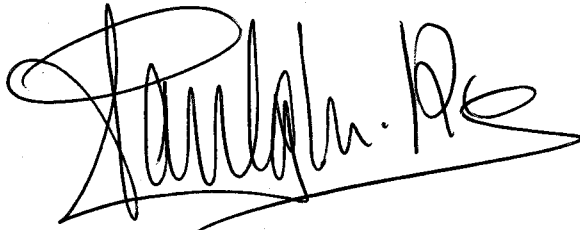


**EVOLUCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES DE
LEVADURAS RESPONSABLES DE LA CRIANZA BIOLÓGICA DEL VINO
DE JEREZ.**

Trabajo realizado en el Departamento de I+D de Pedro Domecq S.A, para optar al grado de Doctor en Biología Molecular y Celular por la licenciada,

Paula Martínez Rodríguez



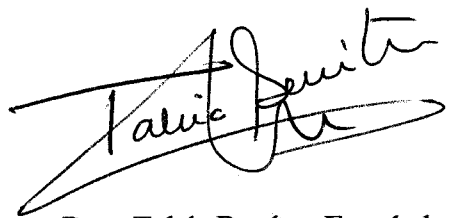
Sevilla, Febrero de 1995

DIRECTORES:

Dr. Luis Pérez Rodríguez

Director de I+D
Pedro Domecq S.A.

Profesor Titular de Ingeniería Química
Universidad de Cádiz



Dra. Tahía Benítez Fernández

Profesora Titular de Genética
Universidad de Sevilla



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Que se registra esta Tesis Doctoral
n.º 158 número 304 del libro
de correspondencia.
Sevilla, 20 FEB 1955

El Jefe del Negociado de Teses,

Alicia de Alcazar

A Alicia y M^a Sol

ÍNDICE

GLOSARIO DE VOCABULARIO BODEGERO

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN

1.1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

1.2. LA ELABORACIÓN DEL VINO EN LA ZONA DEL JEREZ

1.2.1. EL VIÑEDO

1.2.2. VINIFICACIÓN

1.2.2.1. Aspectos bioquímicos de la fermentación

1.2.2.2. Aspectos microbiológicos de la fermentación

1.2.3. LA CRIANZA Y ENVEJECIMIENTO DEL VINO DE JEREZ

1.2.3.1. Tipos de envejecimientos y tipos de vinos

1.2.3.2. Sistema de envejecimiento

1.2.3.3. El envejecimiento fisico-químico

1.3. LA CRIANZA BIOLÓGICA

1.3.1. DEFINICIÓN Y ANTECEDENTES

1.3.2. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

1.3.3. ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE LA CRIANZA

1.3.3.1. Etanol

1.3.3.2. Glicerina

1.3.3.3. Acidez volátil

1.3.3.4. Acetaldehído

1.3.3.5. Ácidos orgánicos

1.3.3.5.1. Ácido tartárico

1.3.3.5.2. Ácidos cítrico y succínico

1.3.3.5.3. Ácido málico

1.3.3.5.4. Ácido láctico

1.3.3.5.5. Ácido glucónico

1.3.3.6. Alcoholes superiores

1.3.3.7. Aminoácidos

1.4. LEVADURAS INDUSTRIALES

1.4.1. IDENTIFICACIÓN

1.4.2. LEVADURAS VÍNICAS

2. MATERIALES

2.1. SISTEMAS INDUSTRIALES

2.1.1. AÑADAS

2.1.2. SOLERAJES

2.2. CEPAS

2.3. PRODUCTOS QUÍMICOS

2.4. TAMPONES Y SOLUCIONES

2.4.1. TAMPONES PARA LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL CARIOTIPO ELECTROFORÉTICO

2.4.2. SOLUCIONES PARA LA EXTRACCIÓN DEL ADN MITOCONDRIAL

2.4.2.1. Solución I

2.4.2.2. Solución II

2.4.3. TAMPONES GENERALES PARA EL MANEJO DE ADN

2.4.3.1. Tampón TE

2.4.3.2. Tampón TBE

2.4.3.3. Tampón TAE

2.4.4. TAMPONES Y SOLUCIONES PARA LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE LA OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO

2.4.4.1. Solución fijadora

2.4.4.2. Solución post-fijadora

2.4.5. TAMPÓN CITRATO-FOSFATO PARA EL MEDIO YPD_{pH} pH 4.5

2.4.6. SOLUCIONES INDICADORAS

2.4.6.1. Reactivo de Luff

2.4.6.2. Metilindol

2.4.6.3. Naranja de metilo

2.4.6.4. Púrpura de bromocresol

2.4.6.5. Azul de metileno

2.5. MEDIOS DE CULTIVOS PARA LEVADURAS

2.5.1. MEDIOS MÍNIMOS

2.5.1.1. Medio mínimo (SD)

2.5.1.2. Medios mínimos con distintas fuentes de carbono

2.5.1.3. Medios mínimos con distintas fuentes de nitrógeno

2.5.1.4. Medio mínimo estricto (MM, MME15)

2.5.2. MEDIOS COMPLETOS

2.5.2.1. Medios completos (YPD, YPG, YPDE, YPD_{pH} e YPDG)

2.5.2.2. Medio líquido fermentativo

2.5.3. MEDIO CON ARBUTINA

2.5.4. MEDIOS DE PREESPORULACIÓN

2.5.4.1. Medio de preesporulación 1 (PRE 1)

2.5.4.2. Medio de preesporulación 5 (PRE 5)

2.5.5. MEDIOS DE ESPORULACIÓN

2.5.5.1. Medio de esporulación 1 (SPO 1)

2.5.5.2. Medio de esporulación 2 (SPO 2)

2.5.6. MEDIOS INDUSTRIALES

2.5.6.1. Mosto sin fermentar

2.5.6.2. Vino (S/T o S)

2.6. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

3. MÉTODOS

3.1. CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE LEVADURAS

3.1.1. TOMA DE MUESTRAS

3.1.2. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE LOS CULTIVOS PUROS

3.1.3. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

3.1.3.1. Características morfológicas

3.1.3.2. Fermentación de azúcares

3.1.3.3. Asimilación de azúcares

3.1.3.4. Asimilación de nitratos

3.1.3.5. Escisión de la arbutina

3.2. CONDICIONES DE CULTIVO: CRECIMIENTO

3.2.1. CULTIVOS SUMERGIDOS

3.2.2. CULTIVOS BAJO VELO DE FLOR

3.3. MÉTODOS GENÉTICOS

3.3.1. ESPORULACIÓN

3.3.1.1. Método 1

3.3.1.2. Método 2

3.3.2. CARIOTIPO ELECTROFORÉTICO

3.3.2.1. Preparación de las muestras

3.3.2.2. Preparación del gel y teñido

3.3.2.3. Equipo utilizado

3.3.2.4. Parámetros usados en la separación

3.3.3. POLIMORFISMO DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DEL ADN MITOCONDRIAL

3.3.3.1. Extracción del ADNmt

3.3.3.2. Restricción del ADNmt

3.3.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO RELATIVO DE ADN POR CÉLULA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

3.4. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS

3.4.1. CÉLULAS TOTALES

3.4.2. CÉLULAS VIABLES

3.4.3. VIABILIDAD CELULAR DEL VELO DE FLOR

3.4.4. FRECUENCIA DE FORMACIÓN DE "PETITES"

3.5. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

3.5.1 AUXOTROFÍAS VITAMÍNICAS Y VITAMINAS ESENCIALES PARA LA FORMACIÓN DE VELO

3.5.2. AUXOTROFÍAS PARA AMINOÁCIDOS

3.5.3. UTILIZACIÓN DE LA PROLINA

3.5.4. PRODUCCIÓN, SENSIBILIDAD Y/O RESISTENCIA AL FACTOR KILLER

3.6. FORMACIÓN DE VELO DE FLOR

3.6.1. EFECTO DEL PRECULTIVO EN LA FORMACIÓN DE VELO

- 3.6.2. HIDROFOBICIDAD DE LA SUPERFICIE CELULAR
- 3.6.3. TRATAMIENTO CON PROTEINASA K
- 3.6.4. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD (FLOTABILIDAD) CELULAR DEL VELO.
- 3.6.5. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA
- 3.6.6. LIOFILIZACIÓN
- 3.6.7. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO EN LA FORMACIÓN DE VELO A DISTINTO GRADO ALCOHÓLICO
- 3.7. CARACTERIZACIÓN METABÓLICA**
 - 3.7.1. CRIANZA BIOLÓGICA CON CULTIVOS PUROS
 - 3.7.2. CONSUMO DE GLICERINA A DISTINTO GRADO ALCOHÓLICO
 - 3.7.3. ORIGEN DE LA ACETOÍNA EN LOS VINOS CON CRIANZA BIOLÓGICA
 - 3.7.4. FERMENTACIÓN DE MOSTOS Y BURBAS CON DISTINTA CONCENTRACIÓN DE SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN
 - 3.7.5. FERMENTACIÓN DE MOSTOS CON CULTIVOS PUROS
 - 3.7.6. DETERMINACIONES ANALÍTICAS EN SOLERAJES INDUSTRIALES
 - 3.7.6.1. Consumo de alcohol y glicerina
 - 3.7.6.2. Contenido en ácidos orgánicos, aminoácidos y polifenoles
 - 3.7.6.3. Contenido en acetaldehído
- 3.8. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS**
 - 3.8.1. GRADO ALCOHÓLICO
 - 3.8.1.1. Destilación
 - 3.8.1.2. Transflexión
 - 3.8.1.3. Cromatografía de gases
 - 3.8.2. AZÚCARES TOTALES Y ACIDEZ VOLÁTIL
 - 3.8.3. ACIDEZ TOTAL
 - 3.8.4. pH
 - 3.8.5. SULFUROSO
 - 3.8.6. COLOR
 - 3.8.7. DENSIDAD

- 3.8.8. GRADO BAUMÈ
- 3.8.9. ACETALDEHIDO, ACETATO DE ETILO, N-PROPANOL, I-BUTANOL, I-AMÍLICOS
- 3.8.10. ACETOÍNA Y BUTANODIOL, 2-3
- 3.8.11. DIETILACETAL
- 3.8.12. ACIDOS ORGÁNICOS Y GLICERINA
- 3.8.13. AMINOÁCIDOS
- 3.8.14. POLIFENOLES
 - 3.8.14.1. Índice de polifenoles totales
 - 3.8.14.2. Ácidos y aldehidos fenólicos
- 3.8.15. PRUEBA DE REMONTADO

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS DE VELO DE FLOR

4.1.1. CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA

4.1.2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA

4.1.2.1. Contenido en ADN

4.1.2.2. Cariotipo electroforético

4.1.2.3. Análisis de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial

4.1.2.4. Esporulación

4.1.3. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

4.1.3.1. Auxotroffas

4.1.3.1.1. Auxotroffas para aminoácidos

4.1.3.1.2. Auxotroffas vitamínicas

4.1.3.2. Producción, sensibilidad y/o resistencia al factor Killer

4.2. FORMACIÓN DE VELO DE FLOR

4.2.1. EFECTO DE LA NATURALEZA DE LA CEPA

4.2.2. RELACIÓN ENTRE LA TOLERANCIA AL ETANOL Y LA FORMACIÓN DE VELO

4.2.2.1. Crecimiento a distinto grado alcohólico

4.2.2.2. Frecuencia espontanea e inducida de formación de "petites"

- 4.2.2.3. Viabilidad celular a 15.5% vol de etanol
- 4.2.3. EFECTO DEL PRECULTIVO EN SUSTRATOS RESPIRABLES vs RESPIRABLES
- 4.2.4. HIDROFOBICIDAD CELULAR EN ESTADO FERMENTATIVO vs FILMÓGENO: EFECTO DE LA ADICIÓN DE ÁCIDO OLEÍCO Y/O ERGOSTEROL
- 4.2.5. EFECTO DE LA PROTEINASA K EN EL VELO DE FLOR
- 4.2.6. MORFOLOGÍA CELULAR EXTERNA E INTERNA EN FASE DE VELO vs FASE FERMENTATIVA
- 4.2.7. DENSIDAD (FLOTABILIDAD) CELULAR DEL VELO DE FLOR
- 4.2.8. LIOFILIZACIÓN
- 4.2.9. VITAMINAS ESENCIALES PARA LA FORMACIÓN DE VELO Y EFECTO DE LA ADICIÓN DE ÉSTAS AL VINO
- 4.2.10. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO EN LA FORMACIÓN DE VELO A DISTINTO GRADO ALCOHÓLICO
- 4.2.11. EFECTO DE ALGUNAS PRÁCTICAS ENOLÓGICAS EN LA ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA
 - 4.2.11.1. Efecto del desfangado de mostos y burbas en la cinética fermentativa
 - 4.2.11.2. Efecto de la naturaleza del S/T sobre la formación de velo
- 4.3. METABOLISMO DE LAS LEVADURAS DE VELO DE FLOR
 - 4.3.1. ETANOL Y GLICERINA
 - 4.3.1.1. Consumo de etanol registrado en solerajes industriales
 - 4.3.1.2. Consumo de glicerina en solerajes industriales
 - 4.3.1.3. Consumo de etanol durante la crianza con cultivos puros
 - 4.3.1.4. Consumo de glicerina durante la crianza con cultivos puros
 - 4.3.1.5. Consumo de glicerina a distinto grado alcohólico
 - 4.3.2. ACIDEZ VOLÁTIL
 - 4.3.2.1. Evolución de la acidez volátil durante la crianza biológica con cultivos puros.
 - 4.3.2.2. Formación de velo de flor y degradación de la acidez volátil en vinos acetificados

4.3.3. ACETATO DE ETILO

4.3.4. ACETALDEHIDO, ACETOÍNA, BUTANODIOL2-3 Y DIETILACETAL

4.3.4.1. Niveles de acetaldehido, acetofina y butanodiol,2-3 durante la crianza biológica con cultivos puros

4.3.4.2. Relación entre los niveles de dietilacetil y de acetaldehido en el vino

4.3.5. ÁCIDOS ORGÁNICOS

4.3.5.1. Evolución de los ácidos orgánicos durante la crianza biológica en solerajes industriales

4.3.5.2. Evolución de los ácidos orgánicos durante la crianza con cultivos puros

4.3.6. AMINOÁCIDOS

4.3.6.1. Evolución de los aminoácidos en solerajes industriales

4.3.6.2. Evolución de los aminoácidos durante la crianza biológica con cultivos puros

4.3.6.3. Utilización de la prolina

4.3.7. ALCOHOLES SUPERIORES

4.3.7.1. n-propanol

4.3.7.2. Iso-butanol

4.3.7.3. Alcoholes Iso-amflicos

4.3.8. INTERRELACIÓN OXÍGENO / CRIANZA / REMONTADO

4.3.8.1. Evolución del color durante la crianza biológica

4.3.8.2. Viabilidad celular del velo de flor vs niveles de oxígeno

4.3.8.3. Polifenoles totales y remontado

4.3.9. FRACCIONES POLIFENÓLICAS

4.3.10. COMPORTAMIENTO FERMENTATIVO DE LEVADURAS DE VELO DE FLOR

4.3.10.1. Resistencia al SO₂

4.4. DISTRIBUCIÓN POBLACIONAL DE LOS VELOS DE FLOR EN SISTEMAS INDUSTRIALES DE CRIANZA BIOLÓGICA

4.4.1. SISTEMAS ESTÁTICOS: AÑADAS

4.4.2. SISTEMAS DINÁMICOS: SOLERAJES

4.4.3. FACTORES CONDICIONANTES DE LA SELECCIÓN ESCALAR

- 4.4.3.1. Selección escalar a "escala laboratorio": naturaleza del sustrato y naturaleza de la cepa
- 4.4.3.2. Producción de acetaldehído por diferentes cepas de levaduras de velo
- 4.4.3.3. Formación de velo de flor a niveles crecientes de acetaldehído
- 4.4.3.4. Relación entre la viabilidad celular, aspecto del velo de flor y niveles de acetaldehído

5. CONCLUSIONES

6. BIBLIOGRAFÍA

7. APÉNDICE

8. AGRADECIMIENTOS

GLOSARIO DE VOCABULARIO BODEGERO

Añada: vino sometido a un envejecimiento estático, sin operaciones de sacas y rocíos, que se referencia a su cosecha o año de elaboración.

Burbas o Fangos: sedimento obtenido tras el desfangado de los mostos.

Clarificación: floculación de materia coloidal del vino por adición de polímeros tales como la gelatina (proteínas) y la bentonita (silicatos).

Corrido de escalas: operaciones de sacas y rocíos de un soleraje.

Criaderas: escalas de envejecimiento integrantes de un soleraje exceptuando a la solera. La 1ª criadera es la que precede en vejez a la solera, la 2ª la que precede a la 1ª, y así sucesivamente.

Crianza biológica: envejecimiento de vinos en botas en cuya superficie crece velo de flor.

Desfangado: decantación de los trozos de la pulpa y membranas celulares de la uva contenidas en el mosto.

Encabezado: adición de alcohol destilado de vino al mosto fermentado o al vino.

Envejecimiento fisico-químico: envejecimiento oxidativo del vino en botas que no cria velo de flor en su superficie.

Fermentación dirigida: la fermentación del mosto no estéril llevada a cabo principalmente por una cepa de levadura inoculada mediante la adición de un pie de cuba.

Injerción de velo: inoculación de células en fase de velo, depositándolas en la superficie del medio.

Lagar: lugar donde se recibe la uva de las viñas y se encuentra la maquinaria de prensado para la obtención del mosto.

Lías: flora microbiana y compuestos que precipitan una vez fermentado el mosto.

Mosto: zumo de uva sin fermentar.

Mosto de 1ª yema: primera fracción de mosto que se obtiene al ejercer una presión de prensado baja (2.5 Kg/cm²).

Mosto de 2ª yema: segunda fracción de mosto que se obtiene con una presión de prensado mayor (4 Kg/cm²).

Mosto fermentado: zumo de uva fermentado sin encabezar.

Pago: zona agrícola, en nuestro caso vitícola, de características semejantes.

Pie de cuba: Mosto fermentando por una cepa de levadura seleccionada en fase tumultuosa que se inocula en el depósito de fermentación antes de llegar el mosto del lagar.

Prensas: últimas fracciones de mosto que se obtienen al ejercer una presión de prensado muy alta (6-7 Kg/cm²).

Rocío: reposición del volumen de vino retirado en la saca de una escala, con el vino procedente de la escala que le precede en vejez.

Saca: extracción de una parte del volumen de vino contenido en las botas pertenecientes a las correspondientes escalas de envejecimiento integrantes del sistema dinámico.

Sobretablas: vino joven encabezado sujeto a un sistema estático de envejecimiento. Este vino es el que rocía a la escala más joven de los solerajes de crianza biológica.

Solera: escala de mayor vejez de un soleraje.

Soleraje: sistema de envejecimiento dinámico compuesto por un número variable de escalas de envejecimiento, sujetas a operaciones de sacas y rocios; característico de la zona de Jerez.

Vino: mosto fermentado encabezado.

LISTA DE ABREVIATURA

°Bé: Grado Baumè

t: tiempo

h: horas

min: minutos

T: temperatura

H: humedad

Max: máximo

Min: mínimo

μ : tasa de crecimiento

τ : tiempo de generación

AV: acidez volátil

HD%: grado de hidrofobicidad

CRA: criadera

S: solera

S/T: sobretablas

VJ: vino joven encabezado sin meter en botas

D.O: densidad óptica

A: absorbancia

Hz: Herzio

HPLC: cromatografía líquida

GC: cromatografía gaseosa

rpm.: revoluciones por minuto

ppm.: partes por millón

1. INTRODUCCIÓN

1.1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

La crianza biológica del vino de la zona del Jerez constituye una etapa fundamental en su singular elaboración. La evolución que registra el vino durante esta fase es muy marcada, llevando implícitas modificaciones muy notables en su constitución, y siendo esencial en la elaboración de los vinos Finos, Manzanillas y Amontillados.

En la actualidad, las nuevas tendencias del mercado están desplazando el consumo hacia los tipos de vinos de Manzanillas y Finos de tal forma que si bien hasta hace escasas décadas estos vinos podían constituir un porcentaje marginal en los vinos de Jerez comercializados en el exterior, hoy constituyen una fracción importante y a nivel de mercado nacional casi de forma absoluta. Este desplazamiento hacia la demanda de vino obtenido mediante crianza biológica (Finos y Manzanillas) establece la necesidad de programar y dirigir la elaboración del vino de Jerez hacia este tipo de vino y no suscribirla a los "antojos de la naturaleza", que de manera caprichosa podría dictar el porcentaje de logro de cada tipo.

En primer lugar, cabe preguntarse si los cambios tecnológicos introducidos en los procesos de vinificación en aras de conseguir productos de mayor calidad (desfangado, clarificación, filtración, entre otros) o de una mayor racionalidad operativa pueden inducir modificaciones en la naturaleza o comportamiento de la crianza biológica.

Por otra parte, se observa cómo; según el soleraje y escala del mismo, el vino sometido a crianza biológica posee unas características analíticas y sensoriales más o menos diferenciadoras, con mayor o menor presencia de metabolitos que influyen en ello como es el acetaldehído, así como una mayor o menor proporción de botas con el velo de flor en mejor o peor estado. Así pues, se ha hecho necesario ampliar y profundizar en los conocimientos de la crianza biológica y de sus factores condicionantes.

Debido a que el proceso es multipoblacional y a la falta de buenos marcadores fenotípicos, se considera indispensable llevar a cabo una caracterización de las levaduras de velo de flor por técnicas moleculares de clasificación.

En el presente trabajo se caracteriza a las levaduras que forman el velo de flor desde un punto de vista taxonómico, genético y fisiológico. Con este triple enfoque se pretende llegar al conocimiento de cuál o cuales son las especies de levaduras que intervienen de manera activa en la crianza biológica bajo velo de flor, cuál es la distribución poblacional de dichas especies y sus causas, así como, descubrir las características más destacables de cada una de ellas que pudieran tener un interés aplicado directo en la industria.

1.2. LA ELABORACIÓN DEL VINO EN LA ZONA DEL JEREZ

1.2.1. EL VIÑEDO

La combinación de clima, tierra y variedad de cepa tiene una gran importancia enológica en la elaboración del vino de la zona del Jerez. La calidad de los vinos depende de diversos factores siendo de gran importancia la variedad, el estado de madurez y sanitario de la uva, el clima, el terreno y las prácticas realizadas en el cultivo de la viña (Pérez, 1982; Domecq, 1989).

El viñedo se asienta mayoritariamente sobre una tierra de color blanco compuesta en un 30-60% de caliza y proporciones variables de arcilla y arena que recibe el nombre de *albariza*. Ésta es pobre en elementos nutricionales de la planta pero tiene una alta capacidad de retención hídrica, almacenando agua en los periodos de lluvias (otoño-invierno e inicios de primavera) y suministrándosela a la cepa durante el verano (Casas, 1967; Pérez, 1982; Suárez e Íñigo, 1990) .

Un 95% de las cepas cultivadas en los viñedos jerezanos pertenecen a la variedad *Palomino Fino*, variedad que produce unos mostos muy finos de baja acidez. El 5% restante está integrado por las variedades *Moscatel* y *Pedro Ximénez*,

productoras de vinos dulces (Pérez, 1982).

El contenido en ácidos del mosto y por tanto en la uva es un dato tan importante a considerar como la cantidad de azúcares. La acidez de la uva se debe principalmente a los ácidos: málico, tartárico y cítrico. Los azúcares de la uva están constituidos fundamentalmente por glucosa y fructosa, aunque están presente otros muchos a niveles de trazas. Durante la maduración de la uva se produce un enriquecimiento en azúcares y una pérdida de la acidez. El contenido en azúcares pasa de unos 15 g/L a unos 200 g/L y los niveles de ácido málico disminuyen hasta valores inferiores a 0.5 g/L generalmente. El seguimiento del proceso de maduración de la uva marca la fecha óptima para realizar la vendimia y obtener la máxima calidad de la cosecha. El "índice de maduración" más generalizado es el que deriva de la relación entre la cantidad de azúcares y ácidos del mosto (Pérez *et al.*, 1982).

La vendimia en la zona del Jerez suele iniciarse durante la primera decena del mes de Septiembre, para finalizarla al final de ese mismo mes.

1.2.2. VINIFICACIÓN

Se entiende por vinificación al conjunto de operaciones y prácticas que se llevan a cabo con el fin de transformar la uva en vino, respetando al máximo las cualidades intrínsecas que posee dicha uva, para así obtener el mejor vino posible (Suárez e Íñigo, 1990).

El proceso de vinificación se inicia con la recogida y la transformación física de la uva para extraerle el mosto. La recogida se hace a mano y las operaciones de prensado se realizan teniendo en cuenta la composición heterogénea del mosto contenido en las distintas partes de la uva, obviando la presencia de compuestos procedentes de las partes sólidas que a diferencia de otros tipos de vino no contribuyen a la calidad futura del jerez. Hoy en día se utiliza una maquinaria de prensado que respeta estos principios enológicos. A la primera fracción del mosto, obtenida al ejercer una presión de prensado baja, se le denomina mosto de *1ª yema*

(65% del volumen total) y a la segunda fracción obtenida con una mayor presión, mosto de 2ª yema (23%). Las últimas fracciones del prensado, *prensas* (12%), no se utilizan para elaborar el vino directamente sino que tras su fermentación se destilan para obtener alcohol (Pérez, 1982, 1984).

Una vez obtenido el mosto, tanto de 1ª yema como de 2ª yema, se deja decantar las partes sólidas durante 24 horas, operación denominada *desfangado*. Estos sedimentos reciben el nombre de *burbas o fangos* que después de ser filtradas a través de diatomeas pasan a depósitos donde fermentan separadamente (Suárez e Íñigo, 1990; Casas, 1984).

Previamente a la fermentación del mosto, éste es corregido en su acidez con la adición de 1.5 g/L de ácido tartárico y se le adiciona con 80 mg/L aproximadamente de anhídrido sulfuroso que actúa como antioxidante de los mostos y de los vinos, inhibiendo oxidasas, y como antiséptico selectivo, impidiendo en lo posible el desarrollo bacteriano y de algunas levaduras no deseables. De esta manera, el pH del mosto se lleva a valores próximos a 3 ya que a este pH se dificulta la actividad bacteriana, no influyendo en la actividad fermentativa de las levaduras (Pérez, 1982, 1984).

La fermentación del mosto se realiza en fermentadores de 40.000 L de capacidad, dispuestos con sistemas para regular la temperatura de fermentación que se sitúa en torno a los 25°C. La temperatura no sólo tiene influencia sobre la actividad fermentativa del microorganismo, sino que a medida que sea mayor, se producen mayores pérdidas de aromas y otros componentes volátiles, trayendo consigo una pérdida de calidad del vino resultante (Amerine y Kunkee, 1968).

En nuestro caso, se lleva a cabo una *fermentación dirigida* utilizando como *pie de cuba* una cepa de levadura autoctona seleccionada de alto poder fermentativo perteneciente a la especie *S. cerevisiae*.

Con estas prácticas se consigue disminuir el tiempo de inicio de la fermentación, favoreciendo el crecimiento rápido en el mosto de las levaduras

fermentativas, reducir la posibilidad de infección bacteriana y poder llevar a cabo un control durante la fermentación (Valcarcel *et al.*, 1990).

Al cabo de 30 días la fermentación queda prácticamente finalizada. El mosto fermentado adquiere una graduación alcohólica aproximada del 12% (v/v), pudiendo variar según la cosecha y la zona de procedencia de ésta, más o menos limítrofe al mar.

Al término de la fermentación alcohólica, el vino joven, al que aún en la zona se le sigue denominando mosto, empieza a decantar originando un precipitado turbio denominado *lías*, compuestas por la flora microbiana y una serie de compuestos que han quedado insolubilizados debido a la presencia del alcohol, como sales potásicas y cálcicas del ácido tartárico, proteínas, etc. Este proceso de decantación se ve favorecido por los primeros fríos que suelen producirse en esta época de Diciembre. Durante este periodo de reposo se desarrolla un *velo de flor* o cultivo filmógeno de levaduras que cubren la superficie del vino en contacto con la atmosfera del interior del depósito que lo contiene, por lo que todos los vinos secos de la zona del Jerez tienen una fase más o menos prolongada de *Crianza Biológica bajo velo de flor* (Pérez, 1982, 1984).

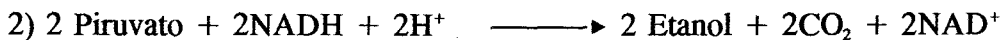
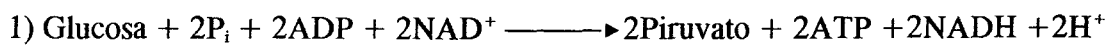
Como técnicas recientemente introducidas, tras el encabezamiento de los mostos, los S/T y/o añadas se someten a un proceso de clarificación, mediante la adición de gelatina y bentonita, y de filtración a través de tierras de diatomeas, antes de ser introducidos propiamente en los sistemas de crianza y/o envejecimiento. Estas prácticas tienen como objeto, el lograr una mayor estabilidad fisico-química futura del producto.

El mosto fermentado ya limpio es analizado sensorialmente por catadores expertos y analíticamente en el laboratorio, decidiéndose inicialmente la clase de envejecimiento característico que dará lugar al tipo de vino de la zona del Jerez. Los fermentados más finos y lígeros, normalmente procedente de mostos de 1ª yema, son

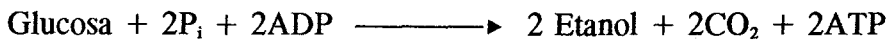
destinados a vinos con crianza biológica, y los de mayor cuerpo y color, generalmente mostos de 2ª yema, a olorosos.

1.2.2.1. Aspectos bioquímicos de la fermentación.

La fermentación alcohólica se inicia con la glucólisis, transformándose el azúcar en piruvato y obteniéndose ATP y NADH. Posteriormente, las células de levaduras descarboxilan al ácido pirúvico transformándolo en acetaldehído, que finalmente es reducido a etanol recuperándose los NAD⁺ necesarios para la glucólisis (Amerine y Kunkee, 1968). Las reacciones son las siguientes:



Global:



Pero no todas las moléculas de azúcares del mosto siguen esta vía, sino que dependiendo de la flora microbiana presente se llevarán a cabo, en mayor o menor grado, otras reacciones tales como la fermentación gliceropirúvica en la que se origina glicerina y ácido pirúvico.

El pirúvico puede dar origen a otros productos secundarios, entre ellos el ácido acético y sus ésteres, acetoína y derivados como el diacetilo que a ciertos niveles colaboran negativamente en la apreciación organoléptica del vino (Suárez e Íñigo, 1990).

De los ácidos orgánicos contenidos en el vino, son el pirúvico, succínico y el láctico los producidos fundamentalmente durante la fermentación ya que los ácidos mayoritarios, málico, tartárico y cítrico provienen de la uva. El ácido láctico se origina bien por reducción biológica del pirúvico, bien en la denominada fermentación maloláctica del ácido málico llevada a cabo por las bacterias lácticas. Cuando la uva ha sido atacada por *Botrytis*, están presente los ácidos glucónico y

glucurónico los cuales tienen gran repercusión en los vinos del Jerez (Pérez et al., 1991).

Es interesante destacar la formación de compuestos derivados del metabolismo de la levadura, como la formación de alcoholes superiores en las rutas de síntesis o degradación de algunos aminoácidos (Pérez, 1979).

1.2.2.2. Aspectos microbiológicos de la fermentación.

En la fermentación espontánea de los mostos se perfilan tres fases, en cada una de las cuales intervienen levaduras de distinta especie con marcadas diferencias fisiológicas. En la primera destacan levaduras productoras de bajo grado alcohólico y elevada acidez volátil, en la segunda dominan especies homofermentativas y productoras de grado alcohólico medio y en la tercera especies del género *Saccharomyces*, típicamente alcoholígenas (Suárez e Íñigo, 1990)

Son numerosas las especies de levaduras aisladas en los mostos del Jerez, pertenecientes a los géneros *Kloeckera*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Saccharomyces* y *Saccharomyces*, principalmente. Entre ellas destacan las especies del género *Saccharomyces*, y en especial *S. cerevisiae*, *S. chevalieri*, *S. fermentati*, *S. rosei* y *S. italicus* (Zajara, 1957; Íñigo et al., 1963; García, 1982; Valcárcel et al. 1990).

Sin embargo, la mayoría de estas especies no se aíslan durante la fermentación debido a las prácticas enológicas llevadas a cabo tales como la sulfitación de los mostos y a la utilización del pie de cuba, que ejercen una presión selectiva entre los distintos integrantes de la flora microbiana presente a favor de las levaduras de alto poder alcoholígeno. De esta manera, la fermentación es dirigida mayoritariamente por la cepa seleccionada (*S. cerevisiae*) y por *S. fermentati* y *S. chevalieri* (Valcárcel et al., 1990).

1.2.3. LA CRIANZA Y ENVEJECIMIENTO DEL VINO DE JEREZ

1.2.3.1. Tipos de envejecimientos y tipos de vinos.

Los procesos de encabezado, envejecimiento biológico y fisico-químico por el sistema de añadas y posterior de soleras, son el fundamento de la fase post-fermentativa, determinante en la elaboración del Jerez. Tan es así que en esta zona el vino no consigue su apelativo tras la fermentación alcohólica del mosto puesto que aún entonces se le sigue denominando mosto, sólo es llamado vino cuando éste ha sido sometido al proceso de envejecimiento donde adquiere su acentuada personalidad (Domecq, 1989).

Hay que diferenciar dos tipos de envejecimientos, la *Crianza Biológica* y el *envejecimiento fisico-químico*. Es la naturaleza de una u otra crianza lo que va a determinar el tipo de vino resultante, estableciendo las peculiaridades y diferencias entre ellos. El destinar al vino a uno u otro tipo de envejecimiento se consigue mediante la fortificación o encabezado, que consiste en añadir alcohol destilado de vino de tal manera que se eleve la graduación alcohólica original de aproximadamente 12 % a 15.5 % (v/v) en los vinos para crianza biológica y a 18 % (v/v) en aquellos para envejecimiento físico-químico (Pérez, 1991; Díaz, 1989; Casas, 1984).

Los tipos de vinos básicos de la zona del Jerez son:

- *FINOS Y MANZANILLAS*: vinos muy finos de color oro pajizo a muy pálido, de aroma punzante y delicado, ligeros, secos y poco ácidos, con graduación alcohólica comprendida entre 15 y 17% (v/v). El proceso de envejecimiento se lleva a cabo sólo y exclusivamente mediante crianza biológica.

- *AMONTILLADOS*: vinos de color ámbar, aroma punzante atenuado (avellanado), suave y lleno al paladar, seco y con graduación alcohólica comprendida entre 16 y 18% (v/v). Éstos tienen una primera y larga fase de crianza biológica (tipo fino) y

posterior envejecimiento físico-químico.

- *OLOROSOS*: vino de color oro, muy aromático, de mucho cuerpo (nuez), seco o ligeramente abocado y con graduación alcohólica entre 18 y 20% (v/v). Éstos tienen una corta crianza biológica inicial previa al encabezado y una larga fase posterior de envejecimiento físico-químico.

- *DULCES*: vinos elaborados a partir de mostos azucarados de uvas de Pedro Ximenez y Moscatel encabezados con alcohol de vino, quedando con más de 200 g/L de azúcar.

1.2.3.2. Sistema de envejecimiento.

El envejecimiento de los vinos del Jerez se realiza de una manera singular, practicándose de forma tradicional desde hace cientos de años. La vasija utilizada es la bota de madera de roble, con una capacidad aproximada de 500 L (Pérez, 1982, 1991).

Este sistema se fundamenta en dos etapas, la primera de forma estática o envejecimiento en *añadas* y la segunda de forma dinámica o sistemas de *criaderas* y *soleras*; utilizándose tanto en el proceso de envejecimiento físico-químico como en el de crianza biológica.

En la fase estática o envejecimiento en *añadas* el vino almacenado se caracteriza por el año de la cosecha de la cual procede y se le denomina *sobretablas*. El vino, antes de pasar a sus *soleras* específicas, es otra vez analizado organoléptica y analíticamente para confirmar que la evolución sufrida en este período está acorde con el tipo de vino inicialmente predefinido. El tiempo de permanencia en esta etapa depende de la categoría y tipo de vino, para los finos y manzanillas oscila entre uno y dos años y para los olorosos es superior a un año, pudiendo sobrepasar los diez años.

El sistema de soleras o segunda etapa de crianza y envejecimiento está compuesto por varias escalas o estadios formados por un número determinado de botas. La que contiene el vino más envejecido se sitúa sobre el suelo, razón por la que se le denomina *solera*. Sobre ésta se colocan las distintas escalas que la siguen en menor vejez, recibiendo el nombre de *criaderas* y enumerándose según su orden de antigüedad con respecto a la solera (*1ª criadera, 2ª criadera...*). El número de escalas de un soleraje es variable.

La solera o escala de mayor vejez suministra el vino destinado al consumo. Periódicamente se extrae una determinada proporción del vino contenido en cada una de las botas que componen la solera, produciendo un vacío parcial en ella. Esta operación se denomina *saca*. El vacío producido en la solera se completa con el conjunto de vino de la escala que le precede en vejez, *1ª criadera*, mediante una *saca* de dicha escala. El vacío parcial originado en la *1ª criadera* se repone con vino de la *2ª criadera*, y así sucesivamente hasta la *criadera* más joven que se completa con vino procedente del sobretablas o sistema de *añadas*. La operación de completar el vacío originado en una escala se denomina *rocio*. Esta forma de operar en el envejecimiento de los vinos hace de la solera una mezcla compleja por el número de *añadas* que la componen, permitiendo mantener la calidad del producto constante a lo largo del tiempo independientemente de la cosecha (Fig. 1). Las operaciones de *sacas* y *rocios* en el soleraje recibe el nombre de *correr escalas* (González Gordón, 1948; Casas, 1967, 1973, 1984; Pérez, 1982, 1984, 1991; Díaz, 1989).

Las operaciones descritas se realizan con una técnica cuidadosa y tradicional para conseguir la homogenización tras el *rocio* del vino contenido en la bota, y en el caso de los sistemas de crianza biológica para no alterar el velo de flor que cubre la superficie del vino ni los depósitos acumulados a lo largo de los años en el fondo de la bota (Pérez, 1982).

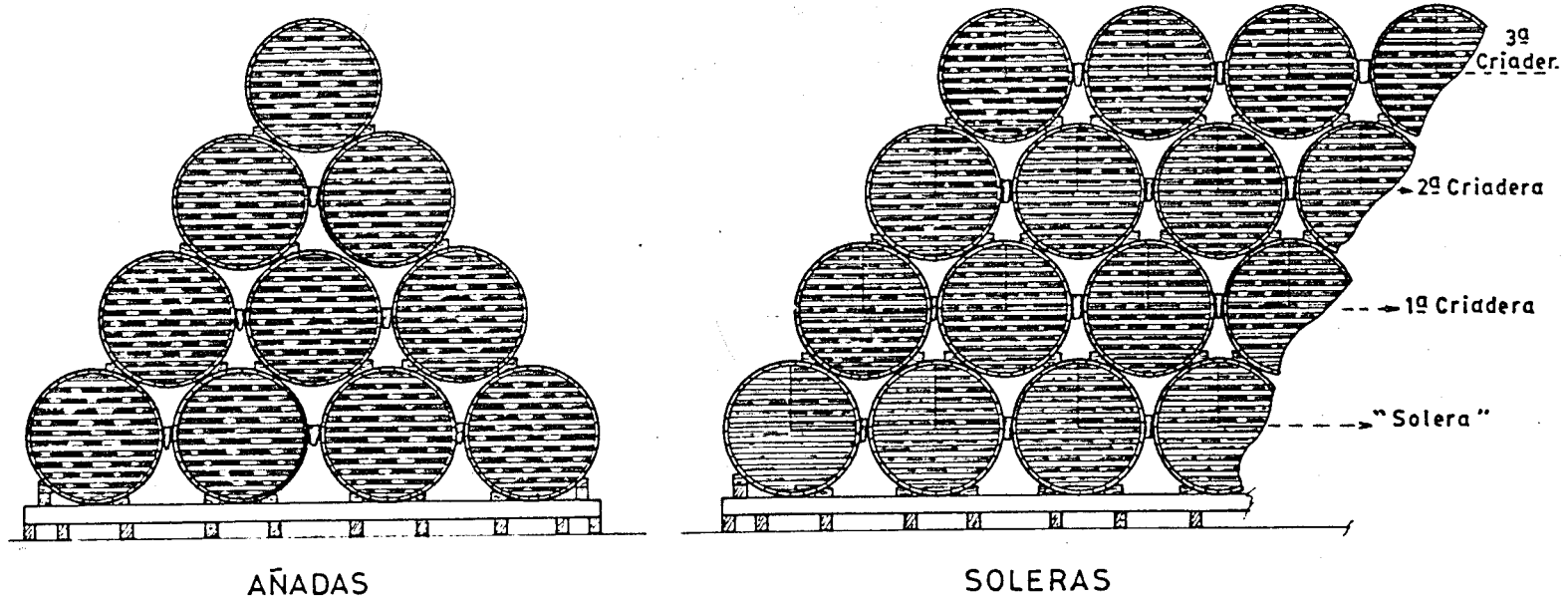
El *tiempo medio de envejecimiento* por sistema de solera que se asigna a un vino, es el cociente que resulta de dividir el volumen total de vino contenido en dicho sistema por el que representa la *saca* anual (Pérez *et al.*, 1984).

1.2.3.3. El envejecimiento físico-químico.

En el envejecimiento de los Amontillados, 2ª fase, y en el caso de los Olorosos y vinos dulces se produce una evolución físico-química del vino hacia un estado de equilibrio entre sus componentes durante un dilatado periodo de tiempo en el que se produce una cesión de compuestos por parte de la madera de la bota. En estos sistemas no se produce desarrollo biológico debido al alto contenido alcohólico que poseen (18% v/v). Tanto la ausencia de velo de flor, la aireación producida en las operaciones de trasiegos del soleraje como la continua penetración a través de la madera de la bota provocan una mayor presencia de O₂ en el vino, acentuándose los procesos oxidativos (Pérez 1984, Suárez e Íñigo, 1990).

Es interesante resaltar el efecto de la *merma*, efecto de pérdida de volumen que se produce en el vino a través de la madera de la bota. Dicha pérdida no es de vino en sí, sino que debido a la absorción relativa que la madera ejerce sobre los distintos componentes del vino, es el agua la que penetra mayoritariamente a través de la estructura celular de la madera para ser evaporada en su capa externa. Ésto provoca un aumento progresivo de la concentración del resto de los componentes, registrándose por tanto un aumento del grado alcohólico y del extracto seco (Pérez, 1979; Martínez *et al.*, 1993).

FIGURA 1: Sistema de envejecimiento del vino de Jerez, después de la primera saca y rocío.



1.3. LA CRIANZA BIOLÓGICA

1.3.1. DEFINICIÓN Y ANTECEDENTES

Se denomina "Crianza Biológica" a la transformación bioquímica que sufre el vino durante la etapa de envejecimiento como consecuencia de la intensa y continúa acción metabólica de la levadura en fase filmógena o *velo de flor* (Pérez, 1991; Suárez e Íñigo, 1990). Bobadilla (1943) define a la flor como un conjunto de microorganismos que viven en la superficie del vino, constituyendo lo que técnicamente se llama un *velo*. Cuando empieza la formación de velo, se observan unos puntos blancos, que después se convierten en manchas mayores, con contornos irregulares. El citado autor agrega que hay ciertos requisitos para que el desarrollo de la flor se verifique en condiciones óptimas, siendo los principales la existencia de superficie suficiente en contacto con el aire (por lo que se deja un vacío aproximadamente de 1/6 de la capacidad de la bota), temperatura comprendida entre 15 y 20°C, y graduación alcohólica entre 14.5 y 15.5% (v/v).

La crianza biológica surge por primera vez en Sanlúcar de Barrameda a consecuencia de una bajada en la graduación alcohólica en los vinos de consumo local en el siglo XVIII, ya que hasta entonces el contenido alcohólico de los vinos superaba el 17% (v/v) (Pérez, 1994). Es a mediados del siglo pasado cuando la crianza biológica comienza a practicarse en Jerez de la Frontera (González Gordon, 1948, Marcilla et al, 1936 y Fornachón, 1953).

En un principio, el cultivo bajo velo de flor se establece de forma estacional sobre el vino alternándose con periodos de baja actividad biológica, debido fundamentalmente a la adecuación no idónea de las bodegas que no mantenía las condiciones ambientales que requiere este tipo de envejecimiento. Las épocas más propicias para el desarrollo del velo es la primavera y el otoño por establecerse mejor las condiciones del entorno. Este resurgir estacional puede aparentar una analogía con el fenómeno de floración; la "floración del vino" motiva que se denomine a esta

crianza biológica, crianza bajo velo de flor (Pérez, 1982).

