctica, ya que se combina con el acetaldehído necesario para la reoxidación de los coenzimas reducidos [166].

El CO_2 actúa indirectamente sobre la fermentación maloláctica, ya que favorece el crecimiento de las bacterias lácticas y consecuentemente la velocidad de degradación del ácido málico [26, 31, 175, 344].

Los ácidos acético, cítrico, L-láctico, succínico y tartárico ejercen una ligera inhibición de la fermentación maloláctica. La más marcada está producida por el ácido láctico. Esta inhibición puede considerarse como un control retroactivo por el producto final de una reacción sobre el enzima que lo cataliza [172]. LONVAUD-FUNEL [204] encuentra que tanto el ácido L-láctico como el ácido oxámico son inhibidores no competitivos, mientras que el resto de ácidos del vino (sobre todo cítrico, succínico y tartárico), son inhibidores competitivos. La afinidad del enzima maloláctico por estos sustratos es muy próxima a la del malato, y la unión de los mismos impide la transformación maloláctica.

La concentración inicial de ácido málico también puede influenciar el desarrollo de la fermentación maloláctica en el caso de aquellas bacterias que tengan un enzima maloláctico inducible [166]. Así, aún en el caso de elevados inóculos de células proliferantes, si la concentración de ácido málico es inferior a la necesaria para la inducción del enzima, la fermentación maloláctica no se producirá. Por otra parte, de los trabajos de BRÉCHOT *et al.* [45] se desprende que concentraciones de ácido málico superiores a 40 mM retrasan la fermentación maloláctica.

LAFON-LAFOURCADE [172] también estudió el efecto que ciertas sustancias minerales y algunos componentes polifenólicos tenían sobre el desencadenamiento de la fermentación maloláctica. Observó que los enriquecimientos con materias minerales, sobre todo Mg y Mn, no tenían acción positiva. Teniendo en cuenta que estos minerales son catalizadores de la reacción maloláctica, la falta de activación con la adición de los mismos se debe a que el medio de ensayo ya los contenía como contaminantes, al menos en las cantidades mínimas requeridas. Los polifenoles ensayados por LAFON-LAFOURCADE [172] no tenían ningún efecto sobre la actividad maloláctica, excepto el ácido gálico que en concentración de 1 g/l mostraba una importante inhibición de la fermentación maloláctica.

Por último, vamos a considerar el papel que tiene la competencia entre los microorganismos sobre el desencadenamiento de la fermentación maloláctica. Es bien conocida la capacidad de ciertas levaduras para producir SO_2 [31]. El efecto que este antiséptico tiene sobre el crecimiento de las bacterias lácticas y sobre la fermentación maloláctica ya ha sido descrito con anterioridad, y explica el que bacterias no proliferantes sean incapaces de realizar la fermentación maloláctica en vinos fermentados por ciertas cepas de levaduras. El descubrimiento de la existencia de bacteriofagos de bacterias lácticas [321] puede explicar también las dificultades de realización de la fermentación maloláctica.

1.2.4.- CONTROL DE LA FERMENTACION MALOLACTICA.

Dado el carácter ambivalente de la fermentación maloláctica, es necesario conocer la forma de potenciarla en aquellos casos en que se desee, y de inhibirla en aquellos otros en que se juzgue como perjudicial. Los métodos de control son los siguientes:

1.- **Estimulación del crecimiento de la flora autóctona.** Para ello los niveles de SO_2 no deben sobrepasar los 40-50 mg/l [170, 189], el pH debe ser mayor de 3.2 [62, 282], y la temperatura de los vinos debe estar entre 16°C y 25°C [26, 282]. Hay que tener también presente que un prolongado contacto con las heces del vino favorece la liberación de nutrientes debido a la lisis de levaduras [99, 118, 166, 178, 274]. GUILLOUX-BENATIER y CIOLFI [145] han mostrado cómo distintos extractos de levadura estimulan tanto el crecimiento como la realización de la fermentación maloláctica de las bacterias lácticas. También un incremento del contenido en CO_2 de los vinos tiene un efecto positivo sobre la fermentación maloláctica [89], así como una maceración larga con los hollejos, ya que ésto da lugar a la extracción de factores que estimulan el crecimiento de las bacterias lácticas [26, 166]; un bajo contenido en alcohol, menos de un 14% (v/v), también favorece el crecimiento de la flora autóctona. La competencia con levaduras también puede introducir un factor negativo para la consecución de la fermentación maloláctica. Esto se debe al gasto de sustancias nutritivas por las levaduras, y también por la producción de metabolitos que inhiben el crecimiento bacteriano, como el SO_2 [121], proteínas [89] y ácidos grasos [181].

2.- **Inoculación con vino que ya ha realizado la fermentación maloláctica.**

En ciertos vinos la fermentación maloláctica puede estimularse

inoculándolos con vinos que ya han llevado a cabo la fermentación maloláctica. La principal desventaja de este método es que exista algún vino que espontáneamente realice esta fermentación, y que las bacterias del vino utilizado como inóculo sean capaces de crecer en el vino que va a ser inoculado. Autores como VETSCH [89] han observado una importante muerte de células cuando un vino es inoculado en otro. Por ello, puede ser necesario inocular grandes volúmenes de vino con la fermentación maloláctica realizada, y ésto puede resultar poco práctico. CASTINO *et al.* [62] sugieren un inóculo del 5%, mientras que KUNKEE [166] recomienda del 15% al 50%. Las dificultades prácticas que ocasiona la inoculación de grandes volúmenes pueden ser subsanados por inoculación con las heces, o con las células obtenidas por filtración [21] o centrifugación, a partir de un vino con fermentación maloláctica en proceso de realización.

3.- **Inoculación con cepas comerciales o de laboratorio.** Las ventajas de este método son un mejor control sobre el tiempo y la velocidad de la fermentación maloláctica y sobre los aromas y sabores del vino. Muchos autores han descrito la estimulación de la fermentación maloláctica por inoculación de cepas bacterianas [25, 27, 29, 42, 62, 102, 118, 120, 125, 167, 170, 172, 174, 178, 200, 249, 251, 254, 255, 341]. Estos estudios han llevado al desarrollo de varias cepas comerciales de bacterias malolácticas [89], y han revelado que algunos factores tales como las condiciones de precultivo y el momento en que se realiza la inoculación afectan al crecimiento de las células y al desencadenamiento de la fermentación maloláctica. Cuando los enólogos desean inocular sus propias bacterias seleccionadas, los principales criterios para la selección de cepas son: una tolerancia al etanol superior al 15%, una tolerancia al SO₂ superior a 50 mg/l, capacidad de crecimiento a pH=3.0, capacidad para crecer a las bajas temperaturas propias de la bodega (entre 10°C y 15°C), producción de características organolépticas adecuadas en vino, buena resistencia al

ataque por bacteriofagos, e incapacidad para producir gomas y mucílagos extracelulares [89]. En este sentido, DELFINI [99] amplía estos criterios hasta un total de 21 a fin de seleccionar la bacteria maloláctica ideal.

Muchos autores han observado una muerte rápida e importante de bacterias lácticas cuando se inoculan directamente en vino, de manera que niveles iniciales de inóculo de 10^6 a 10^8 células por mililitro disminuyen hasta 10^1 a 10^3 células/ml tras la inoculación [199]. Tal pérdida de viabilidad se debe a que el vino representa un ambiente hostil debido a su pH bajo, al contenido en alcohol (10% o más), a la presencia de SO_2 , al bajo nivel de nutrientes [166], y a la presencia de compuestos antimicrobianos como ciertos fenoles. Se han propuesto varios métodos de precultivo de células a fin de evitar la pérdida de viabilidad. Los medios que se recomiendan para el precultivo de células se basan generalmente en jugo de uva, que contiene extracto de levadura, y ocasionalmente Tween 80 [27, 166]. HAYMAN y MONK [148] encontraron que el método de precultivo puede afectar significativamente la capacidad de los microorganismos para crecer y degradar el ácido málico. Ellos comprobaron que el crecimiento de *Leuconostoc oenos* en vino se potenciaba si se le precultivaba previamente en un medio con jugo de uva que contenía entre el 40% y el 80% de vino. Sin embargo, el incremento de la tasa de crecimiento estaba correlacionada negativamente con la actividad maloláctica, de forma que la tasa de degradación de ácido málico en vino disminuía linealmente a mayor contenido del vino en el medio de precultivo.

Las bacterias malolácticas pueden inocularse en los siguientes momentos de la vinificación: antes de la fermentación alcohólica, durante la fermentación alcohólica, y tras la finalización de la fermentación alcohólica. La inoculación antes del inicio de la fermentación alcohólica se ha propuesto dado que las bacterias tienen una mayor probabilidad de vivir en un medio carente de alcohol, y además con mayor cantidad de

nutrientes que todavía no han sido agotados por las levaduras [166]. BEELMAN (1982) y BEELMAN y KUNKEE (1985) encontraron que la inoculación de las bacterias previamente a la fermentación alcohólica resultaba en una terminación de la fermentación maloláctica antes del final de la fermentación alcohólica [89]. Otros investigadores han observado sólo un pequeño crecimiento de las bacterias malolácticas cuando se inoculan antes del inicio de la fermentación alcohólica [125, 178]. Tal inhibición debe deberse a la elevada concentración inicial de SO_2 y a la carencia de ciertos nutrientes necesarios para las bacterias que pueden ser proporcionados por la autólisis de levaduras [166]. Aunque BEELMAN [89] no informa de que haya efectos negativos asociados a la inoculación de bacterias antes del inicio de la fermentación alcohólica, en otro trabajo [28] señala la existencia de una competencia entre levaduras y bacterias lácticas (crecidas en un medio sintético), la cual provoca una disminución del crecimiento, una aceleración de la fase de muerte y una disminución de la actividad maloláctica de estas últimas. Estas observaciones coinciden con las de LAFON-LAFOURCADE et al. [178], quienes encuentran que en mosto no sulfitado y a $pH=3.3$, el crecimiento de las levaduras era inhibido por la inoculación de *Leuconostoc oenos* a un nivel de 10^7 ufc/ml. Las bacterias parece ser que degradan azúcar del mosto y producen niveles superiores a los normales de D(-)-láctico y acetato. LAFON-LAFOURCADE concluye que, aunque la inoculación conjunta de levaduras y bacterias puede llevar a una más rápida finalización de la fermentación maloláctica, esto supone unos riesgos asociados. Si la fermentación de las levaduras se retrasa, las bacterias metabolizan los azúcares del vino y producen niveles inaceptables de ácido acético. Estos problemas desaconsejan la inoculación de bacterias lácticas antes del final de la fermentación alcohólica.

La inoculación de bacterias durante la fermentación alcohólica ha sido llevada a cabo por GALLANDER [125]. En este estadio la bacteria no

experimenta el efecto de elevadas concentraciones de etanol, y el SO_2 libre inicial se ha reducido por la formación de compuestos de combinación producidos por el metabolismo de las levaduras. Sin embargo el antagonismo entre levaduras y bacterias puede restringir el desarrollo de estas últimas en algunas ocasiones [28].

La ventaja de la inoculación al final de la fermentación alcohólica [125, 166] es que las bacterias tienen a su alcance nutrientes necesarios provenientes de la autólisis de levaduras [28, 121]. Sin embargo la concentración de etanol en este momento es máxima y ello puede retrasar la conclusión de la fermentación maloláctica [178].

No se puede pues establecer de manera taxativa cuál es el mejor momento para la inoculación de las bacterias, ya que siempre existirán ventajas e inconvenientes. Este momento dependerá de la composición del mosto, de la cepa de levadura, y de las técnicas de vinificación.

4.- Utilización de células o enzimas inmovilizados. LAFON-LAFOURCADE [172] estableció que células no proliferantes de *Leuconostoc oenos* en elevada concentración (de 10^6 a 10^7 ufc/ml), podían producir una rápida degradación del ácido málico. No se requiere pues que las células crezcan, y éstas pueden actuar como una preparación cruda de enzima contenido en células enteras. De esta manera la desacidificación ocurre sin modificación de los aromas, ya que éstos se deben al metabolismo de las células en crecimiento. Tal observación ha introducido la posibilidad de una desacidificación continua de vino que pase a través de soportes con células o enzimas aislados, inmovilizados. Los trabajos de LEE y PACK (1980) [164] muestran que células de *Leuconostoc oenos* inmovilizadas en gel de poliacrilamida no mostraban actividad cuando se inoculaban en vino blanco con 12° alcohólicos y un contenido en SO_2 de 50 a 100 mg/l. El fallo en la degradación del ácido málico en este caso puede estar relacionado con la inhibición del enzima maloláctico, o de permeasas asociadas, por el SO_2 o por el etanol.

Sin embargo si las células inmovilizadas se incubaban en mosto de uvas blancas con una concentración del 0 a 50 mg/l de SO_2 , sí que había una degradación del ácido málico cuya extensión iba del 50% al 36% respectivamente. ROSSI y CLEMENTI [291] encontraron una degradación del 75% de ácido málico en mosto, utilizando células inmovilizadas de *Leuconostoc oenos*. TOTSUKA y HARA (1981) [89] compararon la actividad maloláctica en vinos de células de *Leuconostoc mesenteroides*, tanto inmovilizadas como libres; llegaron a la conclusión de que las células inmovilizadas mantenían mejor que las libres su actividad maloláctica cuando se las sometía a condiciones de altas concentraciones de alcohol, pH bajo y alto contenido en SO_2 , así como a lo largo de varios pases por vino [89]. Los intentos de desacidificar el vino utilizando el enzima maloláctico inmovilizado en geles, no han tenido éxito hasta el presente, probablemente a causa de la pérdida de actividad del mismo al pH del vino y por la necesidad del NAD^+ [89].

En resumen, las células inmovilizadas pueden ofrecer varias ventajas para la desacidificación de un vino como son: operaciones sucesivas, mayor tolerancia a vinos de alto contenido en etanol y SO_2 y bajo pH, mejor control sobre la duración y extensión de la desacidificación y ausencia de los efectos del crecimiento bacteriano en el vino. Las desventajas de este método incluyen la posibilidad de contaminación microbiana de los reactores, transferencia de ésta al vino, pérdida de actividad en operaciones prolongadas, y escape de células inmovilizadas al vino.

5.- **Inhibición de la fermentación maloláctica.** La inhibición de la fermentación maloláctica es también una técnica de control negativo que se utiliza cuando no es aconsejable que se produzca este proceso. La inhibición se consigue estableciendo aquellas condiciones que restrinjan o detengan el crecimiento bacteriano. Tales condiciones podrían ser: el mantenimiento del pH del vino en valores inferiores a 3.2, el poseer una

concentración de etanol superior al 14%, una baja temperatura de almacenamiento, un ajuste del SO_2 total a niveles superiores a 50 mg/l [189], un trasiego rápido y posterior clarificación tras la fermentación alcohólica [166], una reducción de la maceración con hollejos y del prensado en caliente [25], la pasteurización [166], y la filtración esterilizante. Otros investigadores han informado que han conseguido inhibir la fermentación maloláctica por adición de altos niveles de ácido fumárico [249, 255]. Otros compuestos químicos que inhiben el crecimiento de las bacterias lácticas son el ácido sórbico y los ésteres del p-hidroxibenzoato, pero su efectividad bajo condiciones industriales no se ha investigado suficientemente. Sin embargo, el metabolismo del ácido sórbico por las bacterias del ácido láctico se ha asociado con el desarrollo de olores a geraniol [175, 276].

1.3.- OBJETIVOS DEL TRABAJO.

Los aspectos del trabajo de investigación que a continuación van a presentarse, están encaminados a conocer el comportamiento de las cepas de bacterias lácticas aisladas durante la campaña 1983-1984. El conocimiento de sus características nos permitirá la selección posterior de aquellas cepas que demuestren poseer mejor aptitud para llevar a cabo la fermentación maloláctica en vinos. Este trabajo tiene como meta el conocer de qué manera se puede asegurar el crecimiento y/o la actividad maloláctica de las bacterias, a fin de establecer un protocolo de actuación que permita solventar los problemas de exceso de acidez y pobreza en aromas que en ciertos vinos de la D.O. Utiel-Requena se vienen dando.

Secuencialmente, los objetivos que se han propuesto en estos trabajos han sido:

- 1.- Establecer la **capacidad de degradación de ácido málico** por parte de las cepas. Para este fin se utilizó un medio sintético que nos mostrase la actividad maloláctica de las cepas en condiciones óptimas.
- 2.- El estudiar la influencia que ciertos **factores físico-químicos** tenían sobre el desencadenamiento de la fermentación maloláctica en vino. Para solventar este problema se ensayaron todas las variables sobre un mismo tipo de vino a fin de evitar resultados erróneos debidos a la mayor o menor "fermentabilidad" de los vinos. LAFON-LAFOURCADE [174] establece que en el vino existen sustancias desconocidas actualmente que son capaces de potenciar, cambiar o inhibir la actividad maloláctica de las bacterias lácticas. A esta característica es a lo que ella denomina "fermentabilidad" de los vinos. También se utilizaron en esta serie de ensayos inóculos elevados de células no proliferantes, a fin de evitar problemas relacionados con el crecimiento de las cepas en vino [172].

Los factores físico-químicos que se ensayaron fueron el pH, la temperatura, la concentración de etanol, la cantidad de SO_2 , y la proporción del CO_2 en la atmósfera de incubación. Se eligieron estos parámetros porque son los que más influencia tienen sobre el crecimiento y sobre la fermentación maloláctica [31, 42, 172, 174, 175], y además porque son los parámetros más susceptibles de modificación por parte del enólogo. Esto tiene una gran importancia cuando se pretende llevar a la práctica los resultados de la investigación realizada en el laboratorio.

- 3.- El tercer objetivo fue determinar la **influencia del pH sobre el crecimiento** de las bacterias. Se ensayó un rango de pHs que iba desde pH=3.0 hasta 3.5 en vino, dado que es a pHs bajos donde interesa que estas bacterias se desarrollen [89, 100].

4.- El estudio del efecto de distintos niveles de inóculo sobre la duración de la fermentación maloláctica, constituyó otro de los puntos a resolver en el presente trabajo.

5.- El último objetivo que nos propusimos fue evaluar qué efecto tenía la adaptación progresiva a pHs bajos en vino sobre el crecimiento y la rapidez de realización de la fermentación maloláctica.

2.- MATERIAL Y METODOS.

2.1.- MEDIOS DE CULTIVO.

Medio C.

Medio MRS.

Medio MLO.

Medio agar MRS.

Medio agar MLO.

La composición de los medios de cultivo precedentes se halla especificada en el Apartado 2.5.3 del Capítulo II.

Vino.

El vino utilizado en la mayor parte de las experiencias era un vino rosado procedente de uvas Bobal vendimiadas en la campaña 1984-1985. Este vino nos fue proporcionado por la Cooperativa Vinícola de Requena. En las

experiencias en las que se utilizaron otros tipos de vinos, el origen y características particulares de los mismos se especifican al describir los ensayos.

Al vino originario de la Cooperativa Vinícola de Requena, se le sometió en el laboratorio a un proceso de clarificación. Tras la clarificación, se separó por decantación la porción clara superior de la que contenía el sedimento arrastrado por los clarificantes. La porción de vino clarificado se filtró por tierras Kieselgur (Merck), y posteriormente se esterilizó por filtración a través de membrana Millipore de 0.45 μm de tamaño de poro. Tras estos tratamientos, el vino se almacenó a 4°C hasta el momento de su utilización. A este vino le denominamos vino base (VB), y sus características se exponen en la Tabla 35.

2.2.- CLARIFICACION DE LOS VINOS.

A los vinos se les sometió a un proceso de clarificación con dos finalidades: la primera era el poder llevar a cabo la filtración esterilizante sin los problemas de colmatación inmediata de los filtros por causa de las materias en suspensión. El segundo objetivo era conseguir la estabilización del vino, evitando de esa manera precipitaciones o enturbiamientos posteriores, que dificultaran la observación del comportamiento de los microorganismos sembrados en él.

La clarificación se realizó con bentonita y gelatina. El empleo y la actividad de la bentonita ya ha sido comentada previamente en el Apartado 2.2.4.2 del Capítulo I. La gelatina se utiliza para precipitar las sustancias tánicas oxidadas y condensadas, y de esta forma se consigue mejorar el color y el sabor [331]. Cada vino requiere unas dosis distintas

de clarificantes según su composición y características [229, 331]. Por ello lo primero que se necesita es la determinación de las dosis óptimas de gelatina y bentonita que clarifiquen al máximo sin alterar las cualidades del vino. La determinación de las concentraciones óptimas se realizó ensayando diferentes cantidades de ambos clarificantes para una cantidad de vino determinada.

La gelatina se preparó al 1% (p/v), disolviéndola en agua destilada a 50°C y acidulada con 3-4 gotas de HCl por litro para facilitar la disolución. La bentonita se preparó al 2% (p/v), dejándose hidratar durante 24 horas; posteriormente se diluye en agua hasta una concentración final del 10% (p/v).

Para el ensayo, se prepararon 5 probetas de 250 ml de capacidad con 250 ml de vino a las cuales se les añadieron las siguientes cantidades de clarificantes:

<u>Nº de probeta</u>	<u>ml de gelatina</u>	<u>ml de bentonita</u>
1	0.10	0.5
2	0.15	1.0
3	0.20	1.5
4	0.25	2.0
5	0.35	2.5

Tras la adición secuencial de gelatina y bentonita, se agitó bien la mezcla y se dejó reposar durante 24-48 horas. Al cabo de este tiempo se examinaron las probetas. Se eligieron aquellas concentraciones de gelatina y bentonita que habían logrado una mayor precipitación sin alterar el color, sabor u olor del vino. Estas concentraciones fueron las que se emplearon posteriormente en la clarificación de todo el vino a tratar, y eran 600 mg/l de bentonita y 80 mg/l de gelatina.

2.3.- FILTRACION POR TIERRAS Y FILTRACION ESTERILIZANTE.

Para la filtración por tierras empleamos harina fósil de diatomeas tipo Kieselgürtl (Merck). Estas harinas filtran por tamizaje, y los estratos de cierto espesor son adsorbentes también [229]. El filtro de tierras se preparó de la siguiente manera:

- 1.- En una probeta de 250 ml se colocó un volumen de 75 ml de Kieselgürtl y agua hasta completar los 250 ml. Se agitó bien.
- 2.- Se cortaron dos círculos de papel de filtro que acoplasen en el interior de un embudo Büchner. El embudo se ajustó a un Kitasato conectado a una bomba de vacío. Uno de los círculos de papel de filtro se colocó dentro del embudo, humedeciéndose con agua destilada. Se vertió la suspensión de tierras y se conectó la bomba de vacío. Sobre el espesor de tierras compactadas y libres de agua se colocó el otro círculo de papel de filtro.
- 3.- Se pasó el vino a través del filtro de tierras, desechándose los primeros 150-200 ml.

Tras esta primera filtración, al vino se le sometió a una filtración esterilizante a través de membrana Millipore de 0.45 μ m de diámetro de poro. La filtración se hizo mediante vacío.

2.4.- ACTIVIDAD DEGRADADORA DEL ACIDO MALICO EN MEDIO SINTETICO.

Se utilizó el medio C, adicionado de 10 g/l de ácido L-málico, para observar la capacidad degradadora de este ácido que presentaban las cepas aisladas por nosotros. Este ensayo se realizó tanto en condiciones de aerobiosis como de anaerobiosis, a fin de observar si ésto influía en la

velocidad de degradación.

Los lactobacilos se crecieron en MRS y los cocos heterofermentativos en MLO, de 24 a 72 horas a 28°C. Dos series de tubos con 10 ml de medio C se sembraron con un inóculo del 1%. Una serie de los tubos se incubó a 28°C en aerobiosis y otra a 28°C en cámara de anaerobiosis con un 90% de N₂ y un 10% de CO₂. La dinámica de degradación del ácido L-málico se observó tomando muestras a los 1, 2, 5, 18 y 36 días desde la inoculación. Las muestras recogidas se cromatografiaron sobre papel, según la técnica ya descrita en el Apartado 2.4.16 del Capítulo II.

2.5.- ESTANDARIZACION DE LOS INOCULOS.

Para la realización de nuestros ensayos fue necesario buscar un método que nos permitiese trabajar siempre con la misma concentración celular. Para ello establecimos la siguiente metodología de trabajo.

Las cepas se hacían crecer tres veces sucesivas en medio MRS o MLO a 28°C durante 1-3 días, según la velocidad de crecimiento característica de cada cepa. El cultivo crecido en la tercera siembra se centrifugaba a 4000 rpm en una centrífuga de sobremesa Kokusan durante 20 minutos. Se eliminaba el sobrenadante y el sedimento se resuspendía en suero fisiológico estéril a pH=5.0, volviéndose a centrifugar en las mismas condiciones. Tras eliminar el sobrenadante, el sedimento se recogía con 1-2 ml de suero fisiológico estéril. Esta suspensión se diluía con agua en un tubo de las mismas características que los que posteriormente se fueron a emplear en las respectivas pruebas, de forma que se obtuviera una densidad óptica equivalente al punto 2 de la escala de McFARLAND. El volumen añadido de la suspensión celular original para llegar a esta densidad óptica, era el

mismo que se empleaba posteriormente para la inoculación de las distintas pruebas.

A fin de observar qué relación existía entre el punto 2 de la escala McFARLAND y la cantidad de células viables presentes en el inóculo, se obtuvo una suspensión de estas características, se diluyó convenientemente, y se sembró por duplicado en placas de agar MRS o MLO, incubándose durante 3-6 días a 28°C. Al cabo de este tiempo se realizó el recuento de las colonias y el establecimiento de la equivalencia entre ambas escalas.

2.6.- CUANTIFICACION DE LA DEGRADACION DEL ACIDO MALICO.

Para la cuantificación de la degradación del ácido L-málico por parte de las bacterias lácticas, se empleó un ensayo enzimático basado en la oxidación del ácido L-málico a oxalacetato mediante el enzima malato-deshidrogenasa. Esta oxidación produce $\text{NADH}+\text{H}^+$ en cantidad proporcional a la concentración de L-malato presente en el medio, cuya aparición puede seguirse espectrofotométricamente [32]. Para la realización de este ensayo se empleó el sistema enzimático de determinación de ácido L-málico de Boehringer-Manheim [39].

Las cepas se sembraron en medio C adicionado de 10 g de ácido L-málico, y en el vino base estéril. Los volúmenes que se emplearon para este ensayo fueron de 15 ml por tubo, y los tubos tanto de vino como de medio se sembraron con una concentración celular correspondiente al punto 2 de la escala McFARLAND.

Al cabo de 24 horas, 7 días y 30 días se tomaron muestras del medio C y del vino base inoculados y se realizaron determinaciones enzimáticas de su contenido en ácido L-málico. También se determinó la cantidad de ácido

L-málico presente en los controles correspondientes sin sembrar. El ácido L-málico degradado por las cepas a lo largo del tiempo se obtuvo por diferencia entre la concentración original del medio sin inocular y la hallada en las diferentes muestras.

2.7.- DESARROLLO DE LA FERMENTACION MALOLACTICA A DISTINTOS pHs.

Se ensayaron 10 valores de pH desde 3.1 a 4.0 con intervalos de 0.1. La modificación del pH se llevó a cabo utilizando HCl y NaOH 0.1, 1 y 10 M [55]. Tras ajustar los valores, los vinos se dejaban reposar durante dos horas, al cabo de las cuales se volvía a medir el pH y ajustar de nuevo caso de ser necesario [199]. Tras el ajuste el vino se esterilizó por filtración y se repartió en tubos de hemólisis, a razón de 3 ml por tubo. Estos tubos se sembraron con una concentración celular equivalente al punto 2 de la escala McFARLAND. La degradación del ácido L-málico se siguió por cromatografía en papel (Apartado 2.4.16 del Capítulo II). Las muestras se tomaron a los 2, 4, 6, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 y 63 días.

2.8.- DESARROLLO DE LA FERMENTACION MALOLACTICA A DIVERSAS CONCENTRACIONES DE ETANOL.

Con esta prueba se trató de determinar la concentración máxima de etanol a la cual se podía producir la fermentación maloláctica. Previamente el pH del vino se ajustó a 3.5 en la forma especificada en el Apartado 2.7 de este Capítulo. Se ensayaron las siguientes concentraciones de etanol en

% (v/v): 13, 14, 15, 16 y 20, además de la que originariamente presentaba el vino (12%). El aumento del grado alcohólico del vino base se consiguió añadiendo etanol absoluto hasta obtener las concentraciones adecuadas [133]. La determinación de la concentración final de etanol en el vino se realizó utilizando el sistema enzimático de Boehringer-Manheim [40]. La esterilización, el reparto, y la inoculación de estos vinos, así como el seguimiento de la degradación del ácido L-málico, se realizaron de igual forma que en Apartado 2.7 de este Capítulo.

2.9.- DESARROLLO DE LA FERMENTACION MALOLACTICA A DIVERSAS CONCENTRACIONES DE SO₂.

Se investigó el efecto que concentraciones de SO₂ total tenían sobre la consecución de la fermentación maloláctica. Estas concentraciones fueron de 100, 150 y 200 mg/l, además de la que originariamente presentaba el vino base, y que era de 50 mg/l. Las cantidades de SO₂ total especificadas, se consiguieron mediante la adición de metabisulfito potásico. Una concentración determinada de metabisulfito potásico en solución ácida produce la mitad de SO₂; por ello debe adicionarse al doble de la concentración que queremos obtener [331]. El pH del vino se ajustó a 3.5 previamente a la adición del metabisulfito potásico. La comprobación de los niveles de SO₂ total y libre se realizó mediante titulación iodométrica, según la metodología explicada en el Apartado 2.4.12 del Capítulo II. Tras los ajustes de pH el vino se esterilizó, repartió, inoculó y se le siguió la fermentación maloláctica según lo descrito en el Apartado 2.7 de este Capítulo.

2.10.- DESARROLLO DE LA FERMENTACION MALOLACTICA A DISTINTAS TEMPERATURAS.

Se ensayaron las siguientes temperaturas: 10, 15, 18, 22 y 25°C. Estas temperaturas a pesar de ser inferiores a la descrita como óptima para la fermentación maloláctica [172, 174], comprenden el rango de temperaturas que se encuentran en las bodegas, dependiendo de su localización y del momento en que se produzca la fermentación maloláctica. Al vino destinado a esta prueba se le ajustó el pH a 3.5 con HCl y NaOH, como ya describimos en el Apartado 2.7 de este Capítulo. La esterilización, el reparto, la inoculación y el seguimiento de estos vinos se realizó asimismo de igual forma que en Apartado 2.7 de este Capítulo, y los tubos correspondientes se situaron en estufas y baños ajustados a las temperaturas descritas.

2.11.- DESARROLLO DE LA FERMENTACION MALOLACTICA A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CO₂ EN LA ATMOSFERA.

Se estudió la influencia que sobre la fermentación maloláctica tenía la concentración de CO₂ en la atmósfera de incubación de las muestras. Para ello, se eligieron cuatro concentraciones de CO₂ a ensayar:

<u>Prueba</u>	<u>Concentración en %</u>	
	<u>N₂</u>	<u>CO₂</u>
1	75	25
2	50	50
3	25	75
4	0	100

El pH de los vinos de esta prueba se ajustó a 3.5 y éstos se esterilizaron, repartieron e inocularon en la forma descrita en el Apartado 2.7 de este Capítulo. Los tubos inoculados se situaron dentro de cámaras de anaerobiosis (Oxoid) provistas de un sistema de entrada y salida de gases y de un manómetro, mediante el cual se controlaban las cantidades de gases introducidos. En todos los casos se añadía una pequeña sobrepresión de H_2 , aproximadamente del 2% del total. El H_2 tenía la finalidad de reaccionar con los restos de O_2 que quedasen en la cámara, dando H_2O ; esta reacción se facilitaba por la presencia de un catalizador incorporado en el equipo de las cámaras. Antes de establecer la atmósfera definitiva en las cámaras, se eliminaba la atmósfera normal mediante un aporte de N_2 y salida continua mediante vacío, realizándose de esta forma un lavado durante unos 5 minutos. Dentro de la cámara se introducía un indicador de anaerobiosis compuesto por 1/3 de glucosa al 6%, 1/3 de NaOH 0.006 N, y 1/3 de azul de metileno al 0.015% [147]. Este indicador se introducía en estado reducido, poseyendo en este caso un aspecto incoloro. La aparición de color azul señalaría que se habrían perdido las condiciones de anaerobiosis. De esta forma, pudimos controlar que todo el ensayo se realizaba en perfectas condiciones. Los vinos fueron preparados, inoculados y analizados para ver la desaparición del ácido L-málico, en la forma descrita en el Apartado 2.7.

2.12.- ENSAYO CONTROL.

Los resultados obtenidos en los ensayos descritos en los Apartados 2.7, 2.8, 2.9, 2.10 y 2.11 de este Capítulo, se compararon a los conseguidos en un ensayo control realizado en vino base estéril a pH=3.5,

con unas concentraciones originales de etanol de 12% (v/v) y 50 mg/l de SO_2 , a 25°C y en atmósfera normal. Los tubos de este ensayo se inocularon en la forma ya descrita en el Apartado 2.7, con cada una de las cepas ensayadas. La fermentación maloláctica se observó en los mismos plazos y con la misma técnica que se describe en el Apartado 2.7 de este Capítulo.

2.13.- OBSERVACION DEL CRECIMIENTO EN VINO A DISTINTOS pHs.

En este experimento se quiso observar la capacidad de crecimiento de las cepas que, previamente cultivadas en medio sintético, se inoculaban en vino. Para ello se ensayaron diversos valores de pH que iban desde 3.1 a 3.5. No se ensayaron valores superiores, ya que nos interesaba seleccionar cepas que creciesen a pHs inferiores a 3.5. Al mismo tiempo que observábamos el crecimiento, seguíamos la marcha de la fermentación maloláctica.

Se realizó la observación del crecimiento en vino por varios procedimientos, a fin de determinar cuál era el más adecuado y rápido. En primer lugar se ensayaron métodos de recuento de células totales, como el recuento microscópico y el recuento mediante un contador de partículas (Coulter Counter ZM). Estos dos métodos tenían la ventaja de medirnos el número total de células, tanto de aquellas en fase de crecimiento activo, como aquellas que no fueran capaces de reproducirse, las cuales podían mantener todavía intacto el sistema enzimático responsable de la fermentación maloláctica.

En segundo lugar llevamos a cabo un seguimiento del crecimiento por medidas espectrofotométricas, observando el incremento de la absorbancia a 650 nm, con cubetas de 0.1 cm de paso de luz. El aparato utilizado fue de

la casa Beckman, modelo DU-7. Este método resultaba atractivo dada su facilidad de manejo y la rapidez en la obtención de resultados.