Según Cruess (1948) el desarrollo del velo de flor comienza con la aparición de islotes que crecen hasta unirse para formar una lisa, delgada y continua película. En pocas semanas se espesa y se arruga. El velo joven y en presencia de abundante aire presenta un color casi blanco. El velo viejo adopta una coloración grisacea, pudiendo llegar a ser marrón claro si existe una escasa aireación. Con el tiempo se desprenden trozos de él, que caen al fondo de la bota y son sustituidos por nuevo desarrollo. El sedimento de levaduras se autolisa, proceso que afecta positivamente al sabor y bouquet del vino.

Durante esta etapa son metabolizados muchos componentes del vino y surgen otros, de manera que el vino va adquiriendo una estructura característica, se acrecienta su finura, su olor punzante y la palidez de color. En el trasiego del vino a lo largo de todo el sistema se aportan nuevos micronutrientes y oxígeno, potenciándose así la crianza (González Gordón, 1948; Pérez *et al.*, 1984; Díaz, 1989). Este velo de levaduras consume oxígeno en su metabolismo oxidativo y al cubrir toda la superficie del vino lo aísla del contacto con la atmósfera, de modo que el oxígeno está prácticamente ausente en él, persistiendo en el medio un relativo carácter reductor que posibilita la presencia de determinados componentes en estado reducido e impide una evolución oxidativa del vino (Pérez, 1982).

1.3.2. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

Además del velo de flor responsables del envejecimiento biológico, es muy frecuente la aparición de otros velos aeróbicos sobre muy diversos tipos de vinos que originan en los mismos notables alteraciones, conocidas como *flores del vino*.

Íñigo y Arroyo (1964 a) hacen una revisión de los trabajos llevados a cabo sobre los velos de flor en la que adjudican a Pasteur las primeras descripciones de levaduras encontradas en los velos desarrollados sobre vinos alterados, llegando a la conclusión de que eran levaduras pertenecientes a la especie *Mycoderma vini*.

Rocques (1933) se limita a señalar el hecho de la gran producción de aldehidos debido a la acción del citado *M. vini*. Los autores que posteriormente escriben sobre estos vinos no hacen sino copiar las ideas de Rocques (citado por Marcilla, 1936). Así, De Rossi (1917) describe a cuatro especies del género *Mycoderma* (*M. vini*, *M. duplex*, *M. tenax* y *M. acidificans*) a las que considera causantes de dicha enfermedad (citado por Íñigo y Arroyo, 1964 a). Posteriormente, Lodder y Krejer Van Rig (1952) reúnen a éstas y otros *Mycodermas* en una sola especie, *Candida mycoderma*. Además de éstas, han sido descritas otras especies pertenecientes al género *Pichia* en velos sobre vinos afectados de flores (Suarez e Íñigo, 1990).

No es hasta 1936, en un amplio estudio realizado por Marcilla *et al.* cuando queda más clara la diferencia entre los dos tipos de desarrollo aeróbico. Estos autores señalan que el velo conocido como *Mycoderma vini*, oxida completamente grandes cantidades de alcohol, deja casi inalterada la acidez volátil, la resistencia al etanol que presenta es escasa, dicha flor se desarrolla indistintamente en vinos blancos y tintos, tolera temperaturas relativamente bajas y normalmente no se sumerge el velo mycodérmico en unas épocas para reaparecer en otras, quedando los vinos sosos y "vacíos" al paladar.

Dichos autores concluyen que los caracteres directamente observables en las "flores" desarrolladas en los vinos finos de Jerez y análogos, son absolutamente opuestos. A las levaduras responsables de este tipo de desarrollo aeróbico las clasifican como razas de una nueva especie esporulada y de alto poder fermentativo perteneciente al género *Saccharomyces*, *S. beticus* razas α , β y γ (Marcilla *et al.*, 1936). Prostosserdw y Afrikian (1933) llegan a la misma conclusión, describiendo una nueva especie *S. cheresiensis* (citado por Suárez e Íñigo, 1990).

Santa Maria estudiando el comportamiento de los genes responsables de la formación de flor llega a la conclusión de que tal característica representa una propiedad fisiológica estable por lo que puede ser utilizada para la diferenciación a

nivel de especie. Éste reconoce especies nuevas de levaduras de flor, *S. aceti*, *S. oxidans*, *S. hispanica*, *S. cordubensis* y *S. gaditensis* (Santa María, 1968, 1970).

La descripción de estas nuevas especies da lugar a numerosas controversias y confusiones como expresan Amerine y Kunkee (1968) en una revisión bibliográfica sobre levaduras de vinificación en todo el mundo. Las distintas revisiones sistemáticas realizadas hasta ese momento por Lodder y Krejer Van Rig (1952, 1970) no consideran el carácter filmógeno sobre vinos de alta graduación alcohólica. Así, en la de 1952 clasifican a *S. béticus* como *S. fermentati* y a *S. cheresiensis* como *S. oviformis*. En los estudios taxonómicos publicados en 1970, las cepas de levaduras de flor aisladas de velos por Marcilla *et al.*, Protosserdow y Afrikian, y Santa María se encuentran caracterizadas dentro de numerosas especies: *S. bayanus* (*S. cheresiensis*, *S. beticus* raza γ , *S. oxidans* y *S. aceti*), *S. capensis* (*S. beticus* raza α , *S. oxidans*), *S. cerevisiae* (*S. beticus*), *S. fermentati* (*S. beticus* raza γ), *S. prostoserdovii* (*S. hispanica*) y *S. aceti* (*S. aceti*).

Cruess (1948) afirma que el velo de flor se compone de células de la misma raza de levadura que fermenta el mosto, *S. cerevisiae ellipsoideus*, y que dichas células eran más pequeñas y granulares en estado filmógeno que en el fermentativo, y que se adherían formando grupos. También encuentra especies del género *Pichia* y *Torulopsis*.

Fernandez de Bobadilla (1949) comparte la misma idea afirmando que la "flor" no es más que la fase de velo de una de las variedades de levaduras que intervienen en la fermentación alcohólica (1949) y que dicho velo se mantiene en la superficie gracias a una especie de retículo gelatinoso formado de masas amorfas segregadas por las mismas levaduras (1952).

Los trabajos realizados por Íñigo Leal *et al.* (Suárez e Íñigo Leal, 1990; Íñigo, 1992; Íñigo y Arroyo, 1964 a; Íñigo, 1980; Íñigo *et al.*, 1990) son definitivos para el conocimiento de la microbiología de los velos de flor en los vinos con crianza biológica. Éstos proponen una nueva especie de levadura, *S. montuliensis*, aislada por

primera vez en la zona de Montilla (Íñigo y Arroyo, 1964 a). Éstos concluyen que los velos blastomicéticos formados en los vinos con grado alcohólico superior a 13% (v/v), están constituidos por especies de levaduras del género *Saccharomyces* diferentes de las encontradas en fermentación, y por estas mismas y otras de los géneros *Hansenula*, *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* y *Picchia*, en vinos con grado alcohólico inferior, por lo que no las consideran agentes de la crianza ya que al vino antes de ser sometido a ella se le eleva el grado alcohólico hasta 15.5% (v/v)

Las especies del género *Saccharomyces* que integran los velos son:

- * *S. beticus* (Marcilla *et al.*, 1936)
- * *S. cheresiensis* (Protosserdow y Afrikian, 1933)
- * *S. montuliensis* (Íñigo, 1964)
- * *S. rouxii* (Boutroux, 1883)

Estos autores, en los aislamientos realizados en fase fermentativa no encontraron nunca las especies halladas en los velos espontáneos, ni tampoco especies propias de la fase fermentativa entre las aisladas de los velos. Sin embargo, opinan que el fenómeno biológico de la crianza del vino de Jerez tiene su origen en la microflora epifítica de la uva, tanto en sus orígenes ontogénico como filogénico; no pudiéndose desconectar el fenómeno microbiológico de la crianza, del conocimiento de los agentes de fermentación vínica. Así, relacionan filogenicamente, por presentar un patrón fermentativo de los distintos azúcares similar, a *S. chevalieri* (Lodder y Krejer van Rig, 1952) y *S. beticus* y a *S. oviformis* (Lodder y Krejer van Rig, 1952) y *S. cheresiensis* (Íñigo y Arrollo, 1964 a). Además, suponen a *S. montuliensis* y *S. rouxii* estadios más evolucionados de *S. beticus* y *S. cheresiensis*, que paulatinamente van perdiendo la capacidad de fermentar otros azúcares (Íñigo Leal, 1980).

D. Yarrow en el manual taxonómico editado por Krejer-van Rij (1984) engloba a *S. beticus* y *S. cheresiensis* dentro de la especie *S. cerevisiae* y a *S. rouxii* como *Zygosaccharomyces rouxii*. En dicha revisión no se contempla a *S.*

montuliensis pero su patrón de fermentación de azúcares coincide con el de *S. telluris*.

Actualmente, según Barnett *et al.* (1990), *S. beticus*, *S. montuliensis* y *S. cheresiensis* pertenecen a la especie *S. cerevisiae* y *S. rouxii* a *Zygosaccharomyces rouxii* (Barnett *et al.*, 1990; Barnett, 1992).

En los sistemas industriales de crianza biológica, junto con la levadura de velo de flor coexiste una población bacteriana muy importante de morfología principalmente bacilar (Bravo, 1986). Esta flora participa activamente en la evolución que sufren algunos compuestos del vino, en concreto determinados ácidos (Pérez Juan, 1988; Suárez e Íñigo, 1990).

1.3.3. ASPECTOS BIOQUIMICOS DE LA CRIANZA

No es posible describir de una manera detallada los fenómenos y reacciones que se producen con la crianza biológica en los vinos de Jerez, ya que aunque existan muchos trabajos al respecto, la información sería incompleta a tenor de los procesos que se desconocen (Pérez, 1982). Los cambios se deben principalmente a la actividad de las levaduras de flor, en los procesos respiratorios descritos en el ciclo de Krebs, reproducción celular e incluso en los procesos de autólisis de estas levaduras. La levadura, durante el envejecimiento bajo velo de flor, metaboliza determinados componentes hidrocarbonados, observándose por ello una apreciable disminución en el contenido de etanol, ácido acético, acetato de etilo, glicerina, aminoácidos y ácidos orgánicos, entre otros (Pérez, 1991).

1.3.3.1. Etanol.

El consumo de este compuesto es un fenómeno ampliamente descrito y evidenciado por numerosos autores. Ya Marcilla(1936) atribuía la pérdida de alcohol, observada durante la crianza biológica, en parte a la evaporación y en parte a reacciones de oxidación llevadas a cabo por la levadura en las que se forma etanal,

que se acumula parcialmente en el vino y del que la mayor proporción se oxida a ácido acético, y por último a anhídrido carbónico y agua. Este hecho fue comprobado y matizado por otros investigadores (Fornachón, 1953; Bobadilla y Navarro, 1952; Saavedra, 1959; Saavedra y Garrido, 1963; Cabezudo *et al.*, 1967; Webb y Noble, 1976; Casas Lucas, 1987; Gonzalez Gordon, 1948).

La disminución del grado alcohólico que sufren los vinos finos durante su crianza se explica por la asimilación del etanol por parte de las levaduras. Éstas, en ausencia de azúcares en el medio, utilizan dicho compuesto como principal fuente de carbono siguiendo una vía metabólica en la que se forma acetaldehído, reacción catalizada por la alcohol deshidrogenasa en presencia de NAD^+ , y posteriormente acetil-CoA que pasa a formar parte del ciclo de Krebs donde se produce la energía necesaria para la síntesis de su material celular, grasas, aminoácidos, carbohidratos de reserva, proteínas, etc (Saavedra y Garrido, 1963; Cabezudo *et al.*, 1967).

1.3.3.2. Glicerina.

Conjuntamente a la utilización de etanol por las levaduras se produce un consumo de glicerina. La cantidad consumida de ambas sustancias depende de diversos factores característicos de las condiciones específicas de la crianza: número de criaderas, sistemática de rociados o corrido de escalas propias de cada bodega, relación superficie/volumen del cultivo y condiciones climáticas, entre otras (Bravo, 1984). La presencia de precursores polares de fosfoglicéridos tiene un efecto positivo sobre el metabolismo de la glicerina y restrictivo sobre el consumo de etanol, sugiriendo, que ésta es consumida, al menos parcialmente, a través de una vía anabólica para la síntesis de fosfolípidos. La glicerina no es metabolizada por la levadura vía fermentativa (Bravo Abad, 1984). Su consumo es proporcional al tiempo de crianza, y además es el componente cuya concentración disminuye con mayor regularidad a lo largo del tiempo (Saavedra, 1959; Bravo, 1984; Martínez de la Ossa *et al.*, 1987a, 1987b).

1.3.3.3. Acidez volátil.

La acidez volátil está constituida por la parte de ácidos grasos pertenecientes a la serie corta, que se encuentra en los vinos en estado libre o de sal. El componente esencial es el ácido acético y uno de sus derivados: el acetato de etilo, también pequeñas cantidades de ácido propiónico, butírico y sus ésteres (Delanoe *et al.* 1987).

La acidez volátil disminuye fuertemente durante la crianza debido a la acción de las levaduras de flor, organismos que presentan una elevada resistencia a la dosis de acético, pudiendo desarrollarse en medios con un contenido de hasta 3 g/L, y provocar una disminución continua durante la crianza (Marcilla *et al.*, 1936). El ácido acético, vía conversión de acetil-CoA, se incorpora bien al ciclo de Krebs o bien a la ruta de síntesis de ácidos grasos en la que se fijan moléculas de CO₂ (Cabezudo *et al.*, 1967; Saavedra y Garrido, 1962; 1963).

Las levaduras de flor, asimismo, disminuyen el riesgo de contaminación acética (Marcilla *et al.*, 1936; Cruess *et al.*, 1938; Fornachon, 1953; Saavedra y Garrido, 1962; Íñigo y Arroyo, 1964 b). Novella (1992) contempla la posibilidad de utilizar las levaduras de flor como practica enológica como remedio curativo de la enfermedad de la picadura acética.

El acetato de etilo disminuye progresivamente a lo largo de la crianza (Pérez, 1991; Martínez de la Ossa *et al.*, 1987b).

1.3.3.4. Acetaldehido.

El oxígeno es utilizado por la levadura en fase de velo para combustionar fundamentalmente al etanol que, como ya se ha dicho, en una primera fase es oxidado a acetaldehido. Éste se forma en cantidades generalmente de 300-400 mg/L, pudiendo llegar hasta 700-800 mg/L según las condiciones del medio, ejerciendo una gran influencia en las características sensoriales de estos vinos y es considerando el componente más típico de los vinos de flor. La producción de acetaldehido nunca

transcurre de forma regular, generalmente hay una formación bastante rápida en las primeras semanas, seguida de un periodo en que la concentración permanece estacionaria o disminuye, y de otro en que se vuelve a elevar o continúa cayendo (Saavedra, 1959; Íñigo y Arrollo, 1964 b). La velocidad de formación de etanal depende de la cepa de levadura, temperatura, relación superficie/volumen y del vino en cuestión (John y Rankiine, 1977). El vino sometido a cultivo sumergido alcanza niveles muy superiores de acetaldehído, pudiendo llegar a ser de 1000 mg/L, niveles que ni son organolépticamente favorables ni posiblemente saludables (Rankine, 1982).

Cabezudo *et al.* (1968) diseñan un procedimiento para acelerar el envejecimiento biológico de los vinos finos en cultivo sumergido. En este estudio realizan una selección de cepas de levaduras de velo teniendo en cuenta su capacidad de consumo de la acidez volátil y su producción de acetaldehído, haciendo notar el distinto comportamiento entre cepas de la misma especie. Íñigo y Arrollo (1964 b), también encuentran que la producción de acetaldehído es variable según la capacidad propia de cada cepa, destacándose en la fase de aparición de velo una cepa de *S. rouxii* seguida de una de *S. cheresiensis*, y al cabo de un mes de cultivo sobresale una cepa de *S. montuliensis*.

Otros componentes, que se forman sólo en pequeñas cantidades, parecen originados en una evolución del etanal, tales como el dietilacetil, la acetoina y el butanodiol,2-3 (Saavedra, 1959; Fornachon, 1953). Casas (1954) apunta la posibilidad de que el glicol provenga de la hidrogenación de la acetoina formada en una condensación acetoinica del etanal .

El 2,3-butanodiol y la acetoina aumentan con la crianza, interpretándose este hecho como una condensación acetoinica de dos moléculas de acetaldehído; la acetoina así formada es sólo reducida a 2,3-butanodiol, no oxidándose a diacetilo en estos casos (Suárez e Íñigo, 1990).

1.3.3.5. Ácidos orgánicos.

Son muy numerosos los trabajos que se han realizado sobre la evolución de los ácidos orgánicos durante la crianza biológica de los vinos finos. Pérez Juan (1988), en una revisión bibliográfica de estos estudios, concluye que la evolución del contenido ácido de un vino bajo velo de flor, pasa por un mínimo hacia la primera mitad de la crianza, produciéndose a continuación una recuperación hasta niveles ligeramente inferiores a los iniciales. Ese mínimo aparece debido a la ocurrencia simultánea de pérdida y generación de ácidos, lo que determina la concentración de los mismos en un momento del proceso. Las causas de la pérdida de ácidos en el vino pueden ser de naturaleza química (precipitaciones) o bioquímicas (acción de levaduras y bacterias) sobre determinadas especies ácidas. El proceso de generación abarca dos aspectos; uno, el incremento en la concentración de ácidos presentes originariamente en el vino y otro, la aparición de nuevos ácidos en el vino.

1.3.3.5.1. **Ácido tartárico.**

Disminuye su concentración a lo largo de la crianza como consecuencia de precipitaciones físico-químicas en forma de bitartrato (Martínez de la Osa *et al.*, 1987a; Pérez *et al.*, 1982).

1.3.3.5.2. **Ácido cítrico y succínico.**

El ácido cítrico presente inicialmente en el vino disminuye hasta niveles despreciables, debido a su asimilación por parte de las bacterias presentes en el medio. La concentración del ácido succínico del vino no sufre apenas modificación debido a que coexisten reacciones de consumo y generación de este compuesto con velocidad muy semejante (Pérez Juan, 1988).

Fernández *et al.* (1966), encuentran que de las especies de flor, sólo *S. rouxii* presenta cierta capacidad de asimilación del cítrico y del succínico (Fernández *et al.*, 1966a y 1966b). Íñigo y Bravo Abad (1963), observan un comportamiento

identico entre *S. beticus*, *S. rouxii* y *S. montuliensis*, en lo que a degradación de ácidos se refiere, agotando totalmente el láctico y succínico, y disponiendo parcialmente de cítrico y málico; mientras que *S. cheresiensis* sólo deja vestigios de málico y cítrico.

1.3.3.5.3. Ácido málico.

El ácido málico procedente de la uva desaparece en dos procesos sucesivos. Uno, en el intervalo de tiempo comprendido entre el final de la fermentación y el encabezado de los mostos, debido a la actividad de las bacterias malolácticas. Otro, durante durante la crianza bajo velo cuyas causas no están totalmente aclaradas, aunque todos los hechos señalan a estos mismos microorganismos como los responsables de este descenso (Pérez, 1982; Pérez Juan, 1988).

Bobadilla y Navarro (1949, 1952) afirman que la desaparición de este ácido es un proceso de velocidad e intensidad variable según los años y viene determinado por diversos factores, tales como el grado alcoholico, temperatura y dosis de sulfuroso, considerando a las bacterias causantes del "ahilado" las responsables de dicha disminución.

Las experiencias en laboratorio con levaduras de flor desarrolladas sobre vinos (Marcilla *et al*, 1936), o sobre medios sintéticos (Saavedra y Garrido, 1962), usando málico como única fuente de carbono y en presencia o en ausencia de etanol, muestran un consumo insignificante de dicho ácido. Sin embargo, Fernandez *et al.*, (1966), encuentran que sólo *S. rouxii* presenta ligera asimilación de este ácido.

1.3.3.5.4. Ácido láctico.

Los datos sobre la evolución del ácido láctico son contradictorios. Algunos autores obtienen en bodega unos incrementos considerables en dicho ácido en la crianza biológica (Marcilla *et al.*, 1936; Saavedra y Garrido, 1959; Casas, 1973;

Fernandez y Navarro, 1949). Bravo (1984) encuentra una variación con numerosos altibajos, alcanzándose en la 1ª criadera la máxima concentración. Pérez (1982) registran en un soleraje de fino un aumento de ácido L-láctico en las escalas jóvenes debido a la fermentación maloláctica llevada a cabo por las bacterias lácticas y un posterior consumo que lo achaca a las levaduras de velo, por el contrario el ácido D-láctico no experimenta una evolución tan regular.

En los estudios realizados a nivel laboratorio, también se encuentran resultados contradictorios. Fornachon (1953) no encuentra variación apreciable en la concentración de ácido láctico. Saavedra y Garrido (1961) encuentran una variación muy irregular. Íñigo y Arrollo (1964 b), en la experiencia con diversas cepas de levaduras de flor, no observan modificación del contenido en dicho ácido a excepción de una cepa de *S. montuliensis* que consume aproximadamente 0.3 g/L.

Los ensayos de asimilación del ácido láctico en medio sintético demuestran que las levaduras de velo de flor tienen la capacidad de asimilar este ácido (Fernandez *et al.*, 1964), aunque Khayyat *et al.* (1979) encuentran que el desarrollo es muy lento cuando es el ácido láctico la única fuente de carbono.

1.3.3.5.5. **Ácido glucónico.**

La concentración inicial del ácido glucónico, que es mayor en el vino procedente de uvas afectadas por *Botrytis*, disminuye a lo largo de la crianza biológica debido al metabolismo de las bacterias lácticas, ya que las levaduras en fase filmógena no consumen dicho ácido (Pérez *et al.*, 1991).

1.3.3.6. **Alcoholes superiores.**

La suma de los alcoholes superiores experimenta un aumento considerable durante la crianza (aproximadamente un 20% de la 3ª criadera a la solera). El n-Propanol, el Iso-butanol y los Iso-amflicos experimentan un aumento durante la fase de desarrollo del velo debido a una multiplicación celular activa, ya que la formación

de dichos compuestos está ligada a vías anabólicas de las levaduras. El Iso-butanol y los Iso-amílicos provienen de los cetoácidos correspondientes originados en la vía de síntesis o degradación de los aminoácidos. El n-propanol se origina a partir del ácido acético y del ácido pirúvico (Pérez, 1979).

1.3.3.7. Aminoácidos.

Polo (1971) comprueba la disminución en el contenido de aminoácidos libres que se produce en este sistema de crianza. Esteban *et al.* (1979) trabajando con cultivos puros obtuvo un consumo mayoritario de la leucina, isoleucina y valina, no encontrando variaciones en los niveles de prolina. Botella *et al.* (1990), observan un elevado consumo de prolina, la cual inicialmente constituye un 50% de los aminoácidos totales y en la última etapa de envejecimiento alcanza unos niveles del 20%, insinuando que dicho compuesto debe actuar como fuente de precursores de aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas celulares.

1.4. LEVADURAS INDUSTRIALES

La utilización de la biotecnología en la producción de alimentos y bebidas se practica desde hace más de 8000 años en la elaboración de productos tan importantes como el pan, vinagre, bebidas alcohólicas, masas agrias y quesos. Los procesos biotecnológicos se utilizan actualmente para la obtención de otros productos fermentados, alimentos y aditivos alimentarios (aminoácidos, vitaminas, levadura). La biología moderna (biología molecular, bioingeniería, etc) ha causado un fuerte impacto en la industria alimenticia.

Las levaduras constituyen cuantitativa y económicamente el grupo de microorganismos más importante explotado comercialmente por el hombre. La cantidad total de levadura producida anualmente es superior a cinco millones de toneladas. Además de la importancia en la industria alimentaria, la levadura es un

gran modelo experimental para el conocimiento básico de los procesos bioquímicos, genéticos y metabólicos en las células vivas. *S. cerevisiae* se utiliza de forma experimental debido a que es un eucariota que se puede cultivar y analizar genéticamente como las bacterias (Botstein *et al.*, 1988; Oda *et al.*, 1989). Además, posee una serie de ventajas adicionales, ya que se reproduce de forma estable como haploide, diploide aneuploide o poliploide, y al tratarse de un organismo eucariota su estructura genética es mucho más parecida a la de organismos superiores que a las de las bacterias.

Aunque muchos son los estudios realizados sobre la genética y bioquímica de la levadura de laboratorio *S. cerevisiae*, el conocimiento de las cepas industriales de *saccharomyces* bajo estos puntos de vista es muy limitado. Las levaduras industriales han sido seleccionadas durante siglos para características que dificultan enormemente su manipulación genética. Éstas son generalmente poliploides o aneuploides, homotálicas y esporulan difícilmente, siendo muy baja la viabilidad de las esporas (Spencer *et al.*, 1983; Oda *et al.*, 1989). Todo ello hace el análisis de tetradas y por tanto el análisis genético difícil (Russell *et al.*, 1987; Keiding, 1988)).

Las razones de esta organización genética podría estar en el hecho de que el hombre lleva más de 10000 años seleccionando alimentos y bebidas con unas características determinadas, y por lo tanto ejerciendo una fuerte selección en favor de aquellos genotipos que no cambian fácilmente. Debido a esta necesidad de propiedades constantes en las cepas, ha habido una fuerte selección en contra de aquellas cepas con una reproducción sexual eficiente. Por otra parte, dado que muchas mutaciones son recesivas, la selección ha favorecido la aparición de cepas con alta ploidía, cuyos fenotipos no cambian incluso cuando algunos alelos mutan (Spencer *et al.*, 1990). Sin embargo, actualmente el hombre trata de mejorar a estas cepas industriales para obtener nuevos productos, mejorar los producidos tradicionalmente u obtenerlos a menor coste, enfrentándose al problema que ello supone.

1.4.1. IDENTIFICACIÓN

La nomenclatura de las levaduras ha cambiado considerablemente en los últimos años. Tradicionalmente las cepas industriales han sido identificadas en base a su morfología y su capacidad para asimilar y fermentar distintas fuentes de carbono y nitrógeno (Barnett, 1992). La clasificación basada en las características fenotípicas no tiene en cuenta el concepto "mutación", no considerando la variabilidad nutricional de una determinada especie. Sin embargo, se hace necesario un procedimiento de identificación rápido que permita distinguir la cepa utilizada de cualquier otra contaminación, para así asegurar la presencia única o mayoritaria de la cepa original durante todo el proceso.

La identificación de levaduras industriales no ha sido fácil, dado que la mayoría de ellas proceden de la misma especie, *S. cerevisiae* y carecen de marcadores genéticos como las levaduras de laboratorio. Los recientes progresos en biología molecular han llevado a cabo el desarrollo de nuevas técnicas para la identificación de cepas individuales tales como el contenido GC (guanina-citosina), porcentaje de hibridación ADN-ADN, patrón electroforético de proteínas (van Vuuren *et al.*, 1987); zimogramas (Subden *et al.*, 1982; Yamazaki *et al.*, 1982); el polimorfismo de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial (Russell *et al.*, 1987; Kitmoto *et al.*, 1991; Pedersen, 1988; Querol *et al.*, 1992a y 1992b), y la separación de cromosomas por electroforesis en campo pulsado (Naumov *et al.*, 1992; Rank *et al.*, 1991; Querol *et al.*, 1992c; Yamamoto *et al.*, 1991).

Se han descrito diferentes técnicas para separar cromosomas intactos de *Saccharomyces cerevisiae* (De Jonge *et al.*, 1986; Schwartz *et al.*, 1984). De esta manera, se observó que las levaduras vínicas presentaban una amplia variedad de patrones electroforéticos, atribuyéndosele bien a la inestabilidad del cariotipo o a la presencia de numerosas cepas en los aislamientos originales (Yamamoto *et al.*, 1991). Otros autores (Bidenne *et al.*, 1992; Vezinhet *et al.*, 1990), al comparar cepas industriales con cepas haploides de laboratorio, han encontrado cambios

intercromosómicos (tralocaciones) además de intracromosómicos (deleciones y duplicaciones).

Numerosos autores han considerado a las cepas industriales de *Saccharomyces cerevisiae* como organismos que poseen una constitución cromosómica desconocida y una gran heterogeneidad genética (Bakalinsky y Snow 1990). Aneuploidías y/o poliploidías son fenómenos muy extendidos y frecuentes entre las levaduras vínicas, tal es así que el mantenimiento de un complemento cromosómico estable pero desequilibrado ha sido considerado ventajoso (Sancho *et al.* 1986; Adams *et al.* 1992): la posesión de un juego cromosómico extra podría proteger a las levaduras vínicas de los efectos de las mutaciones recesivas letales (Jiménez y Benítez, 1988) o incrementar el número de copias de genes favorables dando lugar a cepas más vigorosas (Adams *et al.*, 1992).

El polimorfismo existente en cepas industriales se ha atribuido al hecho de que el genomio nuclear codifica para funciones génicas requeridas para la adaptación óptima en cada medio industrial en concreto, de manera que el polimorfismo cromosómico estaría sujeto a una fuerte presión selectiva distinta en los diferentes procesos industriales (Bakalinsky y Snow, 1990; Yamamoto *et al.*, 1991); por ejemplo: máxima tasa de crecimiento en melazas para las levaduras panaderas o viabilidad en altas concentraciones de etanol para las levaduras vínicas. De hecho, se obtienen variantes de tamaño y reorganizaciones cromosómicas en poblaciones de *S. cerevisiae* crecidas bajo condiciones selectivas tales como un medio con fosfato limitante, poseyendo las variantes seleccionadas ventajas adaptativas (Adams *et al.*, 1992).

Como alternativa a la electroforesis de cromosomas, el análisis de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial supone un método fácil, rápido y económico, que ha permitido distinguir cepas vínicas y cerveceras de manera inequívoca (Querol *et al.*, 1992a). Usando este método para la identificación de levaduras enológicas, se puso de manifiesto un marcado polimorfismo (Venzinhet *et al.*, 1990, Querol *et al.*, 1992a y 1992b). Además, el análisis de restricción permite

una mejor diferenciación entre cepas (Querol *et al.*, 1992a, 1992b), ya que el número y el tamaño de los cromosomas de las levaduras vínicas era poco variable en comparación con el polimorfismo del ADNmt mostrado por las mismas cepas.

1.4.2. LEVADURAS VÍNICAS

El término "levaduras vínicas" abarcaba a todas aquellas cepas, pertenecientes a numerosas especies, que se encuentran en las uvas y participan en la fermentación del mosto. No es hasta los últimos 10 años, cuando se comienza a llevar a cabo la selección y producción industrial de cepas de levaduras vínicas (Kreuz, 1993). Estas cepas, casi siempre, pertenecen a la especie *S. cerevisiae*.

Las innovaciones llevadas a cabo con respecto a la producción de levaduras vínicas se han dirigido hacia la mejora del proceso fermentativo y de la calidad y propiedades del vino resultante (Bakalinsky y Snow, 1990; Yamamoto *et al.*, 1991). Así, las levaduras vínicas han sido caracterizadas y seleccionadas, principalmente, atendiendo a las siguientes propiedades:

- 1.- Capacidad para fermentar rápida y eficientemente mostos con 20-25 % de azúcar.
- 2.- Tolerancia al etanol, altas temperaturas, CO₂ y al SO₂.
- 3.- Baja producción de metabolitos indeseables (acidez volátil, H₂S, diacetilo, etc)
- 4.- Capacidad de flocular, para que así la sedimentación se produzca rápidamente.
- 5.- La no formación de espuma durante la fermentación.
- 6.- Capacidad de asimilación del ácido málico.
- 7.- Producción de metabolitos que contribuyan favorablemente en la apreciación organoléptica del vino.

Estas propiedades tienden a estar influenciadas por las condiciones de cultivo y favorecidas por la selección artificial (Bakalinsky y Snow, 1990; Yamamoto *et al.*, 1991). Tradicionalmente, la fermentación de los mostos la llevaban a cabo la flora microbiana presente en las uvas y en las instalaciones industriales; flora que varía grandemente entre las diferentes zonas vitivinícolas e incluso en las diferentes viñas

de una misma región (Poulard *et al.*, 1981; Íñigo y Bravo, 1993). Durante los últimos años la mayoría de los productores de vinos utilizan cultivos puros de levaduras, en forma de levadura seca activa, aisladas de su propia región (Subden, 1991). En el caso de las fermentaciones controladas, la levadura inoculada es la principal responsable del proceso fermentativo pero no se inhibe el desarrollo de las cepas naturales, pudiendo tener efectos importantes en el aroma del vino resultante (Martínez *et al.*, 1989; Barre, 1992).

Dado que las levaduras vínicas fermentan un sustrato no estéril, interviniendo varias especies en el proceso, se ha hecho necesario el desarrollo de métodos que permitan identificar inequívocamente la cepa inoculada. Además, la identificación de cepas individuales permite asociar la presencia de ciertas cepas con determinados productos finales y seguir el desarrollo de la cepa seleccionada con respecto a la flora autóctona durante todo el proceso fermentativo (Martínez *et al.*, 1993). Los métodos más comunes son, como ya se indicó anteriormente, el cariotipo electroforético y el análisis de los fragmentos de restricción del ADNmt.

A pesar de la importancia de las levaduras de velo de flor en el envejecimiento de los vinos con crianza biológica, no se conoce casi nada sobre las características fisiológicas y moleculares de estas levaduras e incluso menos sobre la naturaleza de la formación del velo de flor.

Las razones por las que las levaduras vínicas producen etanol a partir de una fuente de carbono fermentable no están claras, parece ser un mecanismo antagónico contra otras especies (Jiménez y Benítez, 1987a). En cualquier caso, las levaduras tienen que adaptarse al etanol que ellas producen para poder crecer y sobrevivir. Además, en el caso del Jerez, el grado alcohólico alcanzado en la fermentación (aproximadamente 12% v/v) se eleva hasta 15.5% (v/v) durante la crianza por adiciones periódicas de etanol.

El genomio mitocondrial más que el nuclear se ha adaptado preferentemente a las altas concentraciones de etanol (Jiménez y Benítez, 1988). Mientras que el

etanol parece ser un fuerte agente mutagénico en las mitocondrias, no tiene efecto en los genomas nucleares de las células de levaduras (Jiménez y Benítez, 1988). El genoma mitocondrial también es el responsable de la viabilidad, jugando un papel importante en condiciones de altas concentraciones de etanol, donde las levaduras apenas crecen y se dividen (Jiménez y Benítez, 1988).

Las mitocondrias de las levaduras de velo de flor están involucradas en la supervivencia celular en presencia de altas concentraciones de etanol debido a un efecto directo en el mantenimiento de la respiración ya que la respiración está directamente implicada en la tolerancia al etanol y en la formación de flor (Jiménez y Benítez, 1988; Bandas y Zakharov, 1980).

La característica "flor" la presentan aquellas levaduras vínicas cuyo ambiente natural son vinos de graduación alcohólica por encima de 15 %vol etanol (Santa María y Vidal, 1973), como un mecanismo que les permite crecer sobre la superficie del vino donde es posible llevar a cabo un metabolismo oxidativo dado que la toma de oxígeno no está restringida. De hecho, los mutantes "petite" de cepas de levaduras de flor son incapaces de formar velo, indicando que el metabolismo oxidativo es esencial para el mantenimiento de las células sobre la superficie del vino (Jiménez y Benítez, 1988).



2 . MATERIALES

2.1. SISTEMAS INDUSTRIALES

Se estudiaron varios sistemas de vinos finos y manzanillas que diferían entre ellos en la composición química del sustrato, en el sistema de crianza (añadas y solerajes con distinto número de escalas), en el tiempo medio de envejecimiento, así como distinta ubicación (Jerez, Sanlúcar).

2.1.1. AÑADAS

Las añadas de vinos de Jerez en crianza biológica estudiadas corresponden a los años de 1981 hasta 1990. El sistema está compuesto por un número reducido de botas, variable según el año del que procede, que se mantienen en la bodega como prueba experimental desde el citado año, y no estando sometidas a las operaciones de corrido de escalas (sistema de envejecimiento estático), las pérdidas de alcohol se reponen tan solo cada cierto tiempo.

También se tomaron muestras de una bota de manzanilla con 8 años de vejez, cercana al sistema de añadas pero con pequeñas reposiciones de vino más joven de forma no regular.

Las características de dichos sistemas se describen en la Tabla 1.

2.1.2. SOLERAJES

Los solerajes estudiados (sistema de envejecimiento dinámico) y sus características se describen en la Tabla 2.

TABLA 1: Características de las añadas de Finos y Manzanillas estudiadas.

Añadas	Ubicación	Vejez (años)	Nº Botas
<u>Finos</u>			
1981	Jerez	11	9
1982	Jerez	10	9
1983	Jerez	9	7
1984	Jerez	8	10
1985	Jerez	7	11
1986	Jerez	6	12
1987	Jerez	5	12
1988	Jerez	4	12
1989	Jerez	3	12
1990	Jerez	2	12
<u>Manzanillas</u>			
Bb	Sanlucar	8	1

TABLA 2: Características de los solerajes de Finos y Manzanillas estudiados.

Soleraje	Ubicación	Vejez media (años)	Escalas	Nº Botas
<u>Finos</u>				
A	Jerez	5	1ªCRA ^a	1743
			Solera	1443
B	Jerez	5	2ªCRA	350
			1ªCRA	329
			Solera	327
C	Jerez	5	3ªCRA	520
			2ªCRA	484
			1ªCRA	423
			Solera	364
D	Jerez	3	1ªCRA	1616
			Solera	1408
E	Jerez	3	1ªCRA	538
			Solera	560
<u>Manzanillas</u>				
F	Sanlucar	5	4ªCRA	NC ^b
			3ªCRA	NC
			2ªCRA	NC
			1ªCRA	NC
			Solera	NC

^a CRA: criadera, ^b NC: desconocido.

2.2. CEPAS.

La clasificación y el origen de las cepas utilizadas en este trabajo se describen en la Tabla 3. Las levaduras de velo de flor se aislaron de solerajes industriales de vino fino y manzanilla. Éstas pertenecen a las especies *Saccharomyces cerevisiae* y *Zygosaccharomyces rouxii* (Barnett *et al.*, 1990). Por razones prácticas, entre paréntesis se expone el nombre de la especie a la que pertenecen de acuerdo con Íñigo y Arroyo (1964 a) y Suárez e Íñigo (1990): *S. beticus*, *S. cheresiensis*, *S. montuliensis* y *S. rouxii*.

TABLA 3: Cepas utilizadas.

CEPAS	ESPECIES ^a	ORIGEN
<u>Vínicas:</u>		
B1 a B16	<i>Sacch. cerevisiae</i> (<i>Beticus</i>)	Este estudio
CH6 a CH15	<i>Sacch. cerevisiae</i> (<i>Cheresiensis</i>)	Este estudio
M9 a M17	<i>Sacch. cerevisiae</i> (<i>Montuliensis</i>)	Este estudio
R6 a R13	<i>Zygosacch. rouxii</i> (<i>Rouxii</i>)	Este estudio
Pie de cuba	<i>Sacch. cerevisiae</i>	Domecq S.A.
47G	<i>Sacch. cerevisiae</i>	T.G Villa (U. Santiago)
<u>Laboratorio:</u>		
1101	<i>Sacch. cerevisiae</i>	R. Esteban (U.Salamca)
1384	<i>Sacch. cerevisiae</i>	R. Esteban (U.Salamca)
ATCC 28097	<i>Sacch. cerevisiae</i> (<i>Uvarum</i>)	ATCC ^b
ATCC 28098	<i>Sacch. cerevisiae</i> (<i>Uvarum</i>)	ATCC
ATCC 28099	<i>Sacch. cerevisiae</i> (<i>Uvarum</i>)	ATCC
ATCC 28100	<i>Sacch. cerevisiae</i> (<i>Uvarum</i>)	ATCC
ATCC 28104	<i>Sacch. cerevisiae</i> (<i>Uvarum</i>)	ATCC
A3Y3A	<i>Sacch. cerevisiae</i>	F. Prado (U. Sevilla)
FX315-5B	<i>Sacch. cerevisiae</i>	F. Prado (U. Sevilla)
DS81	<i>Sacch. cerevisiae</i>	A. Carballo (U. Sevilla)
YNN295	<i>Sacch. cerevisiae</i>	Biorad® (USA)

^a Según Barnett *et al.*, (1990). Entre parentesis, la clasificación según Íñigo y Arroyo (1964).

^b ATCC: American Type Culture Collection.

En la Tabla 4 se describen los genotipos conocidos de las cepas de laboratorio usadas como controles en los distintos experimentos. En la nomenclatura se siguen las recomendaciones elaboradas en el "IV International Conference on Yeasts Genetics" que se recogen en el Yeast Genetics Supplement (Microbial Genetics Bulletin 31, 1969). Los genes se designan mediante tres letras que hacen referencia a la actividad metabólica que determinan, y un número. Las mutaciones y los alelos se indican mediante el símbolo del gen afectado y otro número separado del primero mediante un guión. Los alelos cuyos fenotipos sean dominante se escriben con mayúsculas; los recesivos, con minúscula.

-HIS, , TRP, LYS, LEU, ADE y URA designan genes de las rutas biosintéticas de los aminoácidos y bases a los que corresponden cada abreviatura. Las mutaciones de estos genes producen auxotrofia para ese aminoácido o base.

-MAL, GAL y SUC son genes implicados en la fermentación de maltosa, galactosa y sacarosa respectivamente.

-CUP1 es el gen que codifica para una metalotioneína que acompleja cobre. La amplificación de este gen determina resistencia a cobre.

-BIO, THI, INO y PAN son genes implicados en las rutas biosintéticas de las vitaminas a las que corresponde cada abreviatura. Las mutaciones en estos genes producen auxotrofia para esa vitamina.

-a y α son alelos del gen MAT que determina sexo.

-RAD hace referencia a genes implicados en reparación de daños producidos por radiaciones.

-HO es el gen determinante del homotalismo.

- Δ indica que la mutación del alelo correspondiente es una delección. Delecciones

diferentes de un mismo gen se diferencian por la numeración tras la delta mayúscula.

Los fenotipos se designan con la letra mayúscula inicial:

-Kil-K1 o Kil-K2 se refieren a la producción de la toxina killer K1 o K2 respectivamente.

Tabla 4: Genotipos conocidos de las cepas utilizadas como controles en los diferentes experimentos.

CEPAS	GENOTIPO
47G	<i>MATα/MATα HO/HO</i>
1101	<i>MATα his4 kar1-1 Kil-K1</i>
1384	<i>MATα his4 Kil-K2</i>
ATCC28097	<i>MATα bio ade thia</i>
ATCC28098	<i>MATα bio ino</i>
ATCC28099	<i>MATα/MATα bio/bio</i>
ATCC28100	<i>MATα/MATα bio/bio inolino</i>
ATCC28104	<i>MATα/MATα/MATα/MATα bio/bio/bio/bio pan/pan/pan/pan met/met/met/met</i>
A3Y3A	<i>MATα leu2-K::URA3-ADE2::leu2-K ura3 ade2 his3Δ200</i>
FX315-5B	<i>MATα ura3-52 trp1 leuΔ68 his3Δ200 rad52-1</i>
DS81	<i>MATα ura3 lys2 ade1 ade2 his trp1Δ1</i>
YNN295	<i>MATα ura3 lys2 ade1 ade2 his trp1Δ1</i>

2.3. PRODUCTOS QUÍMICOS.

En la Tabla 5 se relacionan los productos químicos más relevantes en esta tesis, su abreviatura y su procedencia.

Tabla 5: Productos químicos más relevantes utilizados en esta tesis y procedencia de los mismos.

PRODUCTO	PROCEDENCIA
Azúcares	Merck
Vitaminas	Sigma
Ergosterol	Sigma
Ácido oleico	Sigma
Aminoácidos	Merck
Ácidos orgánicos	Merck
Polifenoles	Fluka
Acetaldehido	Merck
Glicerina	Merck
Ácido butírico	Merck
4-metil-pentanol-2	Merck
EDTA (Etilendiaminotetraacetato)	Sigma
SDS (Dodecil sulfato sódico)	Sigma
Proteinasa K	Merck
Zimoliasa 20000	Seikagako

E. Merck AG, Darmstadt, Alemania (Merck); Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA (Sigma); Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza (Fluka); Seikagako Kogyo Co., LTD. Tokyo, Japón (Seikagako).

2.4. TAMPONES Y SOLUCIONES.

2.4.1. TAMPONES PARA LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL CARIOTIPO ELECTROFORÉTICO.

2.4.1.1. Tampón CPE:

Contiene ácido cítrico pH 6, 40 mM; fosfato sódico pH 6, 120mM y EDTA pH 8, 20 mM.