En tercer lugar empleamos un método de recuento de células viables en placas de agar MRS y agar MLO. Este método permite la investigación del número de células capaces de reproducirse y crecer en un vino o en un medio sintético. Las placas para el recuento se sembraron con la muestra diluida de forma adecuada a razón de 0.2 ml por placa. La siembra fue en superficie, y el inóculo se extendió mediante un asa de Digralsky.

De las 47 cepas aisladas se eligieron 28 debido a su elevada capacidad para degradar el ácido málico en medio sintético (Tabla 36). Estas cepas se crecieron previamente en medio sintético (MRS para *Lactobacillus* y cepas no identificadas, y MLO para *L. oenos*), según la metodología expuesta en el Apartado 2.5 de este Capítulo. Tras obtener un buen crecimiento, se sembró cada cepa en tubos con vino a pHs de 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 y 3.5 según la metodología descrita en el Apartado 2.5. Se eligió el pH como factor de estudio debido a las siguientes razones: el pH selecciona el número de especies capaces de crecer en vino [72, 90, 344]; el pH limita el crecimiento de las bacterias lácticas [26, 27, 31, 42, 62, 90, 145, 175, 200, 276, 290, 344]; la fermentación maloláctica resulta más conveniente para vinos de pH bajo [26, 27, 29, 31, 42, 62, 89, 155, 175, 199].

Se tomaron muestras semanalmente para recuentos microscópicos, para el contador de partículas, medición de la absorbancia y recuento en placa. A partir del momento en el que se detectaba inicio del crecimiento, las muestras se tomaban cada 2 días.

2.14.- ADAPTACION PROGRESIVA DE LOS CULTIVOS AL VINO Y A pHs BAJOS.

De las cepas capaces de crecer en vino tras su inoculación desde de medio sintético, se realizó un estudio de la influencia que tenían sucesivos pases por vino sobre la dinámica de su crecimiento y sobre su actividad maloláctica. También se observó la influencia que el nivel de inóculo tenía sobre el desarrollo microbiano.

Para ello se preparó vino a pHs de 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 y 3.5, y se repartió, tras su esterilización por filtración, en tubos de 15 x 150 mm a razón de 10 ml por tubo, y en tubos de hemólisis con 3 ml por tubo.

A partir de los tubos con 20 ml de vino del ensayo 2.13 que presentaban crecimiento y que habían completado la fermentación maloláctica a pHs más bajos, se sembró en tubos con 10 ml de vino al mismo valor de pH, y en los tubos con 3 ml a pH igual e inferiores. Las incubaciones se realizaron a 25°C hasta un máximo de 140 días. En el tubo con 10 ml se seguía el crecimiento y la fermentación maloláctica, y en los tubos con 3 ml el desarrollo de la fermentación maloláctica únicamente. El inóculo se añadió en ambos casos al 10% y 1% del volumen existente en el tubo y por duplicado. La marcha de la fermentación maloláctica se realizó por cromatografía en papel.

3.- RESULTADOS Y DISCUSION.

3.1.- OBSERVACION DE LA CAPACIDAD DE DEGRADACION DEL ACIDO L-MALICO Y CUANTIFICACION DE LA MISMA.

La fermentación maloláctica es uno de los problemas más difíciles de resolver en la vinificación de los vinos. Ya hemos hablado en este Capítulo de las ventajas e inconvenientes de la misma, y si se decide que los vinos de una determinada zona incrementan su calidad con el desarrollo de la fermentación maloláctica, hay varios métodos para potenciarla (ver Apartado 1.2.4 de este Capítulo).

La inducción de la fermentación maloláctica puede efectuarse mediante la estimulación de la flora natural presente en los mostos [62, 118, 285], o por inoculación de bacterias lácticas procedentes de un vino que ya la haya realizado [21]. Sin embargo, estas prácticas tienen como principal inconveniente el que no se puede predecir la calidad final del producto, puesto que no se conoce ni a los microorganismos ni a las actividades metabólicas de los mismos. Esta forma de potenciar la fermentación maloláctica no está exenta de ciertos riesgos, ya que además puede fomentar el crecimiento de cepas no adecuadas.

A pesar de que RANKINE [273] no considera justificada la inoculación de cultivos puros de bacterias lácticas, la mayor parte de las investigaciones actuales se centran en la caracterización de cepas que lleven a cabo la fermentación maloláctica y potencien la calidad del vino [27, 71, 148, 168, 178, 253].

Tras el aislamiento y la identificación de las cepas de bacterias lácticas durante los muestreos de 1983 nos planteamos, al igual que los

autores anteriormente citados, la caracterización de las mismas con fines enológicos. Dentro de esta caracterización estudiamos sus comportamientos metabólicos, así como sus respuestas fisiológicas a diversos parámetros físico-químicos.

Una de las primeras cuestiones que nos planteamos fue la capacidad de degradar ácido L-málico que poseían nuestras bacterias, ya que no todas las bacterias lácticas son capaces de utilizarlo [47]. Este pues sería el paso previo para realizar una selección de las cepas con las cuales tuviéramos que trabajar. La experiencia se llevó a cabo en un medio sintético (medio C), adicionado de ácido L-málico a razón de 10 g/l. La degradación de este ácido se ensayó tanto en condiciones aerobias como anaerobias, a fin de observar si existían diferencias en ambas circunstancias. Se ensayó una atmósfera de nitrógeno y CO₂, siguiendo las indicaciones de ciertos autores que opinan que el CO₂ potencia el crecimiento de ciertas bacterias lácticas [31, 323, 325]. En este sentido, BENDA [31] comenta las experiencias que MAYER llevó a cabo con especies de *Leuconostoc*. MAYER observó que estas especies eran incapaces de crecer en atmósfera de nitrógeno puro sin CO₂; sin embargo, cuando utilizaba una atmósfera mixta compuesta de nitrógeno más 10% de carbónico, se favorecía el crecimiento. En el sentido opuesto STAMER [323] y STAMER y STOYLA [324] apuntan en sus trabajos que algunas de estas bacterias presentan respuestas positivas a las condiciones aeróbicas, y RIBÉREAU-GAYON [282] afirma que la aireación facilita el crecimiento de las bacterias lácticas.

En la Tabla 33 se puede observar la degradación del ácido L-málico en aerobiosis y anaerobiosis a lo largo de 36 días. De las 47 cepas ensayadas, 15 presentaban mayor velocidad de degradación del ácido L-málico en ambiente anaerobio, una en ambiente aerobio, y al resto le resultaba indiferente la atmósfera en la que se realizaba el ensayo. Por especies encontramos que *Leuconostoc oenos* y *Lactobacillus hilgardii* son las que

mayor número de respuestas positivas presentan a la anaerobiosis. En relación con esto, RIBÉREAU-GAYON [282], GANDINI [126] y GARVIE [133] han informado del efecto beneficioso del CO₂ sobre *Leuconostoc oenos*. Por otra parte, GARVIE [47] establece que esta última especie prefiere condiciones reductoras, y ROGOSA [47] afirma que una atmósfera con el 5% de CO₂ o más favorece el aislamiento y el crecimiento de *Lactobacillus hilgardii*. A pesar de que éstas son las tendencias generales, existen diferencias de comportamiento entre las cepas. Así encontramos entre *L. hilgardii* una gran heterogeneidad: de 10 cepas aisladas, 4 se mostraban indiferentes a la atmósfera enriquecida en CO₂, mientras que el resto se encontraban favorecidas.

De las dos cepas clasificadas como *Leuconostoc paramesenteroides*, una (C11) parecía preferir condiciones aerobias para el ataque al ácido L-málico, mientras que a la otra le era indiferente. GARVIE [47, 133] ha descrito a esta especie como "anaerobia facultativa", lo cual no excluye que algunas pocas cepas prefieran condiciones reductoras para crecer y desarrollar su metabolismo. Respecto a los bacilos heterofermentativos *Lactobacillus cellobiosus* y *Lactobacillus brevis*, ninguno de los autores consultados han descrito que el crecimiento de los mismos se vea potenciado en anaerobiosis y con CO₂, antes al contrario: *L. brevis* parece que ve favorecido su crecimiento en condiciones de agitación (es decir, aeróbicas) [323]. En nuestro caso sin embargo la degradación de L-málico por parte de *L. brevis* parece ser independiente de la composición de la atmósfera (Tabla 33). Sobre el efecto que la anaerobiosis ejerce sobre *Lactobacillus fructivorans*, no hemos encontrado más referencia que la de ROGOSA [47], quien asegura que el CO₂ facilita el aislamiento inicial de esta especie a partir de sus hábitats naturales. Sin embargo, no habla del efecto de este gas sobre su crecimiento o sobre el metabolismo de azúcares o ácidos orgánicos. En nuestro caso, no hemos visto influencia ni positiva ni

Especie	Cepa	Días						
		1	2	5	7	18	36	
		A S	A S	A S	A S	A S	A S	
<i>L. oenos</i>	171	c t	t t	t t	++	++	++	
	172	i t	t t	t t	++	++	++	
	T46	c t	t t	t t	++	++	++	
	641	c t	t t	t t	++	++	++	
	66	t +	++	++	++	++	++	
	M41	c t	t t	t t	t t	++	++	
	M42	c t	t t	t t	++	++	++	
	<i>L. paramesenteroides</i>	C11	t c	+ t	+ t	++	++	++
M11		t t	t t	t t	++	++	++	
<i>L. fructivorans</i>	M43	c c	c c	t t	t t	++	++	
	B49	c c	c c	t t	t t	++	++	
<i>L. cellobiosus</i>	34	i i	i i	i i	c c	c c	c c	
<i>L. brevis</i>	33	t t	t t	t t	++	++	++	
	35	i i	i i	c c	c c	c c	c c	
	36	i i	i i	i i	c c	c c	c c	
	37	i i	i i	c c	c c	c c	c c	
	38	i i	i i	i c	c c	c c	c c	
	T11	t t	t t	t t	++	++	++	
	T12	t t	t t	t t	++	++	++	
	<i>L. hilgardii</i>	32	i i	c t	c +	t +	++	++
39		i i	i i	c c	c c	c c	c c	
91		- i	i i	i i	i i	c c	c c	
93		i i	i i	i i	c c	c c	c c	
161		i c	i t	i t	c t	c t	c t	
162		i t	i t	i t	c t	c t	c t	
163		i t	i t	i t	c t	c t	c t	
B22		i i	i i	c c	c c	c c	t t	
61		i i	i i	i i	i i	c c	c c	
67		i c	c c	c c	c c	c c	t t	
<i>L. plantarum</i>		B11	t t	t t	t t	++	++	++
	B12	t t	t t	t t	++	++	++	
	B13	t t	t t	t t	++	++	++	
	22	t t	t t	t t	++	++	++	
	24	t t	t t	t t	++	++	++	
	25	t t	t t	t t	++	++	++	
	27	t t	t t	t t	++	++	++	
	G14	t t	t t	t t	++	++	++	
	G15	t t	t t	t t	++	++	++	
	G16	t t	t t	t t	++	++	++	
	Sp. no determinada	B44	t t	++	++	++	++	++
		B31	++	++	++	++	++	++
		B32	t t	t +	++	++	++	++
		B24	t t	t t	t t	++	++	++
M12		t t	t t	t +	++	++	++	
31		t t	t t	t t	++	++	++	
C43		t t	++	++	++	++	++	
C45		c t	c t	c t	t +	++	++	

Tabla 33.- Degradación del ácido L-málico en medio sintético C adicionado de 10 g/l de ácido L-málico. "A" atmósfera aerobia. "S" atmósfera anaerobia. "-" degradación nula. "i" degradación iniciada. "c" degradación avanzada. "t" trazas de ácido málico en el medio. "+" degradación total.

negativa. Las 10 cepas aisladas de *L. plantarum* se mostraban indiferentes a la atmósfera de cultivo. Entre las cepas que no conseguimos clasificar, tres de ellas (B32, M12, C45) degradan el ácido málico algo más rápidamente en condiciones anaerobias, y el resto lo ataca de igual manera tanto en aerobiosis como en anaerobiosis.

A partir de los resultados obtenidos, hemos podido comprobar que todas las cepas ensayadas muestran capacidad de transformar el ácido L-málico en L-láctico, aunque se aprecien diferencias de actividad tanto entre las especies como entre las cepas. Las especies más activas son *L. oenos*, *L. paramesenteroides* y *L. plantarum*, que al cabo de 7 días degradaron completamente los 10 g/l de ácido L-málico en el medio. Para *L. oenos* la utilización de este ácido es un carácter taxonómico que la separa de las otras especies del género *Leuconostoc* [47, 133, 316]. Según el "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" [47], también del 10 al 90% de las cepas de *L. paramesenteroides* son capaces de degradar el ácido málico. Las cepas C11 y M11, aisladas por nosotros y pertenecientes a esta especie, fermentaron eficazmente la totalidad de este ácido en el medio de cultivo. Este resultado concuerda con lo hallado por CHEN *et al.* [86], quienes aislaron una cepa de *L. paramesenteroides* fermentadora de ácido L-málico. Todas las cepas de *L. plantarum* degradaban completamente este ácido; esta capacidad propia de esta especie ha sido comprobada en numerosos estudios [19, 79, 86, 211, 266]. *L. fructivorans* también fermentó la totalidad del ácido L-málico del medio, aunque tardó 7 días más en finalizar que la tres especies anteriormente nombradas. El grupo de cepas no asignadas a ninguna especie, también demostró poseer una elevada capacidad maloláctica, existiendo cepas que degradaban la totalidad del ácido en 24 horas, y otras en 48 horas (Tabla 33). Las especies más inactivas fueron *L. cellobiosus* y *L. hilgardii*, aunque dentro de esta última especie la cepa 32 logró transformar la totalidad del ácido L-málico al cabo de 5 días. *L.*

cellobiosus, aunque inició la degradación de este ácido no fue capaz de completarla. CHEN *et al.* [86] aislaron una cepa de esta especie que fermentaba totalmente este ácido, pero hay que tener en cuenta que el medio por ellos empleado contenía 1.35 g/l de ácido L-málico, y el nuestro 10 g/l. Una especie que presenta bastante heterogeneidad respecto de su actividad maloláctica es *L. brevis*: de las 7 cepas aisladas, 3 degradaron completamente los 10 g/l de ácido L-málico al cabo de 7 días, mientras que el resto no fue capaz de transformar esta cantidad al cabo de 36 días.

En un principio, nos sorprendió las diferencias en las capacidades degradadoras de las cepas dentro de una especie; sin embargo, al consultar los trabajos de RADLER y BRÖHL [266] y CHEN *et al.* [86] hemos encontrado que dentro de la misma especie, existen cepas que carecen de actividad frente a algunos ácidos orgánicos, mientras que otras cepas sí la poseen. Así por ejemplo existen cepas de *L. oenos* incapaces de metabolizar el gluconato [266], mientras varias cepas de *L. brevis* y *Lactobacillus buchneri* fermentan gluconato pero no descarboxilan malato [266]. Por otro lado, CHEN *et al.* [86] también han observado diferencias entre cepas de una misma especie respecto al porcentaje de utilización de ácido L-málico vía fermentación maloláctica. En el estudio de estos autores [86] se compara la capacidad de degradación de ácido L-málico entre varias cepas pertenecientes a 7 especies, observándose diferencias en la capacidad de degradación de este ácido entre cepas de 4 de las especies. Nuestras propias observaciones y las de los autores anteriormente citados, nos llevan a concluir que la actividad maloláctica es un carácter ligado a la cepa, y que podemos encontrar toda una serie de gradaciones dentro de cada especie. La capacidad de degradar ácido málico se encuentra muy extendida entre las bacterias lácticas, al igual que la de degradar ácido cítrico; sin embargo RADLER y BRÖHL [266] señalaron que entre las cepas que ellos aislaron es más frecuente la fermentación del ácido L-málico que la del

cítrico. Esto también ocurre con nuestros aislamientos (Tablas 31 y 33).

La cuantificación de la actividad maloláctica se realizó tanto en medio sintético como en vino. Para poder efectuar comparaciones entre las actividades de cada cepa, era necesario estandarizar la cantidad de células que inoculábamos en cada ensayo. Dada la heterogeneidad de los tiempos de generación en las diferentes cepas, optamos por inocular a una misma densidad óptica. Un método sencillo consistía en utilizar la denominada escala McFARLAND, en la cual existen una serie de tubos de densidad óptica creciente. Dentro de esta escala se eligió el punto 2 (el mismo con que se inoculaba la tira API 50 CHL en la fermentación de carbohidratos) a fin de obtener un elevado número de células en estado no proliferante, para evitar las diferencias que se pudieran generar en función de las distintas tasas y estados de crecimiento. Para comprobar que realizábamos inoculaciones con igual número de células viables, hicimos recuentos en placa por duplicado de los inóculos a sembrar. Los resultados se pueden observar en la Tabla 34. En la mayor parte de los casos, obtuvimos unas 10^8 ufc/ml, tanto para cocos como para bacilos. Como los resultados obtenidos presentaban bastante homogeneidad, decidimos emplear este sistema para la determinación de la actividad maloláctica.

Las características del vino base en el cual se cuantificó la actividad maloláctica, se exponen en la Tabla 35. En la Tabla 36 se pueden apreciar los resultados obtenidos en los ensayos de cuantificación de la degradación del ácido L-málico a lo largo del tiempo. En esta Tabla se confirman los resultados de la Tabla 33 en la que se expresan los resultados de la degradación mediante método cualitativo (Apartado 2.4.16 del Capítulo II). Todas las cepas ensayadas mostraban actividad fementadora del ácido L-málico en medio sintético, aunque se podían apreciar diferencias tanto en la velocidad, como en la capacidad de degradación. Así observamos que las especies capaces de degradar la totalidad de ácido

Especie	Cepa	ufc/placa		Dilución	ufc/ml
		R1	R2		
<i>L. oenos</i>	171	36	33	10 ⁻⁶	1.7x10 ⁶
	172	30	54	10 ⁻⁶	2.1x10 ⁶
	T46	270	280	10 ⁻⁶	1.4x10 ⁹
	641	89	120	10 ⁻⁶	5.2x10 ⁶
	66	32	23	10 ⁻⁶	1.4x10 ⁶
	ML-34	140	129	10 ⁻⁵	6.7x10 ⁷
	M41	40	56	10 ⁻⁶	2.4x10 ⁶
	M42	114	84	10 ⁻⁶	5.0x10 ⁶
	<i>L. paramesenteroides</i>	M11	38	49	10 ⁻⁶
<i>L. fructivorans</i>	M43	35	48	10 ⁻⁶	2.1x10 ⁶
	B49	44	47	10 ⁻⁶	2.3x10 ⁶
<i>L. cellobiosus</i>	34	38	35	10 ⁻⁶	1.8x10 ⁶
<i>L. brevis</i>	33	113	123	10 ⁻⁶	5.9x10 ⁶
	37	57	54	10 ⁻⁶	2.8x10 ⁶
	38	45	60	10 ⁻⁶	2.6x10 ⁶
	T11	86	88	10 ⁻⁶	4.4x10 ⁶
	T12	83	86	10 ⁻⁶	4.2x10 ⁶
<i>L. hilgardii</i>	32	97	93	10 ⁻⁶	4.8x10 ⁶
	91	29	34	10 ⁻⁶	1.8x10 ⁶
	93	82	60	10 ⁻⁶	3.6x10 ⁶
	161	80	60	10 ⁻⁶	3.5x10 ⁶
	162	33	38	10 ⁻⁶	1.8x10 ⁶
	163	30	22	10 ⁻⁶	1.3x10 ⁶
	B22	74	49	10 ⁻⁶	3.1x10 ⁶
	61	68	72	10 ⁻⁶	3.5x10 ⁶
	67	85	87	10 ⁻⁶	4.3x10 ⁶
<i>L. plantarum</i>	B11	47	61	10 ⁻⁶	2.7x10 ⁶
	B12	40	33	10 ⁻⁶	1.8x10 ⁶
	B13	53	53	10 ⁻⁶	2.7x10 ⁶
	22	48	81	10 ⁻⁶	3.2x10 ⁶
Sp. no determinada	B44	58	70	10 ⁻⁶	3.2x10 ⁶
	B31	51	63	10 ⁻⁶	2.9x10 ⁶
	B32	34	58	10 ⁻⁶	2.3x10 ⁶
	B24	51	50	10 ⁻⁶	2.6x10 ⁶
	M12	38	47	10 ⁻⁶	2.1x10 ⁶
	31	68	78	10 ⁻⁶	3.7x10 ⁶
	C43	45	53	10 ⁻⁶	2.5x10 ⁶
C45	125	129	10 ⁻⁶	6.4x10 ⁶	

Tabla 34.- Relación entre la D.D. correspondiente al punto 2 de la escala McFARLAND y el número de ufc/ml obtenido para cada cepa. Los medios empleados fueron agar MLD en el caso de cepas de *Leuconostoc oenos*, y agar MRS en el resto de los casos. Las placas se sembraron por duplicado con 0.2 ml de la dilución indicada de una suspensión con una D.D. aproximada al punto 2 de la escala McFARLAND. "R1" y "R2" corresponden al recuento de cada una de estas placas.

Características del vino base (VB)

pH	3.03
Alcohol (% v/v)	12.0
SO ₂ total (mg/l)	50
SO ₂ libre (mg/l)	16
Acidez total (g/l en tartárico)	7.19
Acidez volátil (g/l en acético)	0.33
Acido málico (g/l)	2.15

Tabla 35.- Características del vino base empleado en los estudios sobre la influencia de distintos parámetros sobre la fermentación maloláctica y sobre el crecimiento de bacterias lácticas en vino.

Especie	Cepa	Días			
		1	7	30	
<i>L. oenos</i>	172	7.51	9.99	10.00	
	T46	6.70	9.99	10.00	
	641	7.56	9.99	10.00	
	66	8.80	9.99	10.00	
	M41	6.42	9.15	9.97	
	M42	6.84	9.85	10.00	
<i>L. paranesenteroides</i>	C11	9.99	10.00	10.00	
	M11	9.98	10.00	10.00	
<i>L. fructivorans</i>	B49	5.55	9.36	9.99	
<i>L. cellobiosus</i>	34	1.92	3.50	6.22	
<i>L. brevis</i>	33	9.35	9.93	10.00	
	35	0.10	3.97	7.15	
	36	1.10	3.64	5.80	
	37	2.01	4.30	6.36	
	38	0.57	3.97	6.65	
	T11	9.99	10.00	10.00	
	T12	9.66	9.99	10.00	
	<i>L. hilgardii</i>	32	8.10	9.96	10.00
		39	1.70	3.90	6.41
		91	0.81	2.40	4.78
93		?	2.44	6.27	
161		0.80	3.40	5.60	
162		1.05	2.50	7.03	
163		1.00	3.54	6.70	
B22		1.96	4.02	8.93	
61		1.53	2.44	6.17	
67		2.63	5.36	8.96	
<i>L. plantarum</i>	B11	9.98	10.00	10.00	
	B12	9.88	10.00	10.00	
	B13	9.99	10.00	10.00	
	22	9.76	9.99	10.00	
	24	9.99	10.00	10.00	
	25	9.95	10.00	10.00	
	27	9.99	10.00	10.00	
	614	9.92	10.00	10.00	
	615	9.99	10.00	10.00	
	616	9.86	10.00	10.00	
Sp. no determinada	B44	9.99	10.00	10.00	
	B31	9.99	10.00	10.00	
	B32	9.99	10.00	10.00	
	B24	9.98	10.00	10.00	
	M12	9.99	10.00	10.00	
	31	9.99	10.00	10.00	
	C43	9.82	9.99	10.00	
	C45	3.90	9.34	9.90	

Tabla 36. - Degradación a lo largo del tiempo de ácido L-málico en medio C adicionado de 10 g/l de ácido L-málico. Atmósfera aerobia.

málico más rápidamente son *L. plantarum*, *L. paramesenteroides*, y la mayor parte del grupo de cepas no especificadas. Algo más lentas en la degradación, aunque igualmente eficaces, son las cepas de *L. oenos*, *L. fructivorans* (cepa B49), las cepas 33, T11 y T12 de *L. brevis*, y la cepa 32 de *L. hilgardii*. Todas ellas, al cabo de 7 días habían degradado totalmente el ácido L-málico. Las cepas menos eficaces pertenecían a las especies *L. brevis* y *L. hilgardii*. En vino, casi ninguna cepa fue capaz de degradar los 2.15 g/l de ácido L-málico que éste contenía: tan sólo dos cepas de la especie *L. oenos* (M41 y G6). Aunque los datos de degradación en vino no quedan reflejados en la Tabla 36, M41 metabolizó 2.12 g/l de ácido L-málico contenido en el vino en apenas 24 horas, mientras que G6 degradó 0.79 g/l al cabo de 7 días, no observándose restos de este ácido en vino al cabo de 30 días. Las diferencias en la capacidad de degradar el ácido L-málico en vino y en medio sintético no son de extrañar. El medio sintético, contiene todos los nutrientes necesarios para la célula; su pH es de 4.8 (entrando en el rango óptimo de pH para las bacterias lácticas [175, 282]) y carece de inhibidores del crecimiento. Sin embargo, el vino constituye un medio mucho más hostil para el crecimiento y para la actividad metabólica de las bacterias lácticas. El nivel reducido de nutrientes y factores de crecimiento, el pH bajo, y la presencia de inhibidores como el SO₂ y el etanol en vinos hechos, provocan una pérdida de la viabilidad de las bacterias lácticas cuando éstas se inoculan en vino [113, 172, 199, 328], así como la disminución de la actividad maloláctica en un 90% o más [185, 341].

3.2.- EFECTO DE DIVERSOS PARAMETROS SOBRE LA CONSECUCION DE LA FERMENTACION MALOLACTICA EN VINO.

En este Capítulo se estudia el efecto que diversos parámetros tienen sobre la fermentación maloláctica en vino. Los factores estudiados han sido: pH, concentración de SO_2 , concentración de etanol, proporción de CO_2 en la atmósfera de incubación, y temperatura a la que se someten los microorganismos. Es de todos conocida la gran influencia que estos parámetros tienen sobre las bacterias lácticas: afectan tanto al crecimiento como a la actividad maloláctica; sin embargo repercuten más drásticamente sobre el primero que sobre la segunda [174]. Se realizó el estudio utilizando grandes inóculos de células en estado estacionario, a fin de evitar que el efecto de los parámetros estudiados sobre el crecimiento enmascarase los resultados de la fermentación maloláctica. Las altas concentraciones celulares, según LAFON-LAFOURCADE [172] pueden llevar a cabo una rápida degradación de ácido málico, actuando como un extracto crudo de enzima. De esta manera se puede estudiar la actividad de este "extracto crudo" de enzima sin los problemas que se asocian al crecimiento de las bacterias lácticas. La influencia de estos parámetros se ha observado en relación a la actividad maloláctica desarrollada por cada cepa en el ensayo control (ver Apartado 2.12 de este Capítulo).

3.2.1.- INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA FERMENTACION MALOLACTICA.

Muchos autores han estudiado el efecto que este parámetro tiene sobre el crecimiento de las bacterias lácticas [27, 126, 155, 213, 290] y sobre la tasa de fermentación maloláctica [42, 68, 69, 155, 167, 172, 174, 199, 253].

En la Tabla 37 se exponen los resultados obtenidos en el ensayo de 10 pHs distintos en vino. En esta Tabla se puede observar que de las 42 cepas ensayadas, ninguna fue capaz de atacar al ácido málico por debajo de $\text{pH}=3.3$ en las condiciones de ensayo que se definieron. Tan sólo 5 cepas (el 11.9% del total) atacaron el ácido málico a $\text{pH}=3.3$, pero únicamente dos de ellas fueron capaces de degradarlo totalmente. A $\text{pH}=3.4$, 11 cepas lo metabolizaron pero sólo 6 lograron consumir todo el málico del medio. El número de cepas capaces de realizar la fermentación maloláctica fue incrementándose conforme aumentábamos el pH, de manera que a valores de $\text{pH}=4.0$ fueron 30 las cepas que habían realizado la fermentación maloláctica, de las cuales una no logró acabarla totalmente.

Hemos encontrado cepas que no fueron capaces de iniciar la fermentación maloláctica a ninguno de los pHs ensayados, a pesar de que la mayor parte de las mismas podían crecer a $\text{pH}=3.7$ en medio sintético; sólo las dos cepas de la especie *L. paramesenteroides* eran incapaces de crecer a ese pH en medio sintético, detectándose crecimiento sólo a $\text{pH}=4.2$ en dicho medio. Sin embargo, ya hemos hablado antes que el comportamiento de las bacterias lácticas en medio sintético y en vino difiere mucho. Si consideramos dos niveles de pH diferente en un medio sintético y en vino, el efecto que este parámetro tenga sobre el desarrollo o la actividad de la flora láctica, se deberá únicamente a la distinta concentración de protones en el caso del medio sintético, mientras que en el vino, además de esto hay que considerar otros factores. Uno de ellos es el pH, que influye sobre el equilibrio de las distintas formas en las cuales se encuentra el SO_2 en el vino, aumentando la proporción de la forma con más actividad antimicrobiana [24, 54, 189, 306]. Otro de los factores es que al existir etanol en el vino, la disminución de pH hace que el efecto negativo que éste ejerce sobre la viabilidad de las células se incremente [126]. Es por ello que las bacterias lácticas situadas al mismo pH en medio sintético y en vino,

Especie	Cepa	pH									
		3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7	3.8	3.9	4.0
<i>L. oenos</i>	171	-	-	nc	+(6)	+(2)	+(2)	+(2)	+(2)	+(2)	+(2)
	172	-	-	+(35)	+(21)	+(2)	+(2)	+(2)	+(2)	+(2)	+(2)
	T46	-	-	nc	+(42)	+(35)	+(35)	+(2)	+(2)	+(2)	+(2)
	G41	-	-	nc	nc	+(21)	+(14)	+(2)	+(2)	+(2)	+(2)
	66	-	-	nc	nc	+(28)	+(28)	+(14)	+(6)	+(1)	+(14)a
	ML-34	-	-	-	i	i	i	t	t	+(4)	+(4)
	M41	-	-	-	nc	+(28)	+(28)	+(2)	+(2)	+(2)	+(2)
	M42	-	-	-	+(35)	+(28)	+(28)	+(2)	+(2)	+(2)	+(2)
<i>L. paranesenteroides</i>	C11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	M11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. fructivorans</i>	M43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	B49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. cellobiosus</i>	34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. brevis</i>	33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	-	-	-	-	-	i	nc
	38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	T11	-	-	-	-	-	+(21)	+(14)	+(14)	+(7)	+(7)
	T12	-	-	-	-	-	-	-	+(14)	+(7)	+(7)
	T13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. hilgardii</i>	32	-	-	-	-	+(35)	+(28)	+(14)	+(14)	+(1)	+(1)
	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	91	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	161	-	-	-	-	+(6)	+(6)	+(6)	+(6)	+(6)	+(4)
	162	-	-	-	-	+(42)	+(29)	+(29)	+(14)	+(14)	+(7)
	163	-	-	-	-	+(56)	+(42)	+(35)	+(35)	+(18)	+(18)
	B22	-	-	-	-	-	-	+(42)	+(42)	+(35)	+(28)
	61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+(35)
	67	-	-	-	-	+(4)	+(4)	+(4)	+(2)	+(2)	+(2)
<i>L. plantarum</i>	B11	-	-	-	-	-	-	-	+(6)	+(2)	+(2)
	B12	-	-	-	-	-	-	+(28)	+(28)	+(4)	+(2)
	B13	-	-	-	-	-	-	+(4)	+(4)	+(4)	+(2)
	22	-	-	-	-	-	+(35)	+(4)	+(4)	+(2)	+(2)
Sp. no determinada	B44	-	-	-	-	-	+(14)	+(2)	+(2)	+(2)	+(2)
	B31	-	-	-	-	-	+(35)	+(6)	+(6)	+(2)	+(2)
	B32	-	-	-	-	-	+(6)	+(6)	+(4)	+(2)	+(2)
	B24	-	-	-	-	-	+(6)	+(6)	+(6)	+(2)	+(2)
	M12	-	-	-	-	-	-	+(28)	+(14)	+(6)	+(6)
	31	-	-	-	+(28)	+(21)	+(14)	+(6)	+(6)	+(4)	+(2)
	C43	-	-	-	+(2)	+(2)	+(2)	+(2)	+(2)	+(2)	+(2)
	C45	-	-	-	t	+(4)	+(4)	+(2)	+(2)	+(2)	+(2)

Tabla 37.- Influencia del pH en la consecución de la fermentación maloláctica. El ensayo se realizó en un vino con las características que se muestran en la Tabla 35. "-" fermentación maloláctica no realizada tras 63 días. "i" fermentación iniciada al cabo de 63 días. "nc" fermentación avanzada tras 63 días. "t" trazas de ácido málico después de 63 días. "+" fermentación maloláctica completa; entre paréntesis el número de días que tardó en completarse. "a" inóculo con concentración celular menor que en el resto.

poseen mayor actividad metabólica en el primero que en el segundo.

Si estudiamos en la Tabla 37 qué especies eran las que presentaban actividad maloláctica a pHs bajos, concluiremos que *Leuconostoc oenos* y las cepas 31, C43 y C45 fueron las únicas capaces de realizar la fermentación maloláctica por debajo de $\text{pH}=3.5$. El límite inferior de pH al cual se degradó ácido L-málico fue de $\text{pH}=3.3$; sólo las cepas C43 y 172 lograron degradar la totalidad de este ácido, aunque en distintos intervalos de tiempo: C43 completó la fermentación maloláctica en 4 días mientras que 172 lo hizo en 35 días.

Considerando que la actividad maloláctica es inversamente proporcional al tiempo que tarda en realizarse la fermentación del ácido málico [167], observamos que para cada cepa ésta es menor a medida que desciende el pH; es decir, el número de días que se requieren para completar la fermentación maloláctica es mayor cuanto más bajo es el pH (Tabla 37, datos entre paréntesis). Esta metodología para observar la tasa de fermentación maloláctica ya fue seguida por KUNKEE [167] y BOUSBOURAS y KUNKEE [42]. KUNKEE [167] encontró que la fermentación maloláctica era más rápida a pHs más elevados; sin embargo, no observó correlación entre el pH y la velocidad de realización de la fermentación maloláctica a pH inferior a 3.5. Tampoco resultaba muy clara la relación entre el tiempo de realización de la fermentación maloláctica y el pH por encima de 3.7. Sin embargo, BOUSBOURAS y KUNKEE [42] encontraron que el tiempo de finalización de la fermentación maloláctica disminuía siempre en función del aumento de pH. Las diferencias en los resultados entre el estudio de KUNKEE [167] y el realizado posteriormente por BOUSBOURAS y KUNKEE [42], pueden deberse a que KUNKEE observó el efecto del pH sobre la fermentación maloláctica utilizando mostos de distinto origen para cada pH, con lo cual no solamente variaba el pH sino también la composición del medio, y posiblemente la fermentabilidad del mismo [174]. Sin embargo, en el estudio realizado en

1972 [42], se ensayó la actividad maloláctica en un sólo tipo de mosto, al cual se le variaba el pH; de esta manera la única variable que se introdujo en la experiencia fue el pH. Nuestros resultados nos muestran varios casos en los que una vez sobrepasado un umbral de pH característico para cada cepa, el tiempo que tarda en realizarse la fermentación maloláctica es siempre el mismo y no disminuye conforme aumenta el pH, como les ocurría a BOUSBOURAS y KUNKEE.

Otros autores han estimado la actividad maloláctica siguiendo metodologías distintas a las de KUNKEE [176], BOUSBOURAS y KUNKEE [42], y la nuestra; así IZUAGBE et al. [155] consideran el efecto del pH sobre la tasa de degradación del ácido málico en función del tiempo. Estos autores estudiaron el comportamiento de varias cepas de *L. oenos*, observando en todas ellas una disminución en la tasa de fermentación del ácido L-málico a medida que disminuía el pH del medio de cultivo (medio sintético adicionado de jugo de uva). La disminución de la tasa de fermentación era mayor en las cepas de colección ML-34 y PSU-1 que en las cepas aisladas por ellos mismos en los vinos de Oregón. Este resultado es muy interesante, ya que en nuestras experiencias hemos encontrado que la cepa de colección ML-34 ensayada junto con las aisladas de vinos de la zona Utiel-Requena, era menos efectiva en la degradación del ácido L-málico. Esta cepa realizaba la fermentación maloláctica a pHs superiores al resto de cepas de *L. oenos*, y de una forma menos efectiva y más lenta (Tabla 37). La superioridad de las cepas recién aisladas de vino frente a las cepas de colección para llevar a cabo la fermentación maloláctica, ha sido demostrada en los trabajos de BEELMAN et al. [27] y de IZUAGBE et al. [155]. Este comportamiento puede deberse a que las cepas conservadas largo tiempo sobre medios de cultivo ricos pierden la capacidad de degradar el ácido málico en condiciones más restrictivas como son las del vino.

CLEMENTI [68], CLEMENTI y VINTI [69], y ROSSI y CLEMENTI [290] nos muestran en sus trabajos el efecto que el pH tiene sobre la actividad maloláctica de tres especies en mostos y vinos. Estudian este efecto sobre células en crecimiento y sobre células en fase estacionaria. En este último caso ensayan la influencia del pH sobre grandes inóculos o sobre células inmovilizadas en gel de poliacrilamida. En todos los casos observan una disminución de la actividad maloláctica a medida que disminuye el pH; también estos autores han llegado a la conclusión de que las mayores eficiencias en la degradación del ácido málico se conseguían en las primeras horas, disminuyendo a continuación. Esto puede explicarse si tenemos en cuenta la elevada mortalidad de las bacterias lácticas cuando se inoculan en vino [113, 172, 199, 328]. En los primeros momentos las células mantienen su actividad metabólica y son capaces de degradar gran parte del ácido málico. A medida que pasa el tiempo es menor el número de células vivas, y por tanto disminuye la tasa de fermentación maloláctica. Sólo aquellas células que han podido superar las condiciones del vino serán las que crezcan y transformen el ácido málico al cabo de cierto tiempo [200].

LAFON-LAFOURCADE [172] ha estudiado el efecto de diversos parámetros sobre la tasa de degradación de ácido L-málico en medio sintético utilizando elevadas concentraciones celulares. De sus resultados se desprende que cada cepa tiene un pH óptimo de actuación del enzima málico, aumentando la degradación del ácido L-málico a medida que aumenta el pH hasta que se alcanza un máximo, luego esta tasa se mantiene o disminuye si el pH sigue aumentando. La influencia del pH sobre la actividad maloláctica es dependiente de la cepa, no de la especie ya que dos de las cepas de *Leuconostoc oinos* y una de *Leuconostoc gracile* (actualmente estas antiguas especies se denominan *Leuconostoc oenos*) tienen un comportamiento muy distinto en función del pH. Estos resultados corroboran en gran parte los obtenidos por nosotros, a pesar de que LAFON-LAFOURCADE estudia el efecto

del pH en medio sintético y nosotros lo hicimos en vino. Encontramos una considerable heterogeneidad en el comportamiento de las cepas de una misma especie y también encontramos umbrales de pH a partir de los cuales no aumentaba la actividad maloláctica. Nosotros no pudimos observar el efecto inhibitorio de la fermentación maloláctica que presentaban valores de pH superiores a 4 [172] puesto que no fueron probados.

Si tenemos en cuenta que son los vinos de pH bajo los que más dificultades presentan para el crecimiento y la actividad maloláctica de las bacterias lácticas, hemos de seleccionar aquellas cepas capaces de actuar a esos pH bajos. Por ello, pensamos que las cepas más interesantes de entre todas las que hemos aislado, serían aquéllas que realizaran la fermentación maloláctica a los pH más bajos, es decir las cepas pertenecientes a *Leuconostoc oenos* y las cepas 31, C43 y C45. Sin embargo, las cepas incapaces de degradar la totalidad del ácido málico en el medio no deben ser rechazadas ya que hay autores que opinan que la presencia de 1 ó 2 g/l de ácido málico proporciona vinos más equilibrados y de carácter más afrutado que aquéllos en que este ácido ha sido completamente degradado [89].

Por otra parte tampoco hay que eliminar la posibilidad de trabajar con aquellas cepas que sólo realizan la fermentación maloláctica por encima de pH 3.5, ya que observaciones no presentadas en Tablas han confirmado la actividad maloláctica de estas cepas cuando la inoculación de los vinos se realizaba a mayor concentración de la que se utilizó en estas experiencias. Con inóculos mayores a 10^6 ufc/ml todas las cepas de *Leuconostoc oenos* fueron capaces de degradar totalmente el ácido L-málico del vino en 24 horas y a pH 3.1. De igual forma sucedía con *Lactobacillus plantarum* y con todas las cepas de adscritas a ninguna especie. Las especies más inactivas: *Leuconostoc paramesenteroides*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus cellobiosus* y *Lactobacillus brevis* rebajaban considerablemente su pH umbral

de ataque al ácido málico a medida que se aumentaba la concentración de células en el vino inoculado. El efecto del nivel de inóculo sobre el tiempo que tarda en realizarse la fermentación maloláctica ha sido descrito por KUNKEE [167]. Este autor observa una disminución considerable en el tiempo de realización de la fermentación maloláctica cuando emplea un inóculo 10 veces mayor. LAFON-LAFOURCADE [174] también nos habla de la dificultad de inducir la fermentación maloláctica cuando se utilizan inóculos pequeños, y CLEMENTI y VINTI [69] informan que aumentando la proporción de bacterias inmovilizadas en gel de poliacrilamida desde 1/20 a 1/4 la degradación del ácido málico se acelera considerablemente. El efecto que tiene el nivel de inóculo sobre la rapidez de la degradación del ácido L-málico pudimos comprobarlo en nuestras experiencias. La cepa G6 mostraba a pH 3.9 una actividad maloláctica muy elevada. En 48 horas degradaba totalmente el ácido L-málico del vino, sin embargo a pH 4.0 se tardaba 14 días en completar la fermentación maloláctica. Este retraso se debió a que este tubo se inoculó con una menor concentración de células por error. Las experiencias que detallaremos más adelante corroboran esta afirmación. Es indudable pues que si queremos trabajar con cepas menos activas en la degradación de ácido L-málico a pH bajos, pero que tengan interés porque mejoren las cualidades organolépticas de los vinos, se deben utilizar inóculos más elevados. Exceptuando *Lactobacillus fructivorans* (antiguamente *Lactobacillus trichodes*), que es considerado un microorganismo perjudicial en los vinos [124, 160] porque aumenta la acidez volátil y la fija y produce manitol [270], algunas cepas de *Lactobacillus brevis*, de *Lactobacillus plantarum* y de *Lactobacillus hilgardii* pueden sernos útiles si sabemos emplear sus capacidades con la metodología adecuada, ya que cepas de estas especies en otros estudios han producido vinos juzgados con alta puntuación [89]; concretamente *Lactobacillus brevis* es una de las especies preferidas a la hora de realizar la fermentación maloláctica [148,

2511.

3.2.2.- INFLUENCIA DEL NIVEL DE SO_2 SOBRE LA FERMENTACION MALOLACTICA

El SO_2 es un producto ampliamente utilizado en Enología como antioxidante y como controlador del desarrollo de levaduras "salvajes" y bacterias. Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre el efecto que el SO_2 tiene sobre las bacterias lácticas [24, 54, 68, 69, 119, 172, 174, 199, 221, 290, 306]. De todas las formas en que el SO_2 se presenta en los vinos sólo la forma molecular es directamente activa sobre el sistema metabólico de las bacterias, probablemente por oxidación de grupos disulfuro de las proteínas [166].

En la experiencia que hemos realizado hemos pretendido ver el efecto que dosis crecientes de SO_2 total tenían sobre la fermentación maloláctica. No hemos desligado en los resultados (Tabla 38) la porción de SO_2 libre y SO_2 combinado porque a pesar de las teorías que defienden la total inocuidad del SO_2 en forma combinada, FORNACHON [119] afirma que la cantidad de SO_2 combinado es capaz de inhibir el crecimiento de una bacteria, y el grado de inhibición varía según la cepa. Otros autores como CARR [54] y LAFON-LAFOURCADE [172, 174] han estudiado la influencia que el SO_2 libre y combinado tienen sobre el crecimiento de las bacterias. A partir de sus observaciones LAFON-LAFOURCADE establece que las dos formas, libre y combinada del SO_2 , tienen efecto inhibitor, y que el nivel de inhibición depende de la cepa bacteriana. Establecido pues, que las dos fracciones tienen poder inhibitor sobre el crecimiento y la fermentación maloláctica [174] muchos autores estudian el efecto que el SO_2 total tiene sobre estos dos fenómenos [54, 68, 199, 213, 218, 290]. Los resultados que nosotros hemos obtenido al ensayar cuatro concentraciones de SO_2 se exponen

en la Tabla 38. Las concentraciones escogidas cubren el rango de dosis que normalmente se emplean en la D.O. Utiel-Requena. Al no disponer de vino sin SO_2 , el efecto de las concentraciones crecientes de este producto se comparó con el que ejercen los 50 mg/l de SO_2 total que presenta el vino del ensayo control (Apartado 2.12 de este Capítulo). Todas las concentraciones de SO_2 se han probado en vino ajustado a pH 3.5, con lo cual evitábamos las variaciones en la concentración de SO_2 molecular [24, 54, 306]. Se analizó el desencadenamiento de la fermentación maloláctica durante 63 días observándose que solamente una de las cepas ensayadas, la cepa C43 era capaz de realizar la fermentación maloláctica a la concentración de 100 mg/l (Tabla 38) pero con un retraso de 47 días respecto al ensayo estándar. Esta inhibición tan drástica de la fermentación maloláctica puede explicarse porque las bacterias lácticas no producen acetaldehído, como las levaduras, capaz de combinar el SO_2 y de esta forma inactivarlo. Por ello, el efecto del SO_2 sobre cultivos puros de bacterias es mucho más marcado que sobre cultivos mixtos bacterias-levaduras. Si, como ocurre en nuestro caso, la adición de SO_2 se hace en un vino ya terminado y libre de levaduras, basta una sulfitación mínima para bloquear la intervención de la flora maloláctica [126]. El retraso de la fermentación maloláctica que se produce en la cepa C43 puede tener dos explicaciones. Una de ellas se basa en la posibilidad de que los 100 mg/l de SO_2 añadidos al vino no maten a las células, sino sólo las inactiven e impidan la fermentación maloláctica [119]. A lo largo del tiempo se produciría una pérdida de SO_2 total por evaporación y oxidación, lo que disminuiría la presión selectiva sobre las bacterias y posibilitaría que a un determinado nivel de concentración recuperasen su actividad y realizasen la fermentación maloláctica. Otra explicación posible es que los 100 mg/l de SO_2 en el vino matasen a la mayor parte de la población bacteriana dejando sólo unas pocas células resistentes a dicha concentración. Estas

Especie	Cepa	SO ₂ (mg/l)				
		50*	100	150	200	
<i>L. oenos</i>	171	+	-	-	-	
	172	+	-	-	-	
	T46	t	-	-	-	
	641	+	-	-	-	
	66	+	-	-	-	
	ML-34	i	-	-	-	
	M41	+	-	-	-	
	M42	+	-	-	-	
	<i>L. paranesenteroides</i>	C11	-	-	-	-
		M11	-	-	-	-
<i>L. fructivorans</i>	M43	-	-	-	-	
	B49	-	-	-	-	
<i>L. cellobiosus</i>	34	-	-	-	-	
<i>L. brevis</i>	33	-	-	-	-	
	35	-	-	-	-	
	36	-	-	-	-	
	37	-	-	-	-	
	38	-	-	-	-	
	T11	-	-	-	-	
	T12	-	-	-	-	
	<i>L. hilgardii</i>	32	+	-	-	-
		39	-	-	-	-
		91	-	-	-	-
93		-	-	-	-	
161		+	-	-	-	
162		+	-	-	-	
<i>L. plantarum</i>	163	+	-	-	-	
	B22	-	-	-	-	
	61	-	-	-	-	
	67	+	-	-	-	
	B11	-	-	-	-	
	B12	-	-	-	-	
	B13	-	-	-	-	
	22	-	-	-	-	
	Sp. no determinada	B44	-	-	-	-
		B31	-	-	-	-
B32		-	-	-	-	
B24		-	-	-	-	
M12		-	-	-	-	
Sp. no determinada	31	+	-	-	-	
	C43	+	+(47)	-	-	
	C45	+	-	-	-	

Tabla 39.- Efecto de la concentración de SO₂ total sobre la consecución de la fermentación maloláctica tras 63 días de incubación. *Ensayo estándar. "-" fermentación no realizada. "i" fermentación iniciada. "t" trazas de ácido málico. "+" fermentación maloláctica completa; entre paréntesis el tiempo en días que se retrasó la fermentación maloláctica respecto del tiempo que tardó en realizarse en el ensayo estándar.

células se multiplicarían en el vino hasta alcanzar una concentración celular suficiente para permitir la total degradación del ácido málico.

Es difícil hacer una comparación directa entre los estudios realizados por los diversos autores y los nuestros, ya que las condiciones experimentales, los microorganismos, la concentración de SO_2 y los métodos analíticos utilizados eran diferentes en cada caso. Sin embargo vamos a tratar de ofrecer una visión de los resultados obtenidos por los diferentes investigadores a lo largo del tiempo. FORNACHON [119] estudió el efecto que tenía el SO_2 libre y el combinado sobre el crecimiento de *Lactobacillus hilgardii*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus arabinosus* (sinónimo de *Lactobacillus plantarum*). Este autor encontró que *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus hilgardii* descomponen las combinaciones del acetaldehído con el SO_2 liberando SO_2 libre en el medio. Esto provocaba la inhibición del crecimiento en ambas especies. La inhibición era más acusada en *Leuconostoc mesenteroides* que en *Lactobacillus hilgardii*. Esto se debía a que *Lactobacillus hilgardii* era más resistente al SO_2 libre. *L. arabinosus* consumía menos acetaldehído y liberaba menos SO_2 , con lo cual resultaba menos afectado su crecimiento. LAFON-LAFOURCADE [172, 174, 189] estudió las acciones del SO_2 libre y combinado sobre la fermentación láctica de los azúcares, sobre el crecimiento, y sobre la viabilidad de las bacterias. Por otra parte, estudió el efecto inhibitor del SO_2 sobre la fermentación maloláctica, utilizando para ello elevadas concentraciones de células. El ensayo del efecto bactericida de ambas fracciones se realizó con las especies *Leuconostoc gracile*, *Pediococcus cerevisiae*, *Lactobacillus hilgardii* y *Streptobacterium*, y halló que eran muy sensibles al SO_2 libre. Los cocos presentaban mayor sensibilidad al SO_2 libre que los bacilos, mientras que el SO_2 combinado era más efectivo frente a *L. hilgardii* que frente a los cocos [189]. Esta sensibilidad de *L. hilgardii* frente al SO_2 combinado contrasta con los resultados de FORNACHON [119], en los cuales 42

ppm de SO_2 combinado (cantidad superior a la empleada por LAFON-LAFOURCADE) no disminuían apenas el crecimiento de este microorganismo. La diferencia entre los resultados de estos autores respecto a *L. hilgardii* puede explicarse en función de las distintas sensibilidades de las cepas ensayadas, o en función de los pHs empleados en los medios utilizados. LAFON-LAFOURCADE empleó un rango de pHs que iba de 3.0 a 3.4 [189], mientras que FORNACHON ensayó un pH de 4.2 [119]; esto puede hacer que la fracción molecular del SO_2 sea más importante en el primer caso que en segundo, y por ello la actividad antibacteriana también. LAFON-LAFOURCADE [189] estableció que tanto el SO_2 libre como el SO_2 combinado tenían efectos bactericidas, aunque la fracción combinada era de a 10 veces menos activa que la libre. El SO_2 , tanto en su forma libre como combinada, también provocó la inhibición de la fermentación de azúcares y del crecimiento bacteriano. En este último caso la adición de 20 mg/l de SO_2 libre disminuyó la población de bacterias en dos órdenes de magnitud, y posteriormente ésta comenzó a crecer con una tasa de crecimiento algo menor a la del medio sin SO_2 . El efecto que sobre la multiplicación celular tuvo la adición de SO_2 combinado fue una disminución de la tasa de crecimiento y de la población máxima [189].

El SO_2 libre y combinado provoca una inhibición de la fermentación maloláctica cuando se ensaya sobre células no proliferantes [189]. El umbral de sensibilidad varía según la concentración de células no proliferantes utilizada. Así, para una misma concentración de SO_2 combinado, la inhibición de la fermentación maloláctica es mayor si se utiliza 1 g/l de bacterias lácticas no proliferantes que si se utilizan 5 g/l [172]. El hecho de que LAFON-LAFOURCADE haya observado cierta actividad maloláctica al adicionar 100 mg/l de SO_2 combinado o libre al vino [189], nos ha planteado la cuestión de porqué en nuestros resultados no observábamos degradación maloláctica en esa misma concentración de SO_2

total. Este resultado puede explicarse pensando que la concentración celular empleada por nosotros fuera inferior a la empleada por esta autora en sus experiencias, por mayor sensibilidad de nuestras cepas o por la utilización de vinos con diferente fermentabilidad [174].

En España, las experiencias de IÑIGO et al. [153] nos informan que la adición de 30 mg/l de SO_2 a los vinos retrasa el crecimiento y la degradación del ácido málico en 5 días, mientras que dosis de 50 mg/l postergan la fermentación maloláctica de 30 a 35 días. Sin embargo, MARTINIÈRE et al. [218] han encontrado que 80 mg/l de SO_2 total no afectan demasiado al crecimiento bacteriano durante la vinificación tradicional, ni tampoco afecta a la velocidad con que se produce la fermentación maloláctica en relación a vinificaciones sin SO_2 . Sin embargo estos autores apuntaban que el efecto de los 80 mg/l de SO_2 total es bastante más acusado en la termovinificación [218].

El trabajo de MAYER sobre el efecto del pH y del SO_2 en el crecimiento de bacterias lácticas [221] expone que 100 mg/l de SO_2 combinado con acetaldehído inhibió totalmente el desarrollo de bacterias lácticas, incluso en ausencia total de SO_2 libre.

ROSSI y CLEMENTI [290] estudiaron el efecto de la concentración de SO_2 total sobre el crecimiento de *L. oenos*, *P. cerevisiae* y *Lactobacillus casei*. Este ensayo se llevó a cabo en medio sintético a base de jugo de uva y a pH 5. Los autores observaron que *Leuconostoc oenos* presentaba una inhibición completa del crecimiento a más de 25 ppm de SO_2 total, *Pediococcus cerevisiae* y *Lactobacillus casei* mostraron una inhibición mucho menos marcada a concentraciones de 150 y 200 ppm. En un estudio posterior CLEMENTI [68] investigó el efecto de distintas concentraciones de SO_2 sobre la actividad maloláctica de células no proliferantes libres o inmovilizadas. Los resultados de este trabajo muestran que concentraciones crecientes de SO_2 en el medio de cultivo no disminuían significativamente

la actividad maloláctica de las células no proliferantes, lo cual contrasta con los datos de LAFON-LAFOURCADE [172]. La diferencia en los resultados debe buscarse en que CLEMENTI utiliza inóculos 1000 veces más elevados que LAFON-LAFOURCADE y por ello el umbral de sensibilidad al SO_2 se eleva [69, 172]. CLEMENTI y VINTI [69] posteriormente sí observaron un efecto negativo de concentraciones crecientes de SO_2 en vino sobre la actividad maloláctica de *Leuconostoc oenos*, *Pediococcus cerevisiae* y *Lactobacillus casei*. Es posible que en esta ocasión empleasen inóculos más bajos o quizás la realización del ensayo en vino y no en medio sintético dé resultados distintos a los que encontraron un año antes.

LIU y GALLANDER [199] estudiaron cómo afectaba la concentración de sólidos solubles en el contenido en SO_2 de un vino, y qué efecto tenía esto en la consecución de la fermentación maloláctica. Estos autores llegan a la conclusión de que se acelera la fermentación maloláctica a mayor nivel de sólidos insolubles en el medio, debido a que estos últimos fijarían el SO_2 producido por las levaduras durante la fermentación alcohólica e impedirían que éste actuase sobre las bacterias lácticas. También establecen el efecto de distintas dosis de SO_2 sobre el crecimiento de *Leuconostoc oenos* PSU-1 inoculado en mosto-vino de 5° Brix a distintos pH [199]. Las conclusiones que se desprenden de este trabajo es que el efecto negativo del SO_2 sobre el crecimiento se ve incrementado a pH inferiores a 3.5 siendo bastante similares los efectos a pH 3.5 y 3.7. A pH 3.3 la adición de 50 y 75 ppm provocaba una caída drástica de la población de cinco órdenes de magnitud, desde 10^7 a 10^2 . Sin embargo, a pH 3.5 estas mismas dosis sólo provocan una caída de dos o tres órdenes de magnitud. De igual manera a menor concentración de SO_2 en el medio mayor rapidez en la consecución de la fermentación maloláctica.

A pesar del carácter heterogéneo de toda esta información, hay ciertos hechos que han sido comprobados por varios autores, por lo que pueden

generalizarse. Así varios autores han encontrado una mayor sensibilidad al SO_2 de los cocos frente a los bacilos [119, 189, 290]. También es un hecho comprobado por muchos investigadores que tanto el SO_2 libre como el SO_2 combinado, afectan negativamente (aunque con distintos grados de inhibición) al desarrollo, a la fermentación de azúcares y a la fermentación maloláctica de las bacterias lácticas [86, 119, 174, 189]. Tanto LAFON-LAFOURCADE [174] como CLEMENTI y VINTI [69] han encontrado que el efecto negativo del SO_2 sobre la actividad maloláctica de grandes inóculos de células libres o inmovilizadas, es tanto menor cuanto mayor es la concentración celular en el inóculo. Por último, es bien conocido el efecto sinérgico del pH y del SO_2 ; muchos autores han comprobado la potenciación del efecto del SO_2 a pHs bajos [54, 68, 69, 189, 200]. No se pueden establecer de forma general cuáles son los niveles de SO_2 que provocan la inhibición de la fermentación maloláctica a partir de los resultados citados en la bibliografía, ya que éstos dependen de la metodología seguida por cada autor y de las cepas ensayadas. En el caso de que el investigador pretenda seleccionar cepas resistentes al SO_2 con fines prácticos, deberá ensayar estas resistencias en los medios en los que pretenda inocular posteriormente, y a los pHs originales de ese medio. Siguiendo esta metodología, nosotros hemos encontrado que la inoculación de bacterias lácticas directamente de un medio de cultivo rico a un vino con 100 mg/l de SO_2 , inactivaba la capacidad maloláctica de las mismas.

3.2.3.- INFLUENCIA DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE ETANOL EN VINO SOBRE LA FERMENTACION MALOLACTICA.

Otro de los parámetros que afectan a la capacidad de crecimiento, a la viabilidad de las células, y a la fermentación maloláctica, es el etanol.

Es de todos conocido el efecto antiséptico de este producto y el efecto inhibidor que éste ejerce sobre las bacterias lácticas.

La resistencia de las bacterias lácticas al etanol varía según las cepas, siendo esta resistencia por regla general mucho mayor en aquellas cepas aisladas de vinos que en las aisladas de uvas o mostos, aunque existen excepciones. Ya expusimos en el Capítulo anterior que a lo largo de nuestros muestreos se aislaron cepas en momentos avanzados de la fermentación alcohólica que eran incapaces de crecer con 10% (v/v) de etanol.

PEYNAUD [238] informa que una concentración del 6% (v/v) de etanol disminuye la concentración de bacterias lácticas en un 22%, mientras que un 10% de alcohol la reduce en un 40%. Hasta un nivel de 11° alcohólicos las células bacterianas se ven inhibidas pero permanecen vivas. Por encima de esta concentración sólo unas pocas células son capaces de sobrevivir [282]. Los trabajos de MARET y SOZZI [211, 212] nos muestran que el crecimiento en presencia de cantidades del 10% de etanol era bastante general entre las bacterias lácticas que ellos aislaron, pero cuando se elevaba la concentración al 15%, muchas cepas de *L. brevis* y algunas de *P. cerevisiae* y *L. hilgardii* eran incapaces de crecer. RIBÉREAU-GAYON [282] e IÑIGO *et al.* [153], observaron mayor resistencia en los bacilos que en los cocos a elevadas concentraciones de etanol. PEYNAUD [238] nos muestra que un 6% de etanol disminuye la fermentación maloláctica en una proporción que varía del 6 al 11%, y un 10% de etanol lo hace del 13 al 30%, siendo las más afectadas las bacterias heterofermentativas.

Nosotros no hemos realizado en este estudio una evaluación de cómo el etanol afecta al crecimiento, sino de cómo afecta a la actividad maloláctica de células no proliferantes inoculadas en vino. Los resultados obtenidos nos muestran (Tabla 39) que de las 16 cepas capaces de realizar la fermentación maloláctica en el ensayo control (12° alcohólicos), 8

Especie	Cepa	Grado alcohólico					
		12*	13	14	15	16	20
<i>L. oenos</i>	171	+	-	-	-	-	-
	172	+	-	-	-	-	-
	T46	i	-	-	-	-	-
	641	+	+	+	+	+	-
	66	+	-	-	-	-	-
	ML-34	nc	-	-	-	-	-
	M41	+	+	+	+	+	-
	M42	+	+	+(7)	+(7)	+(7)	-
<i>L. paranesenteroides</i>	C11	-	-	-	-	-	-
	M11	-	-	-	-	-	-
<i>L. fructivorans</i>	M43	-	-	-	-	-	-
	B49	-	-	-	-	-	-
<i>L. cellobiosus</i>	34	-	-	-	-	-	-
<i>L. brevis</i>	33	-	-	-	-	-	-
	35	-	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	-	-	-
	38	-	-	-	-	-	-
	T11	-	-	-	-	-	-
	T12	-	-	-	-	-	-
	<i>L. hilgardii</i>	32	+	-	-	-	-
39		-	-	-	-	-	-
91		-	-	-	-	-	-
93		-	-	-	-	-	-
161		+	+	+	+	+	-
162		+	-	-	-	-	-
163		+	+(7)	+(14)	nr	nr	-
B22		-	-	-	-	-	-
61		-	-	-	-	-	-
67		+	+(8)	+(8)	+(21)	+(42)	-
<i>L. plantarum</i>	B11	-	-	-	-	-	-
	B12	-	-	-	-	-	-
	B13	-	-	-	-	-	-
	22	-	-	-	-	-	-
Sp. no determinada	B44	-	-	-	-	-	-
	B31	-	-	-	-	-	-
	B32	-	-	-	-	-	-
	B24	-	-	-	-	-	-
	M12	-	-	-	-	-	-
	31	+	+	t	-	-	-
C43	+	+	+(2)	+(2)	+(10)	-	
C45	+	-	-	-	-	-	

Tabla 39.- Efecto de distintas concentraciones de etanol en vino sobre la consecución de la fermentación maloláctica tras 60 días de incubación. *Ensayo estándar. "-" fermentación no realizada. "i" fermentación iniciada. "nc" fermentación avanzada. "t" trazas de ácido málico. "+" fermentación maloláctica completa; entre paréntesis el tiempo en días que se retrasó la fermentación maloláctica respecto del tiempo que tardó en realizarse en el ensayo estándar. "nr" experiencia no realizada.

podían efectuarla a 13° y 14°, mientras que seis la llevaron a cabo con concentraciones del 16% de etanol; ninguna de ellas fue capaz de degradar el ácido L-málico a L-láctico con 20° de etanol en vino.

Las cepas capaces de realizar la fermentación maloláctica a elevadas concentraciones de etanol pertenecían a las especies *L. oenos*, *L. hilgardii* y al grupo de cepas que no pudimos adscribir a ninguna especie. Este resultado entra dentro de lo esperado, ya que tanto *L. oenos* como *L. hilgardii* son especies que se aíslan de vinos [248], siendo varios los autores que han informado de la elevada resistencia de *L. hilgardii* al etanol [47, 211, 212]. Sin embargo, en nuestro caso no todas las cepas de esas especies fueron capaces de realizar la fermentación maloláctica por encima de los 12° alcohólicos. Esta variabilidad entre cepas ya ha sido observada por MARET y SOZZI [211, 212]. En dos cepas de *Leuconostoc oenos* no hemos observado retraso de la fermentación maloláctica cuando se ensayaban concentraciones superiores a los 12° alcohólicos. Estos datos, en principio, contrastan con los de LAFON-LAFOURCADE [174], quien encuentra que a mayor concentración de etanol, disminuye la tasa de fermentación maloláctica. Pero si observamos los resultados expuestos por ella en un trabajo anterior [172], podemos ver que si el inóculo es lo suficientemente elevado, el efecto que el etanol posee sobre la actividad maloláctica de la células es bastante menor. Es posible que la concentración de células empleada por nosotros haya sido lo suficientemente grande, en el caso de *Leuconostoc oenos*, como para no observar el efecto inhibitor de las altas concentraciones de etanol sobre la fermentación maloláctica en estas dos cepas. Sin embargo, con la cepa M42, hemos observado un retraso de 7 días en la realización de la fermentación maloláctica respecto al ensayo control cuando la concentración de etanol sobrepasaba los 13° alcohólicos. Evidentemente esta cepa necesitaba mayor concentración celular para no ver afectada su capacidad maloláctica por encima de los 12° alcohólicos. Hemos

podido observar los mismos comportamientos dentro de la especie *Lactobacillus hilgardii*, donde dos cepas (163 y G7) tardaban más tiempo en completar la fermentación maloláctica conforme aumentaba la concentración alcohólica; sin embargo la cepa 161 no se veía afectada por cantidades crecientes de etanol, realizando la fermentación maloláctica en el mismo intervalo de tiempo que en el ensayo control. Dentro del grupo de cepas no adscritas a ninguna especie, la cepa 31 fue capaz de realizar la fermentación maloláctica a 13° y 14° alcohólicos, pero en este último caso no pudo completarla totalmente. La cepa C43 realizó la fermentación maloláctica hasta los 16° alcohólicos, pero el tiempo que tardó en completarla aumentó en función del incremento en la concentración de alcohol.

Como resumen de estas observaciones diremos que el etanol ejerce una acción inhibitoria de la fermentación maloláctica, como ya ha sido demostrado por varios autores [172, 174, 211, 212, 238], pero el efecto de este producto sobre la actividad de grandes inóculos de células no proliferantes, está en función de la concentración celular en ese inóculo [174]. Podríamos pensar que cada cepa presenta una concentración celular distinta a la cual cantidades crecientes de etanol no afectan a la duración de la fermentación maloláctica.

Un hecho que merece especial atención es que las cepas 161 y G7, que han mostrado ser capaces de realizar la fermentación maloláctica con un 16% de etanol en vino, son incapaces de crecer en medio sintético con un 10% de etanol. En este caso podemos observar la disociación que existe entre el efecto del etanol sobre el crecimiento y sobre la actividad maloláctica de células no proliferantes. El que el crecimiento de las células sea más sensible al etanol que la actividad maloláctica ha sido comprobado por LAFON-LAFOURCADE [174] y por PEYNAUD [238]. No se dispone de mucha bibliografía sobre los mecanismos de inhibición del etanol sobre bacterias

lácticas, pero basándonos en el extenso trabajo de CASEY e INGLEDEW [59] sobre su efecto en levaduras, podemos pensar que de igual manera que actúa sobre vías metabólicas de levaduras, también actuaría sobre los de las bacterias lácticas. Si los efectos que se producen en levaduras (ver Apartado 3.2.4 del Capítulo II) son extrapolables a bacterias lácticas, puede explicarse fácilmente que el etanol afecte más a la tasa de crecimiento que a la tasa de fermentación maloláctica, ya que el número y la sensibilidad de los procesos afectados por el etanol que intervienen en el crecimiento es mayor. La actividad maloláctica se vería de esta forma alterada por la inhibición de aquellos enzimas que intervienen en la misma [344].

3.2.4.- INFLUENCIA DE DISTINTAS TEMPERATURAS SOBRE LA FERMENTACION MALOLACTICA.

La importancia de este factor sobre la multiplicación bacteriana y sobre la evolución de las fermentaciones lácticas es bien conocida. La mayoría de las bacterias no pueden crecer más que en un estrecho rango de temperaturas, y dentro de esta zona la temperatura actúa sobre la velocidad de crecimiento, sobre la velocidad de las transformaciones metabólicas, y también sobre las necesidades nutricionales [282]. Las bacterias lácticas de vinos son mesófilas [282]. Las temperaturas óptimas de crecimiento, según KUNKEE, para las especies del género *Leuconostoc* está entre 20 y 25°C, para *Pediococcus cerevisiae* entre 25 y 32°C, y para las especies de *Lactobacillus* de 28°C a 37°C [166]. Respecto al efecto de la temperatura sobre la fermentación maloláctica, BENDA [31] afirma que el rendimiento del proceso es mayor a 20-25°C, mientras que LAFON-LAFOURCADE establece que la temperatura óptima de fermentación del ácido málico es de 35°C para

Leuconostoc gracile [172]. Según esta última autora, la actividad maloláctica aumenta con la temperatura [174]. Sin embargo, los resultados que hemos obtenido con nuestras cepas (Tabla 40) no siempre siguen esta regla. Si establecemos como referencia el tiempo que tarda en realizarse la fermentación maloláctica a 25°C, observamos que la actividad de las células no proliferantes en vino no se ve disminuida en la mayor parte de los casos por temperaturas más bajas; es más, a ciertas cepas son incapaces de realizar la fermentación maloláctica en el ensayo control, una disminución de temperatura las capacita para efectuarla. Este es el caso de las cepas B24, B31, B32, B44, B49, M12 y T11, y de todas las cepas de *L. plantarum*.