2.4.1.2. Tampón CPES:

Se prepara a partir del tampón CPE añadiendo D-sorbitol 1.2M. Antes de su uso se añaden 0.2 mg/mL de Zimoliasa 20000.

2.4.1.3. Tampón TESP:

Contiene Tris 10 mM pH8; EDTA 450 mM pH8 y SDS 1%.

2.4.2. SOLUCIONES PARA LA EXTRACCIÓN DEL ADN_{mt}

2.4.2.1. Solución I:

Contiene D-sorbitol 1 M y EDTA 100 mM pH 7.5.

2.4.2.2. Solución II:

Contiene Tris 50 mM y EDTA 20 mM pH 7.5.

2.4.3. TAMPONES GENERALES PARA EL MANEJO DE ADN.

2.4.3.1. Tampón T.E.:

Contiene Tris 10 mM y EDTA 1 mM pH 8.

2.4.3.2. Tampón TBE:

Contiene Tris 45 mM; ácido bórico 45 mM y EDTA 1 mM pH 8.

2.4.3.3. Tampón TAE:

Contiene Tris 40 mM; ácido acético 40 mM y EDTA 1 mM pH 8.

2.4.4. TAMPONES Y SOLUCIONES PARA LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA LA OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO.

2.4.4.1. Solución fijadora:

Contiene 4 % de glutaraldehído en tampón acetato sódico 0.1 M pH 6.1.

2.4.4.2. Solución post-fijadora:

Se genera mezclando volúmenes iguales del tampón acetato sódico 0.1 M pH 6.1 y de una solución de tetróxido de osmio al 4 % en agua destilada. A esta solución se le añade ferrocianuro potásico al 0.8 %.

2.4.5. TAMPÓN FOSFATO-CITRATO PARA EL MEDIO YPD_{pH}.

Se prepara disolviendo 14.07 g de ácido cítrico y 18.96 g de K₂HPO₄ en 67 mL de agua destilada y ajustando el pH final a 4.5 con ácido cítrico o K₂HPO₄ sólidos.

2.4.6. SOLUCIONES INDICADORAS.

2.4.6.1. Reactivo de Luff:

Se prepara una solución de ácido cítrico al 12.5 % y carbonato sódico al 36 % y otra de sulfato de cobre (II) pentahidrato al 25 %. Dicho reactivo se genera mezclando estas soluciones en proporción 4:1.

2.4.6.2. Metilindol:

Solución de metilindol al 0.5 % en etanol.

2.4.6.3. Naranja de metilo.

0.1 % de Naranja de metilo en agua.

2.4.6.4. Púrpura de bromocresol:

0.4 % de púrpura de bromocresol en etanol.

2.4.6.5. Azul de metileno:

Azul de metileno al 0.01 % en tampón acetato sódico 0.25 M pH 6.

2.5. MEDIOS DE CULTIVO PARA LEVADURAS.

2.5.1. MEDIOS MÍNIMOS

2.5.1.1. Medio mínimo (SD):

Contiene base nitrogenada sin aminoácidos y con sulfato amónico (Difco), 0.67%; glucosa, 2 % y agar (Adsa-Micro, Barcelona), 2%.

2.5.1.2. Medio mínimos con distintas fuentes de carbono:

En las pruebas de asimilación de las distintas fuentes de carbono, el medio mínimo se prepara con base nitrogenada con aminoácidos y sulfato amónico (Difco), 0.67 % y agar, 2% (YNB). Al medio YNB se le añade los siguientes azúcares al 2%: glucosa (YNBD), rafinosa (YNBR), lactosa (YNBL), maltosa (YNBM), galactosa (YNBG) y sacarosa (YNBS).

Para la prueba de asimilación de la prolina como única fuente de carbono se utiliza un medio que contiene base nitrogenada sin aminoácidos y con sulfato amónico, 0.67%; agar, 2% y prolina 0.8% (SP).

2.5.1.3. Medio mínimo con distintas fuentes de nitrógeno:

Contiene base carbonatada (Difco), 1.17% y agar, 2% (YCB). Al medio YCB se le añade sulfato amónico 0.5% (YCBA), nitrato potásico 0.5% (YCBN) o prolina 0.6% (YCBP).

2.5.1.4. Medio mínimo estricto (MM y MME15):

Constituido por:

- a) Glucosa 1%.
- b) Sulfato amónico 0.35%.
- c) Sales: KH_2PO_4 , 1 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L; NaCl, 0.5 g/L y $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.5g/L.
- d) Trazas: H_3BO_3 , 500 $\mu\text{g/L}$; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 400 $\mu\text{g/L}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 400 $\mu\text{g/L}$; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 200 $\mu\text{g/L}$; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 200 $\mu\text{g/L}$; KI, 100 $\mu\text{g/L}$ y $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,

40 $\mu\text{g/L}$.

Para determinar las vitaminas esenciales para la formación de velo a este medio (MM) se le añade etanol al 15% v/v (MME15).

Soluciones de vitaminas:

Las vitaminas se añaden al medio en las siguientes concentraciones: piridoxina, 400 $\mu\text{g/L}$; *myo*-Inositol, 10 mg/L; pantotenato cálcico, 2 mg/L; tiamina, 400 $\mu\text{g/L}$ y biotina, 20 $\mu\text{g/L}$ (Campbell and Duffus, 1988).

Para la determinación de auxotroffias vitamínicas, el medio MM se suplementa con todas las vitaminas menos una y se solidifica con 2% de agar. Para la determinación de las vitaminas esenciales para la formación de velo las vitaminas se añaden al medio MME15 por separado o en combinación de todas excepto una.

2.5.2. MEDIOS COMPLETOS

2.5.2.1. Medios completos: YPD, YPG, YPDE, YPD_{pH} e YPDG.

Constituido por extracto de levadura (Adsa-Micro), 1%; peptona (Adsa-Micro), 2% y glucosa, 2% (YPD). El medio YPG contiene glicerol 3% en lugar de glucosa como fuente de carbono. En algunos casos al medio YPD se le añade etanol (Merck) 5% (YPDE5), 10% (YPDE10) o 15% (YPDE15).

El medio YPD_{pH} se prepara añadiéndole al medio YPD, tampón fosfato-citrato pH 4.5, 11.17% (Sherman *et al.*, 1986).

El medio completo YPDG contiene extracto de levadura, 1%; peptona, 2%; glicerol, 3%; y glucosa, 0.1%.

Todos estos medios se solidifican, en su caso, añadiendo agar, 2%.

2.5.2.2. Medio líquido fermentativo.

Contiene extracto de levadura, 0.5%; solución de púrpura de bromocresol, 0.8% (v/v). y uno de los siguientes azúcares al 2%: glucosa (YED), lactosa (YEL), galactosa (YEG), maltosa (YEM), sacarosa (YES). Cuando el azúcar es la rafinosa se le añade al 4% (YER). Este medio se reparte en tubos de ensayo que tienen en su interior una campana Durham.

2.5.3. MEDIO CON ARBUTINA.

Para la prueba de la escisión de la arbutina se prepara un medio que contiene extracto de levadura, 0.1%; arbutina, 0.5%; agar, 2% y una solución de cloruro férrico (1%), 2% (v/v) (ARB).

2.5.4. MEDIOS DE PREESPORULACIÓN.

2.5.4.1. Medio de preesporulación 1 (PRE1).

Contiene extracto de levadura, 1%; nutrient broth (Difco), 3%; glucosa, 5% y agar, 2%.

2.5.4.2. Medio líquido de preesporulación 5 (PRE5).

Contiene extracto de levadura, 0.8%; peptona, 0.3% y glucosa, 10% (Codón *et al.*, 1995).

2.5.5. MEDIOS DE ESPORULACIÓN.

2.5.5.1. Medio de esporulación 1 (SPO1).

Contiene extracto de levadura, 0.25%; glucosa, 0.1%; acetato potásico, 0.98% y agar 2%.

2.5.5.2. Medio líquido de esporulación 2 (SPO2).

Constituido por acetato potásico 0.5% (Codón *et al.*, 1995).

2.5.6. MEDIOS INDUSTRIALES.

2.5.6.1. Mosto sin fermentar.

El mosto sin fermentar se esteriliza en el autoclave a 100°C a vapor abierto durante 1 h. El contenido en azúcares, grado Baumé, concentración de sulfuroso, así como otras características se especificarán en cada experimento.

2.5.6.2. Vino (S/T o S).

El vino joven, con menos de un año de crianza, se denominará sobretablas (S/T). El vino con una vejez mínima de 4 años, procedente de la solera de los solerajes industriales de crianza biológica, se denominará solera (S). Ambos tipos de vino poseen un grado alcohólico aproximado a 15% (v/v) y otras características que se especificarán en cada experimento. Se esteriliza por filtración.

2.6. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.

Las restrictasas utilizadas en los análisis de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial (ADNmt), AluI, HinfI y RsaI, fueron suministradas por Boehringer Mannheim (Alemania).

3 . MÉTODOS

3.1. CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE LEVADURAS.

3.1.1. TOMA DE MUESTRAS.

Se introdujo un asa de cromo estéril en la bota hasta ponerla en contacto con el velo de flor y se tocó en varios puntos de éste. A continuación, se introdujo en un matraz con agua de peptona (1 g/L) donde se recogió la flor de todas las botas muestreadas de una misma escala o añada.

De los sistemas de añadas estudiados se muestrearon todas las botas existentes, y de los solerajes un 10% de éstas (Tabla 2) de forma intercalada para que así fuera lo más significativo posible.

Los matraces se llevaron al laboratorio donde se procedió al aislamiento de las distintas cepas de levaduras.

3.1.2. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE LOS CULTIVOS PUROS.

Las muestras se sembraron en YPD siguiendo la técnica de diluciones sucesivas y se incubaron durante 4-5 días a 28°C.

Se realizaron 20 aislamientos por añada o escala del soleraje, atendiendo a características morfológicas. Cada aislamiento se sometió a dos zig-zag de purificación en el mismo medio de cultivo.

3.1.3. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA.

La identificación taxonómica se realizó según Barnett *et al.*, 1990. Por razones prácticas (industriales) se nombran de acuerdo con Íñigo (Íñigo y Arroyo, 1964 a; Suárez e Íñigo, 1990). Las pruebas llevadas a cabo tuvieron en cuenta caracteres morfológicos y fisiológicos.

3.1.3.1. Características morfológicas:

Se realizó un examen macroscópico (forma, tamaño y aspecto de la colonia) y microscópico de la morfología de las células crecidas en YPD (apiculada, esférica, ovoide etc.), tipo de reproducción vegetativa (gemación, bipartición), agrupaciones celulares (pareja gemante, grupo multigemante, pseudomicelio).

3.1.3.2. Fermentación de azúcares:

A partir de un cultivo joven (48h) crecido en YPD se inocula una colonia en los medios YED, YEL, YEG, YEM, YES e YER, y se incuba a 28°C durante al menos 15 días. Si la prueba es positiva, el gas resultante de la fermentación se recoge en la campana Durham y el indicador de pH que contiene el medio (púrpura de bromocresol) vira de morado a amarillo al haberse acidificado el medio (Lodder, 1970).

En el caso de la rafinosa, azúcar compuesto por tres hexosas (fructosa, glucosa y galactosa), la fermentación puede ser 1/3 si queda melibiosa o sacarosa en el medio, 2/3 si queda galactosa o completa si no hay restos de azúcares. Para su comprobación se determina la presencia de azúcares reductores, glucosa y/o fructosa (Lodder, 1970).

3.1.3.3. Asimilación de azúcares:

Cultivos jóvenes (48h) de las cepas crecidas en YPD se transfieren ("replica en terciopelo") a los medios YNBD, YNBR, YNBL, YNBM, YNBS e YNB (control negativo), se incuban a 28°C durante al menos 15 días y por comparación con el control se observa si se produce crecimiento.

3.1.3.4. Asimilación de nitratos:

Las células de levaduras se siembran en YCB (control negativo), YCBA

(control positivo) y en YCBN, se incuban a 28°C durante 15 días y comparando con los controles, se observa si se produce o no crecimiento .

3.1.3.5. Escisión de la arbutina:

Esta prueba se realiza para confirmar la producción del enzima β -Glucosidasa. Para ello, las células de levaduras se siembran en el medio ARB que contiene arbutina y cloruro de hierro y se incuban a 28° C durante 15 días. Si la prueba es positiva, la sal férrica soluble reacciona con la quinona libre, procedente de la hidrólisis de la arbutina (hidroquinona- β -D-Glucopiranosido), dando lugar a la aparición de un color oscuro si actúa el enzima, o quedando con su coloración original si no es así (Lodder, 1970).

3.2. CONDICIONES DE CULTIVOS: CRECIMIENTO.

3.2.1. CULTIVOS SUMERGIDOS.

Las células se inocularon en tubos de 20 mL que contenían 10 mL de medio hasta alcanzar una D.O. inicial a 660 nm de 0.05 y se incubaron a 30°C (con o sin agitación, según el caso).

El crecimiento se siguió midiendo periódicamente la D.O. del cultivo a 660 nm en un espectrofotómetro Lambda 2 (Perkin-Elmer) hasta alcanzar la fase estacionaria tardía.

La tasa máxima de crecimiento (μ) se determinó a partir del tiempo medio de duplicación (tiempo de generación, τ) durante el aumento exponencial de la turbidez, de acuerdo con la expresión:

$$\mu = \frac{\ln 2}{\tau}$$

3.3.2. CULTIVO BAJO VELO DE FLOR.

En los experimentos de formación de velo, tubos de 20 mL con 10 mL de medio se inocularon con células crecidas en YPD, hasta alcanzar una D.O. inicial a 660 nm de 0.1 y se incubaron a 25°C sin agitación. En otros casos, el inóculo se realizó con el asa llena de células en fase de velo ("injerción de velo") que se deposita cuidadosamente sobre la superficie del medio en cuestión. El crecimiento se determinó contando el tiempo requerido en días para la formación en la superficie del medio de una película completa y ténue. La secuencia del desarrollo del velo se expresó de la siguiente manera: islotes (I), parcial-ténue (PT), completo-ténue (CT) y completo-plegado (F).

En el caso de que el medio a inocular fuese mínimo o se probara la influencia de la adición de algún compuesto en la formación de velo, las células se centrifugaron y se lavaron dos veces con agua destilada estéril antes de inocular el medio.

3.3. MÉTODOS GENÉTICOS.

3.3.1. ESPORULACIÓN.

3.3.1.1. Método 1:

Se transfirió, con un palillo estéril, biomasa de las cepas en fase estacionaria crecidas en YPD a una caja de medio de preesporulación 1 (PRE1) y se incubó durante 2 días a 22°C. Estas cajas se replicaron ("réplica en terciopelo") al medio de esporulación 1 (SPO1) y se incubó a 22°C durante al menos 5 días.

3.3.1.2. Método 2:

Tubos de ensayo que contenían 10 mL de medio de preesporulación 5 (PRE5)

se inocularon con un cultivo en fase estacionaria crecido en YPD hasta alcanzar una D.O. a 660 nm inicial de 0.05 y se incubaron a 22°C con agitación hasta la fase media exponencial (aproximadamente 10^7 células/mL). Las células se centrifugaron, se lavaron dos veces con agua destilada, se inocularon en el medio de esporulación 2 (SPO2) y se incubaron a 22°C con agitación durante al menos 5 días (Codón *et al.*, 1995).

3.3.2. CARIOTIPO ELECTROFORÉTICO

3.3.2.1. Preparación de las muestras:

Se inocularon 10 mL de YPD con 0.1 mL de un preinóculo realizado previamente en el mismo medio de cultivo y se incubaron a 30°C con agitación, durante 48 h hasta fase estacionaria. Estos cultivos se centrifugaron a 6.000 rpm durante 5 min, desechándose el sobrenadante. El precipitado se lavó con 5 mL de EDTA 50 mM pH 8 y se centrifugó nuevamente. El sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en 0.6 mL de tampón CPES con 0.1 mg de Zimoliasa 20.000. La suspensión se mezcló inmediatamente con 1 mL de una solución de tampón CPE con 0.1% de agarosa de bajo punto de fusión (mantenida líquida a 50°C). Esta mezcla se vertió en los moldes, obteniéndose tras la gelificación bloques de 1 x 2 x 0.1 cm. Los bloques se colocaron en cajas de Petri estériles, se cubrieron con 5 ml de CPE y se incubaron durante 4 h a 30°C. Transcurrido este tiempo se eliminó el tampón y se añadió 5 mL de TESP adicionado con 1 mg/mL de proteinasa K. Las muestras se incubaron a 50°C durante 12 h, eliminándose posteriormente el tampón. Los bloques de agarosa se lavaron tres veces a 50°C y seis veces a temperatura ambiente con 10 mL de tampón TE. Finalmente los bloques se cubrieron con 10 mL de EDTA 50 mM pH 8 y se conservaron a 4°C hasta su uso.

3.3.2.2. Preparación del gen y teñido:

El gel empleado se preparó a partir de tampón TBE (0.5x) con un 0.9% de

agarosa y se vertió en el molde. Las muestras se introdujeron en los pocillos del gel, que posteriormente fueron sellados con tampón TBE (0.5x) con un 0.9% de agarosa.

Una vez terminada la separación el gel se tiñó durante 20 ó 30 min con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de agua destilada) y después se lavó con agua destilada entre 12 y 20 h. Los geles se fotografiaron con una cámara Polaroid MP4 con película de tipo 667, un filtro Kodak Wratten 22A y una iluminación inferior de luz ultravioleta de 300 nm procedente de un transiluminador Fotodyne 3-3002 (New Berlin, WI, USA).

3.3.2.3. Equipo utilizado:

Se utilizó un sistema CHEF-DRII de Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA). Éste constaba de un módulo de control, una fuente de electroforesis, un programador de pulsos, una cubeta de electroforesis y un circuito de refrigeración que mantuvo el tampón (TBE (0.5x)) a una temperatura constante de 14°C durante la separación.

3.3.2.4. Parámetros utilizados en la separación:

La separación de cromosomas se realizó a 200 voltios durante 23 h; en las 15 primeras horas el campo eléctrico pulsó cada 60 segundos y durante las siguientes 8 h cada 90 segundos.

3.3.3. POLIMORFISMO DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DEL ADN MITOCONDRIAL:

3.3.3.1. Extracción de ADN:

Con 0.1 mL de un preinóculo crecido en YPD, se inocularon 10 mL de YPD y se incubaron a 30°C durante 24 h con agitación. El cultivo se centrifugó 5 min a 6.000 rpm, desechándose el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 1 mL de

solución I y posteriormente se añadieron 100 μ L de una solución de Zimoliasa 20.000 a una concentración de 2 mg/ml en sorbitol 1M. Se incubó durante 1 h a 30°C. Los protoplastos se recogieron por centrifugación a 13.000 rpm durante 1 min, resuspendiéndose en 1 mL de solución II y se añadió inmediatamente 100 μ L de una solución de SDS al 10% , incubándose durante 45 min a 68°C. Posteriormente se le añadió 400 μ L de acetato potásico 5M y se incubó en hielo durante 30 min. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 13.000 rpm (2 veces) durante 5 min y se pasó el sobrenadante a un eppendorf estéril, al que se le añade 1 mL de alcohol isopropílico, dejándose a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min, desechándose el sobrenadante. El precipitado se lavó 2 veces con 0.5 mL de alcohol etílico al 70% (previamente enfriado a -20°C), se secó al vacío durante 10 min para eliminar todo el resto de alcohol y se resuspendió en 30 μ L de tampón TE pH 8.

3.3.3.2. Restricción de ADN mitocondrial:

10 μ L de la solución de ADN del apartado anterior se cortaron previa incubación durante 12 h con las enzimas de restricción (AluI, RsaI y HinfI). El ADN se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% y se fotografió como en el apartado anterior (3.3.2.3) tras ser teñido en una solución con bromuro de etidio (0.5 μ L/mL de agua destilada) durante 10-15 min.

3.3.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO RELATIVO DE ADN POR CÉLULA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.

Se inocularon 10 mL de YPD con las cepas a estudiar y se incubó a 30°C con agitación hasta la fase estacionaria. El cultivo diluido 100 veces, se centrifugó a 13.000 rpm durante 3 min. El precipitado se resuspendió en 1 mL de etanol absoluto (previamente enfriado a -20°C) y se incubó a -20°C durante 30 min, tras los cuales se centrifugó nuevamente, y se lavó el precipitado con 1 mL de citrato sódico 50 mM. Posteriormente se resuspendió en 0.5 mL del mismo tampón conteniendo 50

μg de RNasa (para eliminar el ARN que puede interferir con la medición del contenido de ADN por la formación de regiones bicatenarias) y se incubó a 37°C durante 2 h. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 0.5 mL del mismo tampón conteniendo 2 μg del colorante (yoduro de propidio). La tinción con el colorante se llevó a cabo durante 30 min a temperatura ambiente, tras lo cual las células pueden ser almacenadas a 4°C hasta su uso.

Inmediatamente antes de la medición, las células se sonicaron para evitar los agregados celulares. La determinación del contenido de ADN por célula se realizó en un citómetro de flujo FACScan (Becton & Dickinson, Mountain View, California). La longitud de onda del laser para la excitación fue de 488 nm. La longitud de onda de excitación máxima del yoduro de propidio (unido al ADN) es 639 nm, longitud a la que se midió la intensidad de fluorescencia.

Los datos fueron procesados y almacenados en un ordenador Hewlett Packard empleando el programa de Becton & Dickison Lysis[®]II (versión 1.0.2).

3.4. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS.

3.4.1. CÉLULAS TOTALES:

La concentración de células totales se estimó mediante conteo al microscopio óptico con una cámara Neubauer.

3.4.2. CÉLULAS VIABLES:

Se define como célula viable aquella capaz de formar colonias en medio sólido. El número de células viables de un cultivo se determinó sembrando una muestra del mismo en cajas que contenían medio YPD sólido. Se realizaron las diluciones adecuadas para obtener entre 100 y 200 colonias por caja. Trás incubar durante 3-4 días a 30°C , se contó el número de colonias aparecidas. Para cada

determinación se sembraron 4-5 cajas de Petri y se calculó el valor medio.

3.4.3. VIABILIDAD CELULAR DEL VELO DE FLOR:

La viabilidad celular del velo de flor se determinó mediante tinción con azul de metileno (Arnold, 1972).

3.4.4. FRECUENCIA DE FORMACIÓN DE "PETITES":

El porcentaje de células "petites" que contenía un cultivo se determinó sembrando una muestra del mismo en cajas que contenían YPDG (4-5 cajas por determinación), donde las colonias "petites" crecen poco y se diferencian de las "grandes" por el tamaño. Estas se incubaron a 30°C y al cabo de 4-5 días se realizó el conteo.

3.5. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA.

3.5.1. AUXOTROFÍAS VITAMÍNICAS Y VITAMINAS ESENCIALES PARA LA FORMACIÓN DE VELO.

Las cepas en estudio y los controles de laboratorio (ATCC28097, ATCC28098, ATCC28099, ATCC28100 y ATCC28104) se inocularon en 10 mL de medio MM a partir de una colonia crecida en YPD y se incubaron a 30°C. A las 24h, 0.1 mL de estos cultivos se volvieron a inocular en MM para así agotar las reservas vitamínicas. Transcurridas otras 24h, estos cultivos se sembraron en los medios MM sólido y MME15 (previa concentración de los preinóculos), suplementados con todas las vitaminas menos una, verificándose posteriormente la aparición de colonias o la formación de velo, respectivamente.

3.5.2. AUXOTROFÍAS PARA AMINOÁCIDOS.

Para la determinación de auxotrofías para aminoácidos, las cepas en cuestión y los controles de laboratorio (A3Y3A y FX315-5B) se sembraron en el medio mínimo SD y se incubaron a 30°C durante 24 h para agotar las reservas celulares. Pasado este tiempo se transfirieron de nuevo a SD por "réplica en terciopelo" y se incubó a 30°C durante 4-5 días, verificandose si había o no crecimiento.

3.5.3. UTILIZACIÓN DE LA PROLINA.

Para determinar la utilización de la prolina como única fuente de carbono o de nitrógeno, las células se sembraron en los medios SP e YCBP, respectivamente. Los medios SD e YCB se usaron como controles negativos negativos. Se incubó a 30°C durante 4-5 días, tras los cuales se verificó la aparición de colonias.

3.5.4. PRODUCCIÓN, SENSIBILIDAD Y/O RESISTENCIA AL FACTOR KILLER.

Para determinar resistencia/sensibilidad a las toxinas K1 y K2, se sembró en el medio YPD_{pH} un cespel de las cepas en cuestión y del control sensible (47G) sobre el cual se depositó un precipitado de las cepas productoras de las toxinas K1 (1101) y K2 (1384). Para determinar la producción de las toxinas, sobre un cespel de la cepa 47G se depositó un precipitado de las cepas de levaduras de flor. Las cajas se incubaron a 30°C durante 4-5 días y se verificó la aparición o no de un halo de inhibición del crecimiento.

3.6. FORMACIÓN DE VELO DE FLOR.

3.6.1. EFECTO DEL PRECULTIVO EN LA FORMACIÓN DE VELO.

Las cepas a probar se precultivaron en YPD, YPDE(5%), YPDE(10%), YPG

y en fase de velo en vino con un contenido en etanol de 15.5% (v/v). Estos cultivos se inocularon en sobretabla (etanol 15.5% v/v) hasta alcanzar una D.O. inicial a 660nm de 0.1. Cuando el preinóculo era velo, el sobretabla se injertó con un asa que contenía igual n° de células, depositándose en la superficie del medio. Se incubó a 25°C y la formación de velo se determinó contando los días necesarios para ver la superficie cubierta por un velo completo y ténue.

3.6.2. HIDROFOBICIDAD DE LA SUPERFICIE CELULAR.

Las células de la cepa B16 cultivadas en YPD hasta fase estacionaria se inocularon en tubos de ensayo que contenían 10 mL de mosto (ázucres totales, 185 g/L; sulfuroso, 60 mg/L; acidez total, 3.6 g/L expresado como ácido tartárico y pH 3.2) o en sobretablas (etanol, 15.5 %v/v). Tanto al mosto como al vino se le adicionó ergosterol, 5 mg/L; ácido oleíco, 5 mg/L o ambos. Estos cultivos se incubaron a 25°C sin agitación.

Se tomaron muestras de los diferentes medios (con o sin las adiciones): cuando las células alcanzaron la fase estacionaria en YPD, durante la fermentación del mosto, una vez terminada la fermentación del mosto y en fase de velo de flor en mosto y en vino.

Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con agua destilada y se resuspendieron en tampón fosfato potásico 0.5 M, pH 3.5 hasta alcanzar una D.O. a 660nm de 0.5. Se mezclaron 2 mL de esta suspensión con 2 mL de tolueno y se agitó en el vortex suavemente durante 2 min. La fase acuosa se recogió con una pipeta Pasteur y se le determinó la D.O. a 660nm final. El grado de hidrofobicidad de la superficie celular, abreviado como H.D%, se calculó a partir de la ecuación $H.D\% = 100(1 - R/I)$, donde R e I son la D.O residual e inicial de la solución tampón respectivamente (Iimura *et al.*, 1980a).

3.6.3. TRATAMIENTO CON PROTEINASA K.

El velo de flor formado en un S/T (15.5% v/v de etanol) se injertó (aproximadamente 10^6 células/mL) en 5 tubos de ensayo que contenían 5 mL de tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7.5 con 1 mg/mL de proteinasa K o en 5 tubos con 5 mL del tampón sin la proteasa (control). Los tubos se incubaron a 30°C con agitación y periódicamente se determinó la D.O a 660 nm. Antes de la toma de muestra para la lectura de la D.O, los tubos se mantuvieron durante un minuto sin agitación para dejar sedimentar a los agregados celulares.

3.6.4. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD (FLOTABILIDAD) CELULAR DEL VELO.

Para determinar la densidad celular se siguieron tres procedimientos diferentes:

1) Con una espátula de red (utensilio utilizado en la bodega para recoger velo de flor de botas e injertarlo en otras que lo han perdido) se recogió aproximadamente 100 mL de velo de flor y se introdujo en un recipiente con cierre hermético y de 250 mL de capacidad. El volumen restante se ocupó con vino que se introdujo suavemente hasta que el matraz quedó completamente lleno sin aire alguno. El recipiente se sometió a ultrasonido (40 Hz) durante 2 h en un baño de ultrasonidos "Ultrasons 3000514" (Selecta, Barcelona) para desorganizar el velo. Trás este tiempo se observaron al microscopio óptico las células que cayeron al fondo y las que quedaron en la superficie.

2) Se tomaron muestras de velo en buen estado (blanco, completo y plegado) de tres botas en la bodega. Tras agitar suavemente, se determinó la viabilidad por tinción con azul de metileno de las células que habían caído al fondo y de las que se habían quedado formando velo en la superficie (flotando). Posteriormente, se agitó energicamente para homogenizar la muestra y se le halló viabilidad global.

3) Un velo formado en la superficie de un vino contenido en un quitasato se agitó suavemente, de manera que al fondo cayeron trozos de velo. A otro, se le sometió a ultrasonido y se agitó energicamente para disgregar totalmente a las células que formaban el velo. Posteriormente, estos dos quitasatos se sometieron a vacío con una bomba de agua.

3.6.5. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Las células de la cepa B16 se recogieron de mosto en fase fermentativa y de vino en fase de velo y se fijaron con la solución fijadora de glutaraldehído según el procedimiento de Byers y Goetsch (1991).

Para la observación al microscopio electrónico de barrido, las muestras se deshidrataron en un gradiente de acetona (50, 70, 90 y 100%), se sombrearon al vacío con carbón evaporado y finalmente se observaron en un microscopio Philips L20.

Para la observación al microscopio electrónico de transmisión se llevó a cabo una post-fijación de las muestras con tetróxido de osmio y ferrocianuro potásico y posterior inclusión en resina. Los bloques obtenidos se cortaron y tiñeron con citrato de plomo según el procedimiento de Byers y Goetsch (1991). Las muestras se observaron en un microscopio Philips CM10.

3.6.6. LIOFILIZACIÓN.

Las cepas B2, B16 y CH15 se cultivaron en mosto y en vino. Las células se recogieron durante la fase fermentativa en mosto y durante la fase de velo en vino. Éstas se mantuvieron sin lavar o se lavaron dos veces con agua destilada y se resuspendieron en agua destilada o en una solución de leche en polvo al 10%, o de glucosa al 7.5% o de *myo*-Inositol al 5% en agua.

Las muestras que contenían 10^8 células viables/mL se liofilizaron durante 20 h, a -50°C , entre 20 y 50 millitor de presión de vacío en un Flexy-Dry (FTS Systems, inc).

Después de la liofilización las muestras se resuspendieron en un volumen igual al inicial y se determinó la viabilidad celular que presentaban estas suspensiones.

3.6.7. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO EN LA FORMACIÓN DE VELO A DISTINTO GRADO ALCOHÓLICO.

Se suplementó con 2, 5, 10, 15 ó 20 g/L de glucosa a mosto fermentado (etanol, 10.6% v/v; acidez total, 4.6 g/L expresada como ácido tartárico; acidez volátil, 0.22 g/l expresada como ácido acético; sulfuroso, 93 mg/L y pH 3.3) y a éste mismo encabezado a una graduación alcohólica de 14.8% (v/v).

Se inocularon tubos de 20 mL que contenían 10 mL de los medios arriba descritos con las cepas B16, M10, M17, CH15 y R13 crecidas en YPD hasta fase estacionaria y lavadas dos veces con agua destilada, hasta alcanzar una D.O. inicial a 660nm de 0.1. Se incubaron a 25°C sin agitación. Cuando en la superficie presentó un velo completo y ténue (CT), se anotó el número de días requerido para la formación de velo y se determinó la concentración de azúcares residuales.

3.7. CARACTERIZACIÓN METABÓLICA.

3.7.1. CRIANZA BIOLÓGICA CON CULTIVOS PUROS.

El velo ya formado de las cepas estudiadas (B2, B3, B16, M10, CH15 y R13) en tubos de ensayo con S/T (sobretablas), se injertó en matraces de 250 mL de capacidad con 150 mL de S/T. A partir del velo de estos cultivos se injertaron unos fermentadores de 5 L de capacidad con 4.5 L de S/T estéril (dos por cada cepa) y se mantuvieron a temperatura ambiente durante un año. Periódicamente se tomaron muestras (cada mes) para ver la evolución del grado alcohólico, glicerina, acidez

volátil y derivados, color, acetaldehído, acetoína y derivados, alcoholes superiores, ácidos orgánicos y aminoácidos. A la última muestra también se le determinó el contenido polifenólico.

3.7.2. CONSUMO DE GLICERINA A DISTINTO GRADO ALCOHÓLICO.

Se fermentó 6 L de mosto estéril por cada cepa a probar (B16 y M10). Al mosto fermentado resultante se le determinó el grado alcohólico y la glicerina final (aproximadamente 11.5% v/v y 7g/L, según la cepa). Éste se dividió en 4 partes, una se dejó de control y a las restantes se le subió el grado alcohólico con alcohol destilado de vino hasta una graduación de aproximadamente 13.5% y 15% (v/v). Matraces de 500 mL con 400 mL de mosto (3 por cada cepa y grado) se incubaron a 25°C. Cuando se formó el velo completo y ténue se cogió la primera toma de muestra, a los 7 días se procedió a la segunda toma de muestras, a los 10 días la tercera, a los 20 días la cuarta y a los 20 días la quinta toma de muestras. A estas muestras se le determinó el grado alcohólico y los niveles de glicerina.

3.7.3. ORIGEN DE LA ACETOÍNA EN LOS VINOS CON CRIANZA BIOLÓGICA.

A un S/T con 200 mg/L de acetaldehído y 38 mg/L de acetoína se le adicionó acetaldehído hasta alcanzar unos niveles de 700 mg/L. A 200 mL del S/T control (sin adición) y otros 200 mL del S/T con la adición de acetaldehído (por duplicado) se les sometió a prueba de remontado (se agitan oxigenándose y se tienen en la estufa a 40°C) durante 10 días, tras los cuales se les determinó el contenido final de acetaldehído y de acetoína.

3.7.4. FERMENTACIÓN DE MOSTOS Y BURBAS CON DISTINTA CONCENTRACIÓN DE SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN.

A un mosto de 1ª yema (°Bé, 10.3; sulfuroso, 87 mg/L; azúcares totales, 188

g/L; acidez total, 5.85 g/L y pH 3.26) se le dejó desfangar durante 5 h. Transcurrido este tiempo se tomó el sobrenadante al cual se le sometió a una doble filtración por placas SA590 de la casa PB (La Papelera del Besós, Barcelona). A los mostos así obtenidos (control, desfangado, y desfangado y filtrado) se les determinó la concentración de sólidos en suspensión (50 mL de mosto se centrifugan durante 15 min a 3.000 r.p.m. y el precipitado se dejó en el horno a 110°C hasta que el peso se hizo constante).

Se llevó a cabo una fermentación dirigida (mosto sin esterilizar), para simular lo mejor posible las condiciones industriales, de 600 mL de mosto (por triplicado) con la cepa de pie de cuba que se inoculó al 4% (v/v) a partir de un cultivo en plena fermentación en mosto. Durante la fermentación se determinó periódicamente la concentración de azúcares residuales y la acidez volátil. Una vez finalizada ésta, se determinó el grado alcohólico final, alcoholes superiores, acetaldehído, ácidos orgánicos y glicerina.

Paralelamente, se llevó a cabo una experiencia similar con burbas o fangos de mostos de 1ª yema, sin filtrar (°Bé, 12.2; sulfuroso, 247 mg/L y pH 3.17) y filtradas por diatomeas (°Bé, 10; sulfuroso, 207 mg/L y pH 3.18). Los sólidos en suspensión se determinaron de igual manera pero centrifugando durante 2h. La inoculación se realizó al 10% debido a la elevada concentración de sulfuroso que tenían éstos.

3.7.5. FERMENTACIÓN DE MOSTOS CON CULTIVOS PUROS.

Tubos de 50 mL conteniendo 30 mL de mosto estéril se inocularon a partir de una colonia de las cepas ensayadas (B2, B3, B5, B16, M9, M10, M17, CH15, R13 y el pie de cuba) crecida en YPD y se incubaron a 25°C durante 48h. Estos precultivos se inocularon en matraces que contenían 600 mL de mosto estéril (3 matraces por cada cepa). La fermentación se siguió tomando muestras periódicamente y determinando la concentración de azúcares totales y la acidez volátil. Finalizada la fermentación se determinó grado alcohólico, alcoholes superiores, acidez volátil y

derivados, y acetaldehído.

3.7.6. DETERMINACIONES ANALÍTICAS EN SOLERAJES INDUSTRIALES.

Para la toma de muestra del vino contenido en las distintas escalas de envejecimiento de los solerajes estudiados se tomaron 50 mL de vino del centro de cada bota. Las muestras de cada sistema correspondientes a una misma escala se mezclaron en tanques de 25 L. De esta mezcla se tomó el volumen necesario para cada determinación.

3.7.6.1. Consumo de alcohol y glicerina:

Se estudiaron siete solerajes ubicados en una bodega (A) y uno ubicado en otra bodega (B). El alcohol consumido en los sistemas industriales se cuantificó teniendo en cuenta el grado alcohólico que tenía el vino de cada escala de envejecimiento en las sacas realizadas en los últimos 3 años, el porcentaje de saca, el tiempo transcurrido entre un trasiego y otro, el volumen de etanol adicionado a las sacas para elevar el grado a 15.5% (v/v) y compensar la disminución sufrida, y el efecto de concentración a consecuencia de la merma.

3.7.6.2. Contenido en ácidos orgánicos, aminoácidos y polifenoles:

Se analizaron cinco solerajes de cuatro escalas cada uno de ellos. Los resultados se expresan como la media de los datos obtenidos en los cinco sistemas.

3.7.6.3. Contenido en acetaldehído:

El acetaldehído se determinó en todos los sistemas de añadas y en todas las escalas de los solerajes que se especifican en las Tablas 1 y 2.

3.8. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS.

3.8.1. GRADO ALCOHÓLICO.

El contenido de etanol se determinó por varios métodos, según la experiencia.

3.8.1.1. Destilación:

En mostos fermentados, el contenido alcohólico se determinó por destilación según ASE (American Society of Enologist, 1972).

3.8.1.2. Transflexión:

El contenido alcohólico de los vinos se determinó por la técnica de transflexión en el infrarrojo cercano con un Infraanalyzer™ 400 de la casa Technicon™ (Nueva York, USA).

3.8.1.3. Cromatografía de gases:

El grado alcohólico se determinó mediante cromatografía de gases en un cromatógrafo Perkin-Elmer modelo Sigma 3B, equipado con inyector para columnas empaquetadas y detector de ionización de llama. Se empleó una columna de separación de alcoholes de la casa Tecnokroma (Barcelona) de 4 metros de longitud y 1/8 de pulgada, cuya fase estacionaria es Carbowax 1.500.

Las condiciones de trabajo fueron: temperatura del inyector, 250°C; temperatura del detector, 250°C; temperatura del horno, 90°C (régimen isoterma); gas portador, nitrógeno a un flujo de 30 mL/min.

100 μ L de la muestra se diluyen en 10 mL de una disolución compuesta de 997 mL de Iso-butanol y 3mL de 3-metilbutanol-1 que actúa como patrón interno.

3.8.2. AZÚCARES TOTALES Y ACIDEZ VOLÁTIL.

El contenido en azúcares totales y la acidez volátil se determinaron por flujo de inyección (FIA) en un Autoanalyzer™ II (Technicon™), siguiendo los métodos de la neocuproina (Sawyer, 1968) y del azul de bromofenol (Owades y Dono, 1968), respectivamente.

3.8.3. ACIDEZ TOTAL.

La acidez total se determinó por valoración potenciométrica con NaOH en un Titralsys de ICA Instruments (Trebies, Francia).

3.8.4. pH.

Se determinó con un pHmetro digital Beckman equipado con un electrodo combinado.

3.8.5. SULFUROSO.

Se determinó por el método iodométrico según OIV (Office International de la Vigne et du Vin, 1978).

3.8.6. COLOR.

El color de los vinos se determinó midiendo la absorbancia a 470nm en un espectrofotómetro Lambda 2, Perkin Elmer.

3.8.7. DENSIDAD.

Se determinó por el método picnométrico (Ribéreau-Gayon et al., 1976) en un densímetro digital DMA 46 de la casa Anton Paar (Graz, Alemania).

3.8.8. GRADO BAUMÈ.

Se determinó con un densímetro Dujardin-Salleron según método de la OIV (Office International de la Vigne et du Vin, 1978).

3.8.9. ACETALDEHIDO, ACETATO DE ETILO, n-PROPANOL, i-BUTANOL Y ALCOHOLES i-AMÍLICOS.

Se determinaron mediante cromatografía gaseosa con el cromatógrafo, la columna y condiciones anteriormente descritas (apartado 3.8.1.3), usando 4-metilpentanol-2 como patrón interno.

3.8.10. ACETOÍNA Y BUTANODIOL, 2-3.

Se determinaron mediante cromatografía de gases en un cromatógrafo Hewlett Packard modelo 5890 serie II, equipado con un inyector para columnas capilares y un detector de ionización de llama. Se empleó una columna CP-WAX 57CB de la casa Chrompack (Middelburg, Holanda) de 25 metros de longitud y 0.25 mm.

Se empleó la técnica de inyección en splitless con las siguientes condiciones de trabajo: temperatura del inyector, 250°C; temperatura del detector, 250°C; programación de temperatura en el horno de 45°C a 195°C con rampa de 3°C/min; nitrógeno como gas portador a un flujo total de 80 mL/min, y presión en cabeza de columna de 12 psi. Como patrón interno se utilizó el 4-metilpentanol-2.

3.8.11. Dietilacetal:

Se determinó mediante cromatografía de gases en el cromatógrafo descrito en el apartado anterior (3.8.10), usando una columna de Alcoholes TC de la casa Tecnokroma de 3 metros de longitud y 1/8 de pulgada.

Las condiciones de trabajo fueron: temperatura del inyector, 250°C;

temperatura del detector, 250°C; programación de temperatura en el horno de 60°C a 120°C con una rampa de 3°C/min. Como patrón interno se utilizó el 4-metilpentanol-2.

3.8.12. Ácidos orgánicos y glicerina:

Los ácidos orgánicos: tartárico, succínico, cítrico, glucónico, málico y láctico, y la glicerina se determinaron por HPLC empleando un equipo Waters compuesto por bombas de alta presión, inyector automático, horno para columnas, detector UV-visible (diodo-array), detector de índice de refracción y un sistema de tratamiento de datos Máxima-820.

Se utilizaron columnas en serie Fast-Fruit-Juice de la casa Waters (Massachusetts, USA) termostalizadas a 55°C y una solución de ácido fosfórico como fase móvil, según el método descrito por Valcarcel *et al.* (1990). Como patrón interno se utilizó ácido butírico.

3.8.13. AMINOÁCIDOS.

Los aminoácidos se determinaron por HPLC en el cromatógrafo antes descrito (apartado 3.8.12) utilizando la técnica "pico-tag" de Waters (manual nº 88140, 1986).

3.8.14. POLIFENOLES.

3.8.14.1. Índice de polifenoles totales:

Se calculó según el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965).

3.8.14.2. Ácidos y aldehidos fenólicos:

Se determinaron por HPLC en el cromatógrafo anteriormente descrito (apartado 3.8.12), mediante inyección directa de las muestras en una columna ODS-2

de la casa Tecnokroma y programación en gradiente. Como fase móvil se emplearon dos soluciones Acético-Metanol-Agua según el método puesto a punto por Valcarcel *et al.*, Domecq S.A. (comunicación personal).

3.8.15. PRUEBA DE REMONTADO.

En una petaca de 200 mL se introdujeron 100 mL de vino y se agitó para oxigenar. Se determinó la absorbancia a 470 nm inicial. Posteriormente se introdujo en la horno a una temperatura de 40°C durante 10 días. Pasado este tiempo se determinó la absorbancia final. El incremento registrado en la absorbancia es un parametro indicativo de la tendencia de un vino a la oxidación (remontado).

4 . RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS DE VELO DE FLOR.

4.1.1. CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA.

Se han realizado un total de 580 aislamientos de cepas de levaduras de flor presentes en los velos de numerosos sistemas industriales de crianza biológica. Éstas se caracterizan como *Saccharomyces cerevisiae* y *Zygosaccharomyces rouxii* (Barnett *et al.*, 1990), siguiendo los criterios usuales de clasificación basados en características morfológicas, y fermentación y asimilación de distintas fuentes de carbono y nitrógeno (Lodder, 1970; Krejer van Rig, 1984; Barnett *et al.*, 1990). En la Tabla 6, se resumen las fuentes de carbono cuya fermentación permite distinguir entre cuatro grupos taxonómicos diferentes.