Dentro de la especie *Leuconostoc oenos* la disminución de la temperatura de 25 a 18°C no alteró para nada el tiempo que tarda en realizarse la fermentación maloláctica en tres de las cepas de esta especie; una temperatura de 15°C fue capaz de reducir este tiempo de 4 a 19 días respecto al que demoró a 25°C. Una temperatura de 10°C aceleró la fermentación maloláctica en 5 de las 8 cepas, no afectó la fermentación maloláctica de la cepa ML-34, y disminuyó la actividad maloláctica de otras dos cepas.

En el caso de *L. hilgardii* sólo una cepa aumentó la rapidez de la fermentación maloláctica a 22°C; el resto no se vio afectado por esta temperatura, pero temperaturas más bajas retrasan o impiden que se complete la fermentación maloláctica. En cuanto a *L. plantarum*, tres cepas fueron capaces de realizar la fermentación maloláctica a 22°C, a pesar de que no consiguieron efectuarla a 25 en el ensayo control (Tabla 40), mientras que otra (B13) la llevó a cabo en un rango más amplio de bajas temperaturas (desde 15 a 22°C). En el grupo de cepas no adscritas a ninguna especie, 5 de las 8 fueron capaces de completar la fermentación maloláctica a 15, 18 y 22°C (Tabla 40), pero no a 25 ni a 10°C. Para las tres cepas restantes de este grupo que pudieron realizar la fermentación maloláctica a 25°C en el

Especie	Cepa	Temperatura (°C)				
		10	15	18	22	25*
<i>L. oenos</i>	171	nc	+	+	+	+
	172	+(-7)	+(-19)	+	+	+
	T46	i	+	+	+	+
	G41	+(-7)	+(-4)	+	+	+
	G6	+(-14)	+(-19)	+	+	+
	ML-34	nc	+	+	+	nc
	M41	+(-25)	+	+	+	+
	M42	+(-25)	+	+	+	+
<i>L. paranesenteroides</i>	C11	nr	nr	nr	nr	-
	M11	-	-	-	-	-
<i>L. fructivorans</i>	M43	-	-	-	-	-
	B49	i	+	-	-	-
<i>L. cellobiosus</i>	34	-	-	-	-	-
<i>L. brevis</i>	33	-	-	-	-	-
	35	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	-	-
	38	-	-	-	-	-
	T11	-	nc	+	nc	-
	T12	-	-	-	-	-
	T12	-	-	-	-	-
<i>L. hilgardii</i>	32	+(21)	+(14)	+(7)	+	+
	39	-	-	-	-	-
	91	-	-	-	-	-
	93	-	-	-	-	-
	161	nr	nr	+(42)	+(-7)	+
	162	nc	t	t	+	+
	163	nc	t	+(42)	+	+
	B22	-	-	-	-	-
	61	-	-	-	-	-
	67	nr	nr	+	+	+
<i>L. plantarum</i>	B11	-	-	-	+	-
	B12	-	-	-	+	-
	B13	-	+	+	+	-
	22	-	-	-	+	-
Sp. no determinada	B44	-	+	+	+	-
	B31	-	+	+	+	-
	B32	-	+	+	+	-
	B24	-	+	+	+	-
	M12	-	+	+	+	-
	31	+(12)	+(2)	+	+	+
	C43	+(17)	+(2)	+	+	+
C45	+(21)	+(2)	+	+	+	

Tabla 40.- Efecto de distintas temperaturas sobre la consecución de la fermentación maloláctica tras 63 días de incubación. *Ensayo estándar. "-" fermentación no realizada. "i" fermentación iniciada. "nc" fermentación avanzada. "t" trazas de ácido málico. "+" fermentación maloláctica completa; entre paréntesis el tiempo en días que se retrasó (cifras positivas) o adelantó (cifras negativas) la fermentación maloláctica respecto al tiempo que tardó en realizarse en el ensayo estándar. "nr" experiencia no realizada.

ensayo control, una disminución de temperatura hasta 18°C no afectó ni positiva ni negativamente la duración de la fermentación maloláctica. Sin embargo por debajo de los 18°C la fermentación maloláctica se retrasó conforme disminuía la temperatura. A pesar de que la mayoría de los autores afirman que la disminución de la temperatura frena la velocidad de la fermentación maloláctica [31, 166, 175], no hay que confundir el efecto sobre el crecimiento (y consiguientemente sobre la duración de la fermentación maloláctica), con el efecto sobre la fermentación maloláctica en sí misma. Es cierto que la disminución de la tasa de crecimiento que se obtiene con bajas temperaturas provoca el enlentecimiento de la fermentación maloláctica, pero no está tan claro que la fermentación maloláctica por sí misma se vea disminuida. La información que nos proporciona LAFON-LAFOURCADE [172] sobre la disminución de la actividad maloláctica a temperaturas bajas es muy parcial, ya que sólo ha ensayado una cepa de la especie *Leuconostoc gracile*, y además realiza la experiencia en un medio sintético a un pH superior al nuestro y sin SO₂ ni etanol en el mismo. En estas circunstancias la disminución de temperatura sólo presenta un efecto negativo, ya que al no existir en el medio ningún tipo de inhibidores la disminución de temperatura no representa ninguna ventaja. KUNKEE [166] afirma que hay que ser cautelosos al asumir que temperaturas más bajas provocan cambios en las tasas de fermentación maloláctica y de crecimiento. A pesar de que la disminución de temperatura provoca un decrecimiento en la velocidad de las reacciones bioquímicas, ciertos autores piensan que este efecto negativo se compensa en el vino porque a bajas temperaturas los efectos inhibidores del alcohol, del SO₂ y del bajo pH se ven frenados [31, 126]. Sin embargo no hay un acuerdo total respecto al efecto negativo o positivo de la baja temperatura sobre la fermentación maloláctica del vino. Otros autores piensan que las bajas temperaturas potencian el efecto negativo del etanol y el SO₂ [175, 344]. De aquí que no

esté muy clara la influencia que la temperatura ejerce sobre la fermentación maloláctica; posiblemente dependerá de los medios y las cepas que se ensayen. A partir de nuestros resultados podemos afirmar que hemos encontrado tanto cepas cuya fermentación maloláctica se vió frenada por la disminución de temperatura (Tabla 40), como cepas en las que la degradación del ácido málico se aceleró. El hecho de que *L. oenos* se vea más beneficiada por la disminución de temperatura que otras especies, es posible que se deba a que el rango de temperaturas óptimas de crecimiento para esta especie es de 18 a 24°C, mientras que *L. hilgardii* y *L. plantarum* tienen óptimos entre 30-35°C [47]. El efecto negativo generalizado de la disminución de la temperatura en los microorganismos es menos drástico para aquellas especies con cifras óptimas menores que para las de óptimos más elevados, mientras que el efecto positivo que supone la temperatura en la disminución de la acción inhibidora del pH, SO₂ y etanol es semejante para toda las cepas. Dependiendo del grado de inhibición que ejerzan los componentes del vino sobre cada cepa, la disminución de la temperatura mejorará en mayor o menor grado la actividad maloláctica de las mismas. Cuando la disminución de la temperatura es tal que los posibles efectos positivos que genera [126] quedan superados por los negativos, la fermentación maloláctica se retrasará, y posiblemente ésto sea lo que han observado los autores que afirman que la disminución de la temperatura provoca un descenso en la tasa de la fermentación maloláctica [175, 282].

3.2.5.- INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE CO₂ SOBRE LA FERMENTACION MALOLACTICA.

La influencia que tiene la aireación sobre las bacterias lácticas es muy discutida. Las bacterias lácticas aisladas de vinos son anaerobias

facultativas o microaerófilas [282]. Ciertos autores opinan que la aireación facilita el desarrollo bacteriano [282], mientras que otros afirman que *Leuconostoc oenos*, microorganismo asociado estrechamente a la fermentación maloláctica, es incapaz de crecer aeróbicamente en medio sólido [133].

Varios autores han estudiado también el efecto estimulador que el CO_2 tiene para ciertas bacterias lácticas. Así MAYER encontró que las especies del género *Leuconostoc* requerían CO_2 para su desarrollo [31]. Este autor encontró que las especies de *Leuconostoc* no crecían en aire sin CO_2 o en una atmósfera de nitrógeno puro, mientras que se observaba un fuerte crecimiento en una atmósfera de $\text{N}_2 + 10\%$ (v/v) de CO_2 [31]. Los trabajos de STAMER y STOYLA [325] sobre *Leuconostoc citrovorum* ML-34 (hoy *Leuconostoc oenos* ML-34) muestran que concentraciones crecientes de CO_2 en la atmósfera de cultivo actúan sobre el desarrollo de esta cepa disminuyendo la fase de latencia, aunque la tasa de crecimiento no se veía afectada durante la fase exponencial. También variaba la carga máxima del cultivo, ya que la incubación con aire producía un 20% menos de masa celular que la incubación con CO_2 . Estos autores afirman que la atmósfera más adecuada para el crecimiento de *L. citrovorum* es aquella que contiene un 100% de CO_2 , mientras que atmósferas de H_2 o de N_2 puros eran menos favorables que una atmósfera de aire normal. Por esta causa afirman que la anaerobiosis no es un requerimiento para su crecimiento [325].

Para el aislamiento de bacterias del ácido láctico, se han empleado frecuentemente la anaerobiosis [183] y atmósferas enriquecidas en CO_2 [343], y se ha encontrado que los requerimientos óptimos de CO_2 dependen de cada cepa [323]. Este es un hecho que también hemos podido comprobar en nuestras experiencias. Si estudiamos la Tabla 41 veremos que en general el CO_2 actúa como estimulador de la fermentación maloláctica. Concentraciones de hasta el 50% de CO_2 en la atmósfera de cultivo normalmente aceleran la

fermentación maloláctica, mientras que concentraciones superiores o no la afectan o la retrasan. En el caso de *Leuconostoc oenos* todas las cepas ven adelantada la realización de la fermentación maloláctica en periodos que van de 2 a 14 días. La cepa ML-34, que en las condiciones de ensayo control se reveló incapaz de completar la fermentación maloláctica, la llevó a cabo sin ninguna dificultad al aumentar la proporción de CO_2 en la atmósfera. En ninguna de las cepas se observó una relación directa entre la aceleración de la fermentación maloláctica y el progresivo incremento del CO_2 . Ya hemos hablado de que el CO_2 facilita el crecimiento de las bacterias lácticas al acortar el tiempo de latencia [325] y por tanto acelera la fermentación maloláctica; sin embargo este efecto no puede apreciarse cuando se trabaja con células no proliferantes, ya que en ellas no se da crecimiento. A partir de los resultados obtenidos con *Leuconostoc oenos* (Tabla 41), no podemos afirmar que la actividad del enzima maloláctico se vea potenciada por cantidades crecientes de CO_2 , ya que el tiempo de aceleración de la fermentación maloláctica fue el mismo en todas las concentraciones ensayadas. Las cepas de *Leuconostoc fructivorans* incapaces de realizar la fermentación maloláctica en condiciones standard lograron acabar la casi totalidad del ácido L-málico en el vino al someterlo a atmósferas con 25 y 50% de CO_2 . En la especie *L. brevis* ninguna cepa fue capaz de llevar a cabo la fermentación maloláctica en condiciones standard; el enriquecimiento de la atmósfera en CO_2 , en general, tiene poco efecto sobre estas cepas: no en vano parece que se desarrollan mejor en condiciones aeróbicas [323]. Sin embargo una cepa de esta especie ve potenciada su actividad maloláctica en atmósfera de CO_2 , con una concentración óptima del 25%; concentraciones mayores de CO_2 son menos efectivas. En la especie *L. hilgardii* también notamos el efecto beneficioso del CO_2 . Las concentraciones que favorecen más la fermentación maloláctica son 25 y 50%, y cantidades superiores o no afectan la rapidez del fenómeno o lo retardan. Dentro de *L. plantarum*

Especie	Cepa	Concentración de CO ₂ (% v/v)				
		A*	25	50	75	100
<i>L. oenos</i>	171	+	+(-14)	+(-14)	+(-14)	+(-14)
	172	+	+(-7)	+(-7)	+(-7)	+(-7)
	T46	+	+(-2)	+(-2)	+(-2)	+(-2)
	641	+	+(-6)	+(-6)	+(-6)	+(-4)
	66	+	+(-4)	+(-4)	+(-4)	+
	ML-34	i	+	+	+	+
	M41	+	+(-7)	+(-7)	+(-7)	+(-7)
	M42	+	+(-4)	+(-4)	+(-4)	+(-4)
<i>L. paraesenteroides</i>	C11	-	-	-	-	-
	M11	-	-	-	-	-
<i>L. fructivorans</i>	M43	-	-	-	-	-
	B49	-	t	t	-	-
<i>L. cellobiosus</i>	34	-	-	-	-	-
<i>L. brevis</i>	33	-	-	-	-	-
	35	-	-	-	-	-
	36	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	-	-
	38	-	-	-	-	-
	T11	-	+	nc	nc	nc
	T12	-	-	-	-	-
	T12	-	-	-	-	-
<i>L. hilgardii</i>	32	+	+(-38)	+(-38)	+	+
	91	-	-	-	-	-
	93	-	-	-	-	-
	161	+	+(-35)	+(-43)	+(7)	+(7)
	162	+	+(-35)	+(-50)	+	+
	163	+	+(-50)	+(-43)	+	+
	B22	-	-	-	-	-
	G1	-	nr	nr	-	+
67	+	+(-10)	+(-10)	+	+	
<i>L. plantarum</i>	B11	+	+	+	t	-
	B12	-	+	+	t	-
	B13	-	+	+	+	-
	22	-	+	+	-	-
Sp. no determinada	B44	-	+	+	-	-
	B31	-	+	+	-	-
	B32	-	+	+	-	-
	B24	-	+	+	-	-
	M12	-	+	+	-	-
	31	+	+	+	+	+
	C43	+	+	+	+	+
	C45	+	+(-2)	+(-2)	+	+

Tabla 41.- Efecto de distintas concentraciones de CO₂ en la atmósfera de incubación sobre la consecución de la fermentación maloláctica tras 63 días. *Ensayo estándar. "-" fermentación no realizada. "i" fermentación iniciada. "nc" fermentación avanzada. "t" trazas de ácido málico. "+" fermentación maloláctica completa; entre paréntesis el tiempo en días que se retrasó (cifras positivas) o adelantó (cifras negativas) la fermentación maloláctica respecto al tiempo que tardó en realizarse en el ensayo estándar. "nr" experiencia no realizada.

encontramos un efecto beneficioso del CO₂ al ensayar concentraciones que van del 25 al 75%, aunque esta última fue menos eficaz que las dos anteriores. Dentro del grupo de cepas no asignadas a ninguna especie, existen dos subgrupos de comportamientos muy homogéneos entre ellos. Las cepas B24, B31, B32, B44 y M12, incapaces de realizar la fermentación maloláctica en condiciones standard, la llevaron a cabo en atmósferas con 25 y 50% de CO₂; estas atmósferas fueron también las más favorables para C45, ya que adelantaron la fermentación maloláctica dos días, mientras que para las cepas C43 y 31 el aumento de la concentración de CO₂ en la atmósfera ni las perjudicó ni las benefició.

El modo en que el CO₂ actúa sobre las cepas acelerando o retrasando la velocidad de la fermentación maloláctica es algo sobre lo cual no tenemos referencias. Los autores que han estudiado la influencia del CO₂ sobre las bacterias lácticas (MAYER [31] y STAMER y STOYLA [325]), han caracterizado el efecto de este compuesto sobre el crecimiento pero no sobre la actividad maloláctica. STAMER y STOYLA no han podido explicar la actuación del CO₂ sobre los mecanismos que regulan la duración de la fase de latencia [325]. A partir de los datos obtenidos en este trabajo no podemos deducir cuál es la manera en que el CO₂ afecta a la rapidez de la fermentación maloláctica.

Si observamos la Tabla 33 veremos que la atmósfera anaeróbica compuesta de N₂ + 10% de CO₂ provoca una aceleración de la degradación del ácido L-málico en dos especies principalmente, *L. oenos* y *L. hilgardii*, cuando se cultivan en medio sintético. Esta aceleración puede deberse al acortamiento de la fase de latencia del crecimiento en ese medio sintético, de manera que en medio con CO₂ las células inoculadas comienzan su crecimiento y metabolismo más rápidamente que las que están en ambiente aerobio, y por ello es más rápida la degradación del ácido L-málico. Cuando el ensayo se realiza en vino, no podemos explicar que la disminución del tiempo necesario para la eliminación del ácido málico se deba al

acortamiento de la fase de latencia, ya que en este medio previamente a la fase de latencia hay otra de muerte muy acusada [113, 199]. Es posible que la presencia de CO_2 en el vino tenga un efecto amortiguador de esta muerte, y por ello acelere la fermentación maloláctica respecto a los ensayos estandar. Sin embargo no todas las concentraciones de CO_2 tendrían un efecto amortiguador beneficioso: para ciertas cepas, determinadas concentraciones de CO_2 podrían provocar una muerte todavía mayor que las condiciones aerobias, y ésto explicaría un retraso en la degradación del ácido L-málico. Si la velocidad de la fermentación maloláctica no se ve alterada es porque posiblemente el CO_2 no tenga efecto amortiguador para esa cepa, o que las condiciones del medio sean tan desfavorables que no puedan ser remontadas superadas ni siquiera mediante la adición de CO_2 . De hecho existen cepas que no dan nunca la fermentación maloláctica en vino a lo largo de los ensayos; posiblemente alguno de los factores, o grupo de factores juntos, es tan insuperable para ellas que ni una disminución de la temperatura, ni un incremento en CO_2 , ni un aumento del pH logran que se realice la fermentación maloláctica en vino, aunque en medio sintético sí que fueron capaces de degradar el ácido L-málico; sin embargo, otras cepas sí han sido capaces de desarrollar la fermentación maloláctica al variar alguno de estos valores.

3.3.- OBSERVACION DEL CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS EN VINO.

Una vez probada la capacidad de degradación del ácido L-málico por nuestras cepas y la influencia del pH, SO_2 , etanol, temperatura, y CO_2 sobre el desencadenamiento de la fermentación maloláctica, nos quedaba por averiguar si estas cepas eran capaces de crecer en vino con pHs bajos

cuando se inoculaban directamente a partir de un medio de cultivo sintético. Para observar este crecimiento ensayamos varios métodos de recuento ya definidos en el Apartado 2.13 de este Capítulo.

3.3.1.- ELECCION DEL SISTEMA DE RECUESTO A EMPLEAR.

La realización de las pruebas de crecimiento en vino nos hizo plantearnos qué método de recuento sería el más adecuado para detectar el desarrollo de los microorganismos en vino. Se ensayaron dos métodos de recuento directos: el recuento microscópico y el recuento mediante contador automático de partículas; también se siguió el crecimiento de los microorganismos sembrados en vino mediante medidas espectrofotométricas; por último se realizó un recuento de células viables.

En primer lugar intentamos seguir la evolución de las poblaciones de bacterias lácticas mediante la realización de recuentos microscópicos de células totales, empleando para ello la cámara de THOMA. Este método fue rápidamente abandonado por resultar difícil y falto de rigor, ya que el tamaño sumamente pequeño de algunas especies (*L. oenos*, *L. brevis*, etc.) y las agrupaciones de células que presentaban las mismas en parejas y cadenas, hacía muy dificultosa la delimitación de cada célula, con lo cual se falseaban los resultados. Las dificultades de este método ya han sido comentadas por RIBÉREAU-GAYON [282]. Seguidamente se pasó a utilizar el contador automático de partículas "Coulter Counter ZM". Para contar bacterias se requiere el uso de aperturas muy pequeñas; nosotros empleamos un tubo con apertura de 30 μ m de diámetro, y las dificultades residían en que dado el pequeño tamaño del orificio de entrada de partículas, éste se bloqueaba constantemente con las impurezas del electrolito y con los agregados celulares, impidiendo el flujo continuo de la solución con la

suspensión bacteriana. Este hecho no sólo hacía perder mucho tiempo durante los recuentos, sino que también introducía frecuentes errores en el conteo. Pero no fue la única dificultad que encontramos en este sistema: dado el pequeño tamaño de nuestras bacterias, al establecer los límites de tamaños entre los que el aparato debía contar, podíamos caer en el error de dejar fuera de los límites a la población de células más pequeñas, o bien contar como células algunas partículas en suspensión o "ruido de fondo". Otra desventaja adicional, al no tratarse de células aisladas sino que largas cadenas en la mayoría de los casos, es que tampoco eran correctamente procesadas por el contador de partículas. Por estos motivos tuvimos que desechar también este método de recuento.

Seguidamente se intentó el estudio del crecimiento de bacterias lácticas en vino utilizando medidas espectrofotométricas, observando el incremento de la absorbancia a 650 nm con cubetas de 0.1 cm de paso de luz. Este método a primera vista resultaba además atractivo por su facilidad de manejo y la rapidez en la obtención de resultados. Sin embargo tampoco nos fue útil ya que debido al medio de cultivo que empleábamos (vino) y a la gran duración de las incubaciones, el color del vino se alteraba por oxidación de sus compuestos coloreados, e incluso se producían precipitaciones. Estas variaciones de color desvirtuaban las medias espectrofotométricas, a pesar de que siempre se comparaban las lecturas con vinos sin inocular sometidos a las mismas condiciones que el resto de los tubos sembrados. Los vinos inoculados siempre presentaban un mayor grado de oxidación que los controles sin inocular. Tampoco se consideró que éste fuera un buen método para estudiar el crecimiento de las bacterias lácticas en vino.

Ante estas dificultades optamos por realizar un recuento de células viables en placas de agar MRS o MLO. Para utilizar este sistema había que asumir previamente dos fuentes de error: un problema es que dado que las

células se agrupan en cadenas o en parejas, la premisa de que una colonia viene formada por una célula no se cumple en todos los casos; otro problema es que algunas células realmente viables no llegan a multiplicarse y formar colonias [282]. A pesar de estas fuentes de error y de ser un método trabajoso y lento en la obtención de resultados, fue el que mejor respondió a las características del ensayo de crecimiento en vino. De hecho muchos autores lo han empleado para observar la dinámica de las poblaciones lácticas en vino [72, 91, 234] y en medio sintético [335].

Una vez pues que se evaluó la validez de cada uno de estos métodos, escogimos el recuento de viables en placa para seguir la evolución de los inóculos en vino.

3.3.2.- CRECIMIENTO DE LAS DISTINTAS CEPAS EN VINO.

Para realizar el ensayo de crecimiento en vino, de entre las 47 cepas aisladas se eligieron aquellas representantes de cada una de las especies que eran más activas en la degradación del ácido málico. En el caso de *Leuconostoc oenos* y del grupo de especies no identificadas se ensayaron todas las cepas, puesto que podían presentar interés a la vista de los resultados obtenidos previamente.

A pesar de que la fermentación maloláctica espontánea se produce a consecuencia de la proliferación de parte de la microflora asociada a las uvas y al equipo de bodega [31, 166, 175, 179, 185, 238, 245, 301, 341, 344], las condiciones que rigen esta proliferación son difíciles de controlar. Es por ello que la fermentación maloláctica continúa siendo un proceso bastante aleatorio. De aquí el interés que despierta el poder controlar las condiciones adecuadas para provocar, o en su caso evitar, el desencadenamiento de la fermentación maloláctica.

La potenciación de la fermentación maloláctica espontánea y la siembra de vinos con otros que ya la han realizado, son prácticas que conllevan el riesgo de que sea provocada por microorganismos poco aconsejables. Otro método de inducir la fermentación maloláctica menos azaroso es la inoculación de cepas puras. La ventaja que ofrece este sistema es que la fermentación maloláctica es conducida por una cepa de características metabólicas y fisiológicas conocidas, reduciéndose el riesgo de que se produzcan alteraciones indeseables [29, 89, 276]. Las principales desventajas de este método son la dificultad de la obtención de biomasa suficiente para inocular grandes volúmenes de vino [62], y la pérdida de actividad en el vino de las cepas mantenidas en medio sintético [155, 185].

Establecidas ya las características fisiológicas y metabólicas de nuestras cepas, tanto en medio sintético como en vino, el siguiente paso a seguir consistió en establecer la capacidad de crecimiento que éstas mostraban al ser inoculadas desde un medio sintético a un vino con pH inferior a 3.5. Se eligieron estos valores de pH porque interesaba seleccionar cepas que fueran capaces de multiplicarse a pHs bajos, ya que los vinos que requieren la fermentación maloláctica suelen tener valores de pH inferiores a 3.5. La capacidad de crecimiento de las 28 cepas ensayadas se muestra en la Tabla 42. Como podemos observar sólo 5 de las 28 consiguieron crecer en vino: de éstas 3 pertenecían a *Leuconostoc oenos* (G6, M41, M42) y las otras dos (C43 y C45) al grupo de cepas no identificadas. Esta mayor capacidad de crecimiento de *Leuconostoc oenos* en vino está ampliamente documentada en la bibliografía [26, 31, 62, 72, 90, 91, 99, 100, 115, 155, 170, 344]. En este sentido DAVIS *et al.* [90] encontraron que en un vino ajustado a pH=3.2 sólo proliferó *L. oenos*, mientras que en el mismo tipo de vino pero a pH=3.7 se desarrollaban *Pediococcus parvulus* y *L. cellobiosus*. Esta observación contrasta con los resultados de ROSSI y CLEMENTI [290], quienes encontraron que una cepa de

Leuconostoc oenos resultaba más sensible a factores adversos (pH, SO₂, temperatura) que una cepa de *Pediococcus cerevisiae* o *Lactobacillus casei*, tanto en medio sintético como en mosto y vino.

La cepa M41 creció solamente a pH 3.5, la cepa G6 creció a pH 3.5 y 3.4, y la cepa M42 lo hizo hasta un pH de 3.3 (Tabla 42). La cepa M42 no creció a pH 3.4 pero sí a 3.3 y 3.5; esto nos hace pensar en un error metodológico a la hora de manejar las muestras. Cuando se repitió esta experiencia, se inoculó con una cantidad demasiado elevada de células, con lo que se logró la degradación total del ácido málico del vino sin que se observase crecimiento. También es posible que en este caso el estado fisiológico de las células del inóculo no fuera el óptimo, de modo que la población no pudiera superar la muerte inicial y no quedaran supervivientes, aunque sí un "extracto enzimático crudo" que permitiera el desencadenamiento de la fermentación maloláctica [174]. La dinámica del crecimiento de las cepas G6, M41 y M42 se presenta en las Figuras 46 a 48.

Las cepas C43 y C45 crecieron a pH 3.4 pero no a 3.5. A pH 3.5 no se apreció degradación del ácido málico, por lo que la explicación más verosímil es que el inóculo empleado fuera inferior debido a un error. Estas cepas crecieron después de haber degradado el ácido málico como consecuencia del fuerte inóculo utilizado (ver Tabla 42). Este desarrollo pudo deberse a que la degradación inicial del málico desacidificara lo suficiente el medio para permitir su multiplicación. El crecimiento de las cepas C43 y C45 se muestra en las Figuras 49 y 50.

En todos los casos ensayados se produjo un gran descenso de la viabilidad tras la inoculación en vino de las cepas crecidas en medio sintético (Figuras 46 a 50). Esta muerte inicial producía descensos de la población viable de hasta 8 órdenes de magnitud (Figura 47). Este descenso de la viabilidad ha sido observado por otros autores [28, 42, 71, 89, 113, 155, 180, 200], pero en ningún caso este descenso fue tan elevado como los

Cepa	Inóculo	pH				
		3.1	3.2	3.3	3.4	3.5
172	1.9x10 ⁶	-	-	-	-	-
66	8.6x10 ⁶	-	-	-	+	+
ML-34	1.8x10 ⁶	-	-	-	-	-
T46	2.3x10 ⁷	-	-	-	-	-
641	9.9x10 ⁷	-	-	-	-	-
171	7.5x10 ⁷	-	-	-	-	-
M42	4.3x10 ⁶	-	-	+	-	+
M41	6.6x10 ⁶	-	-	-	-	+
M12	2.8x10 ⁶	-	-	-	-	-
B32	2.9x10 ⁶	-	-	-	-	-
B11	2.9x10 ⁶	-	-	-	-	-
162	1.7x10 ⁶	-	-	-	-	-
C45	9.2x10 ⁶	-	-	-	+	-
C43	7.3x10 ⁶	-	-	-	+	-
B12	2.9x10 ⁶	-	-	-	-	-
31	4.2x10 ⁶	-	-	-	-	-
T11	3.3x10 ⁶	-	-	-	-	-
T12	5.0x10 ⁶	-	-	-	-	-
B49	6.8x10 ⁶	-	-	-	-	-
B13	2.4x10 ⁶	-	-	-	-	-
22	3.6x10 ⁶	-	-	-	-	-
B44	4.2x10 ⁶	-	-	-	-	-
B24	1.6x10 ⁶	-	-	-	-	-
33	5.0x10 ⁶	-	-	-	-	-
32	2.0x10 ⁶	-	-	-	-	-
M43	1.9x10 ⁶	-	-	-	-	-
B31	6.8x10 ⁶	-	-	-	-	-
M11	2.3x10 ⁶	-	-	-	-	-

TABLA 42.- Crecimiento en vino a distintos pHs de las cepas inoculadas a partir de medio sintético. "+" crecimiento positivo. "-" crecimiento negativo tras 100 días de ensayo.

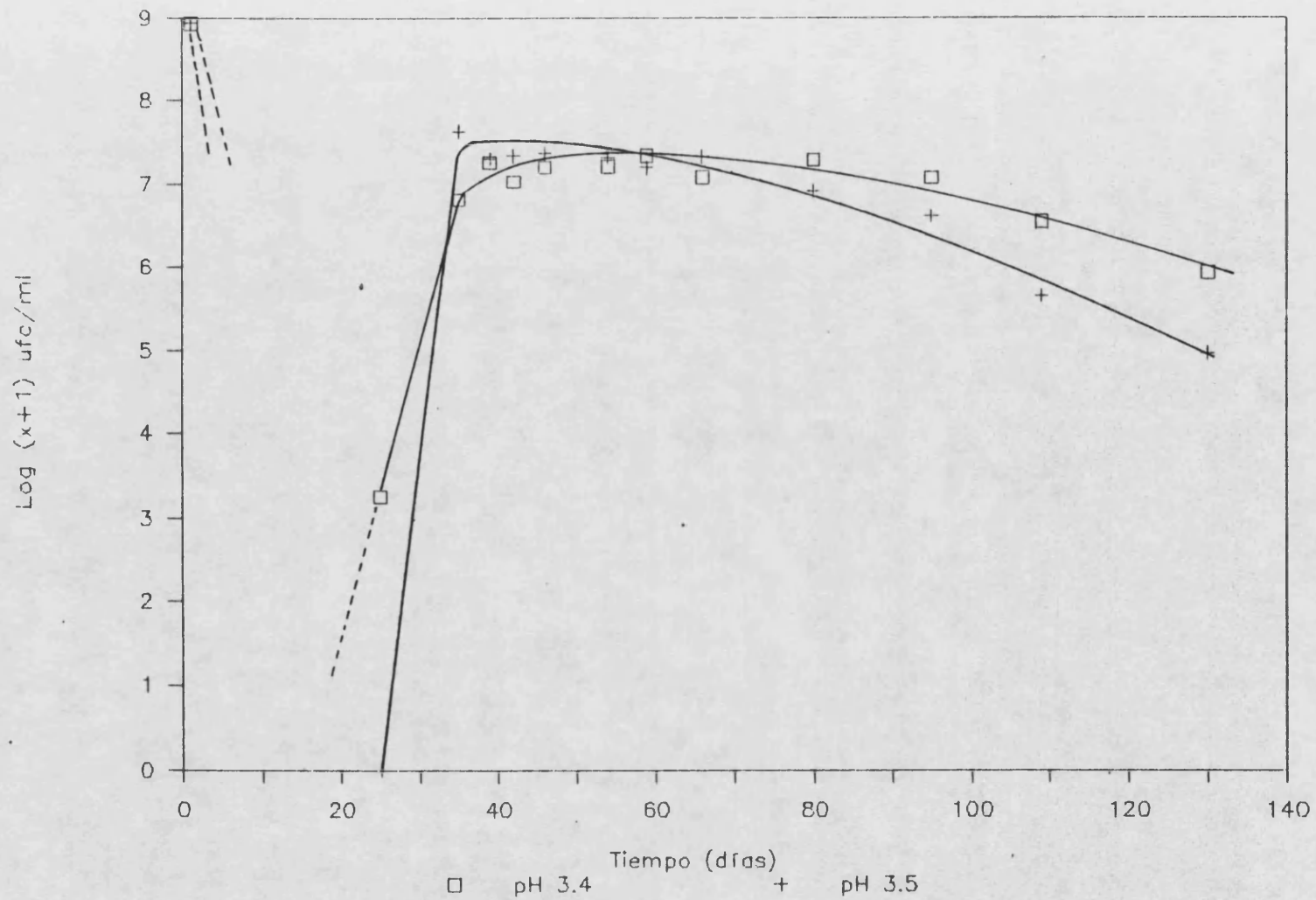


Figura 46.- Crecimiento de la cepa G6 en vino a pH = 3'4 y a pH = 3'5. El inóculo procedía de un precultivo en medio MLO.