TABLA 6: Patrón fermentativo de azúcares mostrado por las diferentes levaduras de velo de flor.

Azúcares ^a						Grupo taxonómico
Lac	Gal	Mal	Raf	Sac	Glu	
-	-	-	+(1/3)	+	+	<i>S. cerevisiae (beticus)</i>
-	-	+	+(1/3)	+	+	<i>S. cerevisiae (cheresiensis)</i>
-	-	-	-	-	+	<i>S. cerevisiae (montuliensis)</i>
-	-	+	-	-	+	<i>Z. rouxii (rouxii)</i>

^a Lac: lactosa, Gal: galactosa, Mal: maltosa, Raf: rafinosa, Sac: sacarosa, Glu: glucosa, 1/3: queda melibiosa en el medio, +: fermentación positiva, -: fermentación negativa.

Todas las cepas asimilan los mismos azúcares que fermentan excepto *S. cerevisiae (montuliensis)* y *Z. rouxii* que también asimilan la sacarosa, no asimilan nitrato como única fuente de nitrógeno, no escinden la arbutina y forman velo en medios que contienen etanol. Su morfología macroscópica y microscópica es la típica del género *Saccharomyces* (colonias blanquecinas y redondeadas, células ovoides,

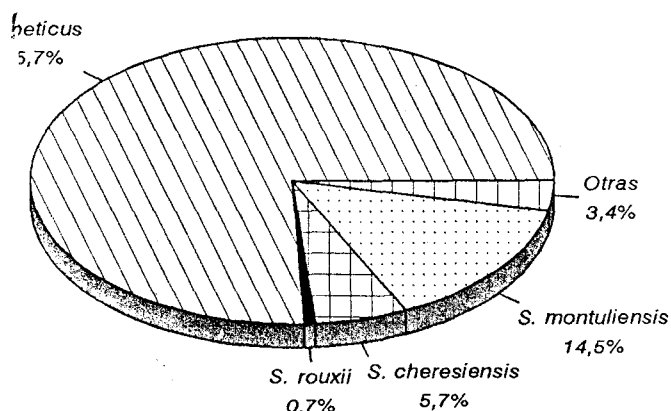
reproducción vegetativa por gemación y agrupaciones celulares en pareja gemante).

Iñigo y Arroyo (1964) reconocen a estos grupos taxonómicos como diferentes especies del género *Saccharomyces* (*S. beticus*, *S. cheresiensis*, *S. montuliensis* y *S. rouxii*). Por razones prácticas (industriales) y apoyándonos en Van der Walt (1987) que considera que la industria debería sentirse libre para desarrollar un criterio taxonómico especial para la clasificación de las levaduras industriales, pudiendo mantener los nombres dados, para así distinguir a las diferentes cepas utilizadas en cada aplicación industrial, se seguirán denominando a dichos grupos como especies del género *Saccharomyces*, de igual manera que Iñigo y Arroyo (1964).

También se han encontrado, aunque en muy baja proporción especies pertenecientes a los géneros *Debaryomyces*, *Pichia*, *Hansenula* y *Candida*.

En la Fig. 2 se representa el porcentaje obtenido de las distintas especies integrantes de los velos de flor teniendo en cuenta el total de los aislamientos realizados. Se observa que la población existente en los velos de flor en los sistemas de crianza biológica es heterogénea y compuesta fundamentalmente por especies del género *Saccharomyces*. Existe un notable predominio de *S. beticus* (75%) seguida de *S. montuliensis* (15%), encontrándose *S. cheresiensis* y *S. rouxii* en baja proporción, 6% y 1% respectivamente.

FIGURA 2: Proporción de las distintas especies de levaduras aisladas en los velos de flor de los sistemas industriales de crianza biológica.



Otras: *Debaryomyces* sp. (1%); *Pichia* sp. (0,9%); *Hansenula* sp. (0,5%); *Candida* sp. (1%)

Existen estudios de caracterización de las especies que integran el velo de flor formado en el mosto una vez fermentado (sin alcoholizar) en la zona de Jerez. Éstos están formados mayoritariamente por *S. beticus* (62%) y *Hansenula anomala* (23%), encontrándose también *S. montuliensis* (4%), *S. rouxii* (2%) y *Zygosaccharomyces acidifaciens* (5%) (Suárez e Iñigo, 1990). Las discrepancias en los resultados obtenidos en este trabajo se deben a la diferencia en el contenido alcohólico del medio. Tanto *H. anomala* como *Z. acidifaciens* no forman velo en vinos con grado alcohólico elevado (15.5% v/v) (Suárez e Iñigo, 1990). En ambos casos es *S. beticus* la especie mayoritaria.

4.1.2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA.

4.1.2.1. Contenido en ADN:

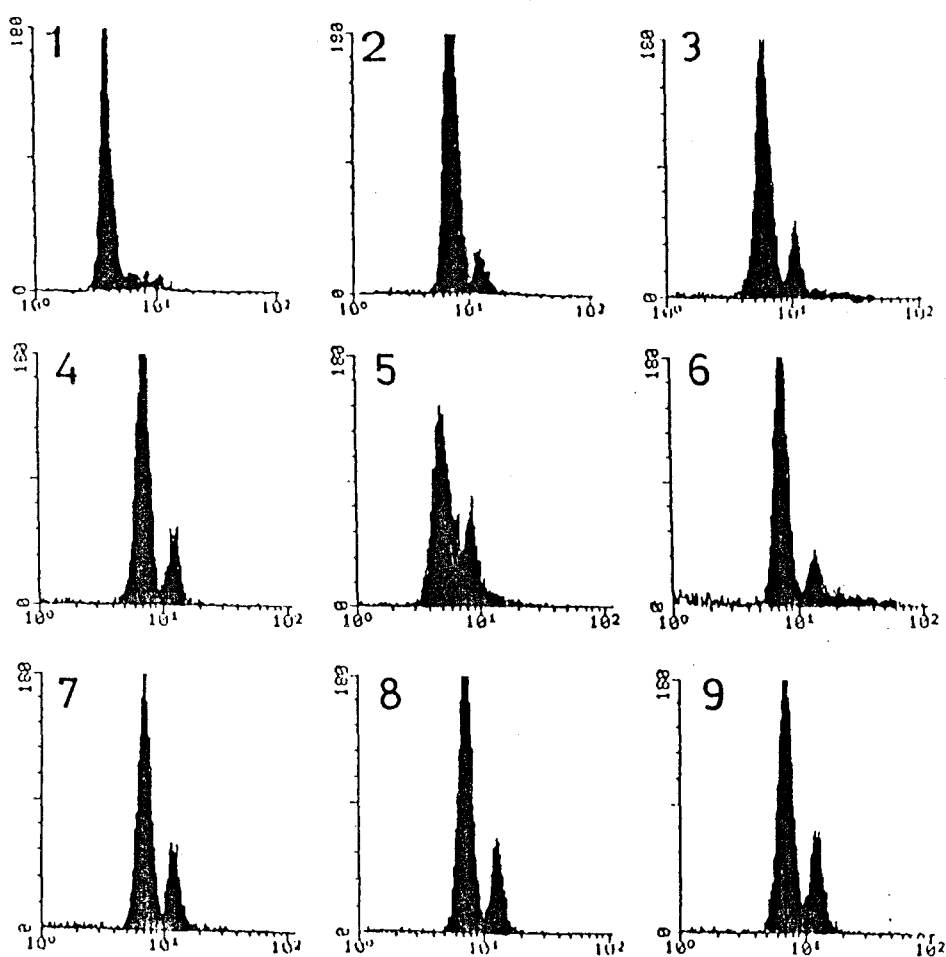
La mayoría de las cepas industriales son poliploides o aneuploides. Por esta razón, y para determinar las posibilidades de manipulación genética, se ha determinado mediante citometría de flujo, el contenido de ADN en algunas de las levaduras de velo de flor. La selección se hizo de manera que estuvieran representadas las cuatro especies de *Saccharomyces* aisladas. Las cepas de laboratorio YNN295 y DS81 se utilizaron como controles haploide y diploide respectivamente. Los resultados se expresan en la Tabla 7A y 7B, y en la Fig. 3, en la que se recogen como ejemplos los resultados de algunas de las cepas.

Cuando se compararon las cepas de flor con los controles YNN295 y DS81, el contenido de ADN varió de 1.3 a 2n entre las cepas de *S. beticus*, *S. cheresiensis* y *S. montuliensis*. No se encontró correlación entre el contenido de ADN y una especie determinada. Sólo las cepas de *S. rouxii* analizadas parecen poseer una dotación cromosómica completa (las cuatro cepas fueron 2n). Las cepas de *S. beticus* y *S. cheresiensis* muestran mayor variabilidad (1.3 a 2n) que las de *S. montuliensis* (todas menos una fueron 2n).



Otros autores también han encontrado una alta complejidad en la constitución cromosómica de levaduras vínicas, con variaciones entre 2-4 en el número de copias de un cromosoma (Bakalinsky y Snow, 1990). Sin embargo, la idea de que poseer juegos extras de algunos cromosomas hace a las cepas más vigorosas (Adams *et al.*, 1992) y que, sobre todo, una constitución cromosómica obedece a adaptaciones específicas a cada medio industrial (Yamamoto *et al.*, 1991), no se ve apoyada por los resultados obtenidos en este trabajo en el que se obtiene una gran variabilidad en el contenido en ADN entre las cepas de levaduras de velo.

FIGURA 3: Análisis mediante citometría de flujo del contenido en ADN de las cepas de laboratorio YNN295 (haploide) (1) y DS81 (diploide) (2) y de las cepas de flor B5 (3), B11 (4), B7 (5), R13 (6), M14 (7), CH15 (8) y CH11 (9).



4.1.2.2. Cariotipo electroforético:

El análisis del cariotipo electroforético mediante la técnica de electroforesis en campo pulsado se ha convertido en un método fiable para la identificación de levaduras industriales que carecen de marcadores fenotípicos (Yamamoto *et al.*, 1991; Naumov *et al.*, 1992; Querol *et al.*, 1992a, 1992b).

Las levaduras de velo de flor y la cepa de laboratorio DS81 se sometieron al análisis del cariotipo mediante la separación de cromosomas intactos por electroforesis en campo pulsado. Los resultados obtenidos se muestran en las Tabla 7A y 7B.

Se observa que todas las cepas de levaduras de velo de flor poseen un patrón principal, idéntico en las cuatro especies (*S. beticus*, *S. cheresiensis*, *S. montuliensis* y *S. rouxii*) y diferente del mostrado por la cepa de laboratorio. Este patrón denominado "patrón de flor" (PF en las Tablas 7A y 7B), lo mostraron 8 de 12 cepas de *S. beticus*, todas las cepas de *S. cheresiensis*, 6 de 8 cepas de *S. montuliensis* y las tres cepas de *S. rouxii* estudiadas.

Por tanto, el 80% de las levaduras analizadas (23 de 29 cepas) tienen un patrón característico de levaduras de velo de flor. Algunas cepas de *S. beticus* (B2, B3, B4 y B5) y de *S. montuliensis* (M17 y M9) presentan un patrón diferente al que denominamos "V" en las tablas 7A y 7B). Estas variaciones fueron específicas de cada cepa excepto para las dos cepas de *S. montuliensis* las cuales comparten el mismo patrón distinto del estándar (V5). Los cambios en los diferentes patrones cromosómicos se detectan tanto en el número como en la longitud de las bandas, incluso en las cepas pertenecientes a la misma especie. En la Figura 4A y 4B se muestran los cariotipos electroforéticos de algunas de las cepas analizadas.

Las levaduras industriales muestran frecuentemente un alto polimorfismo en el patrón de bandas. Venzinhet *et al.* (1990) encuentran 20 patrones diferentes en 22 cepas vínicas. Yamamoto *et al.* (1991) también observa una gran variedad de

cariotipos electroforéticos de levaduras vínicas. Sin embargo, la mayoría de las cepas de levaduras de velo de flor de este estudio muestran un patrón cromosómico característico, no pudiendo establecerse relación alguna entre una variación específica y una determinada especie. Las levaduras de velo están sometidas a presiones selectivas diferentes de las de otras levaduras vínicas, tales como el alto contenido alcohólico (15.5% v/v) y un metabolismo exclusivamente oxidativo (sin azúcares fermentables); siendo posiblemente ésta la razón de la uniformidad encontrada en los patrones cromosómicos de estas levaduras.

4.1.2.3. Análisis de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial:

Los resultados obtenidos en el análisis de restricción del ADNmt se muestran en las figuras 5A y 5B y se resumen en las Tablas 7A y 7B. Cada enzima de restricción usada (AluI, RsaI y HinfI) determina un patrón de bandas específico en muchas de las cepas estudiadas. Se han obtenido 8 patrones diferentes con AluI, 6 con HinfI y 11 con RsaI. Además, al tomar en cuenta a los tres patrones a la vez, se observa que es posible identificar a la mayoría de las cepas por el análisis de restricción del ADNmt (se obtuvieron 17 diferentes combinaciones al usar las tres enzimas). En las levaduras de velo de flor el ADNmt parece ser más variable que el ADN nuclear. De hecho, sólo 14 cepas de las 31 estudiadas tienen un patrón combinado ya presente en otra cepa, lo que significa que mientras el 80% de las cepas tienen el mismo cariotipo electroforético, el 55% de esas mismas tienen un patrón combinado del ADNmt diferente.

El análisis de restricción del ADNmt no sólo permite la identificación individual de la mayoría de las cepas de levaduras de flor por su patrón característico sino también, en muchos casos, la clasificación de las cepas dentro de grupos taxonómicos de gran interés industrial (uno integrado por *S. beticus* y *S. cheresiensis* y otro por *S. montuliensis* y *S. rouxii*). *S. beticus* y *S. cheresiensis* tienen un patrón combinado principal (2-1-2) (PBC), compartido por 9 de 17 cepas. *S. montuliensis* y *S. rouxii* tienen también un patrón combinado principal diferente del anterior (1-2-3) (PMR), compartido por 4 de 14 cepas. Cualquier cepa que presentara el patrón

PBC o el PMR, podrá ser asignada a los grupos taxonómicos anteriormente descritos en sólo unas pocas horas.

Otros autores también han encontrado un mayor polimorfismo en el ADNmt que en el nuclear en levaduras vínicas (Querol *et al.*, 1992a, 1992b; Yamamoto *et al.*, 1991; Vezinhet *et al.*, 1990). El análisis del patrón de restricción del ADNmt parece, por tanto, ser más útil en la identificación de levaduras vínicas y de levaduras de velo de flor. Otras levaduras industriales (panaderas), por el contrario, presentan un gran polimorfismo cromosómico mientras que el análisis de los fragmentos de restricción del ADNmt muestra un mismo patrón de bandas (Codón, 1994).

En principio, la asociación entre el ADNmt y productos de genes nucleares sugiere que ambos genómos estén sujetos a mecanismos evolutivos similares. Sin embargo, el etanol parece ser un fuerte factor mutagénico en las mitocondrias de levaduras pero no tiene ningún efecto en el núcleo (Jiménez y Benítez, 1988). Además, el genomio mitocondrial juega un papel importante en la viabilidad de las células sometidas a condiciones de altas concentraciones de etanol donde las células se dividen muy lentamente como sucede en los vinos de crianza biológica (Jiménez y Benítez, 1988). Estas diferentes presiones selectivas ejercidas entre las levaduras panaderas y vínicas podrían explicar las diferencias encontradas en el polimorfismo del genomio nuclear y mitocondrial de estas levaduras.

TABLA 7A: Contenido en ADN, cariotipo electroforético y patrones de los fragmentos de restricción del ADNmt de diferentes cepas de *S. beticus* y *S. cheresiensis*.

<u>CEPAS</u>	<u>CONTENIDO EN ADN</u>	<u>PATRÓN CROMOSÓMICO</u> ¹	<u>PATRÓN MITOCONDRIAL</u> ²			<u>PATRÓN COMBINADO</u> ³
			<u>Alu I</u>	<u>Hinf I</u>	<u>Rsa I</u>	
<u><i>S. beticus</i></u>						
B1	2	PF	2	1	2	PBC
B2	2	V1	1	1	1	V1
B3	1.7	V3	1	1	1	V1
B4	1.7	V2	1	5	ND	V2
B5	1.6	V4	1	6	11	V3
B6	2	PF	2	1	2	PBC
B7	1.3	PF	4	1	2	V4
B8	1.7	PF	2	1	2	PBC
B11	1.7	PF	2	1	2	PBC
B12	1.8	PF	ND	1	ND	ND
B15	2	PF	2	1	5	V5
B16	1.7	PF	2	1	2	PBC
<u><i>S. cheresiensis</i></u>						
CH6	ND	PF	2	1	5	V5
CH9	2	ND	1	1	2	V6
CH11	1.7	PF	2	1	2	PBC
CH12	1.7	PF	2	1	2	PBC
CH13	1.3	PF	4	ND	ND	ND
CH14	1.7	PF	2	1	2	PBC
CH15	2	PF	2	1	2	PBC

¹ PF indica el patrón cromosómico más frecuentemente encontrado entre todas las cepas de levaduras de flor estudiadas; V1-V4 son variaciones del patrón PF.

² Los patrones están denominados arbitrariamente como 1,2,3 etc, indicando cada número un patrón específico para cada enzima de restricción usada.

³ PBC indica el patrón combinado de las tres enzimas de restricción más frecuentemente encontrado entre las cepas de *S. beticus* y *S. cheresiensis* estudiadas (2-1-2); V1-V6 son patrones combinados distintos del PBC.

ND: no determinado.

TABLA 7B: Contenido en ADN, cariotipo electroforético y patrones de los fragmentos de restricción del ADNmt de diferentes cepas de *S. montuliensis* y *S. rouxii*.

CEPAS	CONTENIDO EN ADN	PATRÓN CROMOSÓMICO ¹	PATRÓN MITOCONDRIAL ²			PATRÓN COMBINADO ³
			Alu I	Hinf I	Rsa I	
<i>S. montuliensis</i>						
M9	2	V5	1	2	4	V7
M10	2	PF	1	2	3	PMR
M11	2	ND	6	2	9	V8
M12	2	PF	1	2	3	PMR
M13	2	PF	1	2	3	PMR
M14	2	PF	8	3	10	V9
M15	ND	PF	7	1	3	V10
M16	ND	PF	3	2	6	V11
M17	1.7	V5	1	2	4	V7
<i>S. rouxii</i>						
R6	2	PF	4	3	10	V12
R7	2	ND	4	3	7	V13
R8	2	PF	5	4	8	V14
R9	ND	ND	2	ND	10	V15
R13	2	PF	1	2	3	PMR
Controles						
YNN295	1	G1				
DS81	2	G2				

¹ PF indica el patrón cromosómico más frecuentemente encontrado entre todas las levaduras de velo de flor estudiadas; V5 es una variación del patrón PF.

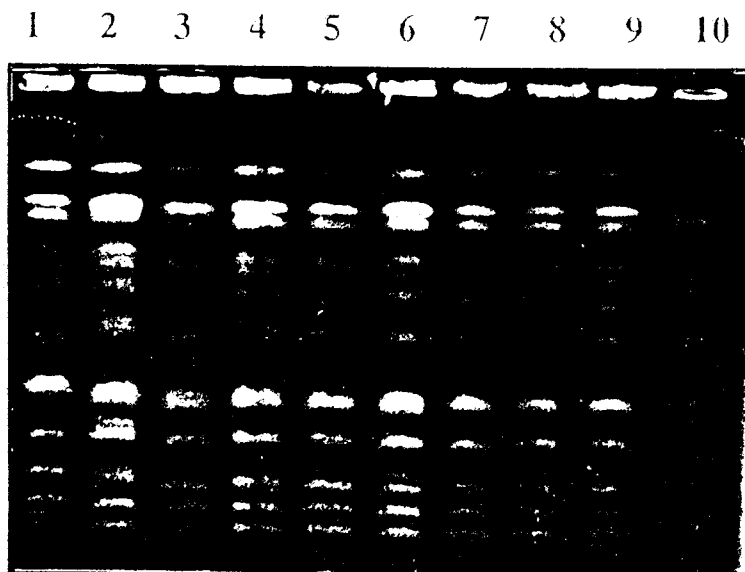
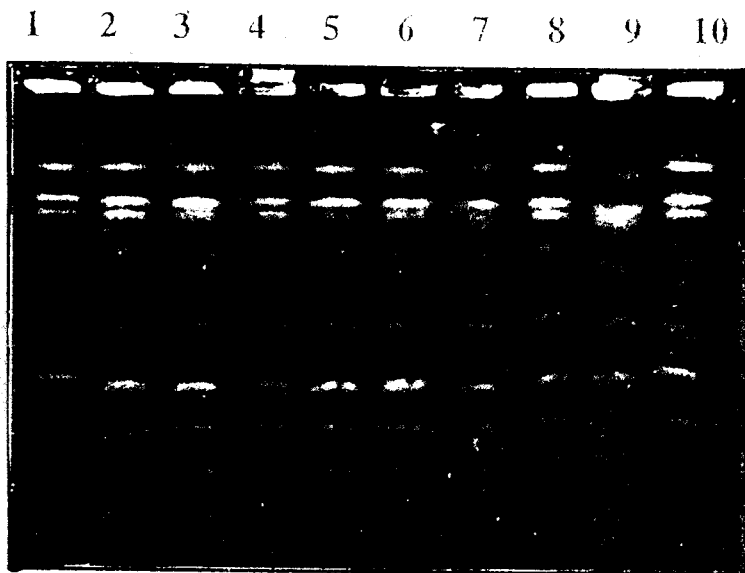
² Los patrones se denominan arbitrariamente como 1,2,3 etc como en la tabla 7A, indicando cada n° un patrón específico para cada enzima de restricción usada.

³ PMR indica el patrón combinado más frecuentemente encontrado entre las cepas de *S. montuliensis* y *S. rouxii* estudiadas (1-2-3); V7-V15 son patrones combinados diferentes de PMR.

ND: no determinado.

FIGURA 4 A: Cariotipo electroforético de cepas de levaduras de velo (carriles 2-8), B12 (2), M17 (3), B15 (4), M16 (5), M10 (6), M9 (7), CH15 (8) y M12 (9); y de la cepa de laboratorio DS81 (carriles 1 y 10).

FIGURA 4 B: Cariotipo electroforético de cepas de levaduras de velo (carriles 2-10), B2 (2), B4 (3), B8 (4), R6 (5), B3 (6), CH12 (7), B11 (8), M14 (9) y B5 (10); y la cepa de laboratorio DS81 (carril 1).



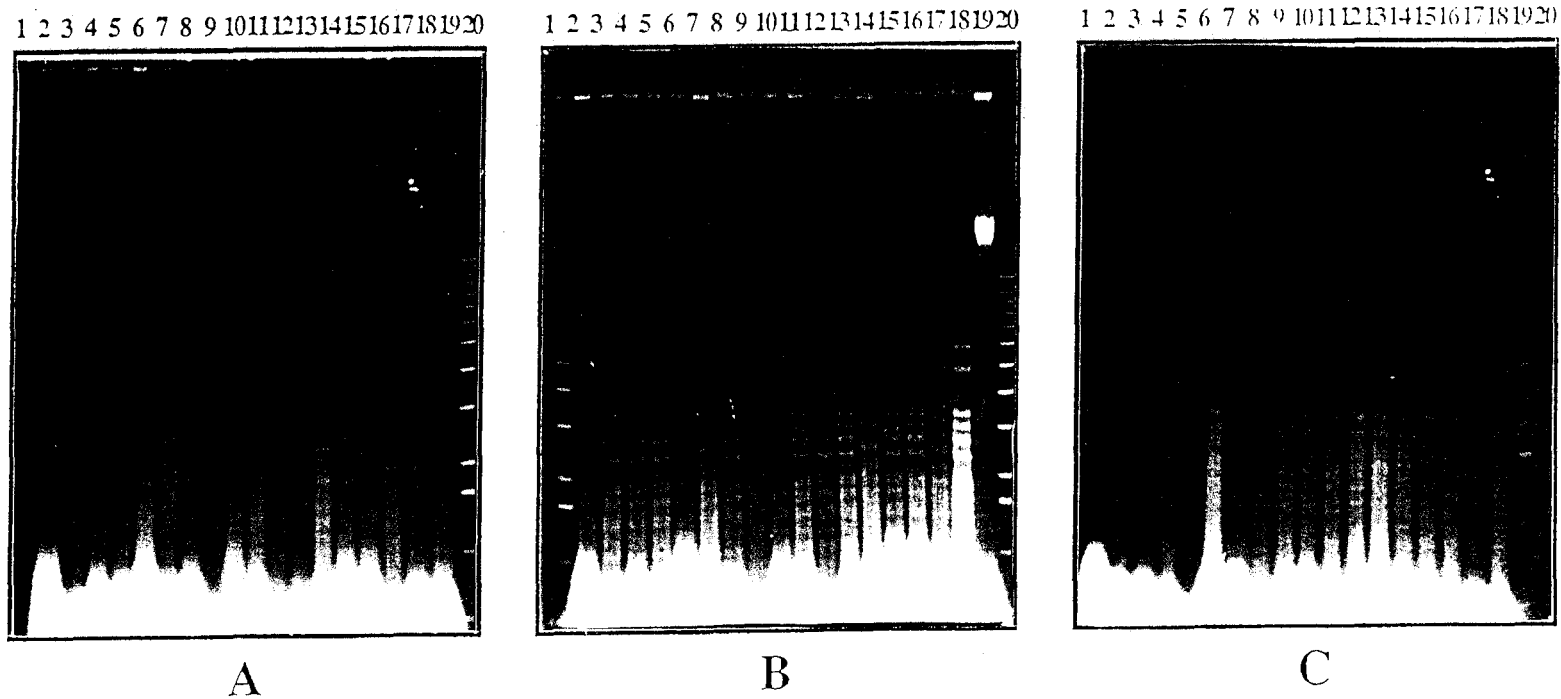


FIGURA 5 A: Análisis de los fragmentos de restricción de ADN mitocondrial con tres restrictasas diferentes; Alu I (A), Hinf I (B), Rsa I (C). Carriles 1 y 20: marcadores de tamaño correspondientes a Ladder 1Kb (Geast Brocade); carriles 2-19 cepas de levaduras de velo: B7 (2), CH12 (3), CH15 (4), B8 (5), CH9 (6), M11 (7), B4 (8), CH13 (9), R6 (10), B6 (11), B5 (12), B11 (13), M15 (14), CH11 (15), CH14 (16), M14 (17), B12 (18) y R13 (19).

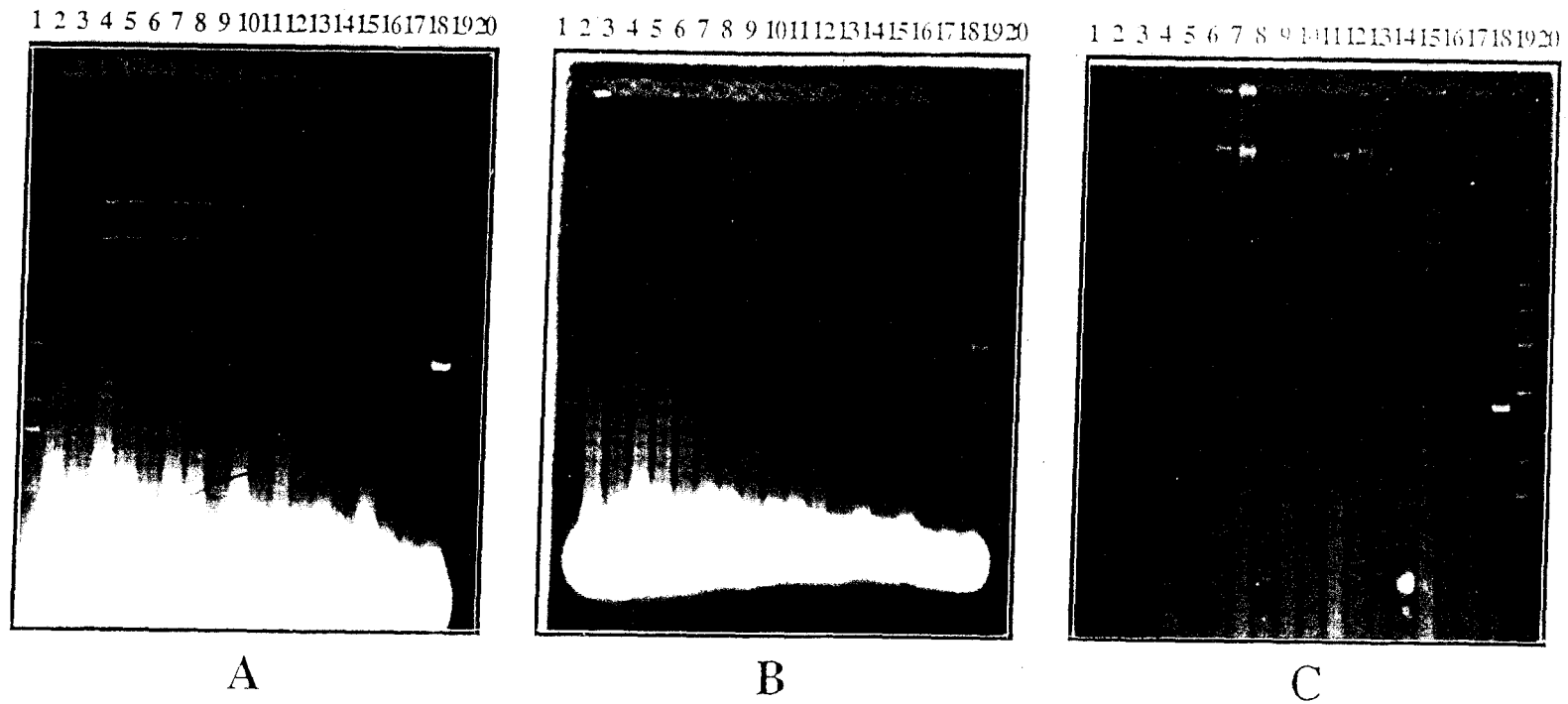


FIGURA 5 B: Análisis de los fragmentos de restricción de ADN mitocondrial con tres restrictasas diferentes; Alu I (A), Hinf I (B), Rsa I (C). Carriles 1 y 20: marcadores de tamaño correspondientes a Ladder 1Kb (Geast Brocade); carriles 2-19 cepas de levaduras de velo: B3 (2), CH15 (3), M12 (4), M10 (5), B2 (6), M17 (7), M9 (8), R13 (9), M13 (10), CH12 (11), CH6 (12), B15 (13), CH13 (14), B1 (15), M16 (16), B16 (17), R7 (18), R8 (19).

4.1.2.4. Esporulación:

Se ha estudiado la capacidad de esporulación de las cepas B2, B3, B16, CH15, M9, M10, M12, M17 y R13 siguiendo uno de los protocolos habituales descritos para la esporulación, consistente en cultivar las células a 22°C en medio sólido rico de preesporulación durante 1-2 días (PRE1) y transferirlas a medio de esporulación (SPO1) sólido e incubarlas de nuevo a 22°C durante al menos 5 días (método 1). Ninguna de las cepas esporuló por lo que se probó el método de esporulación optimizado de levaduras descrito por Codón *et al.* (1995) (método 2), obteniéndose los mismos resultados negativos.

La ausencia de esporulación en las cepas B3, B16 y M17 puede explicarse por la falta de una dotación cromosómica completa (1.7n) (Tablas 7A y 7B). Las restantes cepas B2, CH15, M9, M10, M12 y R13 aunque son 2n, podrían poseer varias copias de algunos de los cromosomas y una sola copia de otros.

4.1.3. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA.

4.1.3.1. Auxotrofías:

La pérdida de actividad de las levaduras vínicas, tanto en los procesos fermentativos como en los de crianza biológica, no sólo puede deberse a las altas concentraciones de etanol y a altas temperaturas, sino también a la carencia o agotamiento en el vino de factores nutricionales esenciales tales como nitrógeno asimilable, aminoácidos, vitaminas o elementos trazas (Ingledeew y Kunkee, 1985). El mosto de uva y el vino son medios de composición compleja que pueden variar en gran medida, atendiendo a numerosos factores tales como las condiciones climáticas, cosecha, variedad de vid, flora microbiana silvestre presente en el mosto, cepa de levadura inoculada etc (Amerine y Kunkee, 1968; Suarez e Iñigo, 1990; Moreno *et al.*, 1991; Querol *et al.*, 1990). Así, la selección de cepas de levaduras para su uso en la industria debe tener en cuenta los requerimientos nutricionales de

éstas, además de la capacidad fermentativa, tolerancia al etanol y al SO₂, producción de acidez volátil, poder alcoholígeno, floculación etc. Se han estudiado, por tanto, las posibles auxotroffas para los aminoácidos y factores vitamínicos de las levaduras de velo de flor.

4.1.3.1.1. Auxotroffas para aminoácidos:

Todas las cepas de levaduras de flor estudiadas son protótrofas para todos los aminoácidos ya que presentaron crecimiento positivo en el medio mínimo SD (Tabla 8).

4.1.3.1.2. Auxotofías vitamínicas:

Aunque todas las cepas fueron capaces de crecer en SD, las levaduras están descritas como auxótrofas para algunas vitaminas del grupo B (Russell *et al.*, 1987). Las cepas ensayadas se cultivaron en un medio mínimo estricto (MM) suplementado con combinaciones de diferentes vitaminas. Todas las cepas resultaron ser auxótrofas para la biotina. Además, las cepas de *S. rouxii* probadas también lo fueron para el *myo*-inositol (Tabla 8).

4.1.3.2. Producción, sensibilidad y/o resistencia al factor Killer:

La actividad killer representa uno de los mecanismos de antagonismo entre levaduras durante la fermentación espontánea de los mostos. Las cepas de levaduras killer secretan toxinas polipeptídicas que matan a las cepas sensibles del mismo género e incluso a otras pertenecientes a otros géneros (Petering *et al.*, 1991). Es por ello, la gran relevancia que ha supuesto en la industria el uso de cepas vnicas seleccionadas killer como inóculo en aquellas fermentaciones que requieren un control microbiológico estricto, inhibiendo el desarrollo y la contaminación de levaduras indeseables (Cansado *et al.*, 1992; Bussey, 1991).

Debido a la importancia que representa en la industria vitivinícola el caracter

Killer de las levaduras, se ha estudiado el comportamiento de las levaduras de velo de flor con respecto a las toxinas K1 y K2. Como control sensible a ambas toxinas se utilizó la cepa 47G, y las cepas 1101 y 1384 como productoras de las toxinas K1 y K2 respectivamente. Todas las cepas de *S. montuliensis* y de *S. rouxii* resultaron ser no productoras y sensibles a ambas toxinas. Las cepas de *S. beticus* y *S. cheresiensis* fueron igualmente no productoras pero resistentes a ambas toxinas (excepto B16 que fue sensible a la K2) (Tabla 8). La respuesta a las toxinas killer parece ser específica de cada especie.

TABLA 8: Auxotrofías para aminoácidos y para vitaminas y resistencia/sensibilidad al factor killer de algunas cepas de levaduras de velo de flor.

CEPAS	CRECIMIENTO SIN:			FACTOR KILLER ³ (res/sen)	
	Aminoácidos ¹	Biotina	Inositol ²	K1	K2
B2	+	-	+	R	R
B3	+	-	+	R	R
B16	+	-	+	R	S
CH15	+	-	+	R	R
M9	+	-	+	S	S
M10	+	-	+	S	S
M12	+	-	+	S	S
M17	+	-	+	S	S
R13	+	-	-	S	S

¹ Además de las cepas descritas en esta tabla todas las cepas de levaduras de velo de flor descritas en la Tabla 1 fueron protótrofas para todos los aminoácidos.

² Las cepas B1, B5, CH11, CH13, CH12, R6, R9 y R8 también se comprobaron para las auxotrofías vitamínicas, resultando ser auxótrofas para la biotina. Las cepas R6, R9 y R8 también fueron auxótrofas para el inositol.

³ Ninguna cepa fue productora de las toxinas K1 y K2.

Otros autores, estudiando el caracter killer en levaduras aisladas durante la fermentación espontánea de mostos, también han encontrado una baja proporción de cepas productoras, no aislando cepas resistentes a las toxinas (Cansado *et al.*, 1989). Además, esta proporción disminuye considerablemente en la fase fermentativa lenta, ya que durante la fase estacionaria de crecimiento comienza la degradación o inactivación del factor killer (Cansado *et al.*, 1989).

Cansado *et al.* (1992) llevaron a cabo fermentaciones en las que el mosto se inoculó con una cepa K2 productora y la isogénica K2 resistente, siendo el n° de células viables de la cepa resistente superior al de la productora durante todo el proceso fermentativo. Parece, por tanto, que la incapacidad de producir el factor killer por cepas resistentes a él favorece la capacidad fermentativa.

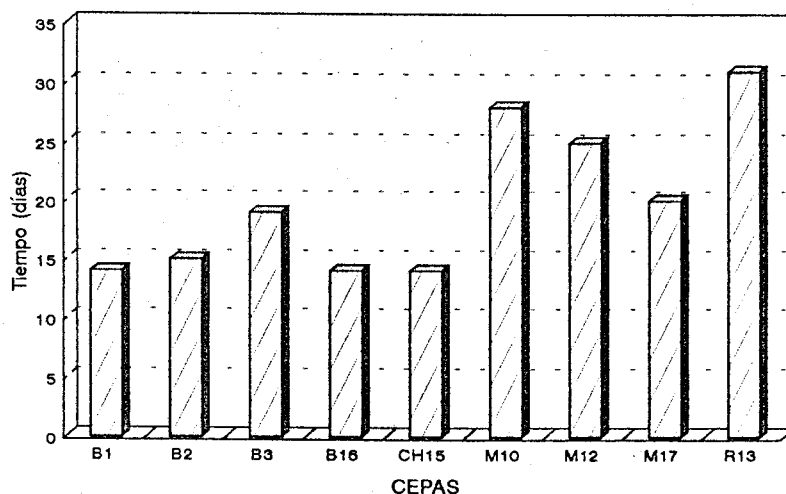
4.2. FORMACIÓN DE VELO DE FLOR.

4.2.1. EFECTO DE LA NATURALEZA DE LA CEPA.

Debido a la importancia que supone la formación del velo de flor en el envejecimiento de los vinos finos y manzanillas, se ha estudiado esta característica en diferentes cepas de levaduras aisladas de los velos de sistemas industriales de crianza biológica. Para ello se seleccionaron al azar varias cepas de las distintas especies que integran los velos. Las células crecidas en YPD en fase estacionaria se inocularon en S/T (15.5% v/v) hasta alcanzar una D.O. a 660nm inicial de 0.1 y se incubaron a 25°C. las células primero crecen y/o se mantienen en el fondo del tubo y después de varios días suben a la superficie del medio líquido e inician el desarrollo del velo. El tiempo transcurrido hasta la formación del velo varía según la cepa (Fig. 6). Las cepas B1, B2, B3, B16 y CH15 pertenecientes a las especies *S. beticus* y *S. cheresiensis* tardan en formar el velo entre 14-19 días, mientras que las restantes cepas M10, M12, M17 y R13 tardan entre 20-31 días. Se observa, pues, que las especies *S. beticus* y *S. cheresiensis* por una parte y *S. montuliensis* y *S. rouxii* por otra, presentan un comportamiento similar con respecto al tiempo requerido para formar el velo a una graduación alcohólica de 15.5% (v/v). Las especies del primer

grupo requieren una media de 15 días para alcanzar la superficie y las del segundo una media de 26 días.

FIGURA 6: Tiempo requerido para la formación de velo por diferentes cepas de levaduras de flor.



S.beticus: B1, B2, B3, B16; S.montuliensis: M10, M12, M17; S.cheresiensis: CH15; S.rouxii: R13.

4.2.2. RELACIÓN ENTRE LA TOLERANCIA AL ETANOL Y LA FORMACIÓN DE VELO.

4.2.2.1. Crecimiento a distinto grado alcohólico:

Las cepas B2, B3, B16, CH15, M9, M10, M12, M17 y R13 se cultivaron en YPD, YPDE(5%), YPDE(10%) e YPDE(15%) y se determinó la tasa de crecimiento que presentan en dichos medios. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

El tiempo requerido para la formación de velo por las diferentes cepas resultó estar directamente relacionado con la tasa de crecimiento, μ (h^{-1}) en YPD (Fig. 7A). Sin embargo, cuando se representó la inhibición del crecimiento en YPDE (10%) ($\%I_{10}$) con respecto a μ en YPD frente al tiempo necesario para la formación

de velo, resultó que las cepas más rápidas en alcanzar la superficie (*S. beticus* y *S. cheresiensis*) fueron aquellas cuyo crecimiento se inhibe más en un medio con una concentración de etanol del 10% (v/v) (Fig. 7B). Ninguna de las cepas crece en YPDE (15%) después de la inoculación, sin embargo las células sobrevivieron durante varios días hasta subir a la superficie donde ya, sí se dividieron y formaron velo.

La formación de velo de flor aparecería en levaduras vínicas como un mecanismo adaptativo que les permite crecer en un medio de alto contenido alcohólico cuyas únicas fuentes de carbono son respirables. De hecho, las cepas de este estudio cuyas tasas de crecimiento se vieron más inhibidas por el etanol son las que forman antes el velo de flor.

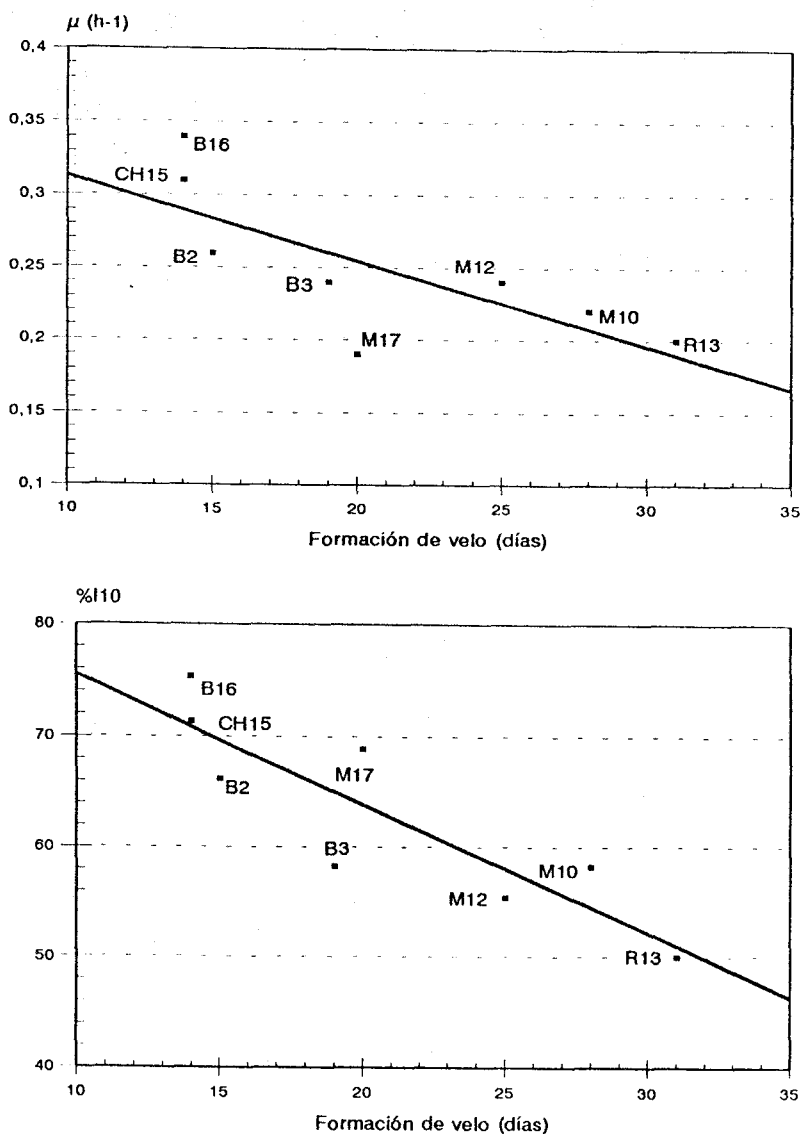
TABLA 9: Tasas de crecimiento, μ (h^{-1}) en YPD, YPDE (5%) e YPDE (10%); porcentaje de inhibición del crecimiento en YPDE (5%) ($\%i_5$) y en YPDE (10%) ($\%i_{10}$) con respecto a μ en YPD y formación de velo (días) en vino de 15.5% (v/v) de etanol (S/T) por diferentes cepas de levaduras de velo.