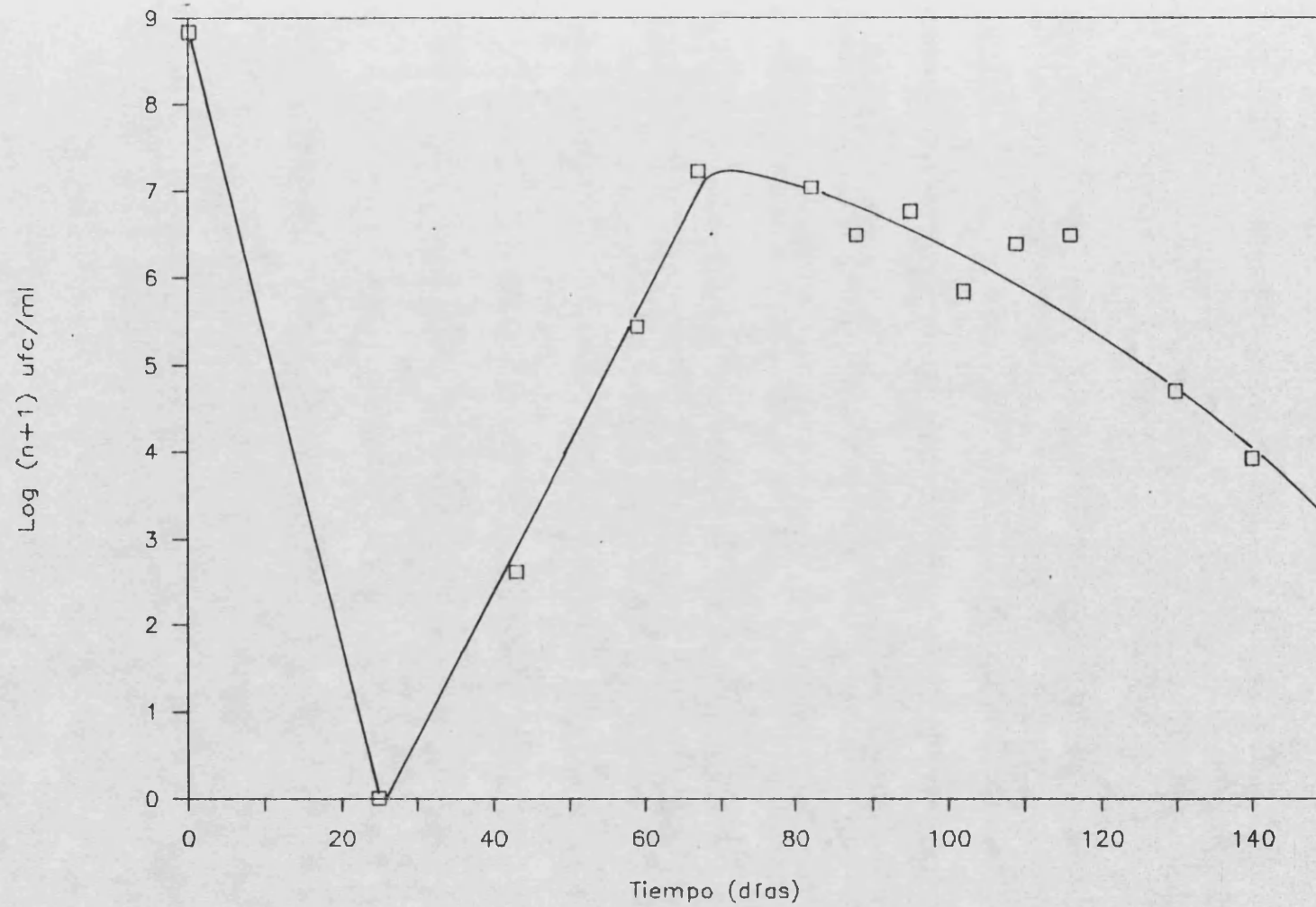


Figura 47.- Crecimiento de la cepa M41 en vino a pH = 3'5. El inóculo procede de un precultivo en medio MLO.

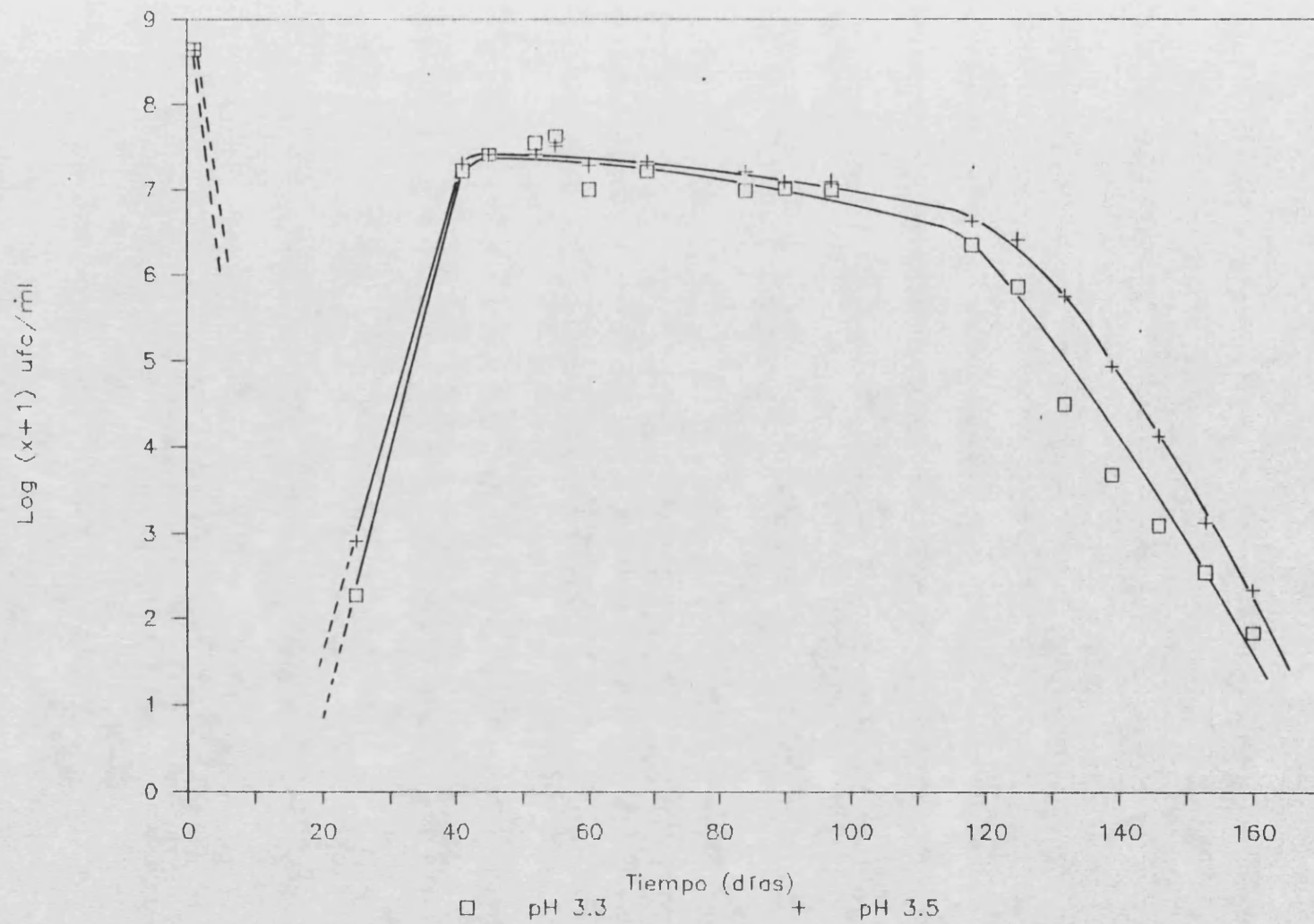


Figura 48.- Crecimiento de la cepa M42 en vino a pH = 3'3 y a pH = 3'5. El inóculo procede de un precultivo en medio MLO.

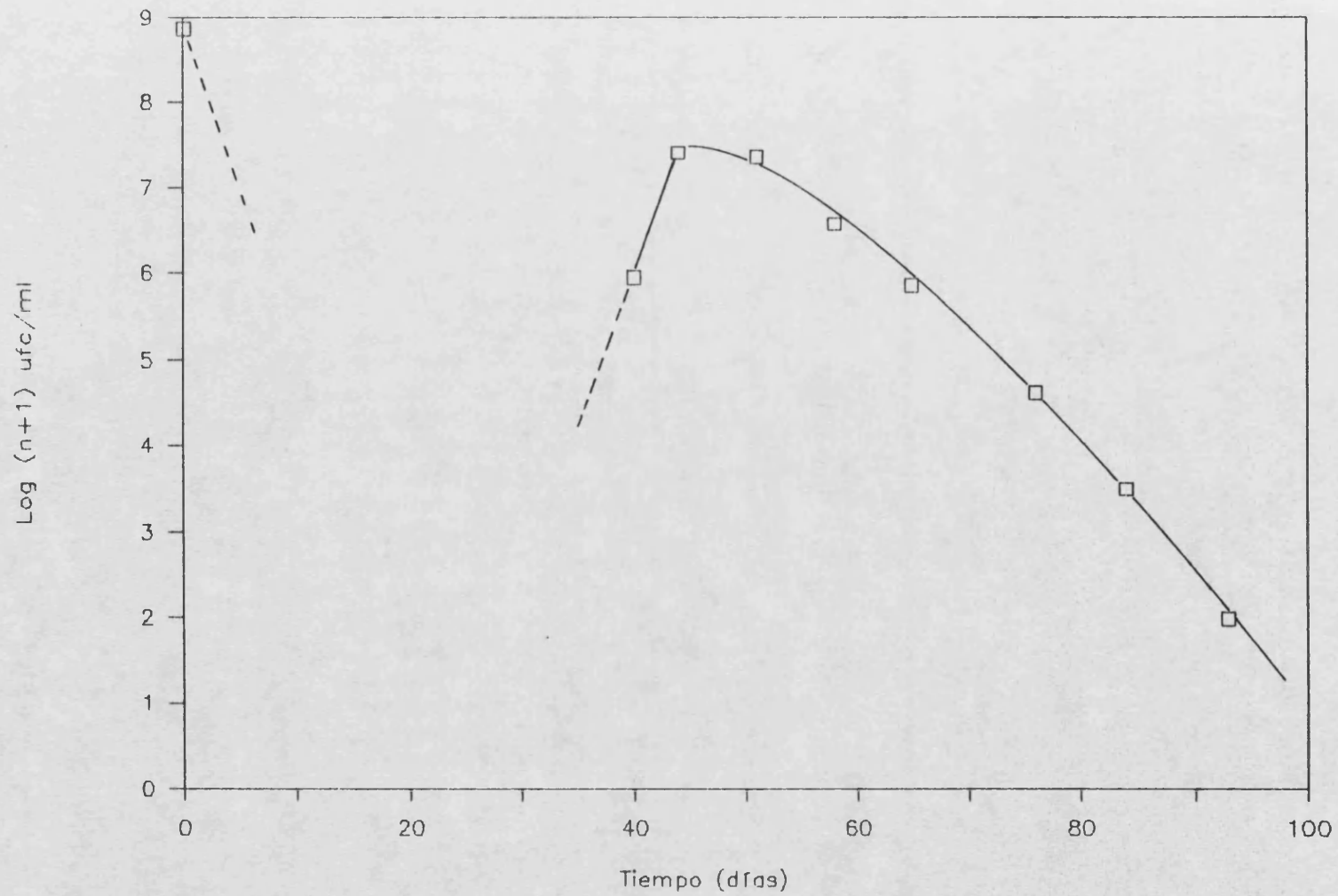


Figura 49.- Crecimiento de la cepa C43 en vino a pH = 3'4. El inóculo procede de un precultivo en medio MRS.

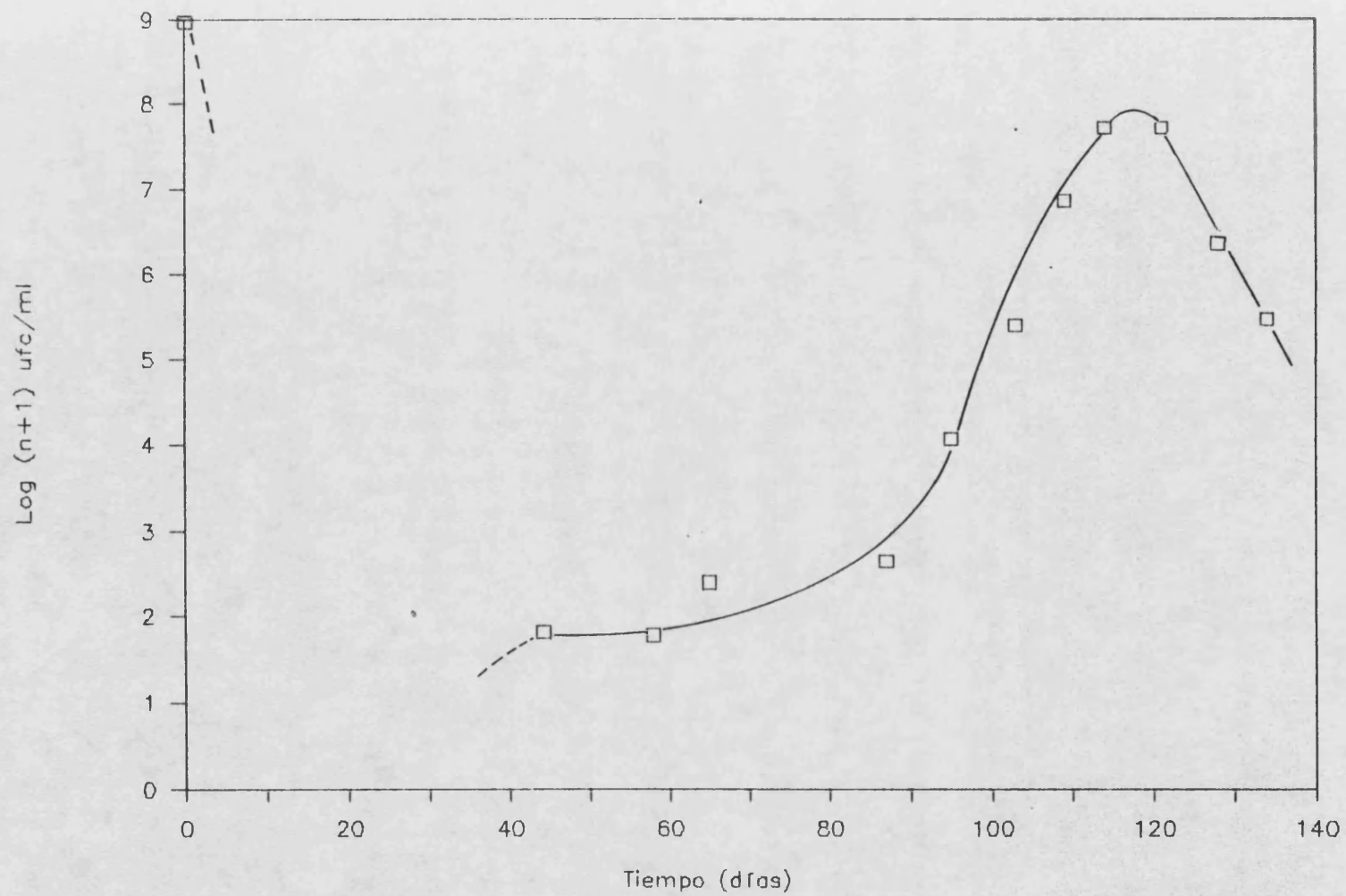


Figura 50.- Crecimiento de la cepa C45 en vino a pH = 3'4. El inóculo procede de un precultivo en medio MRS.

encontrados por nosotros. Esto posiblemente es debido a los diferentes medios de precultivo empleados en otras experiencias [27, 148, 174], aunque no son descartables otros factores como la composición del vino o las condiciones en las que se realiza el cultivo. HAYMAN y MONK [148] obtenían mejores crecimientos en vino con preinóculos cultivados en jugo de uva adicionado del 40 al 80% de vino, aunque la actividad maloláctica disminuyera cuando se aumentaba el porcentaje de vino en el medio de precultivo. Los medios utilizados por nosotros, MRS y MLO, son medios óptimos para el crecimiento de las bacterias lácticas, y el cambio tan brusco de un medio rico a otro tan selectivo como el vino puede ser la causa de la gran muerte inicial previa a la adaptación del cultivo a las nuevas condiciones.

Tras la fase de muerte inicial se producía un periodo de latencia que conducía a un crecimiento exponencial. La duración de la fase de latencia no se puede apreciar claramente en las Figuras debido a que no se tomaron suficientes muestras entre el periodo de muerte y la fase de crecimiento exponencial; de todas formas podemos apreciar que en las cepas C43, G6, M41 y M42 ésta debe de ser más corta que en la C45. Las cuatro primeras tardan entre 18 y 25 días en comenzar la fase exponencial (Figuras 46 a 49), mientras que C45 demoró 90 días (Figura 50). Las causas de estas diferencias hay que buscarlas en la distinta capacidad de adaptación que presentan las cepas cuando se las inocula de medio sintético en vino.

En todos los casos se alcanzaban poblaciones máximas de 10^7 - 10^8 ufc/ml (Figuras 46 a 50). Este nivel poblacional parece ser el umbral máximo característico del crecimiento de las bacterias en vino, pues ha sido descrito por numerosos autores que observaron el desarrollo de estos microorganismos en este medio [28, 29, 71, 72, 83, 90, 91, 115, 175, 179, 199, 217]. Las cepas C43, C45 y M41 murieron rápidamente tras alcanzar su población máxima (Figuras 47, 49 y 50), mientras que G6 y M42 se

mantuvieron en fase estacionaria durante un prolongado periodo de tiempo (Figuras 46 y 48), produciéndose al cabo de 80 días una acentuada fase de muerte en la cepa G6. Los rápidos declives poblacionales tras la fase exponencial pueden deberse a la temperatura a la que se mantenían los vinos inoculados. LAFON-LAFOURCADE *et al.* [179] encontraron que a una temperatura de incubación de 26°C, tras la finalización de la fermentación maloláctica se producía una rápida disminución de la población que no se daba a temperaturas más bajas.

No se apreciaron diferencias significativas en las poblaciones máximas alcanzadas a distintos pHs, pero en la cepa G6 la tasa de crecimiento fue mayor a un pH de 3.5 que a pH 3.4, lo que coincide con lo observado por otros autores [90, 200]. Sin embargo, en el caso de M42 se observó un crecimiento semejante a pH 3.3 que a 3.5.

3.3.3.- EFECTOS DE LA ADAPTACION PROGRESIVA AL VINO.

La estimulación de la fermentación maloláctica con cepas puras requiere grandes inóculos celulares tanto si se utilizan células no proliferantes [102, 172, 174] como si se pretende hacerlas crecer en vino, dada la pérdida de viabilidad que se produce al transferir las células desde un medio sintético. En este trabajo hemos intentado establecer una metodología que permita la inoculación de una cepa seleccionada evitando el uso de grandes inóculos, y minimizando en lo posible la pérdida de viabilidad que se produce en el vino. Se pensó que la adaptación de las cepas mediante sucesivas resiembras en el vino podría ser un método para conseguir estos objetivos. Se estudió el efecto que esta adaptación tenía tanto sobre el crecimiento como sobre la fermentación maloláctica. Para ello, de entre las 5 cepas crecidas en vino a partir del preinóculo

cultivado en medio sintético, se eligieron 2 (G6 y M42) para realizar los ensayos de adaptación. A partir de estos primeros crecimientos en vino, se sembraron dos inóculos de cada cepa con distinto número de células, a fin de establecer de que manera influía la concentración celular en el crecimiento y en la fermentación maloláctica a lo largo de las sucesivas resiembras en vino. En todos los casos se consiguió crecimiento tanto en la inoculación al 10% como al 1%: los resultados del efecto de la adaptación sobre el crecimiento se muestran en las Figuras 51 a 54. Esto significa que una sola siembra en vino permite que un inóculo inferior al menos en 3 órdenes de magnitud sea suficiente para desencadenar el crecimiento (Figuras 46, 48 y 51 a 54). En las Figuras 51 a 54 se puede observar que se produjo un considerable descenso de la fase de muerte inicial, así como una aceleración de la fermentación maloláctica, a medida que aumentaba el número de resiembras de vino a vino: esto nos permite afirmar que existe una adaptación progresiva de las cepas.

Asimismo se constató un diferente comportamiento de estas cepas en las fases estacionarias correspondientes a vinos inoculados con células precultivadas en medio sintético o precultivadas en vino. En este último caso o no existió fase estacionaria o ésta fue sensiblemente inferior (Figuras 46, 48, y 51 a 54). No se posee evidencia alguna que adelante una explicación para este hecho. Una posible hipótesis consistiría en que las células crecidas en medio rico aportarían una serie de nutrientes al vino, los cuales permitirían el mantenimiento de la población máxima durante un periodo de tiempo más prolongado.

A partir del cultivo de G6 obtenido de la segunda resiembra en vino, se sembró de nuevo en las mismas condiciones de pH (3.4) y a un valor de pH ligeramente inferior (3.3) (Figura 52), a fin de observar qué efecto tenía una disminución del pH en los cultivos adaptados. Para ambos pHs la inoculación al 10% no dio lugar a una fase de muerte inicial, ni tampoco de

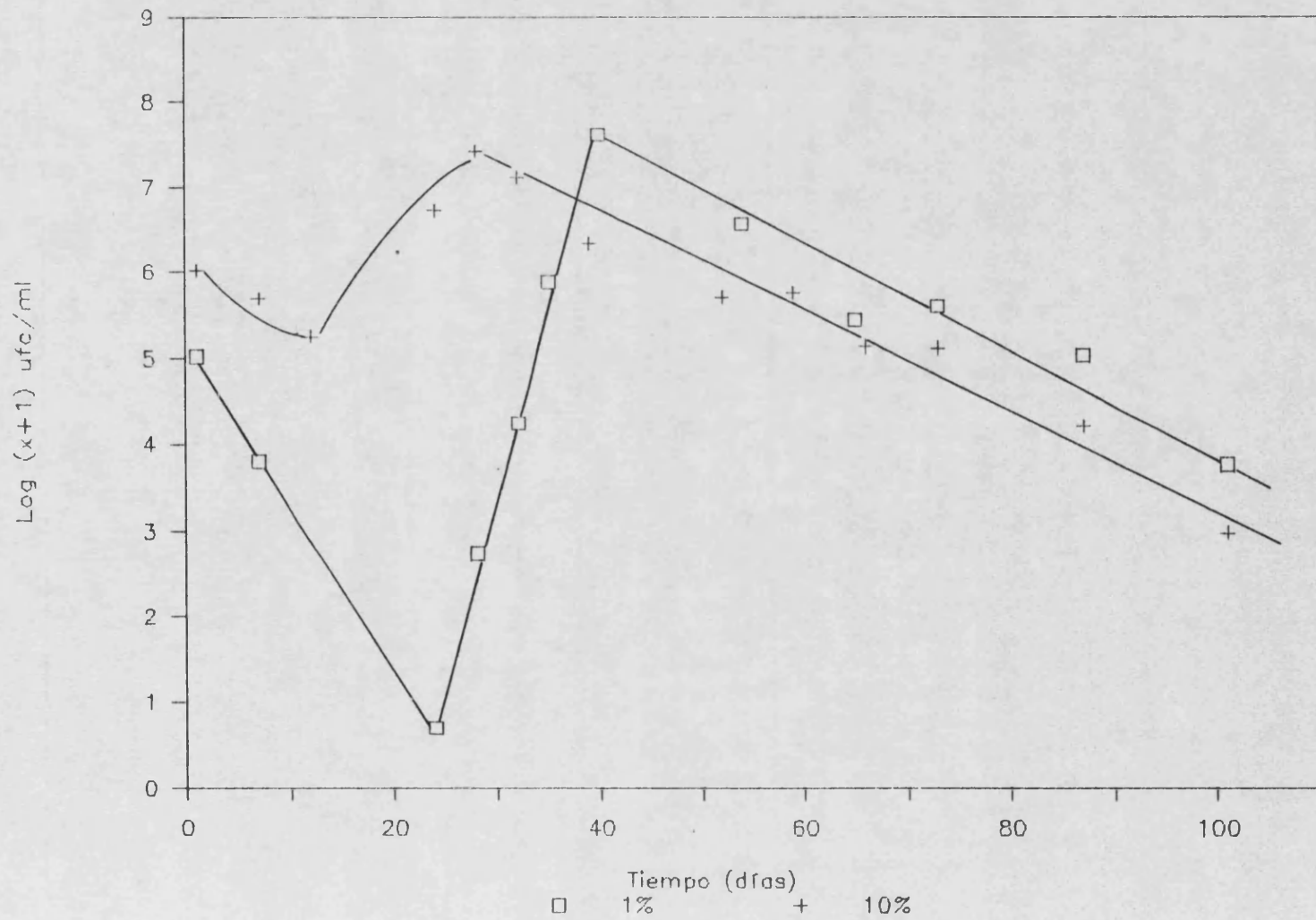


Figura 51.- Crecimiento de la cepa G6 en vino a pH = 3'4. Este ensayo se sembró al 1 y al 10% a partir de un precultivo crecido en las mismas condiciones y cuya cinética se muestra en la figura 46.

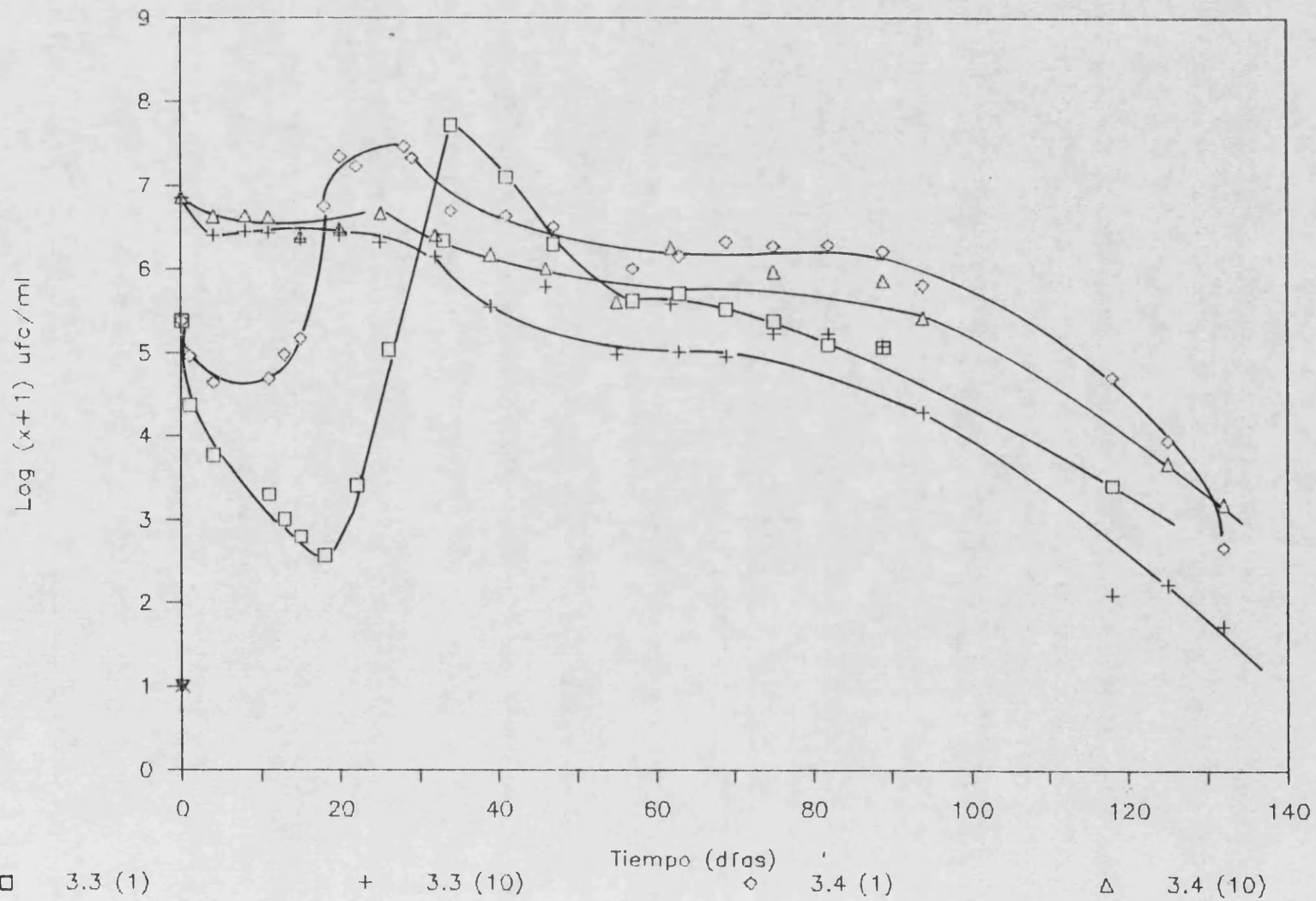


Figura 52.- Crecimiento de la cepa G6 en vino a pH = 3'4 y a pH = 3'3. Este ensayo se sembró al 1 y al 10% a partir de precultivos crecidos en las mismas condiciones y cuyas cinéticas se muestran en la figura 51.

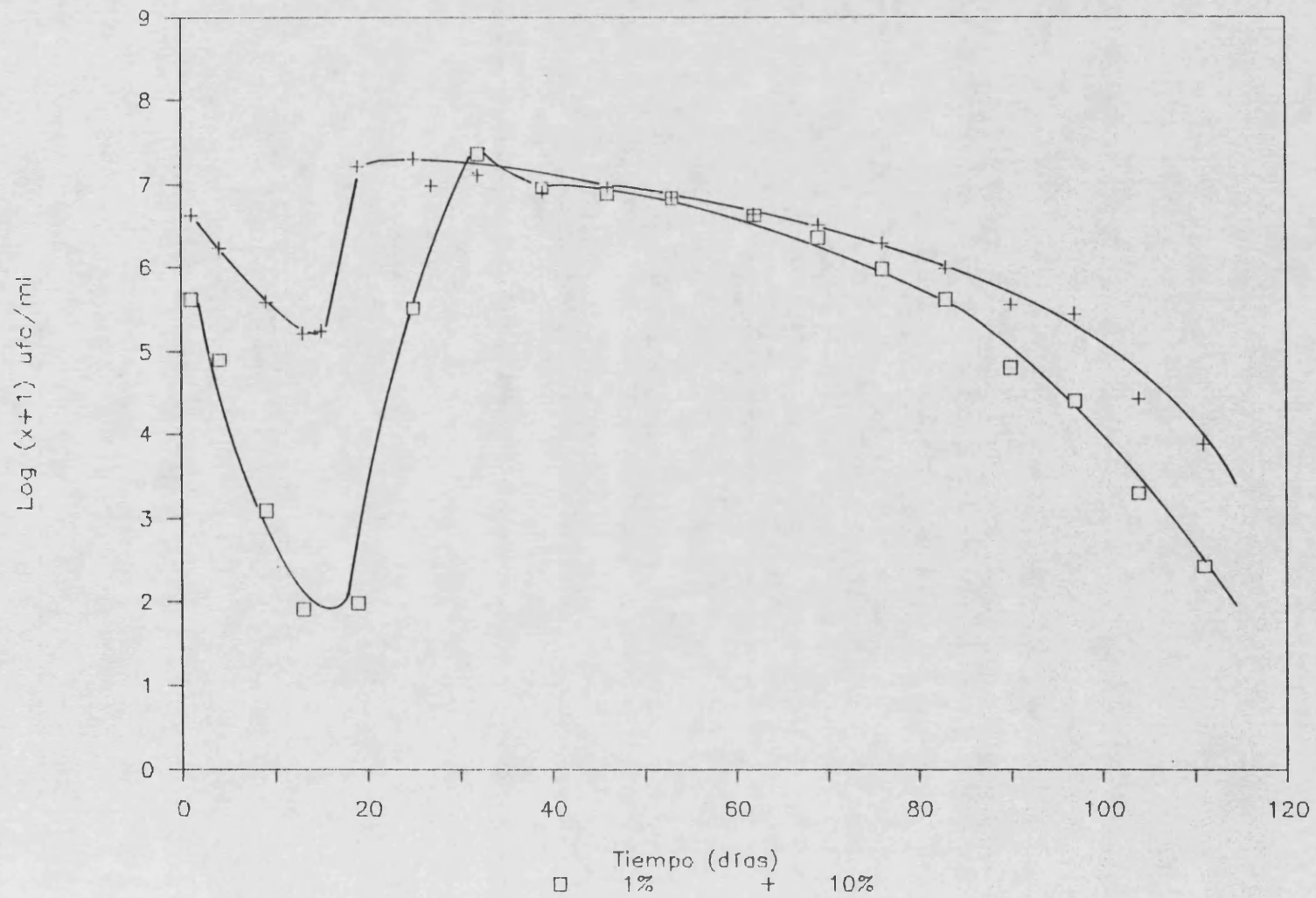


Figura 53.- Crecimiento de la cepa M42 en vino a pH = 3'3. Este ensayo se sembró al 1 y al 10% a partir de un precultivo crecido en las mismas condiciones y cuya cinética se muestra en la figura 47.