CEPA	μ (h^{-1})					FORMACIÓN DE VELO EN S/T (15.5% v/v etanol)
	YPD	YPDE (5%)	$\%i_5$	YPDE (10%)	$\%i_{10}$	
B3	0,24	0,175	27,1 %	0,100	58,3 %	19
B2	0,26	0,181	30,4 %	0,088	66,2 %	15
CH15	0,31	0,192	38,1 %	0,089	71,3 %	14
M10	0,22	0,157	28,6 %	0,092	58,2 %	28
M12	0,24	0,195	18,8 %	0,107	55,4 %	25
M9	0,23	0,144	37,4 %	0,069	70,0 %	- ^a
M17	0,19	0,148	22,1 %	0,059	68,9 %	20
R13	0,20	0,152	24,0 %	0,100	50,0 %	31

^a: No se formó velo después de 50 días.

Los resultados son la media de tres experimentos con desviaciones típicas menores del 10%.

Figura 7: Relación entre la tasa de crecimiento, μ (h^{-1}) en YPD (A) y el porcentaje de inhibición de μ en YPDE (10%) con respecto a YPD ($\%i_{10}$) (B) y el tiempo necesario para la formación de velo por diferentes cepas de levaduras de velo de flor.



Dado que las cepas más sensibles al etanol, en el sentido que su crecimiento se ve más fuertemente inhibido, son las más rápidas en formar velo y a que el etanol es un factor inductor de mutaciones "petites" (Jiménez y Benítez, 1988), se quiso ver si la formación de velo también guardaba relación con la frecuencia de formación de

"petites". Para ello se determinó la frecuencia espontánea (YPD) e inducida (YPDE 15%) de formación de "petites" en las cepas de levaduras de velo. Los resultados se muestran en la Tabla 10. Se observa que en general la frecuencia inducida de formación de "petites" en las especies *S. beticus* y *S. cheresiensis* (una media de 27%) es mayor que en las otras especies, *S. montuliensis* y *S. rouxii* (una media de 13%). Dentro de cada grupo, aquellas cepas más rápidas en formar velo son las que presentan una menor frecuencia inducida de esta mutación (B16 y CH15 con 9 y 15% respectivamente frente a B2 y B3 con 23 y 31%, M9 que no forma velo con un 25% frente a una frecuencia aproximada del 10% en las restantes cepas, M10, M12, M17 y R13). No se observa correlación alguna cuando se toman en cuenta a todas las cepas a la vez. La razón podría ser la existencia de otros factores que afecten a la formación de velo específicos para cada grupo taxonómico. Por otra parte, llama la atención la alta frecuencia de "petites" espontáneos que poseen algunas de las cepas de *S. beticus*. Otros autores (Jiménez y Benitez, 1988) han encontrado frecuencias espontáneas en levaduras de flor de 1-2%, algo más bajas la frecuencia de cepas de laboratorio (3-6%) y más parecida a la que muestran las cepas de *S. montuliensis*.

TABLA 10: Frecuencia espontánea (YPD) e inducida (YPDE 15%) de formación de "petites" en diferentes cepas de levaduras de flor.

CEPAS	FORMACIÓN DE "PETITES" (%)	
	Frecuencia espontánea	Frecuencia inducida
B2	17	23
B3	25	31
B16	7	9
CH15	5	15
M9	1	25
M10	4	7
M12	1	14
M17	1	7
R13	5	13

Los resultados son la media de 2 experimentos con desviaciones típicas menores del 10%.

4.2.2.3. Viabilidad celular a 15.5% v/v de etanol:

Con objeto de estudiar la relación entre la formación de velo y la viabilidad celular a elevada graduación alcohólica, las cepas B3, B16, CH15 y M9 se inocularon en un S/T (15.5% v/v de etanol) y se incubaron a 25°C. Se determinó el número de células viables inicial por siembra en YPD y el porcentaje de "petites". A las 24h y a las 48h se tomaron muestras y se llevaron a cabo las mismas determinaciones. Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla 11.

TABLA 11: Formación de velo, viabilidad celular (%) y frecuencia de formación de "petites" de diferentes cepas de levaduras de velo en S/T (15.5% etanol) a las 24h y 48h después de la inoculación.

Cepas	Formación de velo (días)	Viabilidad (%)		"Petites" (%)		
		24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
B3	19	0.1	0.06	35	36	38
B16	14	1.5	1.3	5	3.4	2.3
CH15	14	1.5	1.1	5	4.9	3.3
M9	∞ ^a	0	0	3	-	-

^a No formó velo después de 50 días.

Los resultados son la media de tres experimentos con desviaciones típicas menores del 10%.

Se observa una relación directa entre el tiempo requerido para la formación de velo y la viabilidad en vino. Las cepas B16 y CH15 las cuales tardan 14 días presentan una viabilidad muy parecida tanto a las 24h como a las 48h y mayor que B3 (15 veces mayor a las 24h y 20 veces a las 48h). M9 no formó velo, presentando una viabilidad 0 a las 24h de la inoculación.

El porcentaje de "petites" permanece aproximadamente constante a lo

largo del tiempo. A la vista de los resultados del apartado anterior donde se observaba un mayor porcentaje de "petites" cuando el etanol estaba presente en el medio (YPDE 15%), cabría también esperar un aumento progresivo de "petites". Ésto no es así ya que éstos al ser más sensibles al etanol y perder la capacidad de formar velo (Jímenez y Benítez, 1988) se mueren en un medio cuyas únicas fuentes de carbono son respirables (vino con 15.5% v/v de etanol y 0 g/L de azúcares). Así, la viabilidad presenta una relación inversa con la frecuencia de formación de "petites", la cepa con menor viabilidad (B3) fue la que presentó mayor porcentaje de "petites".

Por otra parte, aunque el crecimiento con etanol se ve más fuertemente inhibido (Tabla 9) durante la fase no filmógena en las cepas más rápidas en formar el velo, éstas presentan mayor viabilidad y menor frecuencia de formación de "petites".

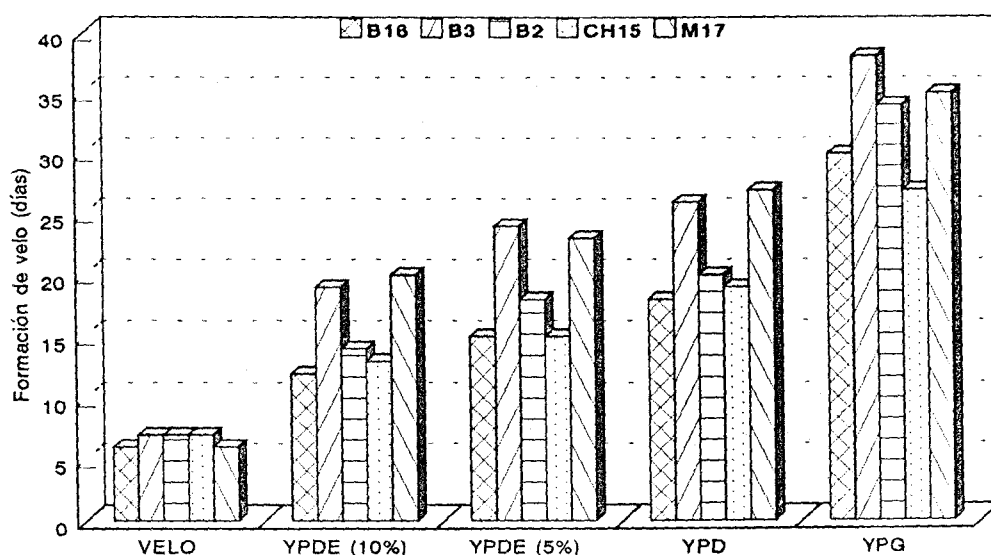
4.2.3. EFECTO DEL PRECULTIVO EN SUSTRATOS RESPIRABLES vs FERMENTABLES.

Dado a que las cepas más sensibles al etanol y con una menor frecuencia de inducción de "petites" en vino (15.5% v/v de etanol) forman el velo más rápidamente, se han llevado a cabo experiencias de formación de velo en las que se precultivaban las diferentes cepas hasta fase estacionaria en distintas fuentes de carbono, respirables (glicerol (YPG) y etanol (S/T)) y fermentables con (YPDE (5%), YPDE (10%)) o sin etanol (YPD). Estos precultivos se inocularon en S/T (15.5% v/v de etanol) hasta alcanzar la D.O de 0.1 a 660 nm; aquellos precultivos en S/T en fase de velo se injertaron con un asa de células. Los cultivos se incubaron a 25°C y se contabilizó el tiempo transcurrido hasta la formación del velo. Los resultados se representan en la Fig. 8.

De nuevo, se observa que el tiempo necesario para el desarrollo del velo es variable según la cepa excepto cuando el inóculo fue velo ya formado en vino (15.5% v/v etanol), siendo este caso el más rápido en todas las cepas (6-7 días). Las

células precultivadas con etanol (YPDE) formaron el velo antes que aquellas precultivadas en glucosa exclusivamente. La respuesta más lenta se obtuvo cuando los precultivos crecieron con glicerol a pesar de ser éste una fuente de carbono respirable (más de 30 días). Estos resultados indican que es el etanol específicamente y no una fuente de carbono respirable el que preadapta a las células de manera que éstas colonizan antes la superficie para formar el velo.

FIGURA 8: Efecto del precultivo en sustratos fermentables vs respirables en la formación de velo de flor en S/T (15.5% v/v etanol).



4.2.4. HIDROFOBICIDAD CELULAR EN ESTADO FERMENTATIVO vs FILMÓGENO: EFECTO DE LA ADICIÓN DE ÁCIDO OLEÍCO Y/O ERGOSTEROL.

La cepa B16 crecida en YPD hasta la fase estacionaria se inoculó en mosto y en S/T con o sin las adiciones de 5 mg/L de ácido oleico y/o 5 mg/L de ergosterol. Se determinó la hidrofobicidad (HD) de las células durante la fermentación del mosto y en la fase de velo en mosto y en vino. Los resultados obtenidos indican que la formación de velo se relaciona con cambios en la HD (Tabla 12). La HD registrada en las células crecidas en YPD y durante la fase fermentativa en mosto se mantiene aproximadamente con valores similares (21%). Cuando se

formó el velo en el mosto fermentado (grado alcohólico de 10.5% v/v), la HD de la superficie celular aumentó ligeramente (desde el 21% en YPD hasta aproximadamente el 28%). Sin embargo, es en la fase de velo en S/T (15.5% v/v de etanol) cuando la HD aumenta sustancialmente (aproximadamente 40%).

Este aumento en la HD no parece deberse a un aumento en componentes lipídicos de la pared celular (Fleet, 1991). La adición de ácido oleico y/o ergosterol al mosto y al vino no se tradujo en un aumento de la HD (Tabla 12). En la Fig. 9 se representan los valores relativos de la HD de la superficie celular de la cepa B16 en mosto y en vino con o sin la adición de ácido oleico y/o ergosterol comparados con la HD en YPD que se considera la unidad. No se observan diferencias significativas entre el control y los medios suplementados.

Además, si el aumento de la HD de la superficie celular debido a cambios en su composición lipídica fuese un prerrequisito para la formación de velo, la adición de ácido oleico y ergosterol podría acelerar el proceso. Sin embargo, no se observaron diferencias en el tiempo necesario para la formación de velo, tanto en mosto (10.5% v/v de etanol) como en el vino (15.5% v/v de etanol): la duración fue de 13 días en mosto y 17 en vino (media de seis cultivos).

Jimura *et al.* (1980a) también han manifestado una relación entre la hidrofobicidad y la formación de velo. Estos autores concluyen que la hidrofobicidad depende de la composición en ácidos grasos de la superficie celular (Jimura *et al.* 1980b).

Otros autores (Mauricio *et al.*, 1990; Mauricio *et al.*, 1991; Larue *et al.*, 1980) encuentran que la viabilidad de las células en el mosto de uva aumenta con la aireación y que dicho aumento se relaciona con un incremento en el contenido de esteroides y fosfolípidos que es dependiente de oxígeno. Además, el crecimiento de levaduras en condiciones anaeróbicas requiere ergosterol y ácidos grasos insaturados (Thomas *et al.*, 1978; Mauricio *et al.*, 1990). En este trabajo, la adición de ergosterol y/o ácido oleico al medio no aceleró la formación de velo ni provocó un

aumento en la hidrofobicidad.

TABLA 12: Cambios en el grado de hidrofobicidad (HD%) de la superficie celular de la cepa B16 cultivada en diferentes condiciones.

Condiciones	Control	+ Ergosterol (5 mg/L)	+ Oleico (5 mg/L)	+Ergosterol y oleico (5 mg/L)
YPD	21 %	ND ^a	ND	ND
MOSTO FERMENTANDO:				
Azucar residual (g/L): 170	25 %			
87	23 %	ND	ND	ND
50	18 %			
4	20 %			
MOSTO FERMENTADO (10.5% v/v etanol, 0 g/L azucar)	26 %	21 %	25 %	26 %
FASE DE VELO EN MOSTO (10.5% v/v etanol, 0 g/L azucar)	28 %	25 %	30 %	ND
FASE DE VELO EN VINO (15.5% v/v etanol)	41 %	35 %	34 %	49 %

^a ND: no determinado.

Los resultados son la media de 3 experimentos con desviaciones típicas menores del 15%.

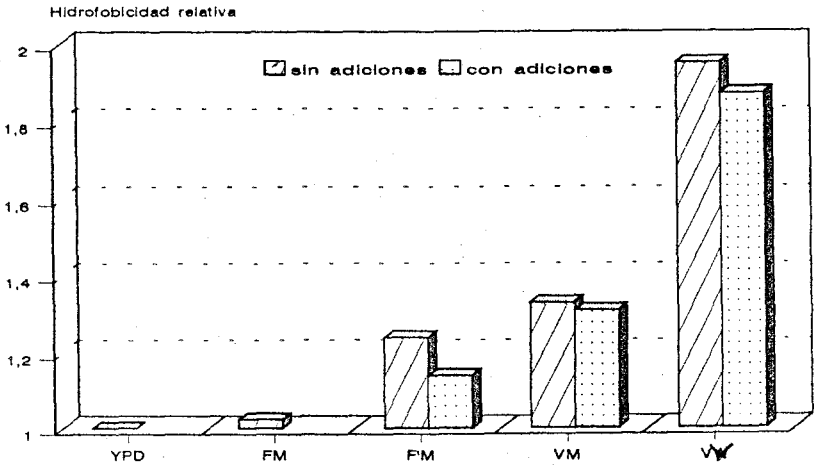
Se ha propuesto (Straver *et al.*, 1993) que los componentes hidrofóbicos de la superficie celular están implicados en diferentes mecanismos microbianos de adhesión, tales como la adhesión de las células de levaduras a las burbujas de CO₂ en la elaboración de vinos y la floculación.

La floculación requiere la secreción de proteínas (lectinas) a la superficie celular (Stratford, 1992a, 1992b; Teunissen *et al.*, 1993). El análisis de las proteínas de la pared celular pone de manifiesto la acumulación de una proteína

de 37 KDa implicada en la floculación (Fernandes *et al.*, 1993) mientras que la hidrofobicidad celular aumenta justo antes del comienzo de la floculación (Straver *et al.*, 1993). Los genes implicados en la floculación son distintos de los implicados en la formación de flor, ya que cruces entre cepas con capacidad de flocular y formar velo dan segregaciones diferentes para ambos caracteres (Jiménez, 1986).

Además, recientemente se han caracterizado otras proteínas implicadas en la adhesión a superficies fuertemente hidrofóbicas que se localizan externamente y que alteran la hidrofobicidad de las células (Templeton *et al.*, 1994).

FIGURA 9: Hidrofobicidad celular (valores relativos) de las células crecidas en YPD (fase estacionaria), fermentando en mosto (FM), en mosto fermentado (F'M), en fase de velo en mosto (VM) y en fase de velo en S/T (VV); con o sin la adición de ácido oleico y/o ergosterol.



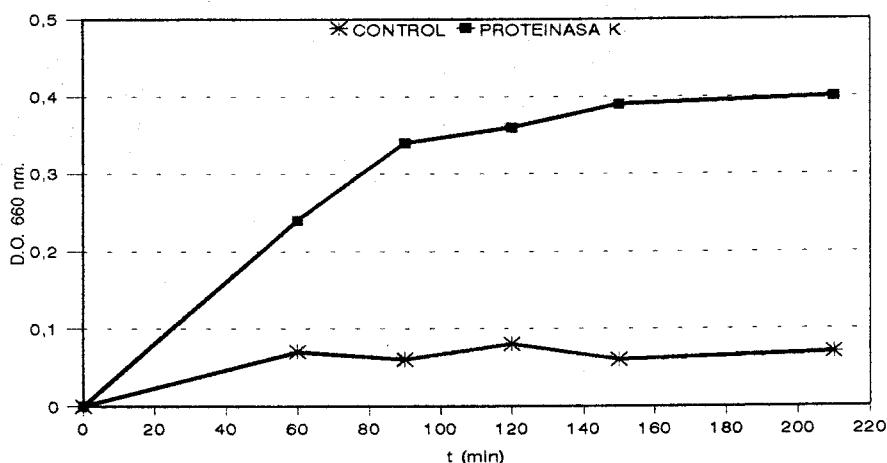
4.2.5. EFECTO DE LA PROTEINASA K EN EL VELO DE FLOR.

Ante la posibilidad de que el aumento de la hidrofobicidad durante la formación de velo se debiera a la presencia en la pared celular de proteínas hidrofóbicas en vez de lípidos, se ha llevado a cabo un tratamiento con proteasa.

La proteínasa K destruye el velo de flor, separando a las células individualmente, como indica el incremento registrado en la D.O a 660 nm (Fig. 10).

El ligero aumento observado en la D.O en el control se debe a la agitación a la que estuvieron sometidos los cultivos durante la incubación a 30°C.

FIGURA 10: Separación del velo de flor de las células libres por efecto de la proteinasa K.



La separación de las células del velo de flor por efecto de la proteinasa K, sugiere que el aumento registrado en la hidrofobicidad de las células en fase de velo podría deberse a la síntesis de proteínas hidrofóbicas en lugar de lípidos.

4.2.6. MORFOLOGÍA CELULAR EXTERNA E INTERNA EN FASE DE VELO vs FASE FERMENTATIVA.

Se observaron al microscopio electrónico de barrido y de transmisión células de la cepa B16 en fase fermentativa en mosto y en fase de velo en vino (S/T 15.5% etanol). Las células en fase fermentativa son más pequeñas y redondas que las células en fase de velo las cuales son más alargadas (25% más largas) y ovoides (Fig. 11). Cruess (1948), por el contrario, afirma que las células en fase filmógena son más pequeñas y granulares.

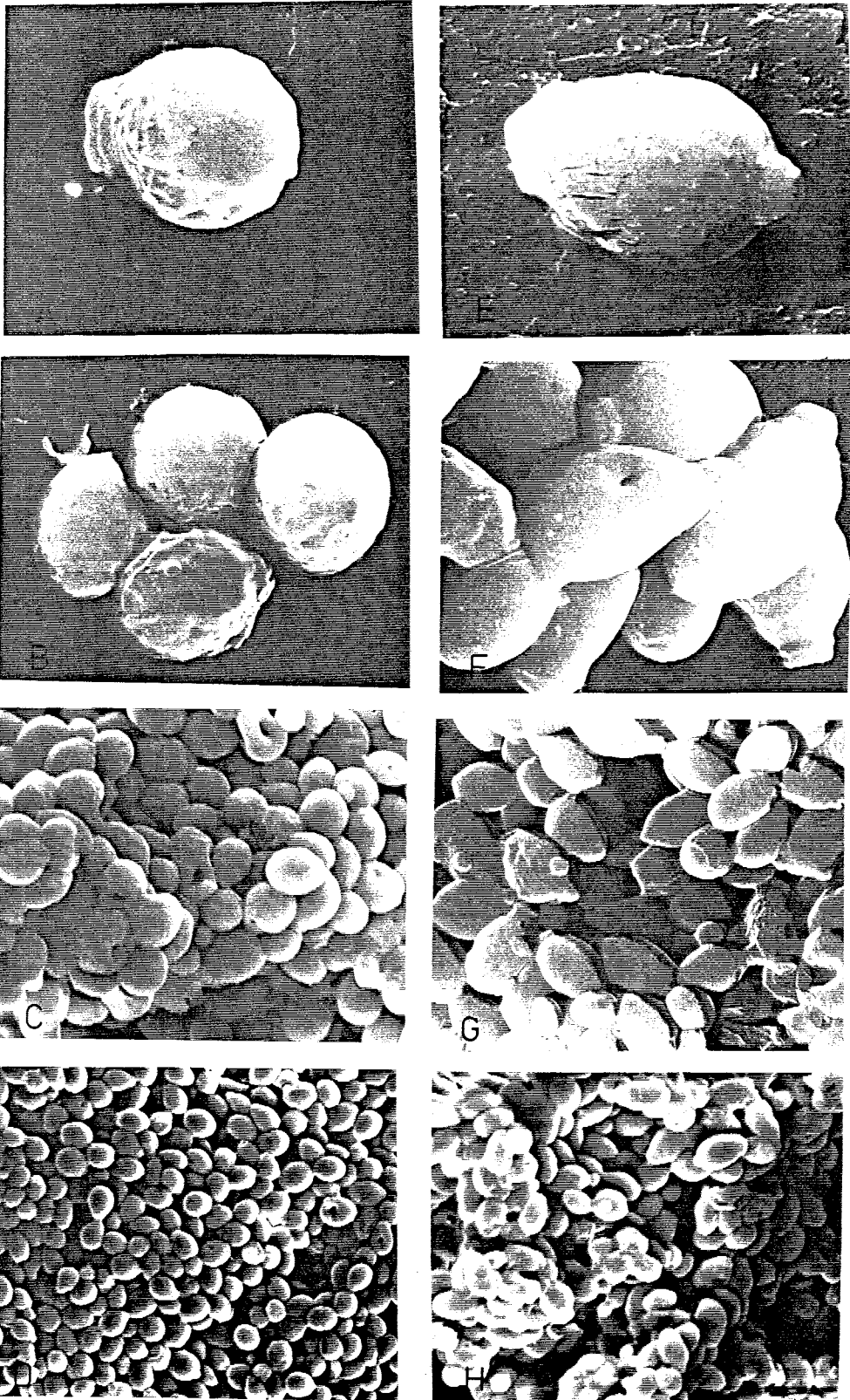


FIGURA 11: Aspecto de las células de la cepa B16 en fase fermentativa (A, B, C, y D) y en fase de velo (E, F, G y H); (A, 12.779x; B, 8.306x; C, 2.832x; D, 1.601x; E, 10.517x; F, 8.860x; G, 3.570x; H, 2.062x).

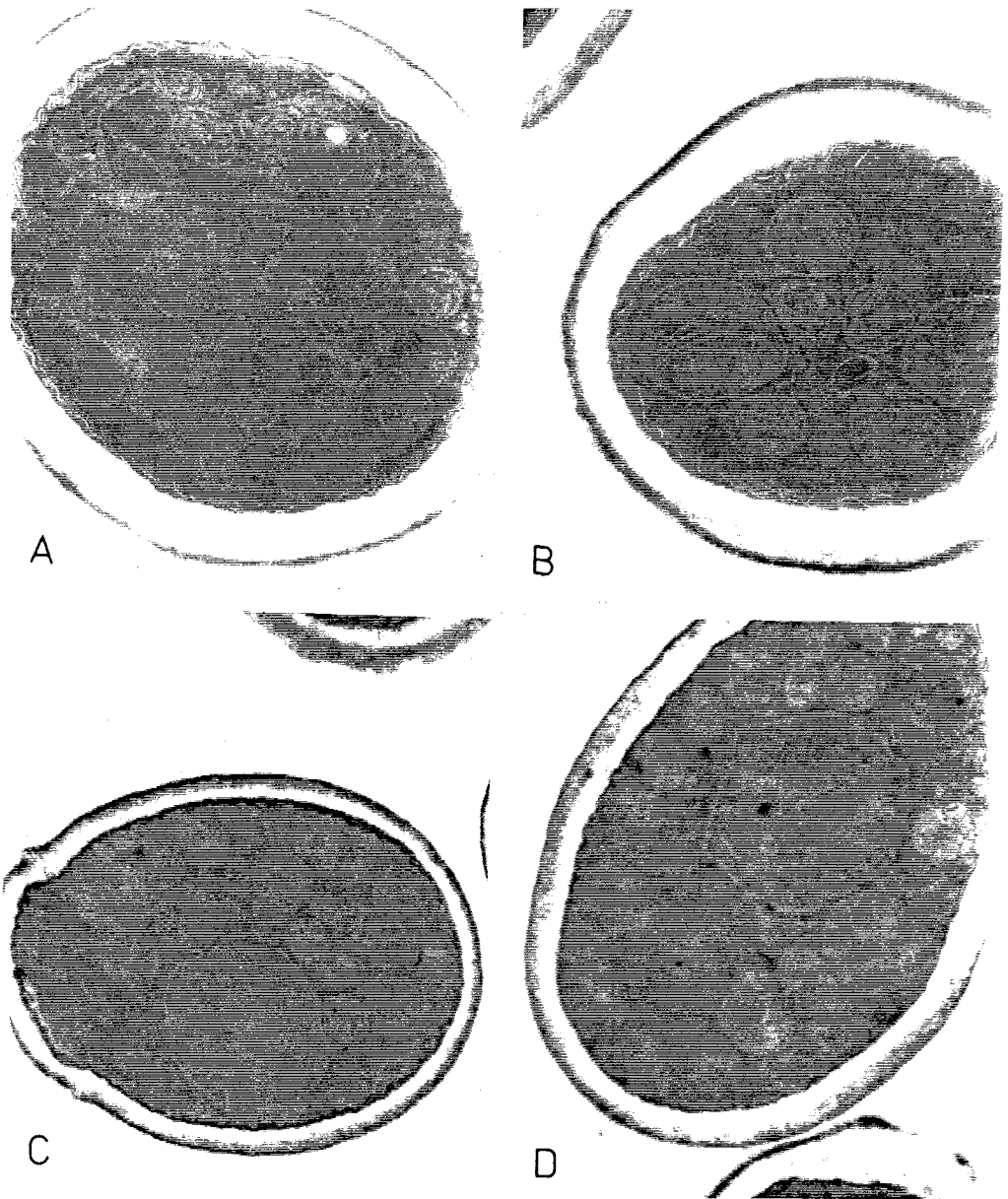


FIGURA 12: Secciones celulares de la cepa B16 en fase fermentativa (A y B) y en fase de velo (C y D); (A y B, 28.500x; C, 15.500x; D, 21.000x).



Cuando se observan secciones celulares al microscopio electrónico de transmisión la única diferencia que se detecta es que la pared de las células en fase de velo es más delgada que la de las células fermentando. No se visualizan ninguna otra estructura especial. Las células en ambas fases presentan un gran número de mitocondrias (8-10/sección), indicando un fuerte metabolismo oxidativo (Fig. 12).

Al igual que en la formación de flor, en la formación de biofilmes la hidrofobicidad de la superficie celular también está implicada tanto en la adhesión de las células a la matriz como en la adhesión entre los microorganismos (Straver *et al.*, 1992). Sin embargo, mientras que la observación al microscopio electrónico de los biofilmes revela la existencia de una matriz de exopolisacáridos (Costerton *et al.*, 1994), en la observación microscópica del velo no se observa ninguna estructura externa o interna específica diferenciadora de las células en estado no-filmógeno.

4.2.7. DENSIDAD (FLOTABILIDAD) CELULAR DEL VELO DE FLOR.

El hecho de que el velo "flote" en la superficie del medio, sólo se explica por el hecho de que sea menos denso. Esta menor densidad podría deberse a la existencia de vesículas gaseosa intra o intercelulares. Para comprobar esta hipótesis, se recogieron aproximadamente 100 ml de velo de flor y se introdujo en un recipiente con cierre hermético de 250 ml. El volumen restante se ocupó con vino que se introdujo suavemente hasta que el recipiente quedó completamente lleno sin aire alguno. Se formaron dos fases claramente diferenciadas, la inferior formada por el vino y la superior por las células en fase filmógena. El matraz se introdujo en un baño de ultrasonidos. Al cabo de 2 horas, se habían formado tres zonas (Fig 13). Algunas células cayeron al fondo del recipiente y otras se quedaron "flotando" en la superficie. Cuando se observaron las células al microscopio, aquellas en la superficie formaban agregados mientras que las del fondo estaban separadas individualmente. El ultrasonido rompe las uniones intercelulares en el velo, separando a las células individuales que caen al fondo. Estos resultados indican que son los agregados los que poseen una menor densidad.

En la fase superior, atrapadas en el velo se observaron burbujas gaseosas. Ésto agregados celulares se formarían por interacciones hidrofóbicas entre las células. Este entramado, así formado, dificultaría el paso de microburbujas gaseosas que quedan atrapadas en su interior, haciéndose menos densos que el medio y flotando por tanto en la superficie. Cuando se observaron secciones de células en fase filmógena al microscopio electrónico de transmisión no se detectó ningún tipo de vesículas gaseosas intracelulares que podrían haber explicado la menor densidad de las células en fase de velo con respecto a las células en fase fermentativa. Por otra parte, tras sonicar las células individuales caen, confirmando que éstas por separado son más densas que los agregados.

FIGURA 13: Aspecto del velo después de sonicar (40 Hz) durante dos horas.



Para comprobar que efectivamente estos agregados celulares atrapan burbujas gaseosas se llevó a cabo la siguiente experiencia. Un velo formado en la superficie de un vino contenido en un quitasato se agitó suavemente, de manera que al fondo cayeron trozos de velo. Otro quitasato, se sometió a ultrasonido y se agitó energicamente para disgregar totalmente a las células que formaban el velo. Posteriormente, estos dos quitasatos se sometieron a vacío con una bomba de agua. Los trozos de velo (de sólo el primer quitasato) subieron a la superficie mientras que las células individualmente disgregadas permanecieron en el fondo. Al haberse producido una depresión en la atmosfera del recipiente las burbujas gaseosas atrapadas entre las células que integran los agregados se expanden, disminuyendo la densidad de estos agregados y subiendo a la superficie. Si existieran vesículas gaseosas intracelulares, las células individuales también habrían ascendido a la superficie. El vacío se mantuvo durante 10 horas no observándose cambio alguno.

Paralelamente, se tomaron muestras de velo en buen estado (blanco, completo y plegado) de tres botas en la bodega. Tras agitar suavemente, se determinó la viabilidad por tinción con azul de metileno de las células que habían caído al fondo y de las que se habían quedado formando velo en la superficie (flotando). Posteriormente, se agitó energicamente para homogenizar la muestra y se determinó la viabilidad global. Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla 13.

TABLA 13: Viabilidad de las células de velo sedimentadas y de las células "flotando" tras agitar el cultivo y viabilidad global de la muestra.

Botas	Porcentaje de células vivas (%):		
	Global	Flotando	Fondo
Nº 1	50	70	46
Nº 2	53	69	36
Nº 3	70	72	41

Los resultados son la media de tres conteos por muestra. La desviación típica fue menor del 8%.

Se observa una mayor tendencia de las células muertas a caer mientras que las células vivas tienen más "flotabilidad", la viabilidad de las células que quedan en la superficie tras ser agitado el velo es superior (diferencias de 20, 16 y 2% en las tres muestras respectivamente) a la viabilidad global de la muestra

4.2.8. LIOFILIZACIÓN.

Con el fin de averiguar si las cepas pueden mantenerse como velo liofilizado para así, en caso necesario, regenerarlo en el menor tiempo posible (la formación de velo es más rápida cuando el inóculo se realiza a partir de velo ya formado (Fig. 8) se ha realizado la siguiente experiencia. Las cepas B2, B16 y CH15 se recogieron en fase fermentativa en mosto y en fase de velo en vino y se liofilizaron bajo las condiciones descritas en métodos.

La viabilidad inicial de las suspensiones celulares sin liofilizar era de 10^8 céls viables/ml. La supervivencia después de liofilizar de las células en fase fermentativa varió entre 1×10^{-3} (liofilizadas en glucosa) y 1×10^{-5} (liofilizadas en agua destilada). Sin embargo, no se recuperó ninguna célula viable cuando éstas se liofilizaron a partir de velo. Los resultados fueron similares en todas las cepas. El hecho de que la misma cepa bajo las mismas condiciones de liofilización de una supervivencia de 1×10^{-4} en fase fermentativa (sin lavar) mientras que en fase de velo la supervivencia esté por debajo de 1×10^{-8} indica cambios en la composición, además de los cambios ya descritos en la forma, tamaño e hidrofobicidad de la superficie celular.

4.2.9. VITAMINAS ESENCIALES PARA LA FORMACIÓN DE VELO Y EFECTO DE LA ADICIÓN DE ÉSTAS AL VINO.

Según los resultados anteriores, ninguna cepa crece en 15% (v/v) de etanol pero sin embargo las células sobreviven, modifican la forma y el tamaño celular, su superficie se hace más hidrofóbica y al cabo de cierto tiempo colonizan

la superficie del líquido formando inicialmente unos islotes ténues que posteriormente crecen uniéndose y formando un velo completo. Cabría, por lo tanto, esperar que este proceso requiera consumo de energía y dependa de la disponibilidad de factores esenciales tales como vitaminas. Todas las cepas de levaduras de velo son auxótrofas para la biotina y las cepas de *S. rouxii* también lo son para el *myo*-inositol (apartado 4.1.3.1.2). Sin embargo, cuando se adicionaron las vitaminas al medio sintético MME (15% v/v etanol) el pantotenato resultó ser la única vitamina esencial para la formación de velo aunque con la ausencia de la biotina y del inositol sólo se observaron islotes en lugar de un velo completo (Tabla 14). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Khayyat *et al.* (1980) y por Castor y Archer (citado por Kunkee y Amerine, 1970). El que las levaduras de velo sean auxótrofas para la biotina y sin embargo no requieran dicha vitamina para formar velo, se explica por el hecho de que a 15% (v/v) de etanol las células no se dividen hasta que no colonizan la superficie del medio en forma de islotes. Para que estos islotes crezcan y formen un velo completo sí es necesario que la biotina esté presente en el medio.

Otros autores, estudiando la formación de velo en medio sintético afirman que no es posible el desarrollo del mismo en medios privados de biotina (Saavedra y Garrido, 1962; Iimura *et al.*, 1980a) y que dicha vitamina promueve la hidrofobicidad (Iimura *et al.*, 1980a).

TABLA 14: Vitaminas esenciales para la formación de velo de algunas cepas de levaduras de flor.

CEPAS	TODAS LAS VITAMINAS	NINGUNA VITAMINA	TODAS MENOS:				
			BIOTINA	TIAMINA	PANTOTENATO	INOSITOL	PIRIDOXINA
B16	CT ¹	-	I	PT	-	I	PT
CH15	CT	-	I	PT	-	I	PT
M17	CT	-	I	PT	-	I	PT
R13	CT	-	I	PT	-	I	PT

¹ CT: velo completo y ténue; PT: velo parcial y ténue; I: islotes; -: no se formó velo después de 50 días a 25°C desde la inoculación.

Cuando se adicionaron al vino las vitaminas una a una para estudiar el efecto en la formación de velo se obtuvieron resultados contradictorios. En una de las experiencias, la piridoxina aceleró la formación de velo en todas las cepas estudiadas (B16, CH15 y M17), y en algunas cepas (B16 y M17) la adición de biotina la retrasó con respecto al control negativo (Tabla 15). Sin embargo, estos resultados no fueron repetitivos ya que cuando se utilizó otro S/T a la misma graduación alcohólica no se observaron diferencias significativas entre las distintas adiciones. En el control positivo (suplementado con todas las vitaminas) siempre se obtuvo un efecto acelerador con respecto al control negativo (ninguna vitamina añadida). El efecto estimulante de suplementar al vino con factores vitamínicos dependerá de los niveles que éste ya posea, ya que incluso a veces el exceso de alguna vitamina puede retrasar la formación de velo.

TABLA 15: Efecto de la adición de vitaminas al vino en la formación de velo de distintas cepas de levaduras de flor.

CEPAS	VITAMINAS ADICIONADAS AL VINO:						
	TODAS	NINGUNA	BIOTINA	TIAMINA	PANTOTENATO	INOSITOL	PIRIDOXINA
B16	15 ^a	18	19	19	16	15	12
CH15	15	19	19	15	15	15	12
M17	17	20	25	22	18	17	15

^a Días que tardó en formarse un velo completo y ténue en la superficie.

Los datos encontrados en la bibliografía son también contradictorios. Así algunos autores encuentran que la biotina suplementada al vino tiene un efecto estimulante en la formación de velo (Cruess, 1948; Bravo, 1986). Freiberg y Cruess (1955), por el contrario no observaron con ninguna de las vitaminas adicionadas (tiamina, riovflavina, inositol, biotina y ácido fólico) algún efecto estimulante. Saavedra (1959) llega también a la conclusión de que un determinado factor sólo estimulará la formación de velo en un medio que sea deficitario en él, pero si ya se

encuentra en las cantidades requeridas, un exceso sobre ellas no afecta al velo o lo hace desfavorablemente.

4.2.10. EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO EN LA FORMACIÓN DE VELO A DISTINTO GRADO ALCOHÓLICO.

Las cepas M17, M10, B16, CH15 y R13 se inocularon en mosto fermentado y alcoholizado (14.8% v/v de etanol) o no (10.6% v/v de etanol), al que se le había añadido glucosa en concentraciones crecientes. Cuando la superficie del tubo estuvo cubierta por un velo completo y ténue, se analizó la cantidad de azúcares residuales. De nuevo, los resultados, expresados en la Tabla 16 ponen de manifiesto diferencias en el tiempo requerido para la formación del velo por las distintas cepas de levaduras de flor. Sin glucosa añadida y con 10.6% (v/v) de etanol, el tiempo varía de 3 días en la cepa B16 a 13 en las cepas M17 y R13. A la graduación alcohólica de 14.8% (v/v), el tiempo requerido para la formación de velo aumenta a 5 días en la B16 mientras que las cepas M17 y R13 no formaron velo después de 30 días.

El tiempo disminuye considerablemente en aquellas cepas más lentas (M10, M17 y R13) cuando hay glucosa en el medio, de manera que el aumento en la concentración de glucosa resulta en una progresiva reducción del tiempo requerido para la formación del velo. Incluso las cepas M10, M17 y R13 que no formaron velo en 14.8% (v/v) de etanol después de 30 días, lo hicieron a los 11, 18, 13 días respectivamente cuando se añadió 20 g/L de glucosa. En todos los casos, el velo se formó cuando la glucosa se había consumido en más del 95%.

TABLA 16: Efecto en la formación de velo de la adición de concentraciones crecientes de glucosa a distinto grado alcohólico.

FORMACIÓN DE VELO (DÍAS)

GLUCOSA AÑADIDA (g/L)	10,6% (v/v) etanol					14,8% (v/v) etanol				
	CEPAS					CEPAS				
	M17	M10	B16	CH15	R13	M17	M10	B16	CH15	R13
0	13	12	3	4	13	- ^a	-	6	6	-
2	11	11	3	3	13	-	18	5	5	16
5	14	16	3	3	11	-	14	5	5	14
10	10	9	3	3	10	19	13	5	5	14
15	10	9	3	3	10	18	13	7	7	14
20	11	9	3	4	8	18	11	5	6	13

^a: No se formó velo después de 30 días.

Cuando se formó el velo la glucosa se había consumido completamente (más del 95%).

4.2.11. EFECTO DE ALGUNAS PRÁCTICAS ENOLÓGICAS EN LA ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA.

El desfangado, la clarificación y filtración de los mostos son prácticas introducidas en el sistema operativo de vinificación con el objeto de obtener una mayor estabilidad fisico-química de los vinos resultantes. Con estas prácticas se reduce considerablemente la cantidad de sólidos en suspensión en los mostos, consiguiéndose una menor extracción de la materia polifenólica y metálica presente en las partes sólidas de la uva, y evitándose en gran medida el remontado u oxidación futura de los vinos. Con objeto de estudiar el posible efecto de dichas prácticas en los procesos microbiológicos de fermentación y crianza biológica se han llevado a cabo las siguientes experiencias.

4.2.11.1. Efecto del defangado y filtración de mostos y burbas en la cinética fermentativa:

Con objeto de simular en lo posible las condiciones dadas en el proceso a escala industrial, se ha llevado a cabo una fermentación dirigida de los mostos y burbas descritos en métodos que contenían concentraciones diferentes de sólidos en suspensión (Tabla 17).

TABLA 17: Concentración de sólidos en suspensión de los mostos y burbas con diferentes tratamientos.

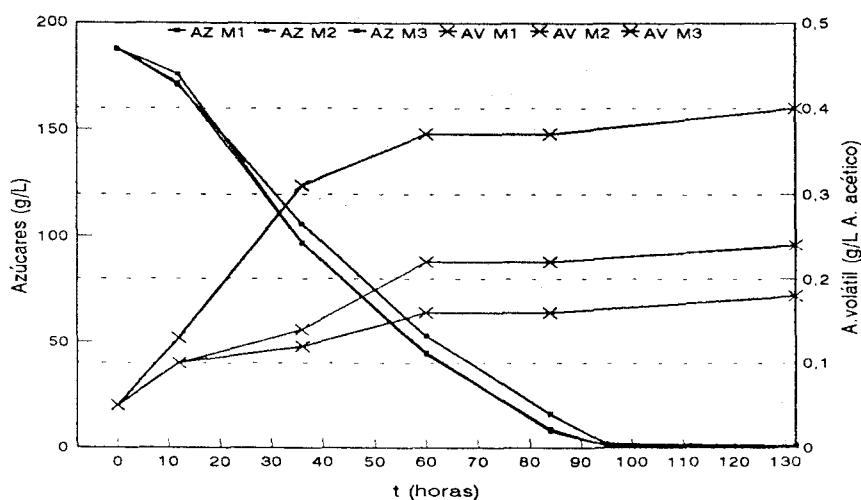
	CONCENTRACIÓN SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN (g/L)
<u>MOSTOS:</u>	
Sin defangar	5
Defangado	1.1
Defangado-filtrado	0
<u>BURBAS:</u>	
Sin filtrar	57
Filtradas	0

El consumo de azúcares y la producción de acidez volátil se representan en Fig. 14. En los tres casos, la velocidad de fermentación es similar, los niveles de azúcares residuales a los 6 días de la fermentación fueron menores de 2 g/L. Se observa una producción diferencial de la acidez volátil, de manera que cuanto mayor es la cantidad de sólidos en suspensión menor es la acidez volátil (0.41 g/L expresada como ácido acético en los mostos defangados y filtrado frente a 0.19 g/L en los mostos sin defangar).

A los mostos fermentados se les determinó el grado alcohólico final, concentración de acetaldehído, acetato de etilo, alcoholes superiores, glicerina y

ácidos orgánicos (Tabla 18). El grado alcohólico final fue similar en todos los casos (las diferencias obtenidas están dentro del error de determinación). La oxidación del ácido acético da como primer producto acetaldehído por lo que cabría esperar una relación directa entre el contenido obtenido en ácido acético y en acetaldehído. Sin embargo, fueron los mostos sin desfangan los que presentaron mayores niveles de acetaldehído y menor acidez volátil. Los niveles de alcoholes iso-amílicos y de glicerina resultaron tener una relación directa con la concentración de sólidos en suspensión. Con respecto al acetato de etilo, n-propanol, metanol y al iso-butanol no se observaron diferencias significativas.

FIGURA 14: Fermentación dirigida por adición de un pie de cuba de mostos con diferente concentración de sólidos en suspensión.



M1: mosto sin desfangan (5 g/L sólidos en suspensión); M2: mosto desfanganado (1.1 g/L); M3: mosto filtrado (0 g/L); AZ: azúcares residuales; AV: acidez volátil.

Con respecto a los ácidos orgánicos se observa una mayor concentración de málico y succínico cuanto mayor es la concentración de sólidos en suspensión. El contenido en ácido cítrico y láctico es prácticamente el mismo en los tres casos.

TABLA 18: Concentración de algunos compuestos tras la fermentación de un mosto de primera yema sin desfangar, desfangado y desfangado-filtrado.

	Sin desfangar	Desfangado	Desfangado y filtrado
Acidez volátil (g/L)	0.19	0.25	0.41
Azúcares (g/L)	1.7	1.4	1.4
Grado alcohólico (% v/v)	10.6	10.8	10.7
Acetaldehido (mg/L)	163	54	67
Acetato de etilo (mg/L)	23	23	27
Metanol (mg/L)	31	32	36
N-propanol (mg/L)	15	15	16
Iso-butanol (mg/L)	27	25	31
Iso-amflicos (mg/L)	236	189	164
Glicerina (g/L)	7.3	6.5	6.2
A. cítrico (g/L)	0.74	0.77	0.64
A. málico (g/L)	0.07	0.15	0.24
A. succínico (g/L)	0.52	0.68	0.89
A. láctico (g/L)	0.11	0.12	0.13

Resultados obtenidos a los 6 días desde la inoculación. Los resultados son la media de tres experimentos con desviaciones típicas menores del 10%.