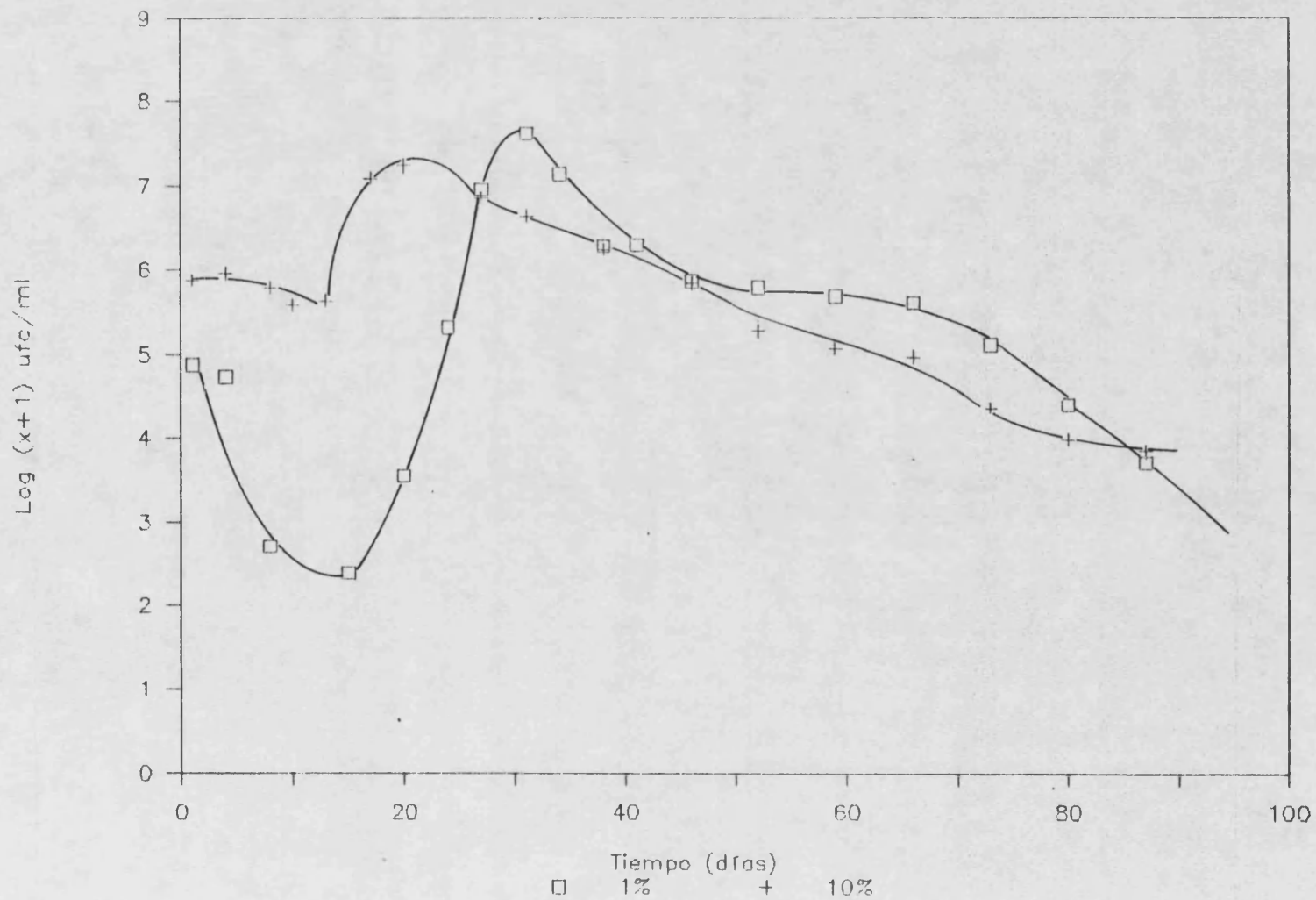


Figura 54.- Crecimiento de la cepa M42 en vino a pH = 3'3. Este ensayo se sembró al 1 y al 10% a partir de un precultivo crecido en las mismas condiciones y cuya cinética se muestra en la figura 53.

crecimiento, sino que se produjo un lento declive de la población hasta un momento en el que el número de viables se redujo bruscamente. Posiblemente el inóculo se hallaba tan cercano a la carga máxima del sistema que no había condiciones que permitieran la multiplicación de las células.

La disminución del pH en una décima afectó tanto a la magnitud de la muerte inicial como al tiempo de latencia; este comportamiento ya fue observado por LIU y GALLANDER [2001]. No se observó que el pH afectara al nivel máximo alcanzado por la población. LIU y GALLANDER [2001] también encuentran que a los pHs por ellos ensayados, el nivel de población alcanzado es similar. Sin embargo, BEELMAN *et al.* [27] hallaron que a pHs menores se obtenían poblaciones máximas inferiores. Las discrepancias con estos últimos autores pueden explicarse porque ellos realizaron sus experiencias en medio sintético, por lo que no son resultados directamente comparables con los obtenidos en vino. Finalmente observamos que cuanto más bajo fue el pH del vino, más acentuado fue el declive de la población tras haber crecido. LAFON-LAFOURCADE *et al.* [179] señalan que el pH es uno de los factores responsables de la muerte celular tras la realización de la fermentación maloláctica.

Muchos autores han informado que los efectos negativos de ciertos componentes del vino sobre las células, son menos acusados con concentraciones celulares elevadas. Nosotros hemos comprobado experimentalmente este hecho realizando una serie de curvas de crecimiento con distintos niveles de inóculo (Figuras 51 a 54). En todos los casos ensayados, se ha observado que la muerte inicial tras la inoculación en vino es mayor cuanto menor es el inóculo utilizado. Tanto es así que en alguna ocasión no ha llegado a producirse el efecto de muerte cuando se empleaban inóculos elevados (Figura 52). Una posible explicación se basaría en la existencia de un cierto efecto de "protección mutua" entre las células al aumentar el número global de las mismas. También es posible que

la acción de los inhibidores se disperse más entre un mayor número de organismos.

Además de ensayar el efecto que la preadaptación tenía sobre el crecimiento en vino de las cepas G6 y M42, también realizamos con ellas unas pruebas para determinar de qué manera afectaba esta preadaptación a la rapidez de la fermentación maloláctica, y a la posibilidad de realizarla a pHs progresivamente inferiores. Los resultados obtenidos en estos ensayos se muestran en las Tablas 43 y 44. A partir de las mismas observamos que hay una aceleración de la fermentación maloláctica, para un mismo valor de pH, a lo largo de los sucesivos pases por vino. Por otra parte, la adaptación previa permitió rebajar el umbral mínimo de pH al cual las células fueron capaces de realizar la fermentación maloláctica. En estas experiencias también se ha corroborado la influencia del nivel de inóculo utilizado: a mayor concentración celular, mayor rapidez en la consecución de la fermentación maloláctica. Asimismo se ha constatado que el pH al que se han cultivado previamente las bacterias influye en el comportamiento posterior de las mismas: los inóculos obtenidos de vino a pH 3.5 tardaron más que aquéllos procedentes de vino a pH 3.3, en llevar a cabo la fermentación maloláctica a pH 3.3.

Hay un hecho que relaciona la concentración celular del inóculo con la capacidad de adaptación de las cepas al vino. Esta relación consiste en que con un inóculo más elevado existe una mayor probabilidad de que en la población haya células capaces de adaptarse al nuevo medio antes de que les sobrevenga la muerte. Estas células serán las que comiencen a crecer en la población. Sin embargo, la adaptación al vino no es una respuesta del todo o nada, sino que parece existir una gradación en la misma. Por ello, se observa que cuando se transfiere un inóculo crecido en vino a otro vino semejante, todavía se observa una fase de muerte, aunque esta vez más reducida. Esto se debe a que la población reinoculada en vino no se halla

Origen inóculo			Inoculación			Tiempo (días)									
Medio	pH	Concentración	Medio	pH	Concentración	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MLD	4.8	?	Vino 1	3.5	8.60x10 ⁶	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
			Vino 1	3.4	8.60x10 ⁶	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Vino 1	3.4	1.05x10 ⁷	Vino 2	3.4	10%	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
					1%	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Vino 2	3.4	5.00x10 ⁶	Vino 3	3.4	10%	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
					1%	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
					10%	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
					1%	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
					10%	-	-	-	-	-	i	nc	nc	nc	nc
					1%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vino 3	3.3	2.50x10 ⁷	Vino 4	3.3	10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
					1%	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
					10%	t	+	+	+	+	+	+	+	+	
					1%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nc
					10%	nc	t	t	t	t	t	t	t	t	t
1%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					

Tabla 43.- Adaptación progresiva al vino de la cepa 66 y su influencia sobre la velocidad de realización de la fermentación maloláctica a distintos pHs. "Vino 1" vino directamente inoculado a partir de cultivo crecido en medio sintético. "Vino 2" vino inoculado a partir del Vino 1. "Vino 3" idem a partir del Vino 2. "Vino 4" idem a partir del Vino 3. "+" fermentación maloláctica completada. "-" fermentación maloláctica no realizada. "i" fermentación iniciada. "nc" fermentación maloláctica avanzada. "t" trazas de ácido málico en el vino.

Origen inóculo			Inoculación			Tiempo (días)									
Medio	pH	Concentración	Medio	pH	Concentración	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MLD	4.8	?	Vino 1	3.5	4.35x10 ⁶	nc	nc	t	+	+	+	+	+	+	+
			Vino 1	3.3	4.35x10 ⁶	t	t	t	+	+	+	+	+	+	+
Vino 1	3.5	2.60x10 ⁷	Vino 2	3.3	10%	-	-	t	+	+	+	+	+	+	+
					1%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				3.2	10%	-	-	-	-	i	+	+	+	+	+
					1%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vino 1	3.3	3.50x10 ⁷	Vino 2	3.3	10%	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
					1%	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
				3.2	10%	-	-	-	t	+	+	+	+	+	
					1%	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
Vino 2	3.3	7.50x10 ⁶	Vino 3	3.3	10%	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
					1%	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
				3.2	10%	-	-	-	t	+	+	+	+	+	
					1%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Vino 2	3.3	7.50x10 ⁶	Vino 3	3.1	10%	-	-	-	-	i	i	nc	nc	+	+
					1%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tabla 44.- Adaptación progresiva al vino de la cepa M42 y su influencia sobre la velocidad de realización de la fermentación maloláctica a distintos pHs. "Vino 1" vino directamente inoculado a partir de cultivo crecido en medio sintético. "Vino 2" vino inoculado a partir del Vino 1. "Vino 3" idem a partir del Vino 2. "Vino 4" idem a partir del Vino 3. "+" fermentación maloláctica completada. "-" fermentación maloláctica no realizada. "i" fermentación iniciada. "nc" fermentación maloláctica avanzada. "t" trazas de ácido málico en el vino.

totalmente adaptada al mismo: la adaptación es progresiva, y debe afectar tanto a mecanismos de resistencia a factores inhibidores del vino, como a las condiciones de actuación de los enzimas implicados en la fermentación maloláctica. Por eso los preinóculos crecidos a pHs distintos del que presenta el vino donde se realiza el inóculo, necesitan más tiempo para adaptarse que los preinóculos crecidos al mismo pH, y como consecuencia tardan más en realizar la fermentación maloláctica.

CONSIDERACIONES FINALES.

Vamos a hacer seguidamente un pequeño resumen con las principales conclusiones a las que hemos podido llegar a partir de los datos presentados en este trabajo.

Respecto al primer objetivo que nos planteamos, que era el conocimiento de la flora asociada a los mostos de la D.O. Utiel-Requena, diremos que en ellos encontramos tres tipos de microorganismos: bacterias lácticas, levaduras y mohos. A pesar de que intentamos el recuento de bacterias acéticas, no conseguimos aislarlas en ninguna de las muestras procesadas.

Las bacterias lácticas se hallaban en mostos sin sulfitar, y en concentraciones que variaban entre 10^3 - 10^4 células por mililitro. Las especies presentes en esta Fase eran *L. brevis*, *L. cellobiosus*, *L. hilgardii*, *L. plantarum*, *L. paramesenteroides* y las cepas 31 y M12, las cuales no pudimos identificar. Las diferencias en el tipo de especies halladas en los distintos mostos se deben a la metodología de aislamiento empleada. Las levaduras se hallaban presentes en mosto sin sulfitar en niveles de 10^5 - 10^6 ufc/ml, y las especies más características en esta Fase son *Candida pulcherrima*, *Candida stellata*, *Kloeckera apis*, *Pichia kluyveri*, *Saccharomyces cerevisiae* y la "levadura negra" *Aureobasidium pullulans*. Entre ellas *S. cerevisiae* se halla en una proporción semejante o inferior al resto. Se han aislado ciertas especies en mostos de la Cooperativa San Pedro que no se encontraban en los mostos de la Escuela de Viticultura y Enología: *Hansenula anomala*, *Pichia membranaefaciens* y *Sporobolomyces roseus*. Por otro lado, las especies *Kluyveromyces thermotolerans*, *Torulaspota delbrueckii* y *Saccharomyces kluyveri* solo se aislaron en mostos de la Escuela de Viticultura y Enología. La baja frecuencia de aparición de estas especies, incluso en mostos procedentes de los mismos viñedos, no nos permite asegurar que sean especies asociadas a una localidad concreta. Dado que su concentración es baja y variable, estas levaduras solo se ven

representadas en aquellas muestras en las que su nivel poblacional es más alto.

No tenemos evidencias que apoyen la existencia de dos tipos distintos de asociaciones de levaduras en los mostos de la Cooperativa S. Pedro y en los la Escuela de Viticultura y Enología. Tampoco hemos detectado diferencias en las poblaciones levaduriformes en mostos procedentes de distintas variedades de uva cultivadas en un mismo viñedo y vinificadas en la Escuela de Viticultura y Enología. La disminución del número de especies que observamos en 1983 respecto a 1982 en la Cooperativa San Pedro, se explica por la modificación de la metodología de aislamiento, y por la aleatoriedad en la aparición de ciertas especies; esto último provocaba que se las hallase raramente incluso en mostos procedentes de una misma vendimia.

La bibliografía consultada [22, 75, 77, 115, 131, 140, 141, 142, 161, 219, 220, 224, 236, 237, 258, 261, 262, 287, 289, 298, 304, 320] nos muestra la existencia de distintas asociaciones y distintas frecuencias relativas de especies de levaduras presentes en mostos de las distintas zonas vinícolas. Sin embargo, hay una serie de especies comunes en la mayor parte de los aislamientos estudiados; entre esas especies comunes se encuentran las que nosotros hemos aislado mayoritariamente en la D.O. Utiel-Requena. Las diferencias más notables entre nuestro datos y los de otros autores es que éstos encuentran *K. apiculata* como mayoritaria en mostos frescos, mientras que nosotros detectamos *K. apis*. Otra diferencia es que mientras que en otras zonas se ha detectado *M. pulcherrima* nosotros aislamos *C. pulcherrima*, que es el estado imperfecto de la primera. También hemos aislado *K. japonica*, estado imperfecto de *H. vallbyensis*, especie que se ha hallado en Francia y en algunas zonas de España de forma ocasional. Otra especie que aparecía en nuestros aislamientos es *T. delbrueckii*, la cual otros autores han aislado con el nombre de *S. rosei*. Las diferencias

en las microfloras de distintas regiones se deben muchas veces a la aparición de especies de escasa representación en el total de la población: a ello se debe la aleatoriedad de sus aislamientos.

Los mohos son microorganismos presentes en los mostos en cantidades semejantes a las levaduras (10^4 - 10^5 ufc/ml). Sin embargo, no se detectan durante la fermentación alcohólica; en el caso de que se aislen durante la misma hay que achacar su aparición a la presencia de poblaciones residuales o esporas, ya que las condiciones anaerobias, el SO_2 , y el aumento de etanol, impiden su crecimiento durante la fermentación alcohólica.

Otro objetivo que nos propusimos en este trabajo fue el estudio de la evolución de los parámetros físico-químicos en función del sistema de vinificación empleado. La conclusión a la que llegamos tras analizar los datos, es que el sistema BIDONE proporciona una disminución de la temperatura máxima de fermentación de unos $4^\circ C$. Esta disminución implica un mayor rendimiento en etanol al reducir las pérdidas por evaporación y al favorecer la producción del mismo por parte de las levaduras. La aplicación del sistema BIDONE disminuye la pérdida de acidez total y de color, y hace que la fracción libre del SO_2 sea más elevada en relación al SO_2 total que en el sistema tradicional; esto último hace que las fermentaciones estén más protegidas de oxidaciones o ataques microbianos. El sistema BIDONE permite finalmente una ligera reducción de la acidez volátil obtenida durante la fermentación, a pesar de que no se obtienen diferencias altamente significativas.

Las ventajas que presenta la vinificación con bajas temperaturas son las mismas que las descritas para el sistema BIDONE, aunque más acentuadas; por ejemplo, la mayor producción de etanol que hemos observado en las vinificaciones estudiadas se alcanza en Tempranillo, el cual se fermentó a $19^\circ C$.

La evolución que siguió la población de bacterias lácticas a lo largo de la fermentación alcohólica fue siempre esencialmente la misma, independientemente de que el sistema de vinificación empleado fuera el tradicional o el BIDONE. El número inicial de bacterias lácticas presentes en los mostos disminuía durante la fermentación alcohólica a niveles tan bajos, que incluso a veces no se detectaban. Al final de la fermentación alcohólica hubo una pequeña recuperación de la población láctica debida al crecimiento de las cepas más resistentes al SO_2 , al etanol y a la competencia con levaduras. Estas bacterias resistentes crecían al final de la fermentación alcohólica a expensas de los nutrientes liberados por la lisis de las levaduras muertas. A partir de aquí observamos dos comportamientos distintos en relación con el nivel de sulfitación de los vinos: en aquéllos que contenían mayor concentración de SO_2 total, el pequeño crecimiento que se dio tras la fermentación alcohólica, no fue lo suficientemente rápido como para que se alcanzara la concentración celular necesaria para el desencadenamiento de la fermentación maloláctica antes de los fríos otoñales. La adición de SO_2 tras el primer trasiego redujo todavía más las posibilidades de crecimiento de estas bacterias. Sin embargo, en los mostos menos sulfitados (los vinificados en la Escuela de Viticultura y Enología), el crecimiento de las bacterias lácticas fue muy rápido, y permitió que se alcanzaran niveles poblacionales suficientes para producir la fermentación maloláctica antes del primer trasiego. La evolución de las especies de bacterias lácticas durante la fermentación fue muy semejante en todos los casos: de todas las especies que aparecían en mostos sin sulfitar, tan sólo encontramos *L. hilgardii* y varias especies no identificadas (B24, B31, B32) en plena fermentación alcohólica. Como caso notable encontramos *L. plantarum* (especie mayoritariamente asociada a mostos frescos) en mosto de Bobal en fermentación. La razón de su presencia exclusiva en estos mostos debemos buscarla en la ausencia de SO_2 en esta

vinificación.

Las especies de bacterias lácticas que aparecían en vinos acabados fueron *L. fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. oenos* y dos cepas no identificadas (C43 y C45). Toda esta evolución de especies parece obedecer a una selección de aquellas más resistentes a las condiciones del vino, pero también es posible que algunas de las cepas aisladas en determinadas fases se hallen como poblaciones residuales no proliferantes, procedentes de etapas anteriores.

Respecto a la evolución de especies de levaduras a lo largo de la fermentación, éstas se encuentran en mostos frescos en concentraciones iniciales de 10^5 - 10^6 ufc/ml, y comienzan a crecer en este medio hasta alcanzar poblaciones de 10^7 - 10^8 ufc/ml. Se observa que mientras que en mosto sin sulfitar el número de especies era muy elevado, tras la adición de SO_2 y el comienzo de la fermentación esta heterogeneidad se reduce drásticamente, quedando como especie conductora de la fermentación *S. cerevisiae*. Varias razas o variedades de esta especie se aislaron a lo largo del proceso fermentativo, pero no pudimos definir tendencias en la sucesión de estas variedades. Unas veces una sola variedad realizaba toda la fermentación alcohólica, mientras que en otros casos se asociaban dos o tres para llevarla a cabo. La asociación más común de variedades en 1982 en la Cooperativa San Pedro fue *S. cerevisiae* var. *cerevisiae*-*S. cerevisiae* var. *bayanus*, mientras que en 1983 fue *S. cerevisiae* var. *cerevisiae*-*S. cerevisiae* var. *chevalieri*. En las fermentaciones seguidas en la bodega de la Escuela de Viticultura y Enología no fueron frecuentes las asociaciones, presentándose normalmente solo una de las variedades a lo largo de la fermentación, o también una sucesión de variedades en lugar de una asociación. La variedad más frecuente en todas las vinificaciones ha sido *S. cerevisiae* var. *cerevisiae*, seguida de *S. cerevisiae* var. *chevalieri*.

La presencia de una u otra variedad es explicable en función de distintas tasas de crecimiento y mayores ventajas en la competencia por nutrientes. Hemos desechado que la sensibilidad al etanol sea la responsable de este fenómeno, puesto que las distintas variedades aparecen a lo largo de toda la fermentación, y su presencia no se restringe a unas determinadas etapas. Generalmente es *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae* la que se halla en vinos trasegados, a pesar de que al final de la fermentación esta variedad coexiste con otras tales como *S. cerevisiae* var. *capensis*, *S. cerevisiae* var. *bayanus* y *S. cerevisiae* var. *chevalieri*. Es posible que estas últimas variedades se vean más afectadas por la adición de SO_2 posterior al trasiego que sufrieron los vinos antes de realizarse el último muestreo.

El estudio de la influencia que tienen los distintos sistemas de vinificación sobre la evolución de la microflora, nos ha permitido observar que los cambios introducidos por el sistema BIDONE son más de carácter cuantitativo que cualitativo. La evolución de las especies a lo largo de la fermentación tradicional y de la fermentación por el sistema BIDONE fue esencialmente la misma. Sin embargo, si estudiamos el número total de levaduras viables durante la fermentación, observaremos que con el sistema BIDONE se logra mantener un crecimiento continuo de la población de levaduras durante toda la fermentación, mientras que con el sistema tradicional el máximo poblacional se alcanza en los primeros días, disminuyendo luego el número de células viables. El mantenimiento de poblaciones viables más altas y durante más tiempo puede ser una razón que apoye la obtención de rendimientos más elevados en la transformación de azúcares por el sistema BIDONE.

Con respecto a las vinificaciones realizadas con poco contenido en SO_2 y a baja temperatura (Escuela de Viticultura y Enología), hemos de afirmar que las adiciones de SO_2 de 100 mg/l fueron suficientes para eliminar la

flora "salvaje", pero no lograron impedir la infección posterior por *Saccharomyces ludwigii*. Las vinificaciones realizadas con 70 mg/l de SO₂ presentaron más problemas, ya que no consiguieron eliminar especies como *Candida stellata* y *Kloeckera apis*, y no impidieron las contaminaciones de origen exógeno con *Kloeckera japonica* y *Pichia guilliermondii*. La vinificación sin SO₂ no eliminaba a las especies "salvajes" hasta el final de la fermentación alcohólica, y además los mostos en fermentación eran susceptibles de contaminaciones.

Otra de las metas a conseguir con este trabajo fue el establecimiento de una metodología adecuada para el aislamiento y clasificación de bacterias lácticas. El método de aislamiento por enriquecimiento fue inadecuado para ofrecer una visión real de las especies que constituían las poblaciones de bacterias lácticas. Esto fue muy evidente cuando en las muestras existían especies de crecimiento muy rápido junto a otras de crecimiento muy lento. Las primeras proliferaron rápidamente en el medio sintético, constituyéndose en población dominante e impidiendo el desarrollo de las más lentas. La existencia de *L. plantarum* en las muestras impedía el aislamiento de otras especies; sin embargo, si ésta no se presentaba, y el resto poseían tasas de crecimiento parecidas, se obtenía un mayor número de especies en un mismo aislamiento.

A pesar de las opiniones en contra de la clasificación de bacterias lácticas basada en la taxonomía "oficial" ("Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" y "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology") la utilización de estas claves nos permitió clasificar la mayor parte de las bacterias aisladas de vinos. Solamente ocho cepas quedaron sin adscribir a ninguna especie, y esto se debió a la falta de resultados claros más que a defectos de las claves.

El empleo de la tira API 50 CHL proporcionó resultados muy claros con la gran mayoría de cepas pertenecientes a *Lactobacillus*, y también en el

caso de *L. paramesenteroides*. Sin embargo este sistema miniaturizado no fue muy eficaz para la determinación del patrón de fermentación de carbohidratos de *L. oenos*. Esta especie, de lento crecimiento y baja actividad metabólica, mostraba mejor sus capacidades fermentativas cuando se ensayaba en el medio semisólido de GARVIE [133].

La caracterización fisiológica y metabólica de las bacterias lácticas aisladas en este trabajo evidenció que todas, excepto *L. paramesenteroides*, eran capaces de crecer a pH 3.7 en medio sintético. Todas se desarrollaron en un intervalo de temperaturas entre 10 y 37°C, pero solamente aquellas pertenecientes a *L. plantarum* lograron hacerlo a 45°C. El crecimiento con 10% de etanol fue positivo en todas las cepas de *L. cellobiosus*, *L. fructivorans*, *L. plantarum*, *L. oenos*, y en las cepas no identificadas. El resto de las especies presentaban heterogeneidad respecto de este carácter. Si nos fijamos en las características metabólicas de las especies aisladas por nosotros, veremos que ninguna de nuestras cepas es capaz de metabolizar ni el glicerol ni el ácido tartárico, lo cual las excluye del grupo de alto riesgo de peligrosidad que define RANKINE [277].

Por otro lado, DELFINI piensa que la bacteria láctica ideal sería aquella que entre otras características, fermentase homolácticamente la glucosa y fructosa. La única especie que cumple esta premisa entre las aisladas por nosotros es *L. plantarum*. Evidentemente, si la glucosa y la fructosa son degradadas homolácticamente, la producción de ácido acético a partir de la misma es menor y además no se produce manitol. Sin embargo, las especies homolácticas pueden producir ácido acético a partir de otros sustratos, como las pentosas.

Las especies más activas frente a los carbohidratos fueron *L. cellobiosus*, *L. plantarum*, *L. paramesenteroides* y la cepa 31. Todas estas son capaces de fermentar xilosa y ribosa, mientras que la L-arabinosa es degradada por todas menos por la cepa 31. Esta característica las haría

parecer peligrosas ya que PEYNAUD et al. [282] informan que la fermentación de las pentosas da lugar a un incremento de la acidez volátil. DELFINI [99] considera que la bacteria maloláctica ideal no debe fermentar pentosas. La única especie de entre las que hemos aislado que cumple este requisito es *L. fructivorans*, pero esta especie se considera perjudicial por muchos autores [3, 5, 89], dado que produce un incremento tanto de la acidez fija como de la acidez volátil en el vino [270].

Las cepas más inactivas frente a los carbohidratos resultaron ser *L. fructivorans*, *L. hilgardii* y *L. oenos*. *L. hilgardii* podría ser una cepa interesante cuando se desee inocular cultivos puros en el vino, ya que no ataca ni al ácido cítrico ni al ácido tartárico, y entre las pentosas no ataca a la L-arabinosa que es la que mayoritariamente se encuentra en el vino. Las cepas G41 y G6 tampoco atacan este azúcar y además tampoco fermentan la xilosa, por lo que también podrían ser adecuadas. En realidad no existe una bacteria maloláctica ideal, ya que ninguna cumple estrictamente todas las características necesarias para serlo. Sin embargo, conociendo el metabolismo y la fisiología de las mismas se pueden establecer las condiciones en las que pueden actuar con un elevado margen de seguridad en la producción de un vino de calidad. Así, no elegiríamos para realizar la fermentación maloláctica en vinos acabados a aquellas cepas incapaces de crecer a pH=3.7 ni con 10% de etanol. Sin embargo, el que tengan un metabolismo homoláctico o heteroláctico no es tan importante si el vino carece de hexosas fermentables. Por otro lado, el metabolismo del ácido cítrico puede producir ácido acético, pero también acetoina y diacetilo, los cuales en cantidades adecuadas mejoran la calidad organoléptica de un vino.

Todas las cepas que hemos aislado son capaces de degradar el ácido L-málico, siendo las más activas frente a él *L. cellobiosus*, *L. plantarum*, *L. oenos*, *L. paramesenteroides* y el grupo de cepas no identificadas.

La capacidad de llevar a cabo la fermentación maloláctica en vino se ve influenciada por varios factores como el pH, SO_2 , temperatura y la concentración de CO_2 en la atmósfera de incubación. A pesar de que se puede generalizar el efecto que cada uno de estos factores ejerce sobre cada especie, es evidente que a nivel de cepa existen comportamientos particulares que deben ser tenidos en cuenta. Así por ejemplo, las especies que realizan la fermentación maloláctica a pHs más bajos en forma de células no proliferantes son *L. oenos* y las cepas C43, C45 y 31; sin embargo dentro de *L. oenos* tenemos cepas que no logran la fermentación maloláctica más que a $\text{pH}=3.9$ (ver Tabla 37), o cepas que actúan mucho más rápidamente que otras en las mismas condiciones. El efecto que ejerce el SO_2 sobre las cepas y las especies sí es bastante general: excepto la cepa C43, el resto es incapaz de realizar la fermentación maloláctica cuando el contenido total de SO_2 en el vino es de 100 mg/l. Las especies más tolerantes al alcohol fueron también *L. oenos*, *L. hilgardii*, y dentro de cepas no identificadas C43 y 31. Dependiendo de las cepas, la tolerancia al alcohol se manifiesta sin alterar la rapidez de la fermentación maloláctica (como era el caso de G41, M41 y 161) o retrasando el fenómeno sin llegar a inhibirlo (como en el caso de C43, M42, G7 y 163). Estas diferencias pueden ser explicadas como resistencia de los enzimas de la fermentación maloláctica a la desnaturalización por el etanol, o por resistencia de las cepas al efecto antiséptico del mismo. Las temperaturas bajas, en contra de lo que afirman muchos autores, no han disminuído la velocidad de la fermentación maloláctica, sino que en algunos casos la han acelerado. Este comportamiento no desafía las leyes físico-químicas, ya que el efecto beneficioso de las temperaturas bajas debe buscarse en que en esas condiciones los efectos negativos del pH y del etanol quedan frenados. El efecto final de la temperatura va a depender por un lado de la acción que tenga sobre los procesos bioquímicos, y por otro del efecto protector

frente a los inhibidores del vino; de esta forma el resultado final será característico de cada cepa. La temperatura en algunos casos carece de efecto, pero a veces una disminución en la misma es capaz de hacer posible la fermentación maloláctica cuando a temperaturas superiores no puede efectuarse; en el caso opuesto una disminución de la temperatura en varios grados puede ocasionar o el retraso o la imposibilidad de completar la fermentación maloláctica. En general, las cepas más adecuadas para trabajar a bajas temperaturas son G6, G41, M41, M42 y 172, pertenecientes todas ellas a *Leuconostoc oenos*. En el caso de *L. hilgardii* y *L. plantarum*, no es recomendable bajar de los 22°C. Para las cepas C43, C45 y 31, las temperaturas por debajo de los 18°C ya retrasan la fermentación maloláctica, mientras que para el resto de cepas no identificadas el rango óptimo para efectuar la fermentación maloláctica se sitúa entre 15 y 22°C, lo cual las hace adecuadas para trabajar en condiciones de bodega.

El CO₂ en general ha mostrado un efecto positivo, acelerando la fermentación maloláctica en la mayoría de las cepas que la realizaban en condiciones control; también ha hecho posible que cepas que no la producían en estas condiciones, la llevaran a cabo en atmósferas más ricas en CO₂. Los niveles más adecuados de CO₂ en la atmósfera dependen de la cepa. En algunos casos, como en el de *Leuconostoc oenos*, existe una cantidad mínima de CO₂ que permite acelerar el proceso (en este caso del 25%) pero un aumento en la atmósfera no mejora los rendimientos. Sin embargo en otras especies sí que hemos observado comportamientos distintos en función de las concentraciones de CO₂: en general, las cantidades de hasta el 50% de CO₂ aceleran la fermentación maloláctica, y las concentraciones mayores o no afectan a la velocidad del proceso o la disminuyen. El modo en que actúa el CO₂ sobre la fermentación maloláctica es algo que desconocemos. Este producto podría actuar protegiendo a las células de la muerte observada al inocular el vino, o puede que active ciertos enzimas implicados en la

fermentación maloláctica; esto explicaría la aceleración del proceso, pero la validez de estas hipótesis queda por comprobar.

Es posible que todos los parámetros que hemos probado no afecten tan sólo a los enzimas responsables de la fermentación maloláctica, sino también a la tasa de viabilidad de las bacterias en vino: menor mortalidad significaría mayor rapidez en la finalización de la fermentación maloláctica, sin necesidad de que los propios enzimas de la fermentación maloláctica se vieran implicados.

De las 28 cepas sembradas en vino a pH igual o inferior a 3.5, sólo 5 cepas pudieron crecer; 3 de ellas pertenecían a *L. oenos* (G6, M41 y M42) y otras 2 no han podido ser identificadas (C43 y C45).

Entre las cepas capaces de crecer en vino a pHs bajos, C43 parece ser la más interesante, puesto que además es la única que realiza la fermentación maloláctica a concentraciones de SO_2 total de 100 mg/l, así como a concentraciones de etanol de hasta el 16%. El inconveniente que presenta esta cepa es que produce dextrano a partir de la sacarosa, lo cual puede provocar la alteración denominada "grasa" del vino [5, 277].

Por el contrario, C45 no presenta tantas ventajas, ya que su crecimiento en vino es mucho más lento y no puede realizar la fermentación maloláctica a concentraciones de SO_2 total superiores a 50 mg/l, ni a concentraciones de etanol superiores a 12° alcohólicos.

Las cepas más interesantes, por tanto, son las pertenecientes a *L. oenos*, y entre todas ellas M41 parece tolerar bien los 16° alcohólicos y las bajas temperaturas.

En este trabajo se ha observado la influencia que diferentes niveles de inóculo tienen sobre la consecución de la fermentación maloláctica y sobre el crecimiento de las cepas en vino, llegando a la conclusión de que la fermentación maloláctica se produce a valores de pH más bajos y con mayor rapidez cuanto mayor es la concentración celular del inóculo. Con

respecto al crecimiento, la utilización de inóculos elevados reduce el fenómeno de muerte inicial y adelanta la entrada en fase exponencial de los cultivos sembrados en vino. Otra conclusión a la que hemos llegado en el presente trabajo, es que la preadaptación de las bacterias en vino tiene un efecto beneficioso en la obtención del crecimiento y de la fermentación maloláctica, siendo necesarias menores concentraciones celulares que cuando se inocula directamente de medio sintético en vino.

CONCLUSIONES.

- 1.- Se ha demostrado que tanto el sistema de vinificación BIDONE como los sistemas que emplean bajas temperaturas son más adecuados que la vinificación tradicional, ya que proporcionan mayor rendimiento en etanol, mayor proporción de SO₂ libre, y menor pérdida de acidez total y de color.
- 2.- Los sistemas miniaturizados API 20 C y API 20 C Aux no resultan adecuados por sí solos para la clasificación de las levaduras del vino. Esto se debe a que se basan en pocas pruebas, los resultados no siempre son fiables, y no permiten la realización de incubaciones prolongadas cuando éstas son necesarias. Se recomienda la utilización de los métodos clásicos con el máximo número de pruebas posibles.
- 3.- La flora levaduriforme asociada a los mostos estudiados de la D.O. Utiel-Requena está constituida mayoritariamente por las especies *Candida pulcherrima*, *Candida stellata*, *Kloeckera apis*, *Pichia kluyveri* y *Saccharomyces cerevisiae*. También es de destacar la presencia de *Aureobasidium pullulans*, aunque actualmente no se la considera perteneciente al grupo de levaduras.
- 4.- No se han observado diferencias en la flora levaduriforme mayoritaria asociada a los mostos de dos vendimias sucesivas. Sin embargo, en 1982 se detectó una mayor aparición de especies ocasionales. No se aprecian tampoco diferencias notables en las asociaciones de levaduras presentes en mostos de distintas variedades de uva o de diversas localidades dentro de la misma zona.
- 5.- Los distintos sistemas y tratamientos de vinificación influyen en la dinámica de las poblaciones microbianas, tanto cuantitativa como

cualitativamente. Aquellos sistemas que disminuyen las temperaturas de fermentación, permiten el mantenimiento de poblaciones viables durante más tiempo. Las vinificaciones con dosis bajas de SO_2 (70 mg/l o inferiores), no eliminan las levaduras "salvajes", y son además susceptibles de contaminaciones exógenas.