Los resultados obtenidos tras la fermentación de las burbas filtradas o no, confirman los resultados anteriores. Como puede observarse en la Tabla 19, en las burbas sin sólidos en suspensión la acidez volátil es el doble que la de las burbas filtradas. Los fermentados con menor acidez volátil son los que poseen mayores niveles de acetaldehido y de iso-amflicos, aunque las diferencias obtenidas no son tan altas como en el caso de los mostos.

TABLA 19: Concentración final obtenida de algunos compuestos tras la fermentación de burbas filtradas y sin filtrar.

	Burbas sin filtrar	Burbas filtradas
Acidez volátil (g/l)	0.22	0.41
Azúcares (g/L)	1.6	2.3
Grado alcohólico (% v/v)	10.3	10.6
Acetaldehido (mg/L)	154	121
Acetato de etilo (mg/L)	23	33
Metanol (mg/L)	54	44
N-propanol (mg/L)	24	18
Iso-butanol (mg/L)	39	35
Iso-amflicos (mg/L)	199	148

Resultados obtenidos a los 6 días desde la inoculación. Los resultados son la media de tres experimentos con desviaciones típicas menores del 10%.

En trabajos realizados con otros tipos de vinos también se obtuvo que el desfangado y la clarificación traen consigo un aumento en la acidez volátil de los vinos resultantes (Larue y Froudiere, 1989; Delfini *et al.*, 1993; Delfini y Costa, 1993; Alexandre *et al.*, 1994). Estas prácticas conllevan una fuerte disminución de los ácidos grasos y esteroides presentes en los mosto necesarios para la síntesis de las membranas de las células de levaduras. Por tanto, la levadura tiene que sintetizarlos a partir del ácido pirúvico, vía acetil- CoA. La biosíntesis de ácidos grasos insaturados y esteroides es un proceso aeróbico. Durante la segunda fase de la fermentación las condiciones son prácticamente anaeróbicas, inhibiéndose la síntesis de ácidos grasos y esteroides. Bajo estas condiciones se acumula acetil-CoA y ácidos grasos de cadena corta. El acetil-CoA se hidroliza originando ácido acético (Delfini *et al.*, 1993).

4.2.11.2. Efecto de la naturaleza del S/T sobre la formación de velo:

La cepa B16 se inoculó en vino (S/T) procedente de la fermentación de diferentes tipos a los que se le adicionó etanol hasta elevarle el grado a 15.5% (v/v). Se incubó a 25°C y se determinó el tiempo que tardó en formarse el velo. Los mostos utilizados fueron los siguientes:

- 1.- **A:** mosto de 1ª yema procedente del pago de Macharnudo y cosechado manualmente.
- 2.- **B:** mosto de 1ª yema procedente de otros pagos asociados y cosechados manualmente.
- 3.- **C:** mosto de 1ª yema procedente del pago de Macharnudo y cosechados mecánicamente.
- 4.- **D:** fangos o burbas originados en el desfangado del mosto del tipo A.

El tiempo requerido para la formación de velo fue el mismo en los tres tipos de vinos procedente de los mostos A, B y C (12 días). Sin embargo, en las burbas (D) fermentadas y alcoholizadas el velo tardó en formarse una media de 8 días.

La aceleración en la formación de velo en las burbas no parece deberse, o al menos totalmente, al mayor contenido en ácidos grasos insaturados de cadena larga y esteroides ya que la adición de ácido oleico y/o ergosterol no aceleró la formación de velo (apartado 4.2.4). Con objeto de estudiar si esta diferencia se debía a que las burbas poseen mayor cantidad de nitrógeno asimilable, se estudió la formación de velo en los vinos procedentes de los mostos A, B y C adicionados con: sulfato amónico, 1 g/L; extracto de levadura, 1 g/L y 5 g/L. No se observó una disminución en el tiempo requerido para formarse el velo, debiendo ser otro u otros compuestos presentes en las burbas los que ejerzan este efecto estimulante del velo.

4.3. METABOLISMO DE LAS LEVADURAS DE VELO DE FLOR.

Durante la crianza biológica en sistemas industriales conviven varias especies de levaduras y bacterias (Bravo, 1986). En este apartado se ha querido caracterizar específicamente el papel llevado a cabo por las levaduras de velo en la crianza biológica, determinar las diferencias en el metabolismo de los distintos componentes del vino entre las distintas especies de levaduras encontradas y seleccionar aquellas cepas idóneas para realizar una "crianza biológica dirigida". Se ha llevado a cabo una experiencia de cultivo biológico bajo velo en fermentadores de 5 L de capacidad, conteniendo 4.5 L de S/T y registrando una superficie específica de 0.057 cm^{-1} (relación superficie/volumen). Estos fermentadores se inocularon con cultivos puros de 6 cepas de levaduras pertenecientes a distintas especies, *S. beticus* (B2, B3 y B16), *S. montuliensis* (M10), *S. cheresiensis* (CH15) y *S. rouxii* (R13) (cada cepa por duplicado). Se estableció un seguimiento del contenido de numerosos compuestos en estos cultivos, comparándose con la evolución de los mismos en solerajes industriales.

NOTA: Uno de los cultivos correspondientes a la cepa B3 perdió el velo de flor a partir del tercer mes de la experiencia; y se siguió analizando de igual manera que los demás, ya que sirvió como referencia.

4.3.1. ETANOL Y GLICERINA

4.3.1.1. Consumo de etanol registrado en solerajes industriales:

Se ha determinado el alcohol consumido en 8 solerajes industriales, cada uno de ellos compuesto por cuatro escalas de envejecimiento (sistema de envejecimiento dinámico) y el sobretabla que los rocía (sistema estático) (Tabla 20). Las botas que componen estas escalas tienen una capacidad aproximada de 500 L que se llenan de vino hasta un máximo de 450 L, con el fin de dejar una zona importante de vacío.

Teniendo en cuenta este volumen y las dimensiones de las mismas, se ha estimado una superficie específica de $0,016 \text{ cm}^{-1}$.

TABLA 20: Tiempo medio de crianza bajo velo de flor de las distintas escalas de envejecimiento que componen los solerajes.

Escala de envejecimiento	Tiempo medio de crianza (años)
Sobretablas (S/T)	1
3 ^a Criadera (3 ^a CRA)	2
2 ^a Criadera (2 ^a CRA)	3
1 ^a Criadera (3 ^a CRA)	4
Solera	5

Siete de estos solerajes se ubican en una misma bodega de crianza (A) y el octavo en otra (B). Los valores del consumo de alcohol por bota de 500 L y año de crianza producidos en cada escala de los solerajes se calculó sumando al alcohol necesario para reponer el grado de la escala correspondiente hasta 15.5 % (v/v), el consumido y no detectado por el efecto de la merma. La merma es la pérdida que se registra por transpiración del vino a través de la madera de la bota y por evaporación a través de la superficie. Debido a que generalmente las bodegas son lugares húmedos y frescos, a que las botas se encuentran tapadas y a la presencia de velo en la superficie del vino en contacto con la atmósfera, es bastante más importante la "merma" establecida por transpiración a través de la madera de la bota que la efectuada por evaporación. El vino ha de traspasar una capa de madera, cuyo grosor puede variar de 3,5 a 5 cm., y existen componentes del vino que pasan más fácilmente a través de ella, es decir, se establece un efecto de separación cromatográfica por absorción a través de la madera, existiendo un paso preferencial de las moléculas de agua (Pérez, 1984). El aumento del contenido de alcohol que se produce a consecuencia de la merma se calculó teniendo en cuenta el aumento del grado alcohólico registrado (2,1 % v/v en 10 años) en un soleraje de amontillados durante su envejecimiento físico-químico, carente por tanto de actividad biológica (Tabla 21), lo que corresponde a un incremento en alcohol de 1,5 L/bota y año.

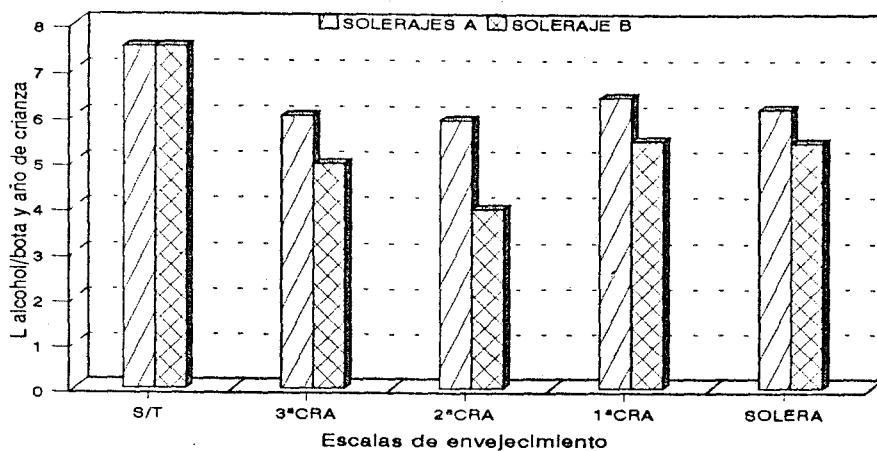
TABLA 21: Aumento del grado alcohólico determinado en un soleraje de amontillado durante su envejecimiento físico-químico.

Escalas	Edad (años)	Alcohol (v/v)
Añada	5	17.0
3 ^a CRA	7.5	17.3
2 ^a CRA	10	17.7
1 ^a CRA	12.5	18.4
Solera	15	19.1

El consumo de etanol, expresado como L/bota de 500 L y año de crianza, fue similar en todos los solerajes A (situados en la bodega A), sin embargo el consumo registrado en el soleraje B (situado en la bodega B) fue menor que en el caso anterior (Fig. 15). En el primer caso el consumo medio es de 6.1 L por bota y año de crianza y en el segundo de 4.9 L. Se observa un mayor consumo de alcohol en los sobretablas que corresponde en ambos casos a 7,5 L (aproximadamente un 25% más). No existen diferencias significativas en el consumo entre las distintas escalas que integran un mismo sistema dinámico (Solera, 1^a, 2^a y 3^a criadera). Aunque en el sistema de soleras, el consumo sea independiente de la vejez del vino, éste sufre fluctuaciones dependientes de la época del año pues el velo es más activo en primavera y otoño, ya que se ve favorecido por las condiciones climáticas. Por otra parte las operaciones de trasiego que se llevan a cabo en el sistema perturban el estado del velo, alterando el metabolismo de la flor del vino. Algunos autores determinan que este consumo puede alcanzar unos valores de hasta 9 L por bota y año de crianza (Suarez e Iñigo, 1990).

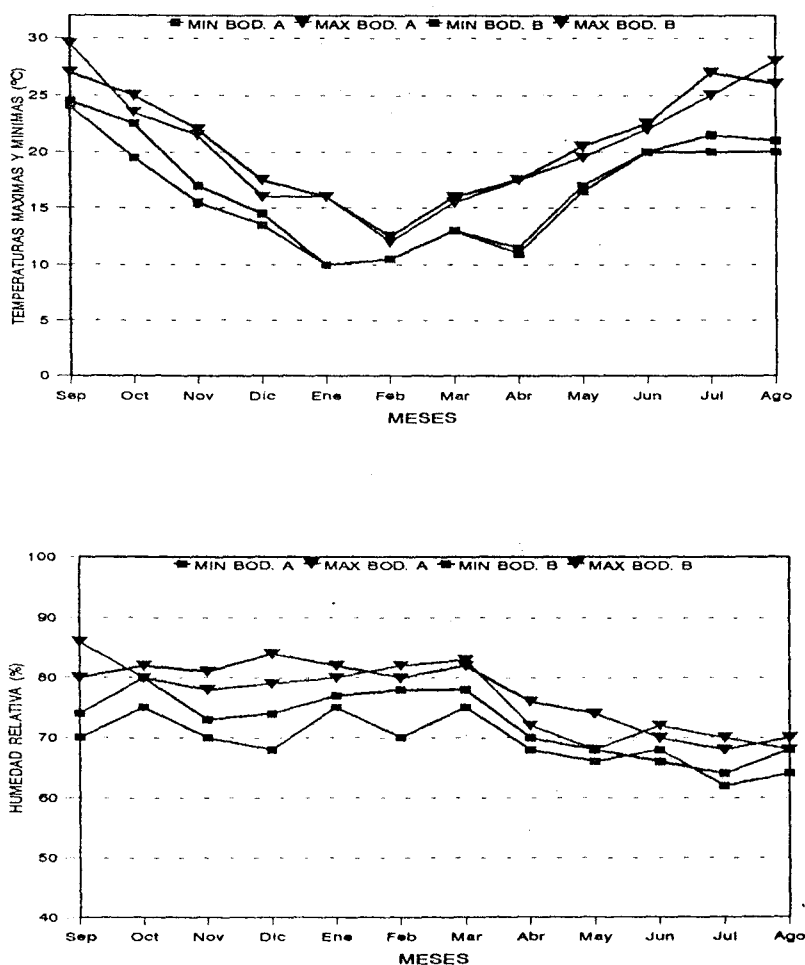
Las diferencias en el consumo entre los solerajes ubicados en la bodega A y el situado en B no se deben a diferencias en las condiciones climatológicas de las bodegas, como registra el seguimiento que a lo largo de un año se realizó de la temperatura y humedad de dichas bodegas (Fig. 16 A y B).

FIGURA 15: Consumo de etanol registrado en solerajes industriales.



Solerajes A: situados en una bodega A; Solerajes B: situados en una bodega B.

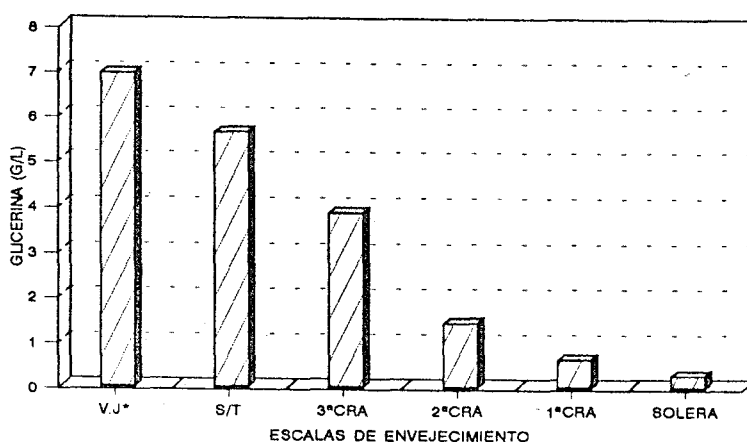
FIGURA 16: Condiciones ambientales de temperatura (A) y Humedad (B) registradas durante un año en la bodega A y en la bodega B.



4.3.1.2. Consumo de glicerina en solerajes industriales:

No se detectan diferencias significativas en el contenido en glicerina de los diferentes solerajes. Los valores medios en glicerina en los ocho solerajes de fino estudiados se representan en la Fig. 17. Durante la crianza biológica se va consumiendo de una forma regular la glicerina existente en el vino. El contenido en el vino joven alcoholizado antes de entrar en botas es de 6.94 g/L, disminuyendo en la solera hasta 0.27 g/L.

FIGURA 17: Contenido en glicerina en las diferentes escalas de envejecimiento integrantes de los solerajes industriales.



VJ*: vino joven encabezado a 15.5% v/v etanol.

4.3.1.3. Consumo de etanol durante la crianza con cultivos puros:

Los valores del grado alcohólico obtenidos durante la crianza en pureza con las cepas anteriormente citadas se describen en la Tabla 22. La referencia corresponde al cultivo que perdió la actividad biológica entre el segundo y tercer mes de la crianza. Como puede observarse en este cultivo la disminución sufrida por el grado alcohólico a partir del tercer mes es constante e igual a 0.1 % (v/v)/mes, (Tabla 22). Dicha pérdida se debe a la evaporación a través de la superficie.

El consumo de etanol en todas las cepas estudiadas durante el primer mes de crianza es superior al registrado en las fases posteriores. En los dos o tres últimos meses, dependiendo de cada cepa, el consumo alcanza valores mínimos (Fig. 18). Se deduce que la disminución del grado alcohólico está ligada con la fase biológica del velo. Es en la fase de formación de éste cuando se consume mayor cantidad de etanol. La fase de multiplicación celular requiere mayor gasto energético que la del mantenimiento del velo. Cuando el velo se va debilitando, se hace más ténue y se oscurece, el consumo de etanol se minimiza debido a que la actividad biológica disminuye.

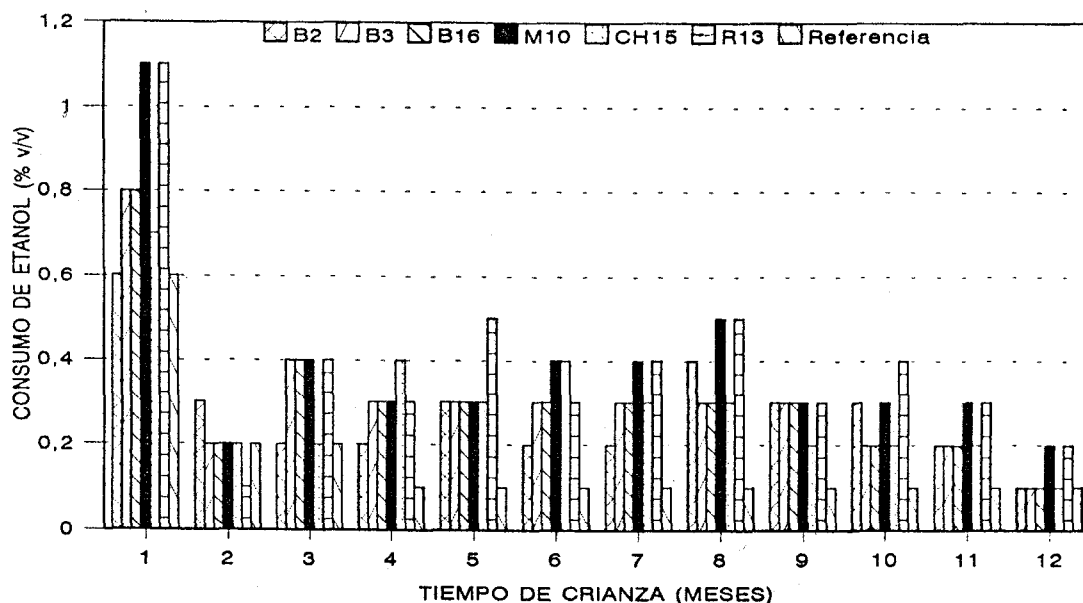
En los cultivos correspondientes a las cepas de *S. montuliensis* y de *S. rouxii* se registra un mayor consumo de etanol que en los de *S. beticus* y *S. cheresiensis* (Tabla 22 y Fig. 18). En el primer caso hubo un consumo total de 5% (v/v) y en el segundo de un 3.5% (v/v). En el cultivo referencia el grado alcohólico disminuyó 1.9% (v/v), del cual un 1% se debió a la actividad biológica inicial y 0.9% a las pérdidas por evaporación.

TABLA 22: Grado alcohólico (% v/v) del vino durante la crianza biológica con cultivos puros de las cepas B2, B3, B16, M10, CH15 y R13.

CEPAS	TIEMPO DE CRIANZA (MESES):												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B2	15.4	14.7	14.6	14.2	13.9	13.5	13.1	12.8	12.5	12.3	12.2	12.1	12.0
B3	15.1	14.5	14.2	14.0	13.8	13.5	13.3	13.1	12.7	12.4	12.1	11.9	11.8
B16	15.4	14.6	14.4	14.0	13.7	13.4	13.1	12.8	12.5	12.2	12	11.8	11.7
M10	15.3	14.2	14.0	13.6	13.3	13.0	12.6	12.2	11.7	11.4	11.1	10.8	10.6
CH15	15.4	14.7	14.5	14.3	13.9	13.6	13.2	12.9	12.6	12.4	12.2	12.0	11.9
R13	15.4	14.3	14.2	13.8	13.5	13.0	12.7	12.3	11.8	11.5	11.1	10.8	10.6
Ref.	15.4	14.8	14.6	14.4	14.3	14.2	14.1	14.0	13.9	13.8	13.7	13.6	13.5

Los resultados son la media de dos cultivos diferentes por cada cepa, con tres determinaciones por cada muestra. La desviación típica fue menor del 5%.

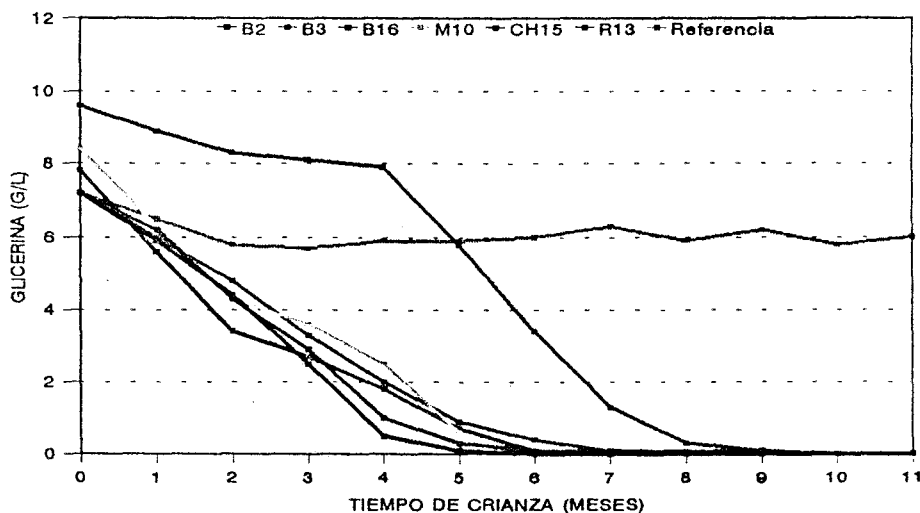
FIGURA 18: Consumo de etanol registrado por diferentes cepas de flor durante la crianza con cultivos puros.



4.3.1.4. Consumo de glicerina durante la crianza con cultivos puros:

El contenido en glicerina se agota hasta niveles de trazas en los cinco-seis primeros meses en todas las cepas estudiadas, excepto en el cultivo que perdió el velo en el 3er mes, a partir del cual permanece constante. No se observan diferencias en la velocidad de consumo de dicho compuesto entre las distintas cepas ensayadas (Fig. 19). La cepa B3 registró valores iniciales superiores a los registrados por las demás cepas debido a que el S/T de partida presentaba un contenido inicial de glicerina mayor y a que durante los cuatro primeros meses la actividad de dicha cepa fue mínima (el velo no cubría completamente la superficie).

FIGURA 19: Contenido en glicerina durante la crianza biológica con cultivos puros.



4.3.1.5. Consumo de glicerina a distinto grado alcohólico:

A los mostos fermentados (aproximadamente 12% v/v de etanol) se les subió la graduación alcohólica hasta 15.5% (encabezado). La glicerina es un componente muy indicativo del grado de crianza de un vino fino ya que durante la crianza biológica decrece constantemente. Se ha estudiado la influencia del grado alcohólico en la asimilación de la glicerina por parte de las levaduras y si se ejerce de igual forma para las especies *S. beticus* y *S. montuliensis*.

Se fermentó un mismo mosto con las cepas B16 (*S. beticus*) y M10 (*S. montuliensis*). Los mostos una vez fermentados (11.5% v/v etanol) se encabezaron con alcohol destilado de vino hasta alcanzar una graduación de 13.5% y 15% (v/v) respectivamente. Se incubaron a 25°C. Cuando en la superficie se formó un velo ténue y completo (aproximadamente a los 12 días a 11.5% v/v etanol, 25 días a 13.5% y 38 días a 15% v/v) se tomó la primera muestra. La segunda toma de muestras se realizó a los 7 días de la primera; la 3ª a los 10 días de la 2ª; la 4ª y la 5ª a los 20 días de las tomas anteriores. A dichas muestras se les determinó el contenido en etanol y en glicerina.

Los resultados obtenidos se representan en las Fig. 20 A, B y C. El consumo de etanol es máximo en todos los casos durante la fase de formación del velo, confirmándose los resultados obtenidos anteriormente. Sin embargo, el consumo de glicerina no es significativo durante la formación del velo (aproximadamente 0,2 g/L en todas las graduaciones y en ambas cepas), produciéndose dicho consumo una vez consolidado el velo. Se observa de nuevo que el consumo total de etanol a 15% (v/v) fue mayor en la especie *S. montuliensis* que en *S. beticus* (4.1% frente a 3.3% respectivamente). En las graduaciones inferiores, 11.5% y 13.8% el consumo total de etanol por ambas especies fue similar (3.4%).

Cuanto mayor fue el contenido de etanol más tiempo tardó en formarse el velo. En la Tabla 23 se expresa el consumo de etanol y de glicerina producidos en las distintas graduaciones alcohólicas en un mismo periodo de tiempo, el registrado una vez formado el velo (a partir de este momento todas las muestras se tomaron a intervalos de tiempo similares).

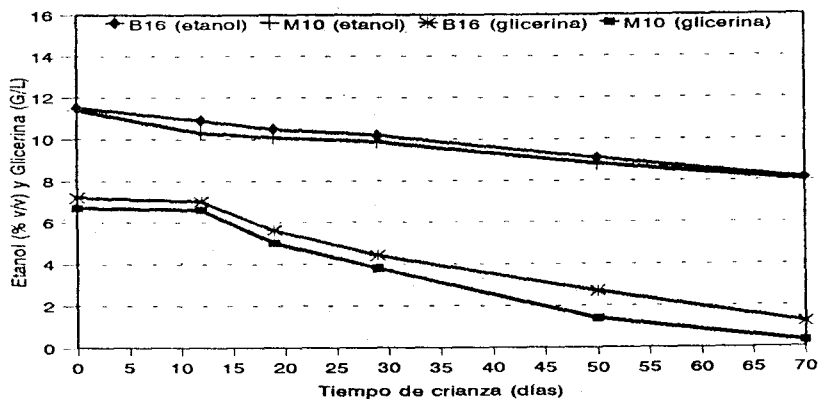
TABLA 23: Consumo de etanol y glicerina a distinta graduación alcohólica registrado una vez formado el velo.

CONSUMO:		GRADUACIÓN ALCOHÓLICA (% v/v):		
		11.5%	13.5%	15%
ETANOL (% v/v)	B16	2.8	2.5	2.4
	M10	2,3	2,9	2,7
GLICERINA (g/L)	B16	5,8	4,7	4,5
	M10	6,3	5,6	5,4

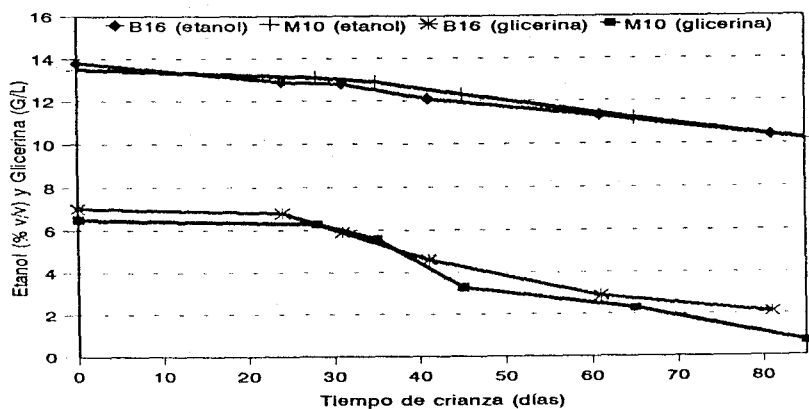
El experimento se hizo por triplicado y con tres determinaciones por muestras. Los resultados tuvieron una desviación típica menor del 5%.

FIGURA 20. Contenido en etanol y en glicerina durante la crianza biológica por *S. beticus* y *S. montuliensis* de un mosto fermentado y encabezado a distintas graduaciones alcohólicas.

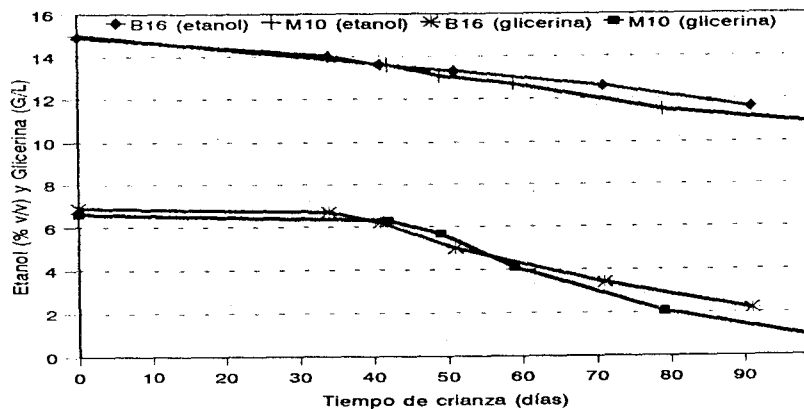
A.- ETANOL 11.5% (v/v)



B.- ETANOL 13,5% (v/v)



C.- ETANOL 15% (v/v)



S. montuliensis consume más glicerina que *S. beticus* en todas las graduaciones alcohólicas ensayadas. A mayor contenido alcohólico, se consume menor cantidad de glicerina. A 11.5% (v/v) de etanol se consume, en el tiempo que duró la experiencia, aproximadamente 1 g/L más de glicerina que a 15%. La diferencia obtenida entre 13.5% y 15% (v/v) etanol es pequeña (0.2 g/L). A la vista de estos resultados, el consumo de glicerina podría acelerarse retrasando el encabezado de los mostos, manteniéndolos durante más tiempo a la graduación alcohólica alcanzada en la fermentación (aproximadamente 12%). No obstante a esta graduación, existe un mayor riesgo de contaminación bacteriana.

Aunque *S. montuliensis* consuma mayor cantidad de glicerina que *S. beticus*, la diferencia entre ambas no es suficiente para que compense el mayor consumo de etanol que registra dicha especie. La disminución en el contenido de etanol durante la crianza biológica se repone con alcohol vínico, que se le añade con el vino en la adecuada proporción en las operaciones de rociado o reposición (Pérez, 1984).

4.3.2. ACIDEZ VOLÁTIL

4.3.2.1. Evolución de la acidez volátil durante la crianza biológica con cultivos puros:

La disminución de la acidez volátil durante la crianza biológica en solerajes industriales es un hecho bien conocido (Martínez de la Ossa et al., 1987). El contenido en acidez volátil expresado en g de ácido acético por L obtenidos durante la experiencia de crianza biológica con cultivos puros se expresan en la Tabla 24. Este compuesto desciende en todas las cepas hasta valores mínimos, variando estos valores entre 0.02 y 0.08 en las cepas CH15 y B3 respectivamente. Una vez alcanzado el mínimo, el contenido en dicho compuesto fluctuó, aumentando ligeramente en los últimos meses de la experiencia. Numerosos autores también han encontrado en determinadas circunstancias un irregular comportamiento durante la crianza (Fornachon, 1953; Saavedra y Garrido, 1962; Iñigo y Arroyo, 1964). Iñigo

y Arroyo (1964) registraron un incremento en la acidez volátil a los pocos días de iniciarse el velo, coincidente con una notable disminución del acetaldehído. Sin embargo, en la industria esta producción ha ido siempre acompañada de la presencia de bacterias en el medio (Suarez e Iñigo, 1990). El etanol se metaboliza a través de una vía en la que se forma acetaldehído y posteriormente ácido acético que se incorpora al ciclo de Krebs o a la ruta de síntesis de ácidos grasos (Cabezudo *et al.*, 1967; Saavedra y Garrido, 1963, 1962). El aumento registrado de la acidez volátil en el vino en la fase final de la experiencia se debe a un desequilibrio entre las reacciones metabólicas anteriormente citadas de producción y consumo del ácido acético.

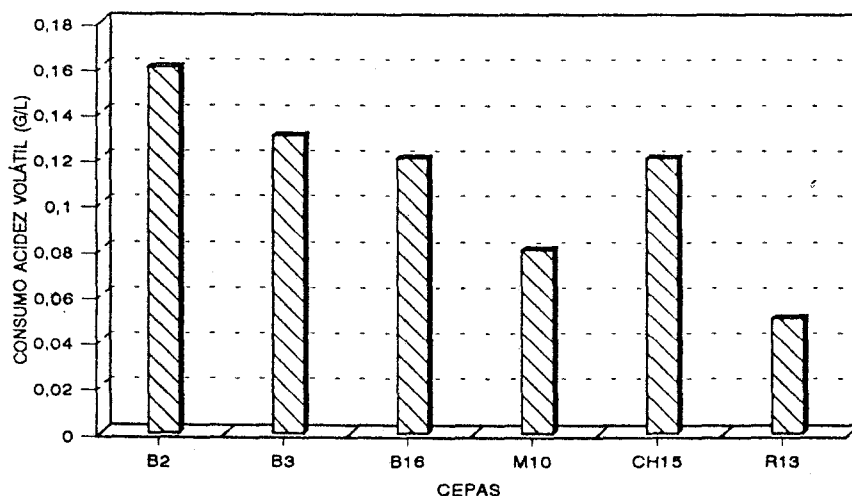
TABLA 24: Niveles de acidez volátil (g/L) durante la crianza biológica con cultivos puros.

CEPAS	TIEMPO DE CRIANZA (MESES):												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B2	0.29	0.23	0.13	0.09	0.06	0.03	0.05	0.04	0.03	0.18	0.18	0.22	0.22
B3	0.53	0.46	0.40	0.34	0.29	0.22	0.22	0.14	0.13	0.08	0.09	0.1	0.13
B16	0.29	0.25	0.17	0.12	0.07	0.04	0.06	0.04	0.03	0.07	0.07	0.14	0.13
M10	0.41	0.36	0.33	0.31	0.28	0.19	0.12	0.11	0.05	0.06	0.09	0.08	0.13
CH15	0.29	0.25	0.17	0.12	0.06	0.04	0.03	0.03	0.02	0.03	0.04	0.1	0.12
R13	0.35	0.32	0.30	0.27	0.23	0.16	0.09	0.07	0.07	0.05	0.09	0.08	0.13
Ref.	0.29	0.30	0.23	0.22	0.16	0.17	0.16	0.16	0.17	0.16	0.14	0.17	0.18

Los resultados son la media de los valores obtenidos en los dos cultivos de cada cepa con tres determinaciones por muestra. La desviación típica fue menor del 10%.

El consumo inicial de este compuesto es superior en las cepas de *S. beticus* y de *S. cheresiensis* que en las de *S. montuliensis* y *S. rouxii*. En los dos primeros meses el consumo registrado por las cepas B2, B3, B16 y CH15 supera 0.1 g/L mientras que el de M10 y R13 es de 0.08 y 0.05 g/L respectivamente (Fig. 21). Se vuelve a observar un comportamiento similar entre *S. beticus* y *S. cheresiensis* y entre *S. montuliensis* y *S. rouxii*.

FIGURA 21: Consumo de la acidez volátil registrado a los dos meses de la crianza biológica con cultivos puros.



4.3.2.2. Formación de velo y degradación de la acidez volátil en vinos acetificados:

El "picado acético" de los vinos es un fenómeno frecuente de graves repercusiones para la industria. Cuando una bota pierde el velo de flor, el vino se airea quedando expuesto a contaminación por parte de las bacterias acéticas. Éstas metabolizan el etanol oxidándolo a ácido acético hasta llegar a avinagrarlo (Suarez e Iñigo, 1990). Las levaduras de velo de flor consumen dicho ácido, pudiendo corregir dicha enfermedad del vino (Novella, 1992).

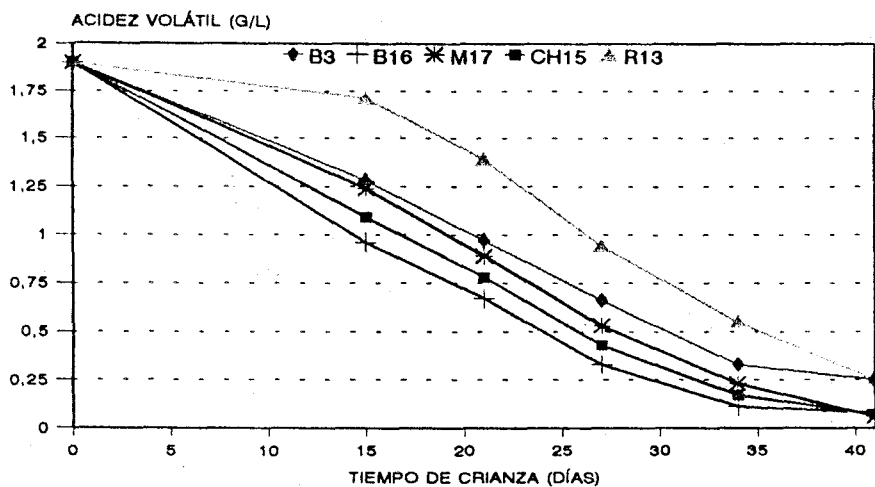
Un S/T con acidez volátil inicial de 0.2 g/L (expresada como g de ácido acético) se acetificó con vinagre de vino hasta alcanzar niveles crecientes de 1, 2 hasta 10 g/L. Estos vinos acetificados se inocularon con las cepas B3, B16, M17, CH15 y R13 crecidas en YPD. Ninguna de las cepas ensayadas formó velo en aquellos tubos que contenían niveles de ácido acético superiores a 2 g/L.

Matraces de 500 mL con 400 mL de un S/T acetificado hasta una acidez volátil de 1.9 g/L, se injertaron con velo de las cepas anteriormente citadas. Cuando



la superficie se cubrió por un velo completo y ténue se tomó la primera muestra (a los 15 días desde el inóculo). Se tomaron muestras periódicamente y se determinó la evolución de la acidez volátil (Fig. 22). Todas las cepas consumen la acidez volátil hasta alcanzar valores inferiores a 0.5 g/L. Las cepas más rápidas son B16 y CH15, seguidas de B3 y M17, siendo R13 la más lenta. Resultados similares se obtuvieron en la experiencia de crianza en pureza (vino sin acetificar). A partir de la sexta semana la acidez volátil sufrió oscilaciones, llegando en algunos casos a aumentar considerablemente.

Figura 22: Degradación de la acidez volátil por diferentes cepas de levaduras de flor en un vino acetificado.



4.3.3. ACETATO DE ETILO

Durante la crianza biológica con cultivos puros, el contenido en acetato de etilo disminuye hasta niveles de trazas por acción metabólica del velo de flor (Tabla 25). Durante la crianza biológica en los sistemas industriales, también se registra un descenso en la concentración de dicho compuesto (Pérez, 1982, Martínez de la Ossa, 1987b)

TABLA 25: Evolución del contenido en acetato de etilo (mg/L) durante la crianza biológica con cultivos puros de diferentes cepas de levaduras de velo.

Cepas	Tiempo de crianza (meses)			
	0	1	2	3
B2	30	14	10	8
B3	31	10	8	-a
B16	30	15	9	7
M10	31	10	5	-
CH15	30	19	17	10
R13	30	9	7	-
Ref.	30	13	8	6

^a -: no detectable. A partir del cuarto mes todos los cultivos presentaron niveles imperceptibles.

4.3.4. ACETALDEHIDO, ACETOÍNA, BUTANODIOL,2-3 Y DIETIL ACETAL

4.3.4.1. Niveles de acetaldehído, acetofina y butanodiol,2-3 durante la crianza biológica con cultivos puros:

El acetaldehído es considerado como el componente más típico de los vinos de crianza biológica, ejerciendo una gran influencia en las características sensoriales de estos vinos. Éste se forma en cantidades generalmente de 300-400 mg/L, pudiendo llegar hasta 700-800 mg/L; dependiendo de la cepa, temperatura, relación superficie/volumen y del vino en cuestión (John y Rankiine, 1977; Iñigo y Arroyo, 1964; Martínez de la Ossa, 1987b; Suarez e Iñigo, 1990).

En todos los cultivos durante la formación de velo, el contenido en acetaldehído (Tabla 26) aumenta hasta alcanzar valores máximos, coincidiendo con la fase en la que se registra un mayor consumo de etanol. Posteriormente y hasta aproximadamente el 4º ó 5º mes, disminuye progresivamente. Una vez alcanzado los valores mínimos, se detecta una nueva fase de producción de dicho compuesto, con pequeñas oscilaciones, no superándose en ningún caso los valores alcanzados en la fase inicial (Fig. 23). Como ya se referenció en la introducción, otros autores también encuentran que la producción de acetaldehído no transcurre de forma regular (Saavedra y Garrido, 1959; Iñigo y Arroyo, 1964).

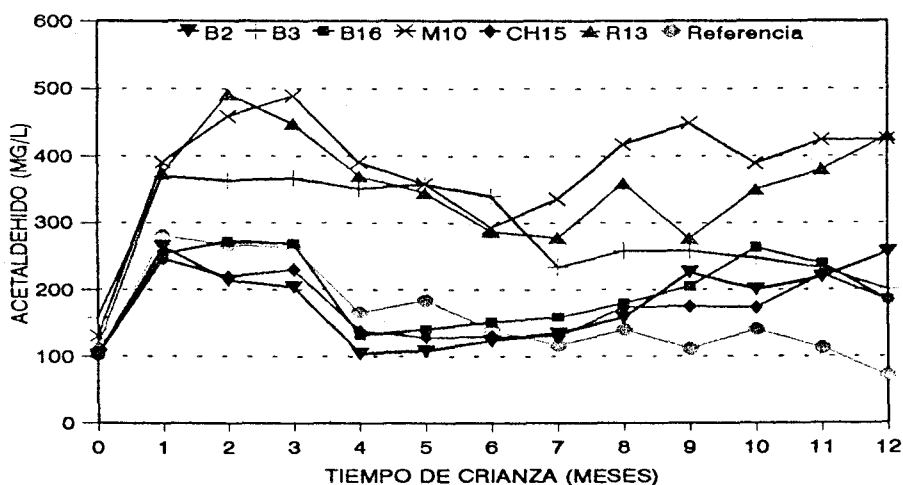
TABLA 26: Contenido en acetaldehído (mg/L) durante la crianza en pureza con cultivos puros.

CEPAS	TIEMPO DE CRIANZA (MESES)												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B2	102	264	214	204	104	108	123	135	159	226	200	219	256
B3	159	370	363	367	351	357	339	234	258	258	247	232	200
B16	102	253	272	269	131	141	152	159	180	205	263	239	185
M10	131	391	459	489	391	358	293	335	418	449	389	424	425
CH15	102	246	219	230	138	128	129	130	174	175	173	223	185
R13	116	374	491	448	370	344	287	277	359	276	349	380	430
Ref.	102	280	267	263	166	184	140	116	140	111	140	112	71

Los resultados son la media de los valores obtenidos en los dos cultivos de cada cepa, con tres determinaciones por cada muestra. La desviación típica fue menor del 5%.

S. montuliensis y *S. rouxii* producen más cantidad de acetaldehído que las cepas de *S. beticus* y *S. cheresiensis* (Fig 23). En todas las fases de crianza las gráficas de contenido en acetaldehído de M10 y R13 superan a las de las otras cepas. Las diferencias que se observan en la gráfica correspondiente a B3 con respecto a las demás cepas de *S. beticus* y *S. cheresiensis* se deben a que la concentración inicial de acetaldehído en el S/T de partida supera en 60 mg/L a la de los restantes.

FIGURA 23: Contenido en acetaldehído durante la crianza biológica con cultivos puros.



La acetoína y el butanodiol,2-3 son compuestos que algunos autores han correlacionado con el contenido en acetaldehído. La acetoína se formaría a partir de una condensación acetoínica de dos moléculas de acetaldehído y el butanodiol,2-3 por reducción de la acetoína (Saavedra, 1959; Fornachon, 1953; Casas, 1954).

Se determinó el contenido inicial (S/T) y final de acetoína y de butanodiol,2-3. En la Figura 24 se representan el incremento máximo de acetaldehído (registrado en la fase inicial de la crianza) y el incremento final en los valores de acetoína y de butanodiol,2-3 obtenidos con las distintas cepas. Se observa una relación directa entre la producción de acetaldehído y el incremento de acetoína, siendo los cultivos de *S. montuliensis* y de *S. rouxii* los que registran un aumento mayor en los niveles de acetoína. Sin embargo, no se detecta ninguna relación con los niveles de butanodiol,2-3, en algunas cepas (B3 y B16) incluso disminuyeron con respecto a los valores iniciales.

Con el fin de comprobar si el origen de la acetoína pudiera encontrarse en una condensación de dos moléculas de acetaldehído por vía físico-química (Saavedra, 1959; Fornachon, 1953; Casas, 1954) o bien deberse a la actividad biológica de la levadura, se añadió a un S/T 500 mg/L de acetaldehído y se sometió durante 10 días a 45 °C. Los resultados se expresan en la Tabla 27.

a 45 °C. Los resultados se expresan en la Tabla 27.

Figura 24: Relación entre el incremento máximo en acetaldehido registrado durante la crianza con cultivos puros y el contenido final en acetoína y en butanodiol,2-3.

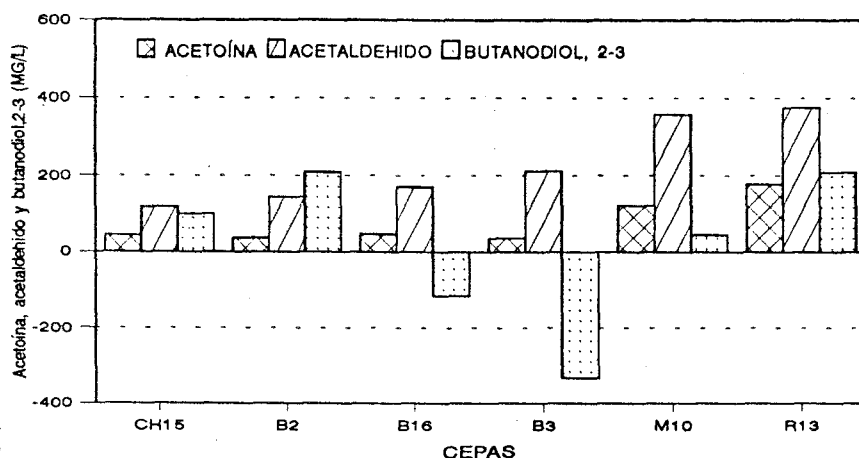


TABLA 27: Niveles de acetoína, acetaldehido y dietilacetil en un S/T adicionado con 500 mg de acetaldehido antes y después de someterlo a la prueba de remontado.

	S/T inicial	S/T + acetaldehido	S/T + acetaldehido tras remontado
Acetaldehido (mg/L)	203	693	700
Acetoína (mg/L)	38	39	36
Dietilacetil (mg/L)	19	86	90

Los resultados son la media de dos experimentos independientes con tres determinaciones por muestra. La desviación típica fue menor del 10%.

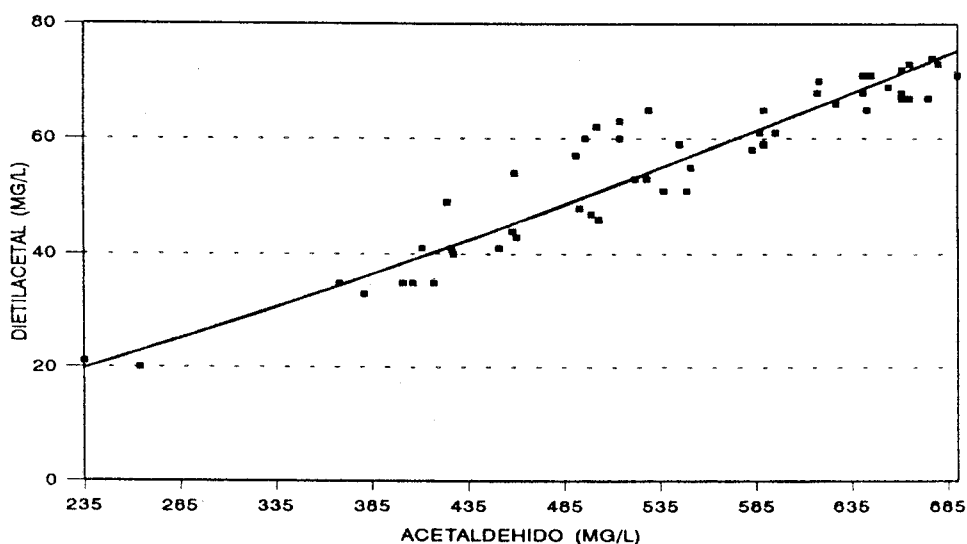
El contenido en acetoína permaneció constante, indicando que el aumento que se registró durante la crianza con las diferentes cepas se debe al metabolismo de las levaduras de velo de flor. En las muestras adicionadas con acetaldehido (500 mg/L), sometidas o no a la prueba de remontado, los niveles de dietilacetil aumentaron. Este aumento podría obedecer a equilibrio químico entre la concentración de acetaldehido

y de dietilacetil, existiendo una relación directa entre ambos compuestos.

4.3.4.3. Relación entre los niveles de dietilacetil y de acetaldehido en el vino:

Con objeto de comprobar que la concentración de dietilacetil guarda relación con la de acetaldehido se determinaron los niveles de dichos compuestos en un gran número de muestras (52). Los resultados de los análisis se representan en la Fig. 25. La regresión resultó tener un coeficiente de determinación (r^2) igual a 0.89. Se comprueba que la mayor cantidad de dietilacetil obtenida en la experiencia del apartado anterior se debía a la adición de acetaldehido.

Figura 25: Relación entre el contenido en acetaldehido y dietilacetil en el vino.



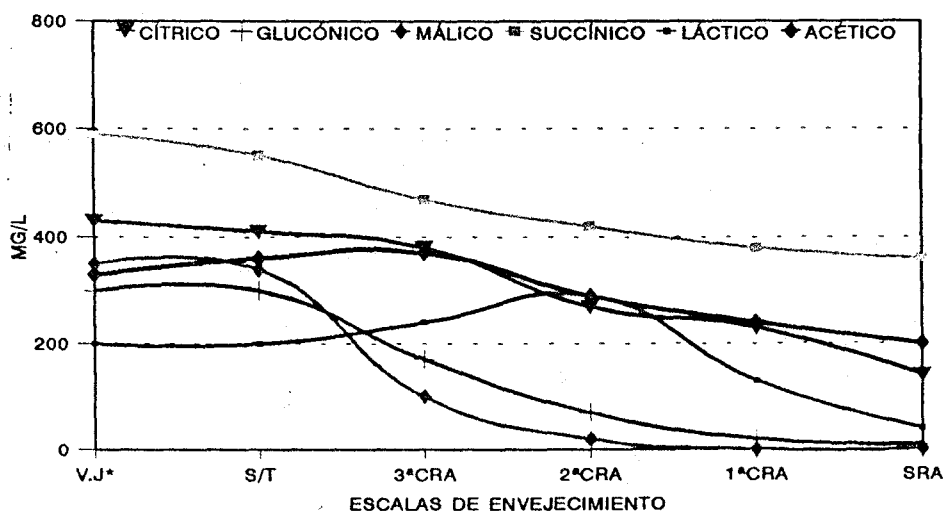
4.3.5. ÁCIDOS ORGÁNICOS

4.3.5.1. Evolución de los ácidos orgánicos durante la crianza biológica en solerajes industriales :

El contenido en los diferentes ácidos orgánicos estudiados (acético, cítrico, glucónico, málico, succínico y láctico) registrado en las distintas escalas de envejecimiento de los solerajes industriales se representan en la figura 26. Los datos

corresponden a la media de los resultados obtenidos en el análisis de cinco solerajes de cuatro escalas. El contenido en todos los ácidos analizados experimenta una disminución neta en el proceso de la crianza (Tabla 28). Durante el envejecimiento estático, los niveles de glucónico, láctico y málico permanecen invariables. El contenido en ácido glucónico y málico disminuye a lo largo de todas las escalas del sistema dinámico, mientras que el láctico aumenta durante las primeras etapas (3ª y 2ª criadera) y disminuye posteriormente. El ácido cítrico y succínico registran una disminución progresiva durante todas las fases de la crianza. El contenido en ácido acético aumenta ligeramente (40 mg/L) durante el envejecimiento estático y disminuye durante el envejecimiento dinámico.

FIGURA 26: Contenido en diferentes ácidos orgánicos en las escalas de envejecimiento de los solerajes industriales.



VJ*: vino joven encabezado (15.5% v/v etanol)

4.3.5.2. Evolución de los ácidos orgánicos durante la crianza con cultivos puros:

El seguimiento del contenido en los distintos ácidos orgánicos estudiados durante la crianza con cultivos puros se representa en la Fig. 27 (A, B, C, D, E, F y G). Los valores correspondientes al ácido acético se describieron en el apartado

4.3.2.1 (Tabla 24). No se detectan diferencias significativas en el comportamiento metabólico con respecto a estos ácidos entre las distintas cepas. En la referencia (Fig. 27 G), el contenido de todos los ácidos orgánicos permanece invariable (las diferencias obtenidas se encuentran dentro del error de determinación cromatográfico).

TABLA 28: Consumo/producción neta (% g/L) de los distintos ácidos orgánicos estudiados con respecto a los niveles iniciales durante la crianza con distintas cepas de levaduras de velo.

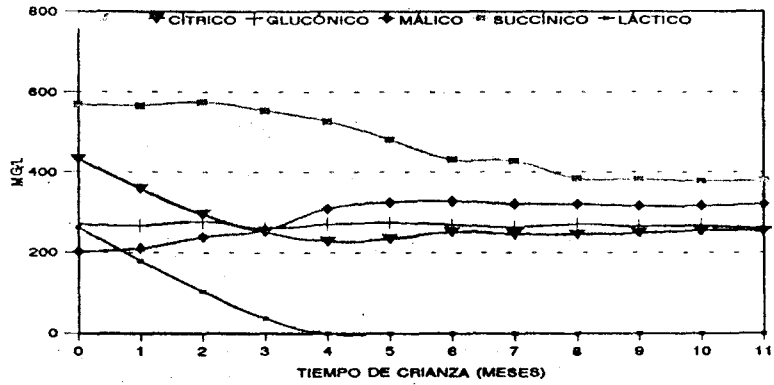
	Cítrico	Glucónico	Málico	Succínico	Láctico
SOLERAJES	67%	97%	100%	39%	80%
CEPAS: B2	41%	(-) ^a	(+) ^b 58%	34%	100%
B3	67%	-	(+) 39%	33%	100%
B16	38%	-	(+) 47%	34%	100%
M10	62%	-	(+) 33%	38%	100%
CH15	45%	-	(+) 34%	43%	100%
R13	53%	-	(+) 28%	44%	100%

^a (-) constante, ^b (+) producción

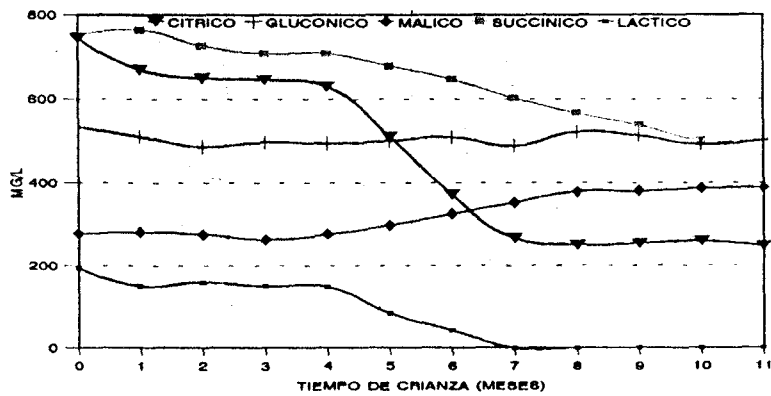
Al igual que en los solerajes, se registra un consumo neto de todos los ácidos estudiados excepto del ácido málico que aumenta (Tabla 28) y del glucónico que permanece constante. El incremento en el contenido del ácido málico es de aproximadamente un 30% con respecto a los niveles iniciales en las cepas M10, CH15 y R13, mientras que en los cultivos de B2, B3 y B16 es superior (entre 40% y 60%).

FIGURA 27: Evolución del contenido en diferentes ácidos orgánicos durante la crianza biológica con cultivos puros; A (B2), B (B3), C (B16), D (M10), E (CH15), F (R139 y G (referencia)).

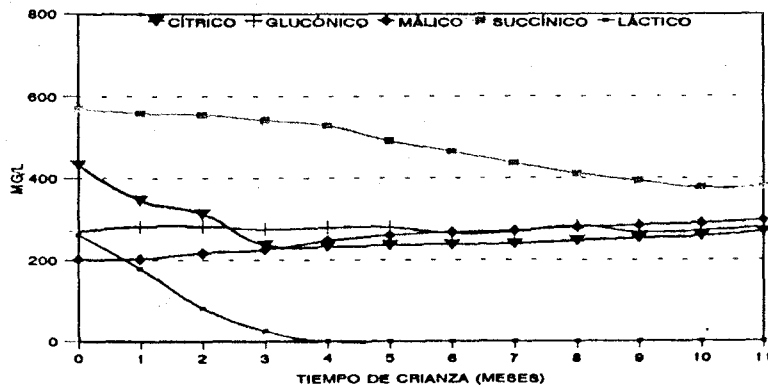
A.- B2



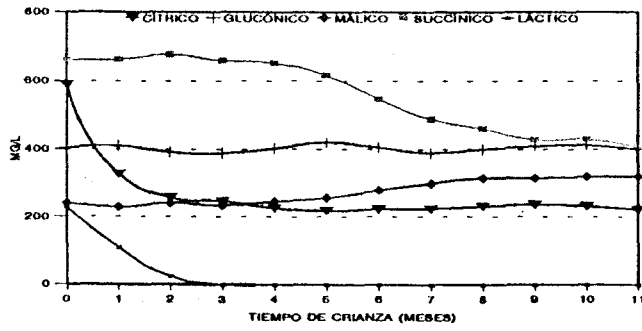
B.- B3



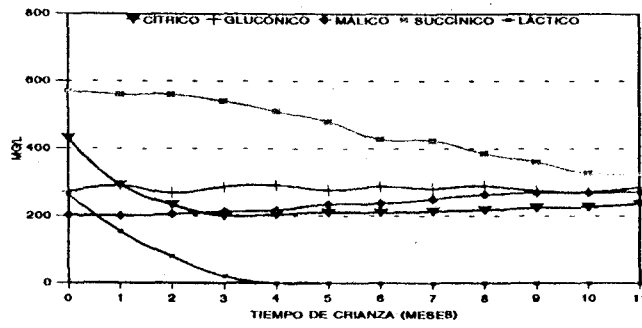
C.- B16.



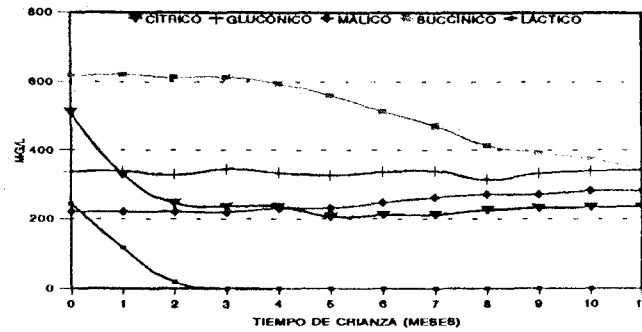
D.- M10.



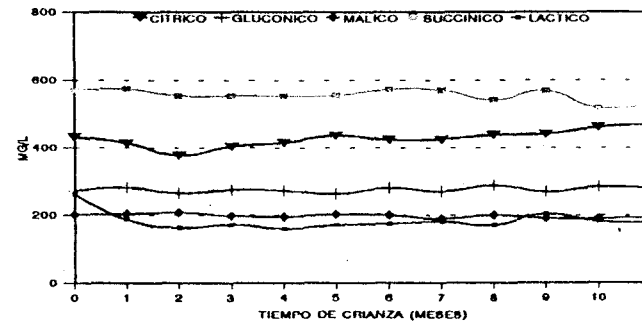
E.- CH15.



F.- R13.



G.- Referencia



No existen datos en la bibliografía donde se recoga la producción de ácido málico por las levaduras de velo durante la crianza biológica. El ácido málico está en el ciclo de Krebs, pudiendo ser éste uno de los orígenes de la cantidad encontrada en el vino. Además, se han propuesto rutas de biosíntesis del ácido málico por levaduras vínicas. Una de ellas, a partir de aminoácidos que existen normalmente disueltos en el vino, especialmente la glicina y el ácido aspártico (Rodopoulo *et al.* citados por Polo, 1973). La otra ruta de generación de dicho ácido sería a partir del pirúvico el cual se carboxila por acción de la piruvato-carboxilasa originándose oxalacetato que se reduce a malato por acción de la malato deshidrogenasa. El glutatión activa a la piruvato carboxilasa y las levaduras resistentes al SO₂ poseen niveles elevados de dicho compuesto (Ronald *et al.*, 1987).

El ácido láctico se consume completamente en los tres primeros meses excepto en el cultivo de B3 la cual consumió dicho ácido fundamentalmente a partir del 4^o mes (como sucedió con la glicerina).

El consumo de ácido cítrico se registra en la fase inicial permaneciendo posteriormente constante. Por el contrario, el contenido en succínico permanece invariable en la fase inicial, consumiéndose posteriormente. Ninguno de estos compuestos se agotaron completamente.

Cuando se comparan los resultados obtenidos en los solerajes industriales (Fig. 26) y los obtenidos en la crianza con cultivos puros de levaduras (Fig. 27), se detectan diferencias en la evolución seguida a lo largo de todas las fases de la crianza por algunos ácidos orgánicos (glucónico, láctico, acético y málico). Dichas diferencias se deben al metabolismo de la flora bacteriana presente en los sistemas industriales de crianza biológica.

Así, la disminución del ácido glucónico en los sistemas industriales (Fig. 26 y Tabla 28) obedece a la presencia de bacterias lácticas que lo metabolizan siguiendo una ruta heterofermentativa con producción de ácido acético, láctico, glicerina, etanol

y anhídrido carbónico (Pérez *et al.*, 1991). Dicho compuesto no se asimila por la levadura en fase de velo (Fig. 27, Tabla 28). Durante el envejecimiento estático la no asimilación se debe a que en los sobretablas las condiciones del vino (50-60 mg/L de SO₂) dificultan el crecimiento bacteriano, no sucediendo igual en las etapas posteriores ya que durante el envejecimiento dinámico la concentración de SO₂ es menor (30-40 mg/L) y además éste se encuentra combinado en más de un 90% con el acetaldehído, perdiendo parte de su actividad antiséptica.

La disminución del ácido málico en los sistemas industriales también se debe a las bacterias lácticas que por fermentación maloláctica consumen dicho ácido originando ácido láctico (Pérez *et al.*, 1982).

El consumo del ácido glucónico y málico por las bacterias lácticas es la causa del aumento registrado del contenido en ácido láctico y acético en la 3^a y 2^a CRA. El posterior descenso del contenido en láctico y acético se debe a la asimilación por parte de las levaduras de velo de flor. La disminución en el contenido en ácido cítrico y succínico se atribuye a la actividad metabólica de las levaduras por incorporación al ciclo de Krebs.

4.3.6. AMINOÁCIDOS

4.3.6.1. Evolución de los aminoácidos en solerajes industriales:

En el apéndice se exponen los niveles medios de los distintos aminoácidos ($\mu\text{mol/L}$) registrados en las escalas de envejecimiento de los cinco solerajes industriales estudiados. Los niveles de la mayoría de todos los aminoácidos disminuyen conforme aumenta el tiempo de crianza. La hidroxiprolina y la p-etanolamina permanecen constantes. La gabalamina y la ornitina registran un aumento de aproximadamente de 30 y 20 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente durante las primeras fases de crianza.

El consumo de aminoácidos totales viene fundamentalmente determinado por la disminución en los niveles de prolina, aminoácido mayoritario en el mosto de uva y en el vino, hecho ya referenciado por algunos autores (Polo, 1971; Botella et al. 1990). En la Tabla 29 se expresan los niveles de aminoácidos libres totales y de prolina registrados en las distintas escalas de envejecimiento de los solerajes estudiados. En el vino sin crianza, la prolina constituye un 70% de los aminoácidos libres totales. Tanto la prolina como los aminoácidos totales decrecen regularmente a lo largo del tiempo.

TABLA 29: Contenido en aminoácidos libres totales y de prolina (mmol/L) en solerajes industriales.

Escalas de envejecimiento	Aminoácidos totales (mmol/L)	Prolina (mmol/L)
V.J ^a	8.1	5.5
S/T	7.15	4.85
3 ^a CRA	4.86	3.16
2 ^a CRA	3.51	1.97
1 ^a CRA	2.28	1.1
Solera	1.77	0.79

^a V.J: vino joven encabezado, S/T: sobretablas, CRA: criadera. Los resultados son la media de los análisis realizados a cinco solerajes de cuatro escalas. La desviación típica fue menor del 10%.

4.3.6.2. Evolución de los aminoácidos durante la crianza biológica con cultivos puros:

En el apéndice se describen los niveles ($\mu\text{mol/L}$) registrados de los distintos aminoácidos estudiados durante la crianza con cultivos puros.

Al igual que en los solerajes, los niveles iniciales de todos los aminoácidos estudiados registran un descenso progresivo durante la experiencia excepto la hidroxiprolina y la p-etanolamina que permanecen invariables. En algunos cultivos (B2, B16

y CH15) se registra un aumento de la gabalamina durante los 2-3 primeros meses de crianza, correspondiéndose con el incremento inicial registrado en los solerajes. La única diferencia significativa encontrada con respecto a los sistemas industriales fue que la ornitina disminuye progresivamente en todos los cultivos a lo largo de la crianza. Excepto en el cultivo de la cepa B16, se registra un ligero aumento del ácido glutámico entre el primer y el segundo mes de la crianza (incluso en la referencia ya que ésta tuvo velo de flor durante los 2-3 primeros meses de la experiencia). El consumo de la glicina y del aspártico podría justificar la producción registrada de ácido málico, de acuerdo con Rodopulo *et al.* (citado por Polo, 1973).

No se observan diferencias significativas en el comportamiento metabólico con respecto a los aminoácidos entre las distintas cepas.

TABLA 30: Contenido inicial en los aminoácidos libres totales y de prolina (mmol/L) y al año de crianza biológica con cultivos puros de distintas cepas de levaduras de flor.

	Aminoácidos totales (mmol/L)	Prolina (mmol/L)
Inicial	10.44	7.97
Final:		
B2	0.41	0.02
B3	0.56	0.04
B16	0.45	0.02
M10	0.44	0.03
CH15	0.53	0.03
R13	0.44	0.04
Ref.	9.28	6.71

Los resultados son la media de dos cultivos por cada cepa. La desviación típica fue menor del 10%.

Al igual que en los sistemas industriales, el consumo de aminoácidos está fundamentalmente determinado por la disminución de los niveles de prolina

(inicialmente constituía el 75% de los aminoácidos totales) que alcanzó niveles de trazas durante la crianza (Tabla 30). Los aminoácidos totales se consumen casi en su totalidad (95%). El metabolismo de la levadura de velo es por lo tanto responsable del consumo de aminoácidos en los sistemas industriales de crianza biológica.

4.1.3.3.6.3. Utilización de la prolina:

Las levaduras de flor descritas en la Tabla 3 se sembraron en un medio cuya única fuente de carbono era la prolina (SP) y en otro donde la prolina constituía la única fuente de nitrógeno (YCBP). Ninguna cepa crece en SP mientras que todas presentan crecimiento positivo en YCBP, indicando que las levaduras de velo de flor son capaces de utilizar la prolina como fuente de nitrógeno pero no como fuente de carbono. Por tanto, el consumo de prolina registrado durante la crianza se debe a la asimilación por parte de las levaduras de velo que la utilizan como fuente de nitrógeno.

El consumo de prolina ha sido un tema que ha dado lugar a numerosas controversias. Generalmente se aceptaba que las levaduras vínicas y las cerveceras asimilaban todos los aminoácidos libres disponibles excepto la prolina. El catabolismo de la prolina como fuente de carbono o como fuente indirecta de nitrógeno requiere la síntesis por parte de las levaduras de una permeasa y una oxidasa de este compuesto, síntesis inducida por sustrato. La oxidasa tiene un requerimiento obligado de oxígeno, convirtiendo a la prolina en glutamato (Brandriss and Magasanik, 1979; Mantachian, 1984). Ambas enzimas se reprimen por amonio, desreprimiéndose cuando dicho ión desaparece (Roon *et al.* 1975). La permeasa puede ser irreversiblemente inactivada cuando está presente la glutamina o amonio en el medio (Courchesne and Magasanik, 1983). Ingledew *et al.* (1987) demuestran que la prolina es utilizada por las levaduras en la fermentación cuando hay oxígeno disponible. El catabolismo de la prolina ocurre en las mitocondrias, los mutantes ρ^- ("petites") pierden la habilidad de usar la prolina como única fuente de nitrógeno (Cooper, 1982).

De acuerdo con los trabajos referenciados anteriormente, las levaduras de velo en fase filmógena pueden asimilar la prolina ya que hay oxígeno disponible y el amonio presente en el mosto se agota hasta niveles de trazas durante la fermentación (10-12 mg/L).

4.3.7. ALCOHOLES SUPERIORES

4.3.7.1. n-propanol:

No se registran grandes variaciones en los niveles de n-propanol durante el tiempo que duró la experiencia. En la fase inicial (2-3 meses) se detecta un ligero aumento, variable según la cepa (entre 2 mg/L en B3 y 12 mg/L en B16 y R13). Posteriormente los niveles de dicho compuesto se mantienen prácticamente constante con pequeñas fluctuaciones (Fig. 28A). No se detectan diferencias entre las distintas especies.

4.1.3.3.7.2. Iso-butanol:

Los niveles de Iso-butanol durante la crianza con cultivos puros se describen en la Tabla 31 y Fig. 28B. Dicho compuesto sigue una tendencia inicial creciente y de duración variable según la cepa. Así, las cepas de *S. beticus* y *S. cheresiensis* produjeron Iso-butanol hasta el 2º o 3º mes de crianza mientras que *S. montuliensis* y *S. rouxii* lo produjeron hasta el 6º mes. Además, el incremento de Iso-butanol registrado en los cultivos de M10 y R13 fue superior al registrado en las restantes cepas (alcanzaron un máximo de 80 y 70 mg/L respectivamente). En las cepas de *S. beticus* y *S. cheresiensis* el máximo se situó en torno a los 45 mg/L. En las fases posteriores el contenido en Iso-butanol permanece prácticamente constante. Se observa, de nuevo, un comportamiento similar entre las especies *S. beticus* y *S. cheresiensis* y entre *S. montuliensis* y *S. rouxii*.

TABLA 31: Niveles de Iso-butanol (mg/L) durante la crianza biológica con cultivos puros.

CEPAS	TIEMPO DE CRIANZA (MESES):												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B2	28	39	48	43	39	39	36	36	35	35	34	37	35
B3	57	60	62	59	55	57	60	59	62	64	66	67	63
B16	28	35	37	41	39	37	37	34	37	34	34	36	37
M10	43	54	67	72	75	77	80	77	79	80	76	74	74
CH15	28	34	39	43	38	37	36	35	35	35	35	34	36
R13	36	50	70	67	65	69	70	66	67	66	67	67	70
Ref.	28	32	30	29	29	27	23	24	27	25	28	31	27

Los resultados son la media de los valores obtenidos en los dos cultivos de cada cepa, con tres determinaciones por cada muestra. La desviación típica fue menor que el 10%.

4.3.7.3. Alcoholes Iso-amflicos:

Al final de la experiencia, el contenido en alcoholes Iso-amflicos fue superior al nivel inicial (excepto en B2) aunque durante la crianza se registraron oscilaciones entre el consumo y la producción de dicho compuesto. Durante el primer més los cultivos de B3, B16, CH15 y R13 registran una disminución en el contenido de dicho compuesto, mientras que los de B2 y M10 tuvieron un aumento inicial. La producción de Iso-amflicos por las cepas de *S. montuliensis* (M10) y de *S. rouxii* (R13) fue superior a la registrada por las cepas de *S. beticus* y *S. cheresiensis* (Fig. 28 C y Tabla 32).

TABLA 32: Contenido en alcoholes Iso-amflicos (mg/L) durante la crianza con cultivos puros.

CEPAS	TIEMPO DE CRIANZA (MESES)												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B2	154	186	174	166	165	169	164	163	168	160	154	157	154
B3	185	180	176	178	180	184	188	190	192	196	193	190	193
B16	154	152	164	184	177	170	161	157	161	168	162	167	160
M10	170	179	181	189	197	208	224	215	217	230	216	215	212
CH15	154	138	151	163	160	158	161	164	161	160	159	157	155
R13	162	148	170	194	188	190	189	193	202	200	200	199	199
Ref.	154	156	153	152	158	161	159	150	143	139	140	144	139

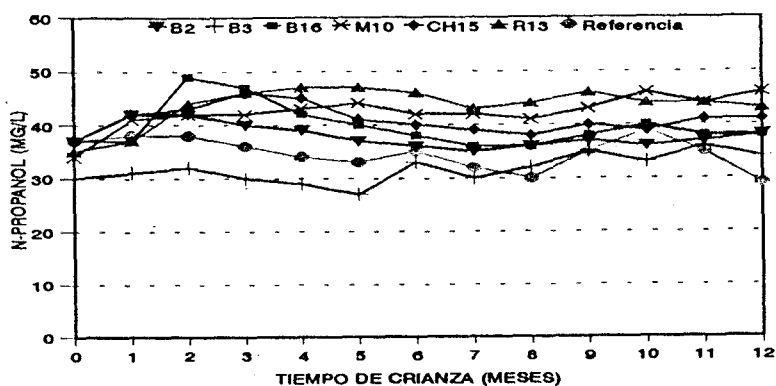
Los resultados son la media de los valores obtenidos en los dos cultivos de cada cepa con tres determinaciones cada muestra. La desviación típica fue menor del 10%.

La producción de alcoholes superiores está ligada a las rutas metabólicas de las levaduras (Pérez, 1979), observándose así las mayores variaciones en el contenido de n-propanol, Iso-butanol y en el de Iso-amflicos en la fase de desarrollo del velo (primeros meses de la crianza).

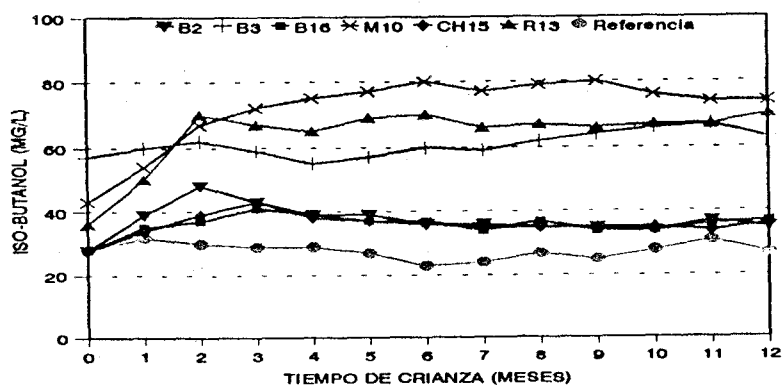
El Iso-butanol y los alcoholes Iso-amflicos se originan en las vías metabólicas, tanto de síntesis como de degradación de algunos aminoácidos, tras una descarboxilación y posterior reducción del ácido cetónico correspondiente. Por el contrario, el n-propanol no tiene precursor directo en los aminoácidos del medio. El n-propanol se forma a partir de reacciones en las que interviene el ácido pirúvico y el acetil-CoA (Pérez, 1979).

FIGURA 28: Evolución del contenido en los alcoholes superiores durante la crianza biológica con cultivos puros; n-propanol (A), Iso-butanol (B) e Iso-amílicos (C).

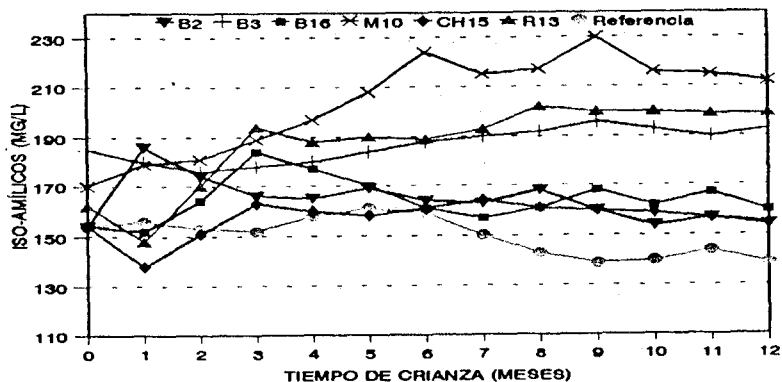
A.- N-PROPANOL



B.- ISO-BUTANOL



C.- ISO-AMILICOS



El n-propanol al no proceder de ningún aminoácido contenido en el vino ni a la vía de síntesis de dichos aminoácidos, no ve favorecida su formación. Presumiblemente, el agotamiento del ácido pirúvico en el medio detenga la síntesis del n-propanol. La disminución de dicho alcohol puede deberse a la formación de propionil-CoA que tras una reacción de carboxilación y otra de isomerización, se transformaría en succinil-CoA que se incorpora al ciclo de Krebs (Pérez, 1979).

En la ruta de degradación de la valina se origina el 2,metil-propanol,1 (Iso-butanol). Como puede observarse en el apéndice y Tabla 31, el incremento registrado en el contenido de Iso-butanol se corresponde con el decremento detectado en los niveles de valina.

El 2,metil-butanol,1 y el 3,metil-butanol,1 (Iso-amflicos) se originan en las vías metabólicas de degradación o síntesis de la Iso-leucina y de la leucina, respectivamente (Pérez, 1979). Así, la disminución registrada en el contenido de dichos aminoácidos durante la crianza con las diferentes cepas (apéndice) se corresponde con el aumento registrado en el vino del contenido en alcoholes Iso-amflicos (Tabla 32).

4.3.8. INTERRELACIÓN OXÍGENO / CRIANZA / REMONTADO

4.3.8.1. Evolución del color durante la crianza biológica:

Es un hecho bien conocido que durante la crianza biológica los vinos no se oscurecen a pesar de estar contenidos en botas de madera. Durante la crianza con cultivos puros, se llevó a cabo un seguimiento de la absorbancia a 470 nm (Tabla 33) como parámetro indicativo del color de los vinos que a su vez determina el grado de oxidación de éstos.

En todos los cultivos, la absorbancia disminuye progresivamente hasta alcanzar valores mínimos (aproximadamente 40) excepto en la cepa B3 donde se

registran oscilaciones. Ésto se debe a que el velo de flor formado por B3 no cubrió completamente la superficie durante casi toda la experiencia por lo que el oxígeno pudo penetrar y disolverse en el vino. En los últimos meses, el color de los vinos se acentúa ya que el velo fue debilitándose. En la referencia por el contrario, la absorbancia sigue una tendencia creciente durante toda la experiencia.

TABLA 33: Valores de la absorbancia a 470 nm de los vinos durante la crianza biológica con cultivos puros.

CEPAS	TIEMPO DE CRIANZA (MESES):												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
B2	85	82	77	65	55	50	46	45	44	56	58	63	64
B3	78	88	94	90	90	80	77	64	62	73	73	72	71
B16	85	78	72	56	53	47	44	47	52	55	55	58	57
M10	79	73	68	64	57	51	44	42	42	47	47	56	54
CH15	85	79	71	61	57	50	47	42	42	45	49	54	56
R13	84	79	74	65	59	48	42	38	42	44	47	50	50
Ref.	85	83	86	89	100	106	110	116	122	134	144	161	170

Los resultados son la media de los valores obtenidos en los dos cultivos de cada cepa. La desviación típica fue menor del 10%.

4.3.8.2. Viabilidad celular del velo de flor vs niveles de oxígeno:

Se midió el oxígeno presente en la atmósfera de cinco botas que poseían un velo desarrollado en buen estado (blanco, completo y plegado) y en otras cinco botas con un velo en mal estado (oscuro, parcial y ténue). A dichos velos se les determinó la viabilidad celular por tinción con azul de metileno.

Las botas con el velo en buen estado presentaban en su atmósfera interna niveles de O₂ de trazas, ≤ 0.1 p.p.m. y una viabilidad celular media del 70%. Por el contrario, la concentración de O₂ en la atmósfera de las botas con el velo deteriorado fue en todos los casos 11 p.p.m. aproximadamente y la viabilidad celular

media del velo del 10%. Cuanto mayor es la intensidad de la crianza (mayor viabilidad celular del velo), mayor es la demanda biológica de O₂ ya que hay mayor número de células respirando.

El velo de flor, por tanto, supone una doble barrera para la oxidación de los vinos: a) impide el contacto físico vino-atmósfera; b) existe una fuerte demanda biológica de oxígeno a consecuencia del metabolismo respiratorio que lleva a cabo la levadura en fase filmógena donde el O₂ actúa como aceptor final de los electrones en la cadena de reacciones catabólicas de oxidación.

4.3.8.3. Polifenoles totales y remontado:

Los polifenoles son compuestos que al oxidarse provocan un aumento en la absorbancia de los vinos y por tanto son poco deseables en los vinos de crianza biológica. Estructuras polifenólicas podrían originarse por reacciones de condensación de moléculas de acetaldehído (Avakiant, 1990). Dado que este compuesto es un metabolito principal de la crianza biológica y se acumula en el vino, se determinó la concentración de polifenoles totales en los vinos resultantes de la crianza con cultivos puros y se les sometió a la prueba de remontado. Tanto los polifenoles totales como el aumento de la absorbancia se trataron de relacionar con el contenido final en acetaldehído (Tabla 34). No se observa ningún tipo de relación entre la concentración de acetaldehído y la de polifenoles totales, así como tampoco entre éstos y el incremento de absorbancia registrada tras la prueba de remontado.

TABLA 34: Contenido en polifenoles totales, acetaldehido e incremento de la absorbancia tras la prueba de remontado de los vinos resultantes de la crianza con cultivos puros.

CEPAS	Polifenoles totales (mg/L)	Incremento en la absorbancia (470 nm)	Acetaldehido (mg/L)
B2	296	29	256
B3	359	29	200
B16	301	31	185
M10	351	35	425
CH15	317	38	185
R13	285	38	430
Ref.	325	51	71

4.3.9. FRACCIONES POLIFENÓLICAS

Dada la importancia que estos compuestos tienen respecto al remontado de los vinos y por tanto en su calidad futura, se consideró interesante estudiar la evolución del contenido en los distintos polifenoles en los vinos finos a consecuencia de la actividad biológica o debido al proceso extractivo de la madera de la bota. Para ello, se determinó el contenido de diferentes ácidos y aldehidos fenólicos en las distintas escalas de envejecimiento de los solerajes industriales (vino contenido en botas de madera de roble) y el contenido inicial y final alcanzado de dichos compuestos en la crianza en el laboratorio con cultivos puros de levaduras de velo (vino contenido en recipiente de cristal).

En las Tablas 35 A y B se exponen los niveles obtenidos de los distintos polifenoles (mg/L) estudiados en los sistemas industriales y en los cultivos de laboratorio. En la Tabla 35 C figuran los incrementos o decrementos de dichos compuestos registrados en el vino al año de crianza con distintas cepas de levaduras de velo y en los solerajes industriales.

TABLA 35: Contenido en diferentes polifenoles (mg/L) en las escalas de envejecimiento de los solerajes industriales (A) y en los cultivos de laboratorio (B); e incrementos o decrementos registrados durante la crianza biológica (C).

A.- SOLERAJES INDUSTRIALES

	3°CRA	2°CRA	1°CRA	SOLERA
A. GÁLICO	6.8	8.2	9.6	11.0
A. TRANSCAFEILTARTÁRICO	116.0	114.0	101.0	90.0
A. PROTOCATEQUICO	4.0	5.3	6.7	7.3
HIDROXIMETILFURFUROL	1.1	1.0	0.9	0.9
A. CIS-p-CUMARILTARTÁRICO	5.0	3.9	3.0	2.9
A. TRANS-p-CUMARILTARTÁRICO	8.5	7.8	6.8	5.7
A. p- HIDROXIBENZOICO	0.4	0.7	1.0	1.4
HIDROXIBENZALDEHIDO	0.2	0.4	0.5	0.5
A. CAFEICO	3.5	4.1	4.1	2.9
A. VAINÍLLICO	0.5	0.4	0.6	0.6
A. SIRÍNGICO	0.6	0.7	0.9	1.0
A. CUMÁRICO	0.9	1.0	1.1	1.1
A. FERÚLICO	0.4	0.7	0.8	0.9

B.- CRIANZA CON CULTIVOS PUROS DE CEPAS DE LEVADURAS DE VELO.

	B2	B3	B16	M10	CH15	R13	REF.
A. GÁLICO	5.3	6.9	5.0	5.8	5.2	5.6	3.1
A. TRANSCAFEILTARTÁRICO	38.4	13.6	38.4	25.6	37.6	31.6	37.2
A. PROTOCATEQUICO	0.9	0.9	1.0	1.1	0.9	1.1	0.6
HIDROXIMETILFURFUROL	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	1.5
A. CIS-p-CUMARILTARTÁRICO	6.0	3.6	6.0	4.7	5.8	5.2	6.1
A. TRANS-p-CUMARILTARTÁRICO	11.3	6.4	11.2	8.6	10.9	9.8	11.0
A. p- HIDROXIBENZOICO	1.7	1.8	1.2	1.3	1.1	1.1	0.6
HIDROXIBENZALDEHIDO	0.3	0.4	0.4	0.7	0.4	0.7	0.4
A. CAFEICO	4.2	3.6	4.9	4.2	4.8	4.5	4.6
A. VAINÍLLICO	0.9	0.8	0.2	0.7	0.5	0.4	0.2
A. SIRÍNGICO	0.4	0.4	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3
A. CUMÁRICO	2.7	2.4	2.5	2.4	2.4	2.4	2.5
A. FERÚLICO	0.7	1.0	0.3	0.7	0.5	0.6	0.3

C.- INCREMENTO O DECREMENTO (-) CON RESPECTO A LOS NIVELES INICIALES

	B2	B3	B16	M10	CH15	R13	REF.	SOLERAJES
A. GÁLICO	2.8	3.8	2.5	3.0	2.7	3.0	2.6	4.2
A. TRANSCAFEILTARTÁRICO	-1.6	0.0	-1.6	-1.2	-2.4	-1.4	-2.8	-26.0
A. PROTOCATEQUICO	0.3	0.4	0.5	0.5	0.4	0.6	0.1	3.3
HIDROXIMETILFURFUROL	-0.6	-0.8	-0.6	-0.7	-0.7	-0.7	0.7	-0.3
A. CIS-p-CUMARILTARTÁRICO	-0.1	-1.5	-0.1	-0.9	-0.3	-0.7	0.0	-2.1
A. TRANS-p-CUMARILTARTÁRICO	-0.8	1.1	-0.8	-0.1	-1.1	-0.6	-1.0	-2.8
A. p- HIDROXIBENZOICO	1.5	1.0	1.1	0.8	1.0	0.7	0.5	1.0
HIDROXIBENZALDEHIDO	0.0	-0.0	0.2	0.4	0.1	0.4	0.2	0.3
A. CAFEICO	1.9	1.0	2.6	1.8	2.5	2.2	2.3	-0.6
A. VAINÍLLICO	0.5	-0.8	-0.2	-0.3	0.1	-0.3	-0.2	0.1
A. SIRÍNGICO	0.1	0.2	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.5
A. CUMÁRICO	0.6	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.4	0.2
A. FERÚLICO	0.3	0.3	0.0	0.2	0.2	0.2	0.0	0.5

Entre los polifenoles estudiados, el ácido gálico, protocatéquico, para-hidroxibenzoíco, cumárico, ferúlico y el hidroxibenzaldehido son los que siguen una tendencia creciente durante la crianza tanto en el laboratorio como en la bodega. El caféico aumenta en los cultivos de laboratorio y en los solerajes se registra un incremento en las criaderas y un posterior descenso en la solera. Se puede concluir, por tanto, que ninguno de los compuestos citados anteriormente provienen sólo y exclusivamente de la madera. El incremento registrado en el ácido protocatéquico es aproximadamente tres veces superior en el vino contenido en botas que en el contenido en vidrio por lo que dicho aumento debe ser atribuido principalmente al proceso extractivo de la madera.

Los niveles de ácido sirínigico durante la crianza en el laboratorio permanen aproximadamente constantes (las diferencias obtenidas no son significativas). Por el contrario, los niveles de ácido sirínigico aumentan de forma regular conforme avanzamos en las escalas de mayor vejez, por lo que dicho incremento parece deberse al proceso extractivo de la madera.

En los sistemas industriales, el ácido vainillico aumenta ligeramente en las escalas con más vejez, mientras que en los cultivos de laboratorio algunas cepas registran un aumento y otras una disminución.

Estrella *et al.* (1983) también determinan un aumento en el contenido de los ácidos protocatéquico, p-hidroxibenzoíco, vainillico y sirínigico durante la crianza en sistemas industriales.