- 6.- La especie que conduce la fermentación alcohólica en los mostos estudiados es *Saccharomyces cerevisiae*. Diversas variedades de esta especie se suceden a lo largo de la vinificación, presentándose asociadas en algunas ocasiones y aisladas en otras. El aislamiento de cada una de estas variedades no se restringió a una etapa determinada de la fermentación.
- 7.- El sistema de enriquecimiento para el aislamiento de bacterias lácticas no proporcionó una representación exacta de las especies que constituyen las poblaciones de mostos y vinos.
- 8.- El sistema API 50 CHL se mostró adecuado para evidenciar el patrón de fermentación de carbohidratos de la mayoría de bacterias lácticas aisladas, pero no para *L. oenos*.
- 9.- Las especies de bacterias lácticas que se encontraron asociadas a mostos sin sulfitar fueron *L. brevis*, *L. cellobiosus*, *L. hilgardii*, *L. plantarum* y *L. paramasenteroides*. Durante la fermentación alcohólica se aisló *L. hilgardii*, y una vez finalizada ésta se hallaron además *L. fructivorans* y *L. oenos*. Esta última es la responsable de la fermentación maloláctica en varios de los vinos analizados. También se detectaron varias cepas durante toda la vinificación, que no pudieron ser asignadas a ninguna especie de las descritas en la bibliografía.

- 10.- Todas las cepas bacterianas aisladas en este trabajo son capaces de fermentar el ácido málico; sin embargo ninguna consiguió metabolizar el ácido tartárico. El ácido fumárico también fue degradado por la gran mayoría de las cepas, mientras que el ácido cítrico sólo fue utilizado por la mitad de las mismas.
- 11.- La capacidad característica de cada cepa de realizar la fermentación maloláctica se ve afectada negativamente por pHs bajos, por concentraciones de SO_2 total superiores a 50 mg/l, y por concentraciones de etanol superiores al 12% (v/v). Las bajas temperaturas y atmósferas enriquecidas en CO_2 pueden potenciar el desarrollo de la fermentación maloláctica.
- 12.- Sólo 5 de las 28 cepas bacterianas ensayadas fueron capaces de crecer en vino a un pH igual o inferior a 3.5.
- 13.- En las inoculaciones de bacterias lácticas en vinos, la concentración celular del inóculo influye en la magnitud de la fase de muerte inicial, en la velocidad con que se realiza la fermentación maloláctica, y en el umbral mínimo de pH al cual cada cepa es capaz de realizarla.

- 1 AERNY, J. (1985). Origine de l'histamine dans les vins. Connaissances actuelles. Bull. O.I.V. 58, 1016-1019.
- 2 AMERINE, M. (1964). Wine. Sci. Am. 211, 46-60.
- 3 AMERINE, M.A.; BERG, H.W.; KUNKEE, R.E.; OUGH, C.S.; SINGLETON, U.L.; WEBB, A.D. (1980). The technology of winemaking. AVI Publishing Company. Westport. C.T.
- 4 AMERINE, M.A.; JOSLYN, M.A. (1970). Table wines, the technology of their production. University of California Press.
- 5 AMERINE, M.A.; KUNKEE, R.E. (1968). Microbiology of winemaking. Annu. Rev. Microbiol. 22, 323-357.
- 6 AMERINE, M.A.; OUGH, C.S. (1972). Recent advances in enology. Crit. Rev. Food Technol. 2, 407-515.
- 7 AMERINE, M.A.; OUGH, C.S. (1976). Análisis de vinos y mostos. Acribia. Zaragoza.
- 8 ANACLETO, J.; VAN UDEN, N. (1982). Kinetics and activation energetics of death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by sulfur dioxide. Biotechnol. Bioeng. 24, 2477-2486.
- 9 ANDERSON, P. (1982). Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos y bebidas. Ministerio de Sanidad y Consumo. Instituto Nacional de Sanidad. Madrid.
- 10 API 50 CH Carbohydrates. (1982). # 5030 API System, S.A. La Balme les Grottes - France.
- 11 API 50 CHL *Lactobacillus*. (1981). # 5041 API System, S.A. La Balme les Grottes - France.
- 12 API 50 L *Lactobacillus* (1978). # 5020 API System, S.A. La Balme les Grottes - France.
- 13 ARISTOY CENCILLO, M. (1980). Variedades de vid cultivadas en Valencia. Diputación Provincial de Valencia. Patronato Provincial de Capacitación Agraria. Valencia.
- 14 ASAI, T. (1968). Acetic acid bacteria. Classification and Biochemical Activities. Univ. Tokio Press. Tokio.
- 15 AYRAPAA, T. (1971). Biosynthetic formation of higher alcohols by yeasts. Dependence on the nitrogenous nutrient level of the medium. J. Inst. Brew. London. 77, 266-276.
- 16 BACCIONI, L.; CANTARELLI, C. (1984). Problemi relativi alla regolazione della temperatura de fermentazione. Ind. Bevande 14, 7-23.
- 17 BARNETT, J.A. (1971). Selection of tests for identifying yeasts. Nature 232, 221-223.

BIBLIOGRAFIA .

- 18 BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. (1983). Yeasts; Characteristics and identification. Cambridge University Press. London.
- 19 BARRE, P. (1966). Recherches sur les bactéries lactiques des vives. I. Isolement et classification. Ann. Technol. Agric. 15, 173-180.
- 20 BARRE, P. (1966). Détermination rapide de la nature optique de l'acide lactique produit dans les fermentations bactériennes. Ses applications dans la classification des *Lactobacillaceae*. Ann. Technol. Agric. 15, 203.
- 21 BARRILLERE, J.M.; BENARD, P.; DUBOIS, C. (1986). Utilisation de retentat de microfiltration pour induire la fermentation malolactique. Rev. Fr. Oenol. 102, 17-19.
- 22 BASCONES, D.; KHAYYAT, N.; ARROYO, V. (1981). Evolución de la microflora de levaduras de los mostos de uva de Jumilla. Microbiol. Españ. 34, 61-69.
- 23 BEECH, F.W.; DAVENPORT, R.R.; GOSWELL, R.W.; BURNETT, J.K. (1968). Two simplified schemes for identifying yeast cultures. En "Identification Methods for Microbiologists". Part B. Academic Press. New York. pp. 150-175.
- 24 BEECH, F.W.; THOMAS, S. (1985). Action antimicrobienne de l'anhydride sulfureux. Bull. O.I.V. 58, 564-581.
- 25 BEELMAN, R.B.; GALLANDER, J.F. (1970). The effect of grape skin treatments on induced malo-lactic fermentation on Ohio wines. Am. J. Enol. Vitic. 21, 193-200.
- 26 BEELMAN, R.B.; GALLANDER, J.F. (1979). Wine deacidification. Adv. Food Res. 25, 1-53.
- 27 BEELMAN, R.B.; GAVIN III, A.; KEEN, R.M. (1977). A new strain of *Leuconostoc oenos* for induced malo-lactic fermentation in eastern wines. Am. J. Enol. Vitic. 28, 159-165.
- 28 BEELMAN, R.B.; KEEN, R.M.; BANNER, M.J.; KING, S.W. (1982). Interactions between wine yeasts and malolactic bacteria under wine conditions. Dev. Ind. Microbiol. 23, 107-121.
- 29 BEELMAN, R.B.; McARDLE, F.J.; DUKE, G.R. (1980). Comparison of *Leuconostoc oenos* strains ML-34 and PSU-1 to induce malo-lactic fermentation in Pennsylvania red table wines. Am. J. Enol. Vitic. 31, 269-276.
- 30 BENDA, I. (1970). Natural and controlled microbial processes in grape must and in young wine. Bayer. Landwidsch. Jahrb. 47, 19-29.
- 31 BENDA, I. (1982). Wine and brandy. En "Prescott and Dunns industrial microbiology". (Reed, G., ed.). AVI Publishing Company. Westport. pp. 293-402.
- 32 BERGMAYER, H.U.; MOELLERING, H. (1984). Acetate. Determination with acetate kinase. En "Methods of Enzymatic Analysis". Tomo VI. (Bergmeyer, H.U., ed.). Academic Press. New York; N.Y. pp. 628-639.

- 33 BERTRAND, A.; MARLY-BRUGEROLLE, C.; SARRE, C. (1978). Influence du débouillage des moûts et du sulfitage sur les teneurs en substances volatiles des vins et des eaux-de-vie. *Conn. Vigne Vin* 12, 35-48.
- 34 BERTRAND, A.; MIELE, A. (1984). Influence de la clarification du moût de raisin sur sa teneur en acides gras. *Conn. Vigne Vin* 18, 293-297.
- 35 BIDAN, P.; COLLON, Y. (1985). Métabolisme du soufre chez la levure. *Bull. O.I.V.* 58, 544-563.
- 36 BILINSKI, C.A.; INNAMORATO, G.; STEWART, G.G. (1985). Identification and characterization of antimicrobial activity in two yeast genera. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 1330-1332.
- 37 BISSON, J.; DAULNY, B.; BERTRAND, A. (1980). Influence de la température de fermentation sur la composition d'un vin blanc sec. *Conn. Vigne Vin* 14, 195-202.
- 38 BOEHRINGER MANNHEIM (1975). Test U.V. para la determinación del ácido L-láctico en los alimentos. "Análisis de alimentos". Boehringer Mannheim. Barcelona.
- 39 BOEHRINGER MANNHEIM (1975). Test U.V. para la determinación del ácido L-málico en los alimentos. "Análisis de alimentos". Boehringer Mannheim. Barcelona.
- 40 BOEHRINGER MANNHEIM (1984). UV-method for the determination of ethanol in foodstuffs and other materials. "Food analysis". Boehringer Mannheim. GmbH.
- 41 BOIX, E. (1969). Paralización de la fermentación. *Semana Vitivin.* 24, 37-41.
- 42 BOUSBOURAS, G.E.; KUNKEE, R.E. (1971). Effect of pH on malo-lactic fermentation in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 22, 121-126.
- 43 BRAVO, F. (1983). Vinificación controlada del mosto de uva. *Semana Vitivin.* 38, 3169-3174.
- 44 BRAVO, F.; REDONDO, A. (1984). Producción y consumo de ácido málico por levaduras en la fermentación del mosto de uva. *Anal. Bromatol.* 36, 127-132.
- 45 BRÉCHOT, P.; CHAUVET, Y.; CROSON, M. (1974). Influence de la concentration initiale de l'acide malique des moûts sur le déclenchement et l'évolution de la fermentation malo-lactique. *Ann. Technol. Agric.* 23, 411-420.
- 46 BREED, R.S.; MURRAY, E.C.D.; SMITH, N.R. (1957). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams Wilkins Co. Baltimore.
- 47 BUCHANAN, R.C.; GIBBONS, N.E. (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams Wilkins Co. Baltimore.

- 48 BUYZE, G.; VANDEN HAMER, J.A.; de HAAN, P.G. (1957). Correlation between hexose monophosphate shunt, glycolytic system and fermentation type in lactobacilli. *Antonie van Leeuwenhoek* 23, 345-350.
- 49 CABALLERO BONALD, J.M. (1967). Lo que sabemos del vino. Gregorio del Toro. Madrid.
- 50 CANTARELLI, C. (1966). Influences des températures de fermentation et de conservation du vin et des vins spéciaux sur leurs caractères chimiques, microbiologiques et organoleptiques. *Bull. O.I.V.* 39, 1191-1205.
- 51 CANTARELLI, C. (1980). Possibilità tecnologiche di abbassamento del contenuto di anidride solforosa nei vini. *Ind. Bevande* 10, 1-14.
- 52 CANTARELLI, C. (1984). Il controllo della temperatura nella fermentazione. *L'enotecnico* 20, 383-396.
- 53 CARR, J.G. (1957). Occurrence and activity of pure lactic acid bacteria from apple juices, ciders and perries. *J. Inst. Brew.* 63, 436-440.
- 54 CARR, G.J.; DAVIES, P.A.; SPARKS, A.H. (1976). The toxicity of sulphur dioxide towards certain lactic acid bacteria from fermented appel juice. *J. Appl. Bacteriol.* 40, 201-212.
- 55 CARR, J.G.; WHITING, G.C. (1956). Acid changes in cider fermentations: II. The effect of juice composition. *Rep. Long Ashton Res. Stn. for 1955*, 163-168.
- 56 CARRE, E.; LAFON-LAFOURCADE, S.; BERTRAND, A. (1983). Désacidification biologique des vins blancs secs par fermentation de l'acide malique par les levures. *Conn. Vigne Vin* 17, 43-53.
- 57 CASEY, G.P.; INGLEDEW, W.M. (1981). The use and understanding of media used in brewing bacteriology. II. Selective media for the isolation of lactic acid bacteria. *Brewers Digest* 56, 26-32.
- 58 CASEY, G.P.; INGLEDEW, W.M. (1981). The use and understanding of media used in brewing bacteriology. III. Selective media for Gram-negative bacteria. *Brewers Digest* 56, 24-35.
- 59 CASEY, G.P.; INGLEDEW, W.M. (1986). Ethanol tolerance in yeast. *CRC Critical Rev. Microbiol.* 13, 219-280.
- 60 CASTINO, M. (1980). La fermentazione malolattica nei vini bianchi. *Riv. Vitic. Enol.* 33, 425-434.
- 61 CASTINO, M.; USSEGLIO-TOMASSET, L. (1969). Osservazioni sulla fermentazione malolattica spontanea nel Barbera. *Atti Acc. It. Vite Vino* 21, 3-16.
- 62 CASTINO, M.; USSEGLIO-TOMASSET, L.; GANDINI, A. (1975). Factors which affect the spontaneous initiation of the malo-lactic fermentation in wines. The possibility of transmission by inoculation and its effect on organoleptic properties. En "Lactic acid bacteria in beverages and food". (Carr, G.J.; Cutting, C.U.; Whiting, G.C., eds.). Academic Press. London. pp. 139-148.

- 63 CATO, E.P.; MOORE, W.E.C. (1965). A routine determination of the optically active isomers of lactic acid for bacterial classification. *Can. J. Microbiol.* 11, 319.
- 64 CAZELLES, O.; GNAEGI, F. (1982). Enquête sur l'importance pratique du problème des bactériophages dans le vin. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 14, 267-270.
- 65 CIOLFI, G.; STEFANO, R. di; DELFINI, C. (1981). Influenza dell'anidride solforosa sui composti volatili ceduti dai lieviti. *Riv. Vitic. Enol. Conegliano* 34, 519-527.
- 66 CIURANA, J. (1980). Els vins de Catalunya. Servei de publicacions de la Generalitat de Catalunya. Dptm. de la Presidència. Barcelona.
- 67 CLAUS, D.; LACK, P.; NEU, P. (1983). D.S.M. Catalogue of strains. *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.*
- 68 CLEMENTI, F. (1982). Influenza di pH e SO₂ sull'attività di cellule libere e immobilizzate di fermenti malolattici. *Ann. Fac. Agr. Univ. Perugia* 36, 335-342.
- 69 CLEMENTI, F.; VINTI, G. (1983). Influenza di diversi parametri sull'attività in vino di starters concentrati e cellule immobilizzate di fermenti malolattici. *Ann. Fac. Agr. Univ. Perugia* 37, 301-309.
- 70 CORNU, M.C.; MARCHAND, A.; MEURVILLE, E.; BELIN, J.M. (1984). Incidences des composés phénoliques sur des bactéries lactiques et acétiques isolées du vin. *Sci. Alim.* 4, 73-79.
- 71 COSTELLO, P.J.; MONK, P.R.; LEE, T.H. (1985). An evaluation of two commercial *Leuconostoc oenos* strains for induction of malolactic fermentation under winery conditions. *Food Technol. Aust.* 37, 21-30.
- 72 COSTELLO, P.J.; MORRISON, G.J.; LEE, T.H.; FLEET, G.H. (1983). Numbers and species of lactic acid bacteria in wines during vinification. *Food Technol. Aust.* 35, 14-18.
- 73 COTTRELL, T.H.E.; McLELLAND, M.R. (1986). The effect of fermentation temperature on chemical and sensory characteristics of wines from seven white grape cultivars grown in New York state. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 190-194.
- 74 CROUZET, J. (1986). Les enzymes et l'arôme des vins. *Rev. Fr. Oenol.* 102, 42-49.
- 75 CUINIER, P. (1980). Origine des levures assurant l'elaboration d'un vin blanc de Touraine. Identification des espèces. *Conn. Vigne Vin* 14, 111-126.
- 76 CUINIER, C.; BOUIX, N.; LEVEAU, J.-Y. (1981). Méthode d'étude de l'origine des levures en oenologie. Identification des espèces et différenciation des clones. *Vignes Vins* 302, 3-7.

77. CUINIER, C.; GUERINEAU, L. (1978). Évolution de la microflore au cours de la vinification des vins de Chinon. *Vignes Vins* 269, 29-41.
78. CUINIER, C.; LEVEAU, J.Y. (1979). L'identification des levures des vignobles et des vins. Méthode rapide à l'aide de la galerie API 20 C. *Vignes Vins* 283, 44-49.
79. CHALFAN, Y.; GOLDBERG, J.; MATELES, R.I. (1977). Isolation and characterization of malo-lactic bacteria from israeli red wines. *J. Food Sci.* 42, 939-943.
80. CHALFAN, Y.; LEVY, R.; MATELES, R.I. (1975). Detection of mannitol formation by bacteria. *Appl. Microbiol.* 30, 476.
81. CHARPENTIER, C. (1985). La désacidification biologique des vins par les *Schizosaccharomyces*. En "Communications a le Journée de Recontres Oenologiques Montpellier, 1985". Laboratoire d'Oenologie. Université de Dijon. pp. 1-15.
82. CHARPENTIER, C.; FEUILLAT, M.; GERVAUX, V.; AUTHER, R. (1985). La désacidification biologique des vins blancs par les *Schizosaccharomyces*. *C.R. Acad. Agric. Fr.* 71, 425-432.
83. CHAUVET, J.; BRECHOT, P.; DUBOIS, C.; DUPUY, P.; DORANGE, J.L. (1982). Stimulation de la croissance dans le vin d'une flore malolactique par les acides malique et citrique. *Sci. Alim.* 2, 495-504.
84. CHAUVET, J.; BRECHOT, P.; DUPUY, P.; DUBOIS, C. (1980). Les acides malique et citrique peuvent-ils être les substrats permettant la croissance des bactéries malo-lactiques dans le vin?. *C.R. Acad. Agric. Fr.* 66, 1174-1180.
85. CHAUVET, M.; REYNIER, A. (1978). *Manual de Viticultura*. Mundo-Prensa. Madrid.
86. CHEN, K.H.; McFEETERS, R.F.; FLEMING, H.P. (1983). Fermentation characteristics of heterolactic acid bacteria in green bean juice. *J. Food Sci.* 48, 962-966.
87. DAUDT, C.E.; OUGH, C.S. (1973). Variations in some volatile acetate esters formed during grape juice fermentation. Effects of fermentation temperature, SO₂, yeast strain, and grape variety. *Am. J. Enol. Vitic.* 24, 130-135.
88. DAVENPORT, R.R. (1972). Vineyard yeasts - an environmental study. En "Isolation Methods for Microbiologists". Society for Applied Bacteriology. Technical Series 7. (Lovelock, B., ed.). Academic Press. New York. pp. 143-174.
89. DAVIS, C.R.; WIBOVO, D.; ESCHENBRUCH, R.; LEE, T.H.; FLEET, G.H. (1985). Practical implications of malolactic fermentations: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 290-301.
90. DAVIS, C.R.; WIBOVO, D.; LEE, T.H.; FLEET, G.H. (1986). Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines and at different pH. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 539-545.

- 91 DAVIS, C.R.; WIBOWO, D.; LEE, T.H.; FLEET, G.H. (1986). Growth and metabolism of lactic acid bacteria during fermentation and conservation of some australian wines. *Food Technol. Aust.* 38, 35-39.
- 92 DAZA, R.N.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; PORTERO-AZORIN, F.; SANCHEZ, A.; DAMASO, D. (1986). Estudio comparativo del API 20 C AUX y Abbott Quantum II Yeast Identification System en la identificación de especies de levaduras. *Rev. Esp. Microbiol. Clin.* 1, 311-317.
- 93 DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.R. (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacillus*. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 130-135.
- 94 DE ROISSART, H.-B. (1983). Que sont les bactéries lactiques? *Tech. Lait.* 979, 41-47.
- 95 DE ROSA, T. (1978). *Tecnologia dei vini bianchi*. AEB. Brescia.
- 96 DE VALDEZ, G.F.; DE GIORI, G.S.; DE RUIZ, A.P.; OLIVER, G. (1985). Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 413-415.
- 97 DEIANA, P.; FARRIS, G.A.; FATICHENTI, F. (1983). La microflora bacteriana de los vinos producidos en la isla de Cerdeña. *Alimentaria* 145, 39-43.
- 98 DEL CASTILLO, L. (1985). Genetic aspects of ethanol tolerante and production by *Saccharomyces cerevisiae*: *Curr. Microbiol.* 12, 41-44.
- 99 DELFINI, C. (1983). Studio sull'attività biologica della schizoflora lattica nei mosti e nei vini. I. Isolamento e identificazione tassonomica di stipiti di batteri lattici dotati dell'attitudine a svolgere la fermentazione malolattica nei vini acidi. *Vignevine* 10, 67-74.
- 100 DELFINI, C.; DI STEFANO, R. (1984). L'attività malolattica nei vini. II. Studio sull'attività biologica della schizoflora lattica nei mosti e nei vini. *Vini d'Italia* 2, 11-22.
- 101 DELLAGLIO, F.; BOTTAZZI, V.; VESCOVO, M. (1975). Deoxyribonucleic acid homology among *Lactobacillus* species of the subgenus *Streptobacterium* Orla-Jensen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 25, 160-172.
- 102 DESCOUT, J.J. (1980). Une possibilité d'ensemencement massif pour induire la fermentation malolactique. *Conn. Vigne Vin* 14, 73-77.
- 103 DIMOTAKI-KOURAKOU, V. (1960). Dosage de l'acide L-lactique à l'aide des échangeurs d'ions. *Ann. Falsif. Exp. Chim.* 53, 569-580.
- 104 DITTRICH, H. H. (1977). *Mikrobiologie des weines*. Eugen Ulmer Verlag.
- 105 DRAWERT, F.; SCHREIER, P.; SCHREUER, W. (1974). Gas chromatographic - mass spectrometric investigation of volatile components of wine. III. Acids of the wine aroma. *Z. Lebensm - Unters. Forsch.* 155, 342-346.

- 106 DRINAN, D.F.; TOBIN, S.; COGAN, T.M. (1976). Citric acid metabolism in hetero- and homofementative lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 481-486.
- 107 DU PLESSIS, L. de W.; VAN ZYL, J.A. (1963). The microbiology of South-african wine making. Part IV. Fermentation of D-glucose, D-fructose, D-xylose, and L-arabinose by lactic acid bacteria from dry wines. *S. Afr. J. Agric. Sci.* 6, 673-687.
- 108 DUNDON, C.G.; SMART, R.E.; MCCARTHY, M.G. (1984). The effect of potassium fertilizer on must and wine potassium levels of Shiraz grapevines. *Am. J. Enol. Vitic.* 35, 200-205.
- 109 DUPUY, P.; MANGENET, J. (1963). I Symposium International d'Oenologie. p. 63. Inra. Edition. Paris.
- 110 ESCHENBRUCH, R.; PETERSON, C.A.; FISHER, B.M. (1984). Towards controlling the malolactic fermentation. En "Proc. 7th Oenol. Symp. (Lemperle, E.; Rosenberg, H., eds.). Int. Assoc. Modern Winery Technol. Mgmt. Breisach. pp. 385-401.
- 111 ETHIRAJ, S.; SURESH, E.R.; ONKARAYYA, H. (1983). Controlled deacidification of 'Bangalore Blue' grape must with *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Food Sci. Technol.* 20, 248-250.
- 112 FATTICENTI, F.; FARRIS, G.A.; DEIANA, P.; CECCARELLI, S. (1984). Malic acid production and consumption by selected of *Saccharomyces cerevisiae* under anaerobic and aerobic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19, 427-429.
- 113 FEUILLAT, M.; GUILLOUX-BENATIER, M.; GERBAUX, V. (1985). Essais d'activation de la fermentation malolactique dans les vins. *Sci. Alim.* 5, 103-122.
- 114 FINEGOLD, H.; MARTIN, S. (1983). Diagnostico microbiológico. Bailey-Scott (ed). 6^a ed. Ed. Médica Panamericana.
- 115 FLEET, G.H.; LAFON-LAFOURCADE, S.; RIBÉREAU-GAYON, P. (1984). Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1034-1038.
- 116 FLORENZANO, E. (1984). I lieviti vinari nel nuovo ordinamento sistematico. *Atti Acc. It. Vite Vino* 36, 449-469.
- 117 FLORENZANO, G.; BALLONI, W. (1981). Progressi nelle conoscenze sulla fermentazione dell'acido malico nei vini. *Atti Acad. It. Vite Vino* 33, 179-194.
- 118 FORNACHON, J.C.M. (1957). The occurrence of malo-lactic fermentation in australian wines. *Aust. J. Appl. Sci.* 8, 120-129.
- 119 FORNACHON, J.C.M. (1963). Inhibition of certain lactic acid bacteria by free and bound sulphur dioxide. *J. Sci. Food Agric.* 14, 857-862.
- 120 FORNACHON, J.C.M. (1964). A *Leuconostoc* causing malo-lactic fermentation in australian wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 15, 184-186.

- 121 FORNACHON, J.C.M. (1968). Influence of different yeasts on the growth of lactic acid bacteria in wine. *J. Sci. Food Agric.* 19, 374-378.
- 122 FORNACHON, J.C.M.; LLOYD, B. (1965). Bacterial production of diacetyl and acetoin in wine. *J. Sci. Food Agric.* 16, 710-716.
- 123 FRATEUR, J. (1950). Study of the systematic of *Acetobacter*. *Cellule* 53, 287-289.
- 124 FRAZIER, W.C. (1976). *Microbiología de los alimentos*. Acribia. Zaragoza.
- 125 GALLANDER, J.F. (1979). Effect of bacterial inoculation on the stimulation of malo-lactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 30, 157-159.
- 126 GANDINI, A. (1969). La fermentazione malo-lattica sotto l'aspetto microbiologico, chimico et tecnologico. *Vini d'Italia* 11, 125-134.
- 127 GANDINI, A.; GERBI, V.; GAUDIO, R. (1984). Indagine sulla frequenza e l'importanza della fermentazione malolattica nel Grignolino. *Vignevini* 11, 39-43.
- 128 GANDINI, A.; GERBI, V.; VAIRA, A. (1984). La diffusione della fermentazione malolattica nei vini bianchi secchi piemontesi. *Ind. Bevande* 14, 302-308.
- 129 GARCIA BARCELO, J. (1976). *Métodología de Análisis de vinos y derivados*. SEPSA. Barcelona.
- 130 GARCIA MAIQUEZ, E. (1978). *Estudios sobre las levaduras y otros microorganismos presentes en los mostos de Jerez*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- 131 GARCIA MAIQUEZ, E. (1982). Evolución de levaduras durante la fermentación alcohólica del jerez. *Segundas Jornadas Universitarias sobre el Jerez*. Cádiz. Libro de resúmenes. pp. 283-291.
- 132 GARVIE, E.I. (1960). The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. *J. Dairy Res.* 27, 283-292.
- 133 GARVIE, E.I. (1967). *Leuconostoc oenos* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* 48, 431-438.
- 134 GARVIE, E.I. (1967). The growth factor and amino acid requirements of species of the genus *Leuconostoc*, including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp. nov.) and *Leuconostoc oenos*. *J. Gen. Microbiol.* 48, 439-447.
- 135 GARVIE, E.I. (1980). Bacterial lactate dehydrogenases. *Microbiol. Rev.* 44, 106-139.
- 136 GENEIX, C.; LAFON-LAFOURCADE, S.; RIBÉREAU-GAYON, P. (1983). Les causes, la prévention et le traitement des arrêts de la fermentation alcoolique. *Conn. Vigne Vin* 17, 205-127.

- 137 GIANNAKOPOULOS, P.I.; MARKAKIS, P.; HOWELL, G.S. (1984). The influence of malolactic strain on the fermentation on wine quality of three Eastern red wine grape cultivars. *Am. J. Enol. Vitic.* 35, 1-4.
- 138 GNAEGI, F.; CAZELLES, O.; SOZZI, T.; D'AMICO, N. (1984). Connaissances sur les bactériophages de *Leuconostoc oenos* et progrès dans la maîtrise de la fermentation malolactique des vins. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 16, 59-65.
- 139 GNAEGI, F.; SOZZI, T. (1983). Les bactériophages de *Leuconostoc oenos* et leur importance oenologique. *Bull. O.I.V.* 56, 352-357.
- 140 GOTO, S. (1980). Changes in the wild yeast flora of sulfited grape musts. *J. Inst. Enol. Vitic. Yamanashi Univ.* 15, 29-32.
- 141 GOTO, S.; OGURI, H. (1983). Yeast flora in wild grapes from mountainous places around the Kofu basin of central Japan. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 24, 151-157.
- 142 GOTO, S.; YOKOTSUKA, I. (1977). Wild yeast populations in fresh grape musts of different harvest times. *J. Ferment. Technol.* 55, 417-422.
- 143 GOTTSCALK, A. (1946). The mechanism of selective fermentation of D-fructose from invert sugar by Sauternes yeast. *Biochem. J.* 40, 621-626.
- 144 GUILLEM RUIZ, J.V. (1980). Vinos Valencianos. Grupo Exportador de vinos de Valencia. Alboraya. Valencia.
- 145 GUILLOUX-BENATIER, M.; FEULLIAT, M.; CIOLFI, B. (1985). Controbutión à l'étude de la dégradation de l'acide L-malique par les bactéries lactiques isolées du vin: effet stimulant des autolysats de levures. *Vitis* 24, 59-74.
- 146 GUIMBERTEAU, G.; PEYNAUD, E. (1966). Comparaison de quelques méthodes de dosage de l'acide lactique dans les vins. *Ann. Technol. Agr.* 15, 303-309.
- 147 HARRIGAN, W.F.; McCANCE, M.E. (1968). Métodos de laboratorio en Microbiología. Editorial Academia. León.
- 148 HAYMAN, D.C.; MONK, P.R. (1982). Starter culture preparation for the induction of malolactic fermentation in wine. *Food Technol. Aust.* 34, 14-18.
- 149 HIDALGO, L. (1986). Los suelos de la vid en España. (Tomo I). Colección: Monografías INIA nº52. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Madrid.
- 150 HOUTMAN, A. C.; MARAIS, J.; DU PLESSIS, C. S. (1980). Factors affecting the reproductibility of fermentation of grape juice and of aroma composition of wines. I. Grape maturity, sugar, inoculum concentration, aeration, juice turbidity and ergosterol. *Vitis* 19, 37-54.
- 151 INGRAHAM, J.L.; VAUGHN, R.H.; COOKE, G.M. (1960). Studies on the malo-lactic organisms isolated from California wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 11, 1-4.

- 152 INGRAM, M. (1975). The lactic acid bacteria. A broad view. En "Lactic acid bacteria in beverages and food". (Carr, J.C.; Cutting, C.M.; Whiting, G.C., eds.). Academic Press. London. pp. 1-13.
- 153 IÑIGO, B.; BRAVO, F.; PLASENCIA, A.M. (1969). Estudio de bacterias lácticas aisladas del vino. III. Aplicación práctica en bodega de la fermentación maloláctica. Rev. Agr. Technol. Alim. 9, 428-436.
- 154 IÑIGO, B.; VAZQUEZ, D., ARROYO, V. (1963). Los agentes de la fermentación vinica en la zona de Jerez. Rev. Ciencia Aplicada. 93, 296-305.
- 155 IZUAGBE, Y.S.; DOHMAN, T.P.; SANDINE, W.E.; HEATHERBELL, D.A. (1985). Characterization of *Leuconostoc oenos* isolated from Oregon wines. Appl. Environ. Microbiol. 50, 680-684.
- 156 JAYNE-WILLIAMS, D.J. (1975). The application of miniaturized methods for the characterization of bacterial isolates. J. Appl. Bacteriol. 38, 305-309.
- 157 JOYEUX, A.; LAFON-LAFOURCADE, S.; RIBÉREAU-GAYON, P. (1984). Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. Appl. Environ. Microbiol. 48, 153-156.
- 158 JOYEUX, A.; LAFON-LAFOURCADE, S.; RIBÉREAU-GAYON, P. (1984). Métabolisme des bactéries acétiques dans le moût de raisin. Conséquences a l'égard de la fermentation alcoolique et malolactique. Sci. Alim. 4, 247-255.
- 159 KANDLER, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 49, 209-224.
- 160 KANDLER, O. (1984). Current taxonomy of Lactobacilli. Dev. Ind. Microbiol. 25, 109-123.
- 161 KHAYYAT, N.; ARROYO, V.; SOMAVILLA, J.F.; IÑIGO, B. (1982). La España vitivinícola. Estudio microbiológico. Alimentaria 131, 29-32.
- 162 KILLIAN, E.; OUGH, C.S. (1979). Fermentation esters - formation and retention as affected by fermentation temperature. Am. J. Enol. Vitic. 30, 301-305.
- 163 KLUBA, R.M.; BEELMAN, R.B. (1975). Influence of amelioration on the major acid components of must and wines from four French hybrid grape cultivars. Am. J. Enol. Vitic. 26, 18-24.
- 164 KRAUS, A.; DESSAU, W.; SIMON, H. (1966). On the mechanism and stereochemistry of the malate lactate fermentation of *Leuconostoc mesenteroides*. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1209-1214.
- 165 KREGER-VAN RIJ, N.J.W. (1984). The Yeast, a taxonomic study. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam.
- 166 KUNKEE, R.E. (1967). Malo-lactic fermentation. Adv. Appl. Microbiol. 9, 235-279.

- 167 KUNKEE, R.E. (1967). Control of malo-lactic fermentation induced by *Leuconostoc citrovorum*. Am. J. Enol. Vitic. 18, 71-77.
- 168 KUNKEE, R.E. (1974). Malo-lactic fermentation and winemaking. En "Chemistry of winemaking". (Webb, A.D., ed.). Adv. Chem. Ser. 137. pp. 151-170. American Chemical Society. Washington.
- 169 KUNKEE, R.E.; OUGH, C.S. (1966). Multiplication and fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* under carbon dioxide pressure in wine. Appl. Microbiol. 14, 643-648.
- 170 KUNKEE, R.E.; OUGH, C.S.; AMERINE, M.A. (1964). Induction of malo-lactic fermentation by inoculation of must and wine with bacteria. Am. J. Enol. Vitic. 15, 178-183.
- 171 KUNKEE, R.E.; PILONE, G.J.; COMBS, R.E. (1965). The occurrence of malo-lactic fermentation in southern California wines. Am. J. Enol. Vitic. 16, 219-223.
- 172 LAFON-LAFOURCADE, S. (1970). étude de la dégradation de l'acide L-malique par les bactéries lactiques non proliférantes isolées des vins. Ann. Technol. Agric. 19, 141-154.
- 173 LAFON-LAFOURCADE, S. (1975). L'histamine des vins. Conn. Vigne Vin 9, 103-114.
- 174 LAFON-LAFOURCADE, S. (1975). Factors of the malo-lactic fermentation of wines. En "Lactic acid bacteria in beverages and food". (Carr, G.J.; Cutting, C.U.; Whiting, G.C., eds.). Academic Press. London. pp. 43-53.
- 175 LAFON-LAFOURCADE, S. (1983). Wine and brandy. En "Biotechnology". Vol 5. (Reed, G., ed.). Verlag-Chemie. Heidelberg. pp. 81-163.
- 176 LAFON-LAFOURCADE, S. (1985). Rôle des microorganismes dans la formation de substances combinant le SO₂. Bull. O.I.V. 58, 590-604.
- 177 LAFON-LAFOURCADE, S. (1985). Utilization des écorces de levure en vinification. Journée de Rencontres Oenologiques. Montpellier. Libro de resúmenes. pp. 1-23.
- 178 LAFON-LAFOURCADE, S.; CARRE, E.; LONVAUD-FUNEL, A.; RIBÉREAU-GAYON, P. (1983). Induction de la fermentation malolactiques des vins par inoculation d'une biomasse industrielle congelée de *Leuconostoc oenos* après réactivation. Conn. Vigne Vin 17, 55-71.
- 179 LAFON-LAFOURCADE, S.; CARRE, E.; RIBÉREAU-GAYON, P. (1983). Occurrence of lactic acid bacteria during the different states of vinification and conservation of wines. Appl. Environ. Microbiol. 46, 874-880.
- 180 LAFON-LAFOURCADE, S.; DOMERCQ, S.; PEYNAUD, E. (1968). étude de l'ensemencement des vins par les bactéries de la fermentation malolactique. Conn. Vigne Vin 2, 83-97.
- 181 LAFON-LAFOURCADE, S.; GENEIX, C.; RIBÉREAU-GAYON, P. (1984). Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. Appl. Environ. Microbiol. 47, 1246-1249.

- 182 LAFON-LAFOURCADE, S.; GENEIX, C.; RIBÉREAU-GAYON, P. (1984). Les modalités de misse en oeuvre des écorces de levure en vinification. *Conn. Vigne Vin* 18, 111-125.
- 183 LAFON-LAFOURCADE, S.; JOYEUX, A. (1979). Techniques simplifiées pour le denombrement et l'identification des microorganismes vivants dans les moûts et les vins. *Conn. Vigne Vin* 13, 295-309.
- 184 LAFON-LAFOURCADE, S.; JOYEUX, A. (1981). Les bactéries acétiques du vin. *Bull. O.I.V.* 608, 803-829.
- 185 LAFON-LAFOURCADE, S.; LONVAUD-FUNEL, A.; CARRE, E. (1983). Lactic acid bacteria, of wines: stimulation of growth and malolactic fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* 49, 349-352.
- 186 LAFON-LAFOURCADE, S.; PEYNAUD, E. (1965). Sur l'évolution des acides pyruvique et α -cétoglutamine au cours de la fermentation alcoolique. *C.R. Acad. Sci.* 261, 1778-1780.
- 187 LAFON-LAFOURCADE, S.; PEYNAUD, E. (1966). Sur les taux des acides cetoniques formés au cours de la fermentation alcoolique. *Ann. Inst. Pasteur.* 110, 766-778.
- 188 LAFON-LAFOURCADE, S.; PEYNAUD, E. (1970). Nature de l'enzyme malique des bactéries lactiques isolées de vins. *C.R. Acad. Sci.* 270, 228-229.
- 189 LAFON-LAFOURCADE, S.; PEYNAUD, E. (1974). Sur l'action antibactérienne de l'anhydride sulfureux sous forme libre et sous forme combinée. *Conn. Vigne Vin* 8, 187-203.
- 190 LAFON-LAFOURCADE, S.; RIBÉREAU-GAYON, P. (1984). Les alterations des vins par les bactéries acétiques et les bactéries lactiques. *Conn. Vigne Vin* 18, 67-82.
- 191 LAFON-LAFOURCADE, S.; RIBÉREAU-GAYON, P. (1984). Developments in the microbiology of wine production. *Progr. Ind. Microbiol.* 19, 1-45.
- 192 LARUE, F.; GENEIX, C.; LAFON-LAFOURCADE, S.; BERTRAND, A.; RIBÉREAU-GAYON, P. (1984). Premières observations sur le mode d'action des écorces de levure. *Conn. Vigne Vin* 18, 155-163.
- 193 LARUE, F.; GENEIX, C.; PARK, M.-K.; MURAKAMI, Y.; LAFON-LAFOURCADE, S.; RIBÉREAU-GAYON, P. (1985). Incidence de certains polysaccharides insolubles sur la fermentation alcoolique. *Conn. Vigne Vin* 19, 41-52.
- 194 LARUE, F.; LAFON-LAFOURCADE, S.; RIBÉREAU-GAYON, P. (1980). Relationship between the sterol content of yeast cells and their fermentation activity in grape must. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 808-811.
- 195 LARUE, F.; PARK, M.K.; CARUANA, C. (1985). Quelques observations sur les conditions de la formation d'anhydride sulfureux en vinification. *Conn. Vigne Vin* 19, 241-248.

- 196 LEE, S.O.; PACK, M.Y. (1980). Immobilization of *Leuconostoc oenos* for wine deacidification. Korean J. Food Sci. technol. 12, 299-304.
- 197 LEHNINGER, A. (1978). Bioquímica. Omega. barcelona.
- 198 LEIFRON, E. (1954). The flagellation and taxonomy of species of *Acetobacter*. Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol Seral. 20, 102-110.
- 199 LIU, J.-W.R.; GALLANDER, J.F. (1982). Effect of insoluble solids on the sulfur dioxide content and rate of malolactic fermentation in white table wines. Am. J. Enol. Vitic. 33, 194-197.
- 200 LIU, J.-W.R.; GALLANDER, J.F. (1983). Effect of pH and sulfur dioxide on the rate of malolactic fermentation in red table wines. Am. J. Enol. Vitic. 34, 44-46.
- 201 LODDER, J. (1970). The yeasts. A taxonomic study. North-Holland Publishing Company. Amsterdam.
- 202 LONDON, J. (1976). The ecology and taxonomic status of the lactobacilli. Annu. Rev. Microbiol. 30, 279-301.
- 203 LONVAUD, M.; LONVAUD-FUNEL, A.; RIBÉREAU-GAYON, P. (1977). Le mecanisme de la fermentation malolactique des vins. Conn. Vigne Vin 11, 73-91.
- 204 LONVAUD-FUNEL, A. (1985). L'enzyme malolactique des bactéries lactiques du vin. Journée de Rencontres Oenologiques. Montpellier. Libro de resúmenes. pp. 1-8.
- 205 LONVAUD-FUNEL, A.; STRASSER DE SAAD, A.M. (1982). Purification and properties of a malolactic enzyme from a strain of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from grapes. Appl. Environ. Microbiol. 43, 357-361.
- 206 LONVAUD-FUNEL, A.; ZMIROU, C.; LARUE, F. (1984). Le métabolisme de l'acide citrique par les bactéries lactiques de la fermentation malolactique des vins. Sci. Alim. 4, 81-85.
- 207 LOPEZ DE CARRIZOSA. (1972). Prácticas culturales del viñedo. Bol. Asoc. Nal. Ing. Agron. 227, 359-65.
- 208 LOUREIRO, V.; VAN UDEN, N. (1982). Effects of ethanol on the maximum temperature for growth of *saccharomyces cerevisiae*: a model. Biotechnol. Bioeng. 24, 1881-1884.
- 209 LOUREIRO, V.; VAN UDEN, N. (1986). Roles of the specific growth rate and the ethanol concentration in the adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol. Biotechnol. Bioeng. 28, 1443-1445.
- 210 MADRID VICENTE, A. (1986). Manual de análisis y control de calidad de vinos y alcoholes. A.M.V. ediciones.
- 211 MARET, R.; SOZZI, T. (1977). Flore malolactique de moûts et de vins du Canton du Valais (Suisse). I. Lactobacilles et pédiocoques. Ann. Technol. Agric. 27, 255-273.

- 212 MARET, R.; SOZZI, T. (1979). Flore malolactique de moûts et de vins du Canton de Valais (Suisse). II. évolution des populations de lactobacilles et de pédiocques au cours de la vinification d'un vin blanc (un Fendant) et d'un vin rouge (une Dole). *Ann. Technol. Agric.* 28, 31-40.
- 213 MARET, R.; SOZZI, T.; SCHELLENBERG, D. (1979). Flore malolactique de moûts et de vins du Canton de Valais (Suisse). III. Les leuconostocs. *Ann. Technol. Agric.* 28, 41-55.
- 214 MARGHERI, G.; VERSINI, G.; DALLA SERRA, A.; GIANNOTTI, L.; PELLEGRINI, R.; MATTAREI, C. (1984). L'autolisi del lievito in enologia. *Vignevini* 5, 25-28.
- 215 MARHUENDA, R. (1969). Vinificación, sus problemas y soluciones adoptadas. Zona de Monóvar. *Semana Vitivin.* 24, 181-183.
- 216 MARQUES, J.V.; DA SILVA, M.F. (1985). Les technologies de vinification permettant de diminuer les doses de SO₂. *Bull. O.I.V.* 58, 624-636.
- 217 MARTINIERE, P.; SAPI, J.-C.; RIBÉREAU-GAYON, J. (1974). évolution du nombre de bactéries lactiques vivantes au cours de la vinification et de la conservation des vins. *C.R. Acad. Agric. Fr.* 60, 255-261.
- 218 MARTINIERE, P.; SAPI, J.-C.; RIBÉREAU-GAYON, J. (1975). La fermentation malolactique en fonction du sulfitage et du chauffage. *C.R. Acad. Agric. Fr.* 61, 496-502.
- 219 MATEOS, P.L.; KHAYYAT, N.; ARROYO, V.; IÑIGO, B. (1985). Agentes de fermentación de los mostos de uva de la zona Utiel-Requena. *Alimentaria* 162, 63-69.
- 220 MATEOS, P.L.; SANCHEZ-INFANTE, P.; ARROYO, V.; IÑIGO, B. (1985). Mostos de uva de la zona Utiel-Requena. Influencia del anhídrido sulfuroso en la microflora fermentativa. *Alimentaria* 164, 29-36.
- 221 MAYER, M.K. (1978). Progrès récents dans la connaissances des phénomènes microbiologiques en vinification. *Bull. O.I.V.* 51, 269-280.
- 222 MELAMED, N. (1962). Détermination des sucres résiduels des vins, leur relation avec la fermentation malolactique. *Ann. Technol. Agric.* 11, 5-32.
- 223 MILISAVLJERIC, C. (1971). Correction de l'acidité des moûts et des vins. Rapport Yougoslave. *Bull. O.I.V.* 480, 152-156.
- 224 MINARIK, E. (1971). étude de la flore levurienne des régions viticoles périphériques en Tchécoslovaquie. *Conn. Vigne Vin* 5, 185-197.
- 225 MINISTERIO DE AGRICULTURA. (1977). Catastro vitícola y vinícola. D.O. Utiel-Requena. Publicaciones del Ministerio de Agricultura. Servicio de Publicaciones Agrarias. Madrid.
- 226 NISHINO, H.; MIYAZAKI, S.; TOHJO, K. (1985). Effect of osmotic pressure on the growth rate and fermentation activity of wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 170-174.

- 227 NOLL, F. (1983). L(+) lactate. En "Methods of Enzymatic Analysis". Tomo VI. (Bergmeyer, H.U., ed.). Academic Press. New York; N.Y. pp. 582-588.
- 228 NOVAK, M.; STREHAIANO, P.; MORENO, M.; GOMA, G. (1981). Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. *Biotechnol. Bioeng.* 23, 201-211.
- 229 OREGLIA, F. (1978). *Enología Teórico-Práctica*. (Vol I). Ediciones Instituto Salesiano de Artes Gráficas. Buenos Aires.
- 230 OREGLIA, F. (1979). *Enología Teórico-Práctica*. (Vol. II). Ediciones Instituto Salesiano de Artes Gráficas. Buenos Aires.
- 231 OUGH, C.S. (1966). Fermentation rates of grape juice II. Effect of initial °Brix, pH and fermentation temperature. *Am. J. Enol. Vitic.* 17, 20-26.
- 232 OUGH, C.S. (1966). Fermentation rates of grape juices III. Effects of initial ethyl alcohol, pH and fermentation temperature. *Am. J. Enol. Vitic.* 17, 74-81.
- 233 OUGH, C.S.; LEE, T.H. (1981). Effect of vineyard nitrogen fertilization level on the formation of some fermentation esters. *Am. J. Enol. Vitic.* 32, 125-127.
- 234 PAN, C.S.; LEE, T.H.; FLEET, G.H. (1982). A comparison of five media for the isolation of lactic acid bacteria from wines. *Aust. Grape Grow. Winemaker* 220, 42-46.
- 235 PAN, C.S.; FLEET, G.H.; MORRISON, G.J.; COSTELLO, P.J.; LEE, T.H. (1980). Isolation and identification of lactic acid bacteria from Australian wines. Annual Meeting, Am. Soc. Vitic. Enol. Los Angeles.
- 236 PARISH, M.E.; CARROLL, D.E. (1985). Indigenous yeast associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 165-169.
- 237 PARK, Y.H. (1974). Contribution a l'étude des levures de Cognac. I. étude et classification des levures de Cognac. *Conn. Vigne Vin* 8, 253-278.
- 238 PEYNAUD, E. (1967). Recent studies on the lactic acid bacteria of wine. *Ferment. Vinification* 1, 219-256.
- 239 PEYNAUD, E. (1968). Mécanisme biochimique de la fermentation malolactique. *C.R. Acad. Sci.* 67 121-122.
- 240 PEYNAUD, E. (1977). *Enología Práctica*. Mundo-Prensa. Madrid.
- 241 PEYNAUD, E. (1984). *Enología Práctica*. Mundo-Prensa. Madrid.
- 242 PEYNAUD, E.; BLOVIN, J.; LAFON-LAFOURCADE, S. (1967). étude de quelques bacilles homolactiques isolés de vins. *Arch. Microbiol.* 57, 255-270.
- 243 PEYNAUD, E.; DOMERCQ, S. (1959). A review of microbiological problems in winemaking in France. *Am. J. Enol. Viticul.* 10, 69-77.

- 244 PEYNAUD, E.; DOMERCQ, S. (1959). Possibilité de provoquer la fermentation malolactique en vinification à l'acide de bactéries cultivées. C.R. Acad. Agr. Franc. 45, 355-358.
- 245 PEYNAUD, E.; DOMERCQ, S. (1961). études sur les bactéries lactiques des vins. Ann. Technol. Agric. 10, 43-60.
- 246 PEYNAUD, E.; DOMERCQ, S. (1968). étude de quatre cents souches de coques hétérolactiques isolés de vins. Ann. Inst. Pasteur 19, 159-170.
- 247 PEYNAUD, E.; LAFON-LAFOURCADE, S.; GUIMBERTEAU, G. (1967). Sur la nature de l'acide lactique formé par les bactéries isolées des vins. Rev. Ferm. Ind. Alim. 22, 61-66.
- 248 PEYNAUD, E.; SAPIIS-DOMERCQ, S. (1970). étude de deux cent-cinquante souches de bacilles hétérolactiques isolés de vins. Arch. Microbiol. 70, 348-360.
- 249 PILONE, G.J. (1975). Control of malo-lactic fermentation in table wines by addition of fumaric acid. En "Lactic acid bacteria in beverages and food". (Carr, J.G.; Cutting, C.U.; Whiting, G.C., eds.). Academic Press. London. pp. 121-138.
- 250 PILONE, G.J. (1979) Technical note. Preservation of wine yeasts and lactic acid bacteria. Am. J. Enol. Vitic. 30, 326.
- 251 PILONE, G.J.; KUNKEE, R.E. (1965). Sensory characterization of wine fermented with several malo-lactic strains of bacteria. Am. J. Enol. Vitic. 16, 224-230.
- 252 PILONE, G.J.; KUNKEE, R.E. (1970). Colorimetric determination of total lactic acid in wine. Am. J. Enol. Vitic. 21, 12-18.
- 253 PILONE, G.J.; KUNKEE, R.E. (1972). Characterization and energetics of *Leuconostoc oenos* ML-34. Am. J. Enol. Vitic. 23, 61-70.
- 254 PILONE, G.J.; KUNKEE, R.E.; WEBB, A.D. (1966). Chemical characterization of wines fermented with various malo-lactic bacteria. Appl. Microbiol. 14, 608-615.
- 255 PILONE, G.J.; RANKINE, B.C.; PILONE, D.A. (1974). Inhibiting malo-lactic fermentation in australian dry red wines by adding fumaric acid. Am. J. Enol. Vitic. 25, 99-107.
- 256 PIQUERAS, J. (1986). Historia y guía de los vinos valencianos. Generalitat Valenciana. Conselleria d'Agricultura i Pesca. València.
- 257 PITT, J. (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press. London.
- 258 POULARD, A. (1984). Influence de quelques facteurs intervenant sur la variabilité de la microflore levurienne des moûts et des vins. Vignes Vins 326, 18-21.
- 259 POULARD, A.; BRELET, M.; ROUSSET, Y. (1983). Choix d'une température dans les vinifications en blanc sec. Incidences sur la composition et la qualité des vins. Vignes Vins 320, 31-37.

- 260 POULARD, A.; BRELET, M.; ROUSSET, Y.; BERTRAND, A. (1982). Influence du facteur thermique sur les fermentations et la typicité des vins blancs secs du pays nantais. *Vignes Vins* 307, 29-34.
- 261 POULARD, A.; SIMON, L.; CUINIER, C. (1980). Variabilité de la microflore levurienne de quelques terroirs viticoles du pays nantais. *Conn. Vigne Vin* 14, 219-238.
- 262 QUECEDO, C.R.; SOMAVILLA, J.F.; ARROYO, V.; IÑIGO, B. (1976). Agentes de fermentación de mosto de uva de la zona de Galicia. *Rev. Agr. Tecnol. Alim.* 16, 123-130.
- 263 RADLER, F. (1958). The biological decomposition of acids in wine. Isolation and characterization of malic acid decomposing bacteria. *Arch. Mikrobiol.* 30, 64-72.
- 264 RADLER, F. (1958). Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein. IV. Über Faktoren, die das Wachstum der Apfelsäure-abbauenden Bakterien beeinflussen. *Vitis* 1, 288-297.
- 265 RADLER, F. (1975). The metabolism of organic acids by lactic acid bacteria. En "Lactic acid bacteria in beverages and foods". (Carr, J.G.; Cutting, C.U.; Whiting, G.C., eds.). Academic Press. London. pp. 17-27.
- 266 RADLER, F.; BRÜHL, K. (1984). The metabolism of several carboxylic acids by lactic acid bacteria. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 179, 228-231.
- 267 RADLER, F.; LANG, E. (1984). Malatbildung bei Hefen. *Wein-Wiss.* 38, 391-399.
- 268 RADLER, F.; SHÖNING, I. (1977). Entkeimungsfiltration von Milchsäurebakterien aus Wein mit Filterschichten verschiedener stofzusammensetzung. *Weinwirtschaft* 27, 752-760.
- 269 RANKINE, B. C.; BRIDSON, D. A. (1971). Glycerol in Australian wines and factors influencing its formation. *Am. J. Enol. Viticult.* 22, 6-12.
- 270 RANKINE, B.C. (1963). The microbiology of winemaking. *Aust. Wine Brew. Spirit Rev.* 81, 11-17.
- 271 RANKINE, B.C. (1966). Sulphur dioxide in wines. *Food Technol. Aust.* 18, 134-141.
- 272 RANKINE, B.C. (1967). Formation of higher alcohols by wine yeasts and relationship to taste threshold. *J. Sci. Food. Agric.* 18, 583-589.
- 273 RANKINE, B.C. (1970). La fermentation malolactique et son importance dans les vins rouges de table australiens. *Conn. Vigne Vin* 4, 383-397.
- 274 RANKINE, B.C. (1972). Influence of yeast strain and malo-lactic fermentation on composition and quality of table wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 23, 152-158.

- 275 RANKINE, B.C. (1973). Influence of winemaking operations on the quality of table wines. *Food Technol. Aust.* 25, 299-303.
- 276 RANKINE, B.C. (1977). Developments in malo-lactic fermentation of australian red table wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 28, 27-33.
- 277 RANKINE, B.C.; BRIDSON, A. (1971). Bacterial spoilage in dry red wine and its relationship to malo-lactic fermentation. *Wine Brew. Spirit Rev.* 90, 44-50.
- 278 RANKINE, B.C.; FORNACHON, J.C.M.; BRIDSON, D.A.; CELLIER, K.M. (1970). Malolactic fermentation in australian dry red wines. *J. Sci. Food Agric.* 21, 471-476.
- 279 REACTIVOS MERCK (1985). Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y papel. *Reactivos Merck.* (Merck, E., ed.). Darmstadt. R.F.A.
- 280 RIBÉREAU-GAYON, P. (1985). New developments in wine microbiology. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 1-10.
- 281 RIBÉREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E. (1961). *Traité d'Oenologie. Vol II.* Librairie Polytech. Béranger. Paris.
- 282 RIBÉREAU-GAYON J.; PEYNAUD, E.; RIBÉREAU-GAYON, P.; SUDRAUD, P. (1978). *Sciences et Techniques du vin. (Tome II).* Dunod. Paris.
- 283 RIBÉREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E.; RIBÉREAU-GAYON, P.; SUDRAUD, P. (1976). *Sciences et Techniques du vin. (tome III).* Dunod. Paris.
- 284 RIBÉREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E.; SUDRAUD, P.; RIBÉREAU-GAYON, P. (1980). *Ciencias y técnicas del vino. (Tomo I).* Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires.
- 285 RICE, A.C. (1965). The malo-lactic fermentation in New York state wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 16, 62-68.
- 286 RICE, A.C.; MATTICK, L.R. (1970). Natural malo-lactic fermentation in New York state wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 21, 145-152.
- 287 ROSINI, G.; FEDERICI, F.; MARTINI, A. (1982). Yeast flora of grape berries during ripening. *Microb. Ecol.* 8, 83-89.
- 288 ROSINI, G.; FEDERICI, F.; VAUGHAN, A.E.; MARTINI, A. (1982). Systematics of the species of the yeast genus *Saccharomyces* associated with the fermentation industry. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15, 188-193.
- 289 ROSINI, G.; PASQUALI, R. (1980). Gli agenti della fermentazione vinaria del vino "Falerio dei Colli Ascolani". *Riv. Viticult. Enol. Conegliano* 33, 3-9.
- 290 ROSSI, J.; CLEMENTI, F. (1981). Infuenza di alcuni parametri su sviluppo e sintesi enzimatica di fermenti malolattici. *Ann. Fac. Agr. Univ. Perugia* 35, 177-187.

- 291 ROSSI, J.; CLEMENTI, F. (1984). L-malic acid catabolism by polyacrylamide gel entrapped *Leuconostoc oenos*. Am. J. Enol. Vitic. 35, 100-102.
- 292 ROSSI, J.; COSTAMAGNA, L.; CLEMENTI, F. (1977). La flora malolattica in alcuni vini dell'Italia centrale. Ann. Fac. Agr. Univ. Perugia 32, 187-196.
- 293 ROSSI, G.; FEDERICI, F.; MARTINI, A. (1982). Yeast flora of grape berries during ripening. Microb. Ecol. 8, 83-89.
- 294 RUIZ, M. (1980). Sobre la producción de SO₂ y de H₂S por *Saccharomyces cerevisiae* en fermentaciones vnicas. Semana Vitivin. 35, 4321-4323.
- 295 RUIZ, M. (1981). Estudios tendentes a la eliminación de SO₂ y de etanal en los vinos. Semana Vitivin. 36, 5081-5082.
- 296 SALOVAARA, H.; KATUNPÄÄ, H. (1984). An approach to the classification of lactobacilli isolated from finnish sour rye dough ferments. Acta Alim. Pol. 10, 231-239.
- 297 SAN ROMAO, M.V. (1985). Observations sur le métabolisme des bactéries lactiques dans les moûts de raisins altérés. Conn. Vigne Vin 19, 109-116.
- 298 SANCHEZ INFANTE, P.; KHAYYAT, M.; ARROYO, V.; IÑIGO, B. (1985). Mostos de uva de la denominación de origen Alicante. Agentes de fermentación. Alimentaria 164, 25-28.
- 299 SAPI, J.C.; PEYNAUD, E. (1971). étude des substances combinant l'anhydride sulfureux dans les vins. Conn. Vigne Vin 8, 217-24.
- 300 SAPI-DOMERCQ, S. (1980). étude de l'influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore des raisins et des vins. Expérimentation 1978-1979. Comparaison avec les resultats de 1975, 1976 et 1977. Conn. Vigne Vin 14, 155-181.
- 301 SAPI-DOMERCQ, S.; BERTRAND, A.; JOYEUX, A.; LUCMARET, V.; SARRE, C. (1978). étude de l'influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore des raisins et des vins. Expérimentation 1977. Comparaison avec les resultats de 1976 et 1975. Conn. Vigne Vin 12, 245-275.
- 302 SAPI-DOMERCQ, S.; BERTRAND, A.; MUR, F.; SARRE, C. (1976). Influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore levurienne. Conn. Vigne Vin 10, 369-389.
- 303 SAPI-DOMERCQ, S.; BERTRAND, A.; MUR, F.; SARRE, C. (1977). Influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore levurienne. Expérimentation 1976. Conn. Vigne Vin 11, 227-242.
- 304 SAPI-DOMERCQ, S.; GUITTARD, A. (1976). étude de la microflore levurienne du Roussillon. Conn. Vigne Vin 10, 1-21.
- 305 SCHLEGEL, H.G. (1975). Microbiologia General. Omega. Barcelona.

- 306 SCHOPFER, J.-F.; AERNY, J. (1985). Le rôle de l'anhydride sulfureux en vinification. Bull. O.I.V. 58, 515-542.
- 307 SHARPE, M.E. (1979). Identification of the lactic acid bacteria. En "Identification methods for microbiologists". (Skinner, F.A.; Lovelock, D.W., eds.). Academic Press. London. pp. 233-259.
- 308 SHARPE, M.E. (1981). The genus *Lactobacillus*. En "The Prokaryotes". Vol. II. (Starr, M.P.; Stolp, H.; Trüper, H.G.; Balows, A.; Schlegel, H. G., eds.). Springer-Verlag N.Y. pp. 1653-1679.
- 309 SHARPE, M.E.; FRYER, T.F.; SMITH, D.G. (1966). Identification of the lactic acid bacteria. En "Identification methods for Microbiologists". Part A. (Gibbs, B.M.; Skinner, F.A., eds.). Academic Press. London. pp. 65-79.
- 310 SHIMAZU, Y.; UEHARA, M.; WATANABE, M. (1984). Decomposition of L-tartaric and L-malic acids in grape musts by *Botrytis cinerea*. Agr. Biol. Chem. 48, 1565-1573.
- 311 SHIMAZU, Y.; UEHARA, M.; WATANABE, M. (1985). Transformation of citric acid to acetic acid, acetoin and diacetyl by wine making lactic acid bacteria. Agric. Biol. Chem. 49, 2147-2157.
- 312 SHIMAZU, Y.; WATANABE, M. (1979). Malo-lactic fermentation in sparkling wine. J. Ferment. Technol. 57, 512-518.
- 313 SHING, R.; KUNKEE, R.E. (1976). Alcohol dehydrogenase activities of wine yeasts in relation to higher alcohol formation. Appl. Microbiol. 32, 666-670.
- 314 SIMO SANTONJA, V. (1980). Nuestros vinos. Vicent García Editores, S.A. Artes Gráficas Vicent, S.A. Valencia.
- 315 SINGLETON, V.L.; ESAU, P. (1969). Phenolic substances in grapes and wine and their significance. Adv. Food Rev. Suppl. 1, 1-288.
- 316 SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. (1986). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams Wilkins Co. Baltimore.
- 317 SOMAVILLA, J.F.; ARROYO, V.; IÑIGO, B. (1977). Levaduras presentes en velos de vinos de la provincia de Valladolid. Rev. Agr. Technol. Alim. 17, 277-281.
- 318 SOMAVILLA, J.F.; TIENDA, P.; ARROYO, V.; IÑIGO, B. (1971). Agentes de fermentación de los mostos de uva de la región levantina. Agricultura 476, 771-764.
- 319 SOUFLEROS, E.; BERTRAND, A. (1980). Incidence de l'action conjuguée de la température de fermentation et de l'acidité du milieu sur les teneurs en substances volatiles formées par les levures. Conn. Vigne Vin 14, 97-109.
- 320 SOUFLEROS, E.; PANERAS, E.; SAPIS-DOMERCQ, S. (1979). étude ecologique de la microflore levurienne de la région vinicole de Naoussa. Conn. Vigne Vin 13, 137-148.

- 321 SOZZI, T.; GNAEGI, F.; D'AMICO, N.; HOSE, H. (1982). Difficultés de fermentation malolactique du vin dues à des bactériophages de *Leuconostoc oenos*. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic. 14, 17-23.
- 322 SPONHOLZ, W.R.; DITTRICH, H.H. (1974). The formation of fermentation by-products which bind SO₂ of higher alcohols and esters by several pure culture yeasts and by enologically important "wild" yeasts. Wein-Wiss. 29, 301-314.
- 323 STAMER, J.R. (1979). The lactic acid bacteria: microbes of diversity. Food Technol. 33, 60-65.
- 324 STAMER, J.R.; STOYLA, B.O. (1967). Growth response of *Lactobacillus brevis* to aeration and organic catalyts. Appl. Microbiol. 15, 1025-1030.
- 325 STAMER, J.R.; STOYLA, B.O. (1970). Growth stimulants in plant extracts for *Leuconostoc citrovarum*. Appl. Microbiol. 20, 672-676.
- 326 SUDRAUD, P.; CHAUVET, S.; CREBASSA, B.; ROGNON, G. (1985). Activité antilevura de l'anhydride sulfureux moléculaire. Conn. Vigne Vin 19, 31-40.
- 327 SWINGS, J.; DELEY, J. (1981). The genera *Gluconobacter* and *Acetobacter*. En "The Prokaryotes". Vol. I. (Starr, M.P.; Stolp, H.; Trüper, H.G.; Balows, A.; Schlegel, H. G., eds.). Springer-Verlag N.Y. pp. 771-778.
- 328 TARANTOLA, C.; GANDINI, A. (1967). Esperienze di disacidificazione biologica dei vini nel corso del processo fermentativo. Vini d'Italia 51, 451-460.
- 329 TORRES, M.A. (1977). Vifias y vinos. Blume. Barcelona.
- 330 TORRES, M.A. (1978). Vino español. Un incierto futuro. Blume. Barcelona.
- 331 TROOST, R.G. (1985). Tecnología del vino. Omega S.A.
- 332 USSEGLIO-TOMASSET, L. (1967). The volatile acids (homologues of acetic acid) in fermentations with various yeast species. Atti. Acad. Ital. Vite. Vino. 19, 165-183.
- 333 USSEGLIO-TOMASSET, L. (1971). Ethil acetate and the higher alcohols in wine. Rev. Vitic. Enol. 24, 236, 276, 303.
- 334 VALDEZ, G.F.; GIORI, G.S.; DE RUIZ HOLGADO, A.A.P.; OLIVER, G. (1985). Effect of the rehydratation medium on the recovery of freeze-dried lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 50, 1339-1341.
- 335 VAN KEER, C.; VAN MELKEBEKE, L.; VERTRIEST, W.; HOOZEE, G.; VAN SCHOONENBERGHE, E. (1983). Growth of *Lactobacillus* species on different media. J. Inst. Brew. 89, 361-363.
- 336 VAN UDEN, N. (1984). Temperature profiles of yeasts. Advances in microbial physiology. Vol 25, 99-251.

- 337 VAYSSIER, Y. (1985). Utilisation de bactéries lactiques lyophilisées pour la fermentation malolactique. Journée de Rencontres Oenologiques. Montpellier. Libro de resúmenes. pp. 1-9.
- 338 WAGENER, W. W. D.; WAGENER, G. W. W. (1968). The influence of ester and fused alcohol content upon the quality of dry white wines. S. Afr. J. Agric. Sci. 11, 469-477.
- 339 WEBB, A.D. (1967). Some aroma compounds produced by vinous fermentation. Biotechnol. Bioeng. 9, 305-319.
- 340 WEBB, A.D. (1973). Proc. Third. Intern. Specialized Symp. on yeasts. Otaniemi (Finland).
- 341 WEBB, R.B.; INGRAHAM, J.L. (1960). Induced malo-lactic fermentations. Am. J. Enol. Vitic. 11, 59-63.
- 342 WEBB, A.D.; KEPNER, R.E. (1961). Fused oil analysis by means of gas liquid partition chromatography. Ann. J. Enol. Vitic. 12, 51-59.
- 343 WESTHIZEN, van der L.M.; AGENBACH, V.A.; LOOS, M.A.; SCHOOMBEE, N.F. (1981). Research note comparison of procedures for isolation of malo-lactic bacteria from wine. Am. J. Enol. Vitic. 32, 168-170.
- 344 WIBOWO, D.; ESCHENBRUCH, R.; DAVIS, C.R.; FLEET, G.H.; LEE, T.H. (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. Am. J. Enol. Vitic. 36, 302-313.
- 345 WOLLBRECHT, 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.
- 346 WÜRDIG, G. (1985). Levures produisant du SO₂. Bull. O.I.V. 58, 582-589.



Acabóse de componer el presente mamotreto en los Talleres Pardo, en el día de Nuestro Señor de veintinueve de octubre de mil novecientos ochenta y siete, festividad de San Cucufato, paciente mártir.

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de

D. Isabel Tardo Cubillo

la calificación de _____

Valencia, a 7 de Diciembre de 1987

El Secretario,

El Presidente