Los compuestos polifenólicos aportados por la madera, proceden de la degradación de la lignina por alcoholisis, encontrándose que primero cede p-vainillina, ácido vainillico, siringialdehido y escopoletina, y de forma sucesiva los ácidos gálico, sirínigico y p-hidroxibenzoíco, y los aldehidos p-hidroxibenzaldehido y coniferaldehido (Guillen, 1994). Sin embargo, los sistemas de solerajes estudiados estaban compuestos por botas de madera de varias décadas de uso o envinado por lo que las cesiones de polifenoles al vino a consecuencia del proceso extractivo se han

realizado en pequeñas cantidades, a pesar del largo periodo de permanencia del vino en ellas. Es por ello por lo que los niveles registrados de los diferentes compuestos fenólicos en el vino contenido en botas de madera no difieren en gran medida de los detectados en el vino contenido en recipientes de vidrio.

El ácido trans-cafeiltartárico, cis-p-cumariltartárico y el trans-p-cumariltartárico siguen una tendencia decreciente en todos los caso. Dicha disminución se debe a la hidrólisis de dichos compuestos, justificando al menos en parte el incremento de ácido cafésico y de ácido cumárico (Pinedo *et al.*, 1994).

El hidroximetilfurfurol disminuye tanto en los solerajes como en los cultivos de laboratorio.

Exceptuando el ácido protocatéquico, el hidroximetilfurfurol y el ácido ferúlico, los demás compuestos siguen la misma pauta en la referencia como en los cultivos bajo velo, por lo que se podría responsabilizar a las levaduras de los incrementos o decrementos registrados en los polifenoles anteriormente citados.

4.3.10. COMPORTAMIENTO FERMENTATIVO DE LEVADURAS DE VELO DE FLOR

En determinadas industrias de vino de Jerez, se llevan a cabo una fermentación dirigida de mosto mediante la adición de un "pie de cuba" de una cepa seleccionada de alto poder fermentativo, pero que puede no tener la capacidad de formar velo.

La utilización de una cepa de levadura de velo de flor como "pie de cuba" reduciría el tiempo que tarda el velo en aparecer tras la fermentación. Además, indirectamente se estaría llevando a cabo una crianza biológica dirigida ya que dicha cepa sería la integrante mayoritaria en los velos de flor del sobretablas del correspondiente año. En las operaciones de corrido de escalas del soleraje, la cepa seleccionada se iría introduciendo en la población de los velos de flor de las escalas del sistema dinámico. Para ello, la cepa de levadura tendría que presentar tanto características fermentativas como de crianza seleccionables.

Se han estudiado algunas características fermentativas (cinética fermentativa, producción de etanol, de acidez volátil, de acetaldehído y de alcoholes superiores) de 9 cepas de levaduras de velo de flor y se compararon con las características de la cepa utilizada como "pie de cuba". En la Fig. 29 se representan las curvas fermentativas de las diferentes cepas estudiadas. Se observan diferentes comportamientos entre las diferentes cepas. Todas las cepas pertenecientes a *S. beticus* y *S. cheresiensis* fermentan más rápidamente los azúcares que aquellas de las especies *S. montuliensis* y *S. rouxii*.

Con respecto a la producción de etanol, acetaldehído y acidez volátil no se observan diferencias significativas a nivel de especie, aunque sí existen variaciones entre las diferentes cepas (Tabla 36).

FIGURA 29: Cinética fermentativa de varias cepas de levaduras de velo y de la cepa "pie de cuba".

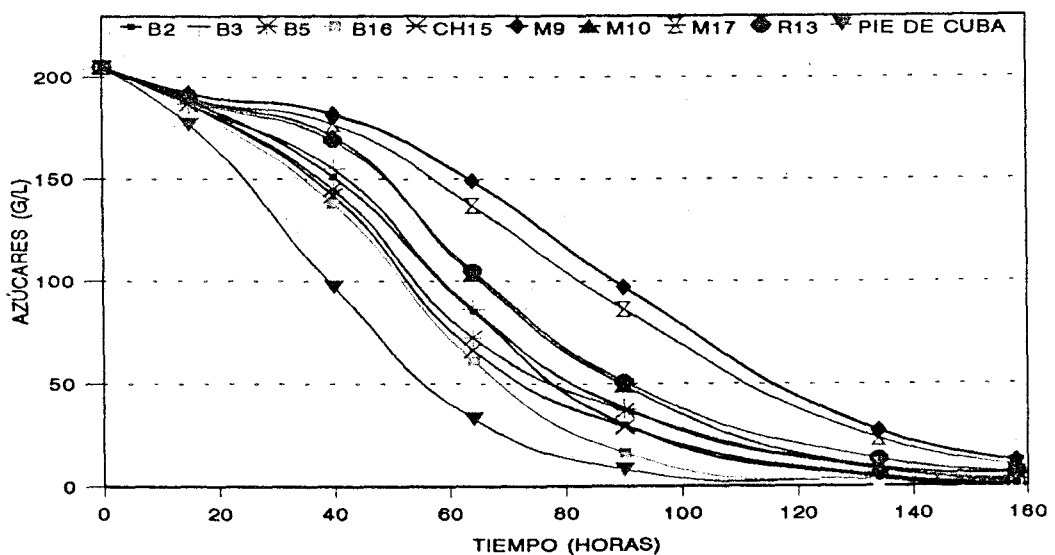


TABLA 36: Producción de etanol, acidez volátil y acetaldehído al cabo de la fermentación de mosto estéril por diferentes cepas de levaduras de velo y por la de "pie de cuba".

CEPAS	ETANOL (% v/v)	ACIDEZ VOLÁTIL (g/L)	ACETALDEHIDO (mg/L)
B2	10.6	1.0	78
B3	10.6	0.85	86
B5	10.5	0.69	73
B16	10.8	0.46	131
CH15	10.8	0.49	116
M9	10.8	1.0	59
M10	10.8	0.75	58
M17	10.7	1.1	77
R13	10.8	0.67	53
Pie de cuba	10.9	0.53	71

Entre las cepas de levaduras de velo de flor ensayadas, B16 y CH15 son las que presentan características fermentativas más destacables junto con la cepa "pie de cuba" (velocidad de fermentación mayor, el grado alcohólico final fue el máximo obtenido con las cepas de flor, baja producción de acidez volátil y mayor producción de acetaldehído). La diferencia más significativa entre estas dos cepas de flor y la de "pie de cuba" es la mayor producción de acetaldehído registrada por las de velo. La cepa "pie de cuba" produjo más etanol pero sólo una décima más que las más alcolígenas de las de velo.

Otros autores encuentran que las levaduras de velo registran una producción de acidez volátil y etanol, en la fermentación de mostos procedentes de la variedad "Pedro Ximenez" (Montilla-Moriles), superior a la que registran las levaduras

aisladas de la tercera fase fermentativa. Éstos concluyen que las levaduras de velo pueden ser perfectamente utilizadas en la fermentación de mostos destinados a crianza biológica; ya que la acidez volátil, producida en exceso, es metabolizada por estas mismas levaduras desde el momento que empieza a aparecer el velo (Íñigo y Arroyo, 1964; Guijo *et al.*, 1986). Sin embargo, dos de las cepas ensayadas en este estudio (B16 y CH15) producen menor acidez volátil que la cepa fermentativa ("pie de cuba").

Con respecto a los alcoholes superiores, no se registran diferencias significativas en la producción de n-propanol entre las diferentes cepas. Sin embargo, si se observan variaciones en la producción de Iso-butanol y de alcoholes Iso-amflicos entre las cepas estudiadas (Tabla 38). Contrariamente a lo obtenido en fase de velo, en la experiencia de crianza biológica con cultivos puros donde *S. montuliensis* y *S. rouxii* registraron una mayor producción de Iso-butanol y de alcoholes Iso-amflicos que *S. beticus* y *S. cheresiensis*, en fase fermentativa no se detectan diferencias a nivel de especies.

TABLA 37: Producción de alcoholes superiores por diferentes cepas de levaduras de velo y por la cepa "pie de cuba" durante la fermentación.

CEPAS	n-Propanol (mg/L)	Iso-Butanol (mg/L)	Iso-Amflicos (mg/L)
B2	23	42	107
B3	23	60	128
B5	22	49	129
B16	22	31	94
CH15	22	32	73
M9	18	55	101
M10	18	49	151
M17	23	60	122
R13	20	46	151
Pie de cuba	30	45	133

4.1.3.3.10.1. Resistencia al SO₂:

La resistencia al SO₂ es una cualidad que tienen que cumplir las levaduras seleccionadas para llevar a cabo la fermentación. Las cepas B16 y CH15 fueron capaces de fermentar un mosto que contenía 800 mg/L de sulfuroso.

Tanto la capacidad fermentativa como las características deseables ya estudiadas con respecto al envejecimiento biológico (las más rápidas en formar el velo a una graduación alcohólica de 15.5%, baja frecuencia inducida de formación de "petites", mayor viabilidad celular a dicha graduación, menor consumo de etanol y rápida degradación de la acidez volátil, etc) de las cepas B16 y CH15, hacen a dichas cepas de velo de flor las idóneas para su utilización como "pie de cuba" y posterior "envejecimiento biológico dirigido".

4.4. DISTRIBUCIÓN POBLACIONAL DE LOS VELOS DE FLOR EN SISTEMAS INDUSTRIALES DE CRIANZA BIOLÓGICA.

4.4.1. SISTEMAS ESTÁTICOS: AÑADAS.

La proporción de las distintas especies aisladas en los sistemas de añadas estudiados (Tabla 1, materiales) se representan en la Fig. 30. La población global se compone de:

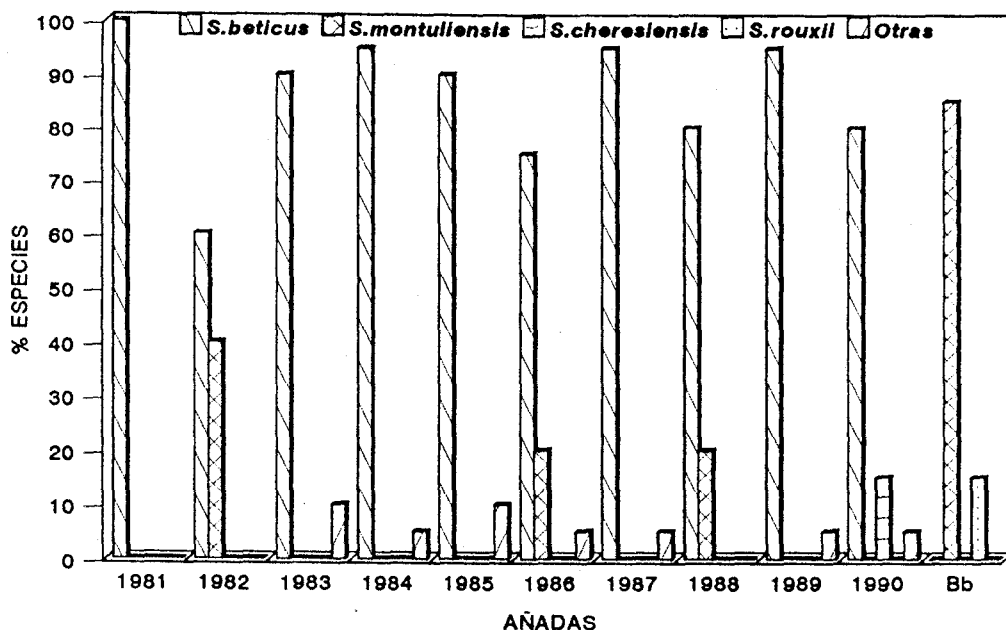
- *S. beticus*: 78.18%
- *S. montuliensis*: 15%
- *S. cheresiensis*: 1.36%
- *S. rouxii*: 1.36%
- Otras especies no pertenecientes al género *Saccharomyces*: 4.1%.

4.4.2. SISTEMAS DINÁMICOS: SOLERAJES.

La proporción de las distintas especies aisladas en las distintas escalas de envejecimiento de los solerajes estudiados (Tabla 2, materiales) se representa en las Fig. 31. La población global se compone de:

- *S. beticus*: 74.17%
- *S. montuliensis*: 14.17%
- *S. cheresiensis*: 8.33%
- *S. rouxii*: 0.28%
- Otras especies no pertenecientes al género *Saccharomyces*: 3.06%

FIGURA 30: Distribución poblacional en los sistemas de añadas.



Otras: *Candida* sp. (1.8%); *Pichia* sp. (0,45%); *Hansenula* sp. (1.4%); *Debaryomyces* sp. (0.45%).

Si bien no se observan diferencias significativas cuando se comparan las proporciones de las distintas especies en la población global de los distintos sistemas de envejecimiento (estático y dinámico), sí se encuentran diferencias en las distribuciones poblacionales que presentaban los solerajes estudiados. La especie *S. montuliensis* aparecía con una proporción mayor del 25% sólo en dos añadas (1982 y Bb) y en dos solerajes (B y C). Estas diferencias no se debían al distinto tipo de envejecimiento (estático, dinámico), ni al número de escalas del que se componían los sistemas (5,4,3,2) ni a la ubicación (Jerez, Sanlúcar). Cuando se analizó químicamente el vino de las añadas y escalas de los solerajes, la diferencia más significativa que presentaban fue la concentración de acetaldehído (Tabla 37 y 38). En aquellos sistemas donde los niveles de acetaldehído eran elevados (> 400 mg/L)

existía una presencia significativa de *S. montuliensis* (> 25%), y en aquellos donde los niveles de dicho compuesto eran menores se observaba una presencia casi exclusiva de *S. beticus*. En la añada de 1982 (518 mg/L de acetaldehído), un 40% de la población está compuesta por *S. montuliensis* y en la añada Bb (430 mg/L), dicha especie representa un 85% de la población. Los solerajes B y C son los que tienen mayor contenido en acetaldehído y en los que *S. montuliensis* representa aproximadamente un 25 y 40% respectivamente de la población total del soleraje.

Además, en los solerajes donde se aisló *S. montuliensis*, se puso de manifiesto la existencia de una SELECCIÓN ESCALAR: la proporción de *S. beticus*, especie que presenta la distribución más amplia, decrece al avanzar las escalas, es decir, conforme aumenta el tiempo de envejecimiento de un soleraje. La distribución de *S. montuliensis* sigue una tendencia inversa a la de la especie anterior, ya que su proporción aumenta en las escalas de mayor vejez que son las que poseen los niveles más elevados de acetaldehído, compuesto que aumenta con la crianza. Tanto *S. cheresiensis* como *S. rouxii* presentan una distribución bastante irregular.

TABLA 37: Contenido en acetaldehído y porcentaje de las distintas especies aisladas en los velos de flor de las añadas estudiadas.

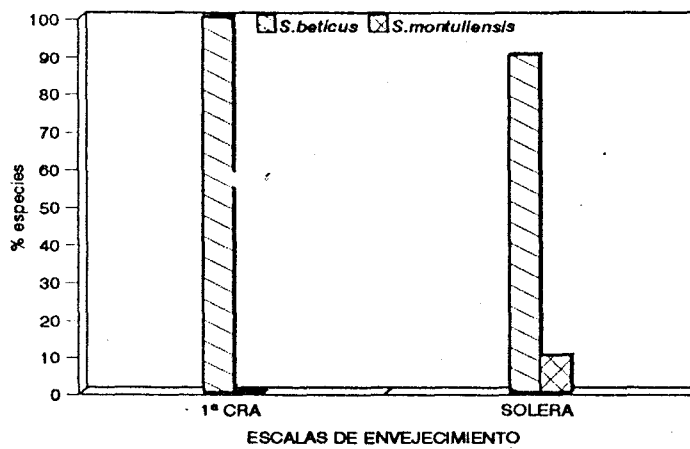
AÑADA	ACETALDEHÍDO (mg/L)	ESPECIES (%) ^a				
		B	M	CH	R	OTRAS
1981	262	100	0	0	0	0
1982	518	60	40	0	0	0
1983	189	90	0	0	0	10
1984	289	95	0	0	0	5
1985	103	90	0	0	0	10
1986	75	75	20	0	0	5
1987	62	95	0	0	0	5
1988	90	80	20	0	0	0
1989	69	95	0	0	0	5
1990	117	80	0	15	0	5
Bb	430	0	85	0	15	0

^a B: *S. beticus*, M: *S. montuliensis*, CH: *S. cheresiensis*, R: *S. rouxii*, OTRAS: especies aisladas no pertenecientes al género *Saccharomyces*.

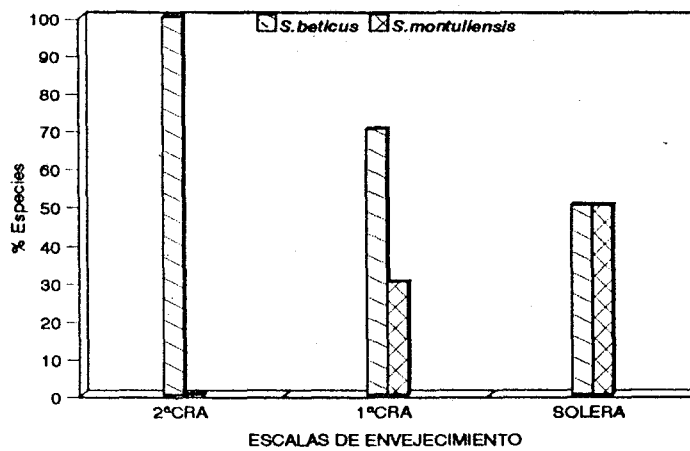


FIGURA 31: Distribución poblacional en los solerajes industriales.

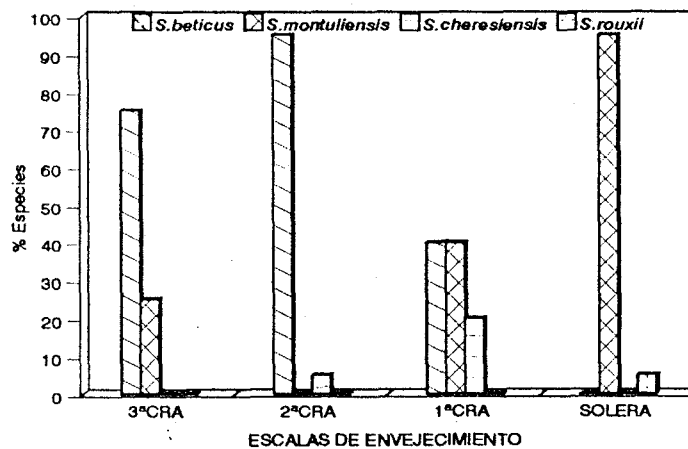
A.- Soleraje A



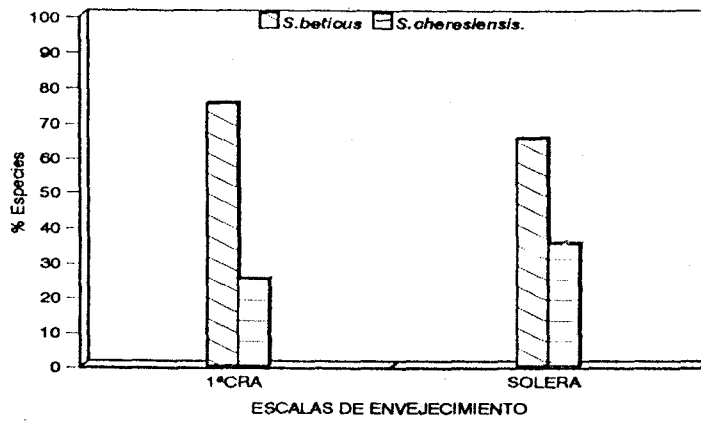
B.- Soleraje B



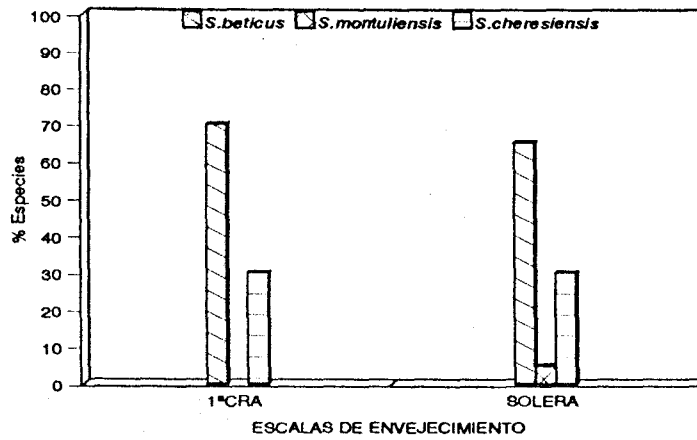
C.- Soleraje C



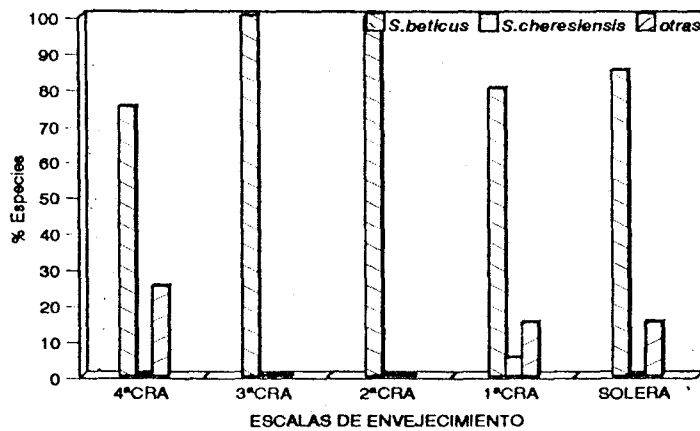
D.- Soleraje D



E.- Soleraje E



F.- Soleraje F



OTRAS: *Debaryomyces* sp. (5%); *Pichia* sp. (4%); *Candida* sp. (2%)

TABLA 38: Contenido en acetaldehido y porcentaje de las distintas especies aisladas en los velos de flor en las escalas que componen los solerajes estudiados.

SOLERAJES	ESCALA	ACETALDEHIDO (mg/L)	ESPECIES (%) ^a				
			B	M	CH	R	OTRAS
A	1ªCRA	91	100	0	0	0	0
	SOLERA	242	90	10	0	0	0
B	2ªCRA	116	100	0	0	0	0
	1ªCRA	504	70	30	0	0	0
	SOLERA	657	50	50	0	0	0
C	3ªCRA	125	75	25	0	0	0
	2ªCRA	288	95	0	5	0	0
	1ªCRA	452	40	40	20	0	0
	SOLERA	533	0	95	0	5	0
D	1ªCRA	53	75	0	25	0	0
	SOLERA	57	65	0	35	0	0
E	1ªCRA	63	70	0	30	0	0
	SOLERA	69	65	5	30	0	0
F	4ªCRA	127	75	0	0	0	25
	3ªCRA	180	100	0	0	0	0
	2ªCRA	164	100	0	0	0	0
	1ªCRA	190	80	0	5	0	15
	SOLERA	200	85	0	0	0	15

^a B: *S. beticus*, M: *S. montuliensis*, CH: *S. cheresiensis*, R: *S. rouxii*, OTRAS: especies no pertenecientes al género *Saccharomyces*.

4.4.3. FACTORES CONDICIONANTES DE LA SELECCIÓN ESCALAR.

4.4.3.1. Selección escalar a "escala laboratorio": naturaleza del sustrato y naturaleza de la cepa.

Con el fin de investigar las causas que originan la selección escalar observada entre las especie en algunos solerajes industriales, se ha llevado a cabo la siguiente experiencia: tubos de ensayo que contenían 10 mL de, S/T (vino joven), o de vino

procedente de la solera del soleraje A (90% *S. beticus*) o de vino de la solera del soleraje C (95% *S. montuliensis*) se inocularon con igual n° de células de las cepas B16, M10, CH15 y R13 (tres tubos por cada tipo de vino). Una vez formado el velo en la superficie, se tomaron muestras periódicamente y se determinó la proporción que presentaban las cuatro especies en la población. La identificación de las cepas se basó en el diferente patrón de fermentación de azúcares que presentan dichas especies. Por cada tipo de vino se aislaron 30 colonias (10 colonias por tubo) en cada toma de muestra. Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla 39.

TABLA 39: Evolución de la población de los velos de flor formados en tres tipos de vino diferentes.

Tiempo (Días) ^a	TIPO DE VINO:											
	Sobretablas				Solera A				Solera C			
	B ^b	M	CH	R	B	M	CH	R	B	M	CH	R
8	70	0	30	0	77	0	23	0	73	0	27	0
20	57	0	43	0	43	0	57	0	43	0	57	0
37	23	0	77	0	23	0	77	0	43	0	57	0
82	63	17	20	0	73	3	23	0	77	7	17	0

^a Tiempo transcurrido desde el inóculo.

^b Porcentaje de las diferentes especies, B: *S. beticus* (B16), M: *S. montuliensis* (M10), CH: *S. cheresiensis* (CH15), R: *S. rouxii* (R13). Los resultados son la media de los valores obtenidos en los tres cultivos por cada tipo de vino. La desviación típica fue menor del 10%.

La distribución de las distintas especies a lo largo del tiempo en los tres tipos de vinos utilizados resultó ser aproximadamente igual. Se observa una presencia casi exclusiva de *S. beticus* y *S. cheresiensis*, excepto en la cuarta toma de muestras en la que aparece *S. montuliensis* aunque en baja proporción. Al inicio del velo (formado por islotes) predomina *S. beticus*, disminuyendo posteriormente. La proporción de *S. cheresiensis* aumenta conforme el velo fue consolidándose (completo

y plegado). Cuando el velo comienza a debilitarse, aumenta de nuevo la proporción de *S. beticus*, disminuye la de *S. cheresiensis* y aparece *S. montuliensis*.

La presencia casi exclusiva de *S. beticus* y *S. cheresiensis* en los tres tipos de vinos utilizados se debe a que dichas especies son más veloces en formar el velo que *S. montuliensis* y *S. rouxii* a una graduación alcohólica de 15.5% (v/v) (Fig. 6). *S. montuliensis* se aísla, tan sólo, tras un largo periodo de envejecimiento (82 días).

Estas mismas cepas por separado se inocularon en los mismos sustratos. Todas formaron velo al cabo del tiempo, variable según la cepa.

Los resultados obtenidos indican que no es la carencia de ningún factor o micronutriente esencial para *S. beticus* lo que provoca su desaparición o disminución de su proporción en la población durante el envejecimiento biológico del vino ya que dicha especie formó velo de flor en el vino procedente de la solera C cuya población se componía en un 95% de *S. montuliensis* y un 5% de *S. rouxii*.

El hecho de que en las escalas jóvenes de los solerajes encontremos mayoritariamente a *S. beticus* y a *S. cheresiensis* se debe, probablemente, a que dichas especies son más rápidas en formar el velo que *S. montuliensis* y *S. rouxii*. Una vez concluida la fermentación y el vino resultante se encabeza a 15.5% (v/v) de etanol, la población de levaduras en él presente requiere un periodo de adaptación (variable según la cepa) a la vida aerobia en superficie durante el cual se producen cambios morfológicos (se alargan), en la composición de la pared (se hacen más hidrófobas), se sintetiza la maquinaria enzimática respiratoria etc. Una vez colonizada la superficie, la velocidad del crecimiento es prácticamente igual para todas las especies (Fig. 8)).

4.4.3.2. Producción de acetaldehído por diferentes cepas de levaduras de velo:

Dado que la presencia de *S. montuliensis* en la población de levaduras integrantes de los velos de flor se relaciona con altos niveles de acetaldehído y que la cepa M10 perteneciente a dicha especie produjo mayor cantidad de este compuesto

durante la experiencia de laboratorio de crianza con cultivos puros (Tabla 26) se consideró interesante estudiar la producción de acetaldehído por un mayor número de cepas.

El velo formado por las cepas B2, B3, B16, M9, M10, M12, M17, CH15 y R13 en mosto fermentado por ellas, se injertó en matraces de 100 mL de capacidad que contenían 50 mL de un S/T de graduación alcohólica 15% (v/v) y 125 mg/L de acetaldehído (por triplicado). Cuando se formó un velo completo y ténue (a los 13 días) se tomaron muestras y se les determinó el contenido en acetaldehído. Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla 40.

TABLA 40: Producción de acetaldehído por varias cepas de levaduras de flor pertenecientes a especies diferentes.

CEPAS	ACETALDEHIDO (mg/L)
B2	408
B3	490
B16	496
CH15	384
M10	603
M12	728
M17	792
M9	704
R13	546

Los resultados corresponden a la media de los tres cultivos de cada cepa. La desviación típica fue menor del 4%.

Aunque se observa un comportamiento diferente entre todas las cepas, la cantidad de acetaldehído producida por aquellas pertenecientes a *S. beticus* y *S. cheresiensis* es inferior a la registrada por las cepas pertenecientes a *S. montuliensis*

y *S. rouxii* (superiores a 500 mg/L). Así pues, se asocia al cultivo bajo velo de flor de *S. montuliensis* una mayor producción de acetaldehído, lo que justifica el mayor contenido en este compuesto encontrado en la 1ª CRA y en la solera de los solerajes B y C.

Otros autores también han encontrado una producción de acetaldehído variable entre cepas de la misma especie, aunque no manifestaron un comportamiento diferencial a nivel de especie (Cabezudo *et al.*, 1968; Iñigo y Arroyo, 1964 b; John y Rankiine, 1977).

En la experiencia de laboratorio de crianza biológica se registró un consumo de etanol superior en el cultivo de *S. montuliensis* (fig. 18). La presencia mayoritaria de esta especie en el velo de flor de los solerajes B y C, justifica el mayor consumo de etanol registrado en los solerajes ubicados en la bodega A (Fig. 15), en la cual se encuentran los solerajes B y C.

4.4.3.3. Formación de velo de flor a niveles crecientes de acetaldehído:

El hecho de que la proporción de *S. beticus* disminuya y la de *S. montuliensis* aumente conforme se avanza en las escalas de mayor vejez puede deberse a la aparición o incremento en la concentración de algún compuesto que favoreciera a *S. montuliensis*. Se estudió al acetaldehído como posible factor desencadenante de la selección escalar.

El velo de las cepas seguidamente indicadas formado en mosto fermentado por ellas mismas, se injertó en un S/T al que se le había añadido concentraciones crecientes de acetaldehído, contabilizándose el tiempo (días) que tardó en cubrirse totalmente la superficie. Los resultados obtenidos se expresan en la Tabla 41.

El acetaldehído ejerce un efecto inhibitor de la formación de velo, retrasándola o inhibiendo completamente el desarrollo de éste cuando supera el nivel crítico de tolerancia. *S. montuliensis* y *S. rouxii* son más tolerantes a dicho

compuesto que las otras dos especies. Los intervalos de tolerancia varían entre las distintas cepas dentro de cada especie. Sin embargo, ninguna cepa de *S. beticus* ni de *S. cheresiensis* forma velo cuando la concentración de acetaldehído es superior a 550 mg/L, mientras que M9, M17 y R13 (*S. montuliensis* y *S. rouxii*) lo formaron cuando los niveles de dicho compuesto era de 780 mg/L. Además, el crecimiento de todas las cepas de *S. beticus* se vió retrasado a partir de la concentración de 270 mg/L. Sin embargo, la formación de velo de las cepas pertenecientes a *S. montuliensis* y a *S. rouxii* no se vió afectada prácticamente hasta que la concentración de acetaldehído no fue superior a 550 mg/L. En los casos en los que no se formó velo, los islotes injertados en la inoculación adoptaron una coloración negra.

TABLA 41: Tiempo requerido (días) para la formación de velo de flor por diferentes cepas de levaduras en un vino con concentraciones crecientes de acetaldehído.

CEPAS	ACETALDEHIDO (mg/L)					
	100	270	450	550	620	780
B2	6	8	12	16	- ^a	-
B3	6	11	-	-	-	-
B16	6	11	11	12	-	-
CH15	6	6	6	14	-	-
M9	6	8	9	8	10	21
M10	6	6	6	6	-	-
M12	7	7	11	14	-	-
M17	6	6	6	6	17	16
R13	6	6	8	6	8	21

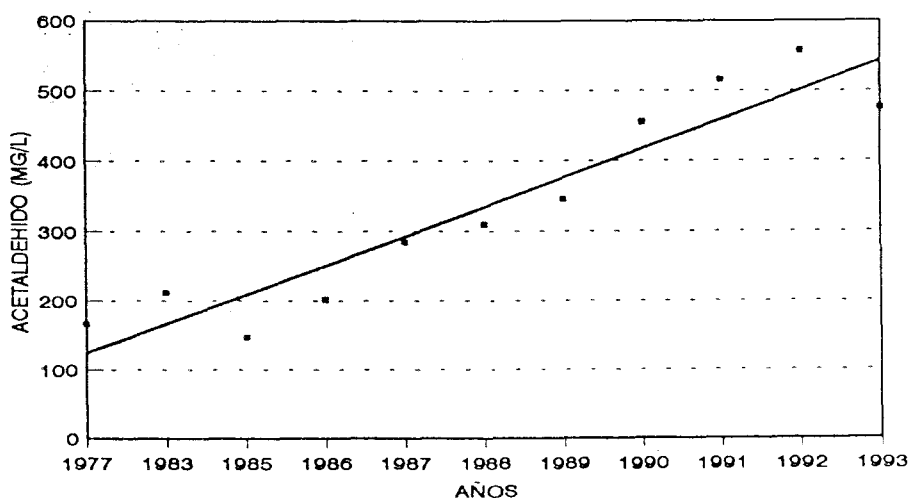
^a -: no se formó velo.

Los resultados son la media de dos experimentos independientes, realizados cada uno de ellos por triplicado. La desviación típica fue menor del 10%.

La concentración de acetaldehído aumenta progresivamente conforme aumenta el tiempo de envejecimiento y a medida que aumenta la proporción de *S.*

montuliensis en el velo de flor, debido a que dicha especie produce niveles altos de este compuesto durante su metabolismo oxidativo en la crianza biológica. *S. beticus* al ser menos tolerante al acetaldehído que *S. montuliensis* se ve desplazada, seleccionándose ésta última a favor. Debido a la mayor rapidez de *S. beticus* en formar el velo, dicha especie es la predominante en las escalas jóvenes donde el contenido de acetaldehído es todavía bajo (no supera los 300 mg/L). los niveles de acetaldehído aumentan progresivamente a consecuencia del metabolismo de dicha especie, que además al ser más tolerante a niveles elevados se selecciona a favor desplazando a *S. beticus* especie mayoritaria en las escalas jóvenes de los solerajes.

FIGURA 32: Evolución del contenido en acetaldehído en las soleras de los solerajes situados en la bodega A, registrada durante los últimos años.



El aumento progresivo de la concentración de acetaldehído registrado durante los últimos años en algunas de las soleras de vinos finos (Fig. 32), se justificaría con un incremento paralelo en la proporción de la especie *S. montuliensis* en la población de los velos de flor. Dicha especie ha ido introduciéndose en la población de aquellos solerajes donde no se encontraba debido a la práctica de "injerción de velo" llevada a cabo en Bodega (cuando una bota pierde el velo o éste se encuentra en mal estado, el velo recogido de cualquier otra bota, incluso perteneciente a otro soleraje diferente, se injerta en dicha bota). La velocidad de formación de flor entre las

distintas especies es similar cuando el inóculo se realiza a partir de velo (Fig. 8), por lo que en este caso *S. beticus* no se ve favorecida con respecto a *S. montuliensis*. A medida que aumentan los niveles de acetaldehído a consecuencia del metabolismo de *S. montuliensis*, ésta se va seleccionando a favor.

4.4.3.4. Relación entre la viabilidad celular, aspecto del velo de flor y niveles de acetaldehído:

Durante el estudio de los solerajes se evidenciaron velos de flor en determinadas botas que presentaban un aspecto macroscópico diferente del normal. Fundamentalmente, se distinguían tres tipos: 1) velo de color "blanco", completo y plegado; 2) velo "negro", parcial y ténue; 3) velo con características intermedias de color "grisáceo".

Del soleraje C, se tomaron muestras del velo de 15 botas con el velo en buen estado (10 correspondientes a la solera y 5 a la 1ª CRA), de 10 con el velo deteriorado (6 correspondientes a la solera y 4 a la 1ª CRA) y de 5 botas de la solera que presentaban un velo de características intermedias, y se les determinó la viabilidad celular por tinción con azul de metileno. También se tomaron muestras de vino de dichas botas y se les determinó el contenido en acetaldehído. Nueve muestras de velo, tres por cada tipo de velo ("blanco", "negro", "gris"), se sembraron en YPD y se aislaron cinco colonias por bota. Los resultados se expresan en la Tabla 42. Todas las colonias aisladas pertenecían a la especie *S. montuliensis*.

Los resultados obtenidos en las botas estudiadas de la 1ª CRA y las de solera, tanto las que poseían la flor "blanca" como las de flor "negra", fueron similares. Se observa grandes diferencias entre los niveles de acetaldehído y la viabilidad celular de los tres tipos de velos analizados.

la viabilidad celular de la flor se asocia con el aspecto del velo, de tal manera que en el velo de color "negro" encontramos el 95% de las células muertas, en los de tonalidad "grisácea" un 72% y en los de color "blanco" un 50%. Las células

muertas adquieren un color negro. A su vez, la viabilidad celular se relaciona con los niveles de acetaldehído que contiene el vino. Cuanto mayor es la concentración de acetaldehído, menor viabilidad celular presenta el velo. A niveles elevados, aproximadamente a partir de 1000 mg/L, el velo adquiere un color negro ya que las células están muertas.

TABLA 42: Contenido en acetaldehído y viabilidad celular del velo de botas que presentaban diferentes estados del velo.

Estado de velo	Acetaldehído (mg/L) ^a			Viabilidad celular (%) ^b
	Mínimo	Media	Máximo	
BLANCO	385	556	684	51
GRIS	682	808	922	28
NEGRO	922	1157	1238	5

^a Los resultados corresponden al contenido mínimo, al contenido máximo, y a la media de todos los valores.

^b Los resultados corresponden a la media de la viabilidad presentada por todas las botas analizadas (tres determinaciones por muestra). La desviación típica fue del 10%.

A medida que los niveles de acetaldehído van aumentando, a consecuencia del metabolismo de *S. montuliensis*, la viabilidad del velo va disminuyendo ya que se llega a la concentración límite de tolerancia, éste se va oscureciendo paulatinamente hasta que adquiere un color negro.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES.

- La población existente en los velos de flor en los sistemas de crianza biológica es heterogénea y se compone fundamentalmente por especies del género *Saccharomyces*. Existe un notable predominio de *S. beticus*, seguida de *S. montuliensis*, encontrándose *S. cheresiensis* y *S. rouxii* en menor proporción.

- Las levaduras de velo de flor presentan una gran variabilidad en el contenido en ADN. Sin embargo, muestran un patrón cromosómico mayoritario característico, no pudiéndose establecer relación alguna entre una variación específica y una determinada especie.

- El ADN mitocondrial de las levaduras de velo es más variable que el ADN nuclear. El análisis de los fragmentos de restricción del ADNmt, no sólo permite la identificación individual de la mayoría de las cepas por su patrón característico sino también en muchos casos, la clasificación de las cepas dentro de grupos taxonómicos de gran interés industrial (uno integrado por *S. beticus* y *S. cheresiensis* y otro por *S. montuliensis* y *S. rouxii*).

- Las levaduras de velo de flor son protótrofas para todos los aminoácidos y auxótrofas para la biotina. Las cepas de *S. rouxii* son también auxótrofas para el *myo*-inositol. Sin embargo, es el pantotenato el único factor esencial para la formación de velo en un medio de contenido alcohólico de 15% vol.

- Ninguna de las cepas estudiadas producen el factor killer aunque la respuesta a las toxinas K1 y K2 parece ser específica de especie. Las cepas de *S. beticus* y *S. cheresiensis* son resistentes mientras que *S. montuliensis* y *S. rouxii* son sensibles tanto a la K1 como a la K2.

- El tiempo requerido por las células de levaduras para alcanzar la superficie de los S/T (vino joven encabezado a 15.5% vol de etanol), cuando se encuentran

sumergidas, varía entre las distintas cepas, aunque aquellas pertenecientes a la especie *S. beticus* y *S. cheresiensis* son más rápidas que las de *S. montuliensis* y *S. rouxii*. Sin embargo, no existen diferencias significativas entre las cuatro especies cuando el S/T se "injerta" con el velo ya formado.

- La formación de velo aparecería en levaduras vínicas como un mecanismo adaptativo que les permite crecer en un medio de elevado grado alcohólico cuyas únicas fuentes de carbono son respirables. De hecho, las cepas de este estudio cuyo crecimiento se vió más inhibido por el etanol durante la fase no filmógena son las que requieren menor tiempo para formar el velo de flor. Asimismo, las cepas más rápidas en formar el velo son las que presentan mayor viabilidad y menor frecuencia inducida de formación de "petites" en vino de 15.5% vol de etanol donde las células no se dividen hasta que no colonizan la superficie.

- La formación de velo puede acelerarse cuando las células se precultivan en un medio con etanol y cuando hay glucosa en el medio, aunque la superficie no se coloniza hasta que la fuente de carbono fermentable se agota.

- La hidrofobicidad de la superficie celular es mayor en las células en fase de velo que en fase fermentativa. Presumiblemente, este aumento de la hidrofobicidad se debe a la presencia en la pared de proteínas hidrofóbicas. La hidrofobicidad de la superficie celular favorece la agregación entre las células. Los agregados celulares retienen burbujas gaseosas, haciéndose menos densos que el vino y flotando, por tanto, en la superficie donde la toma de O₂ no está restringida.

- Además de los cambios en la hidrofobicidad, la formación de velo trae consigo cambios en la forma y en el tamaño celular. Las células en fase fermentativa son más esféricas y pequeñas que en fase filmógena. Asimismo, la pared celular de las células en fase de velo es más delgada que la de las células fermentando.

- Las prácticas enológicas de desfangado, clarificación y filtración de los mostos traen consigo una mayor producción de acidez volátil durante la fermentación

y un retraso en la formación de velo en el vino resultante alcoholizado a 15.5% vol.

- Durante la crianza biológica de los vinos finos de Jerez se produce un fuerte consumo de alcohol, glicerina, ácidos orgánicos y aminoácidos; y producción de otros compuestos tales como alcoholes superiores y acetaldehído. Las distintas especies integrantes de los velos de flor presentan diferencias metabólicas con respecto a algunos de los compuestos anteriormente citados, pudiéndose establecer la existencia de dos grupos taxonómicos de gran interés industrial. Uno de ellos lo compone *S. beticus* y *S. cheresiensis* y el otro *S. montuliensis* y *S. rouxii*, presentando las especies integrantes de cada grupo un comportamiento metabólico similar.

- El consumo de alcohol viene determinado por diversos factores. Ejerce una apreciable influencia la especie dominante de levadura en el "velo de flor" y fase en que se encuentra. *S. montuliensis* y *S. rouxii* consumen mayor cantidad de etanol que *S. beticus* y *S. cheresiensis*. La fase de formación del velo registra un consumo superior a la de mantenimiento del mismo, por lo que tiene gran importancia las alteraciones que sufre en los procesos de manipulación del soleraje.

- *S. montuliensis* y *S. rouxii* producen mayor cantidad de acetaldehído, acetofina, Iso-butanol y alcoholes Iso-amílicos durante la crianza biológica que *S. beticus* y *S. cheresiensis*. Dependiendo de las características deseadas en el vino resultante y atendiendo a las diferencias metabólicas entre las diferentes especies, se puede dirigir de una manera más controlada el envejecimiento biológico del vino, "injertando" en las botas velo formado por una u otra especie.

- El consumo de glicerina, ácidos orgánicos y aminoácidos se produce una vez consolidado el velo, no existiendo diferencias significativas entre las distintas especies. La intensidad del velo (actividad biológica) incide sobre el consumo de dichos compuestos, estando condicionada por las características climáticas de las bodegas (Humedad y Temperatura que también repercuten en la "merma").

- La flora bacteriana existente en los sistemas de crianza biológica juega un importante papel junto con las levaduras de velo de flor en el metabolismo de algunos de los componentes estudiados (ácido glucónico, málico, láctico ...).

- Las levaduras de velo de flor pueden ser utilizadas como agentes fermentativos mediante la adición al mosto de un "pie de cuba". La fermentación dirigida del mosto de uva por una cepa de levadura de flor origina un vino con unos caracteres más adecuados para la posterior crianza, reduciéndose el tiempo requerido para la formación de velo y llevándose a cabo indirectamente una "crianza biológica dirigida". *S. beticus* y *S. cheresiensis* presentan una velocidad fermentativa mayor que *S. montuliensis* y *S. rouxii*. De entre las cepas estudiadas, destacan B16 y CH15 por su alto poder fermentativo, baja producción de acidez volátil y alta producción de acetaldehído.

- Existe una SELECCIÓN ESCALAR entre las distintas especies, en aquellos solerajes donde *S. montuliensis* forma parte de la población de levaduras del velo de flor. Debido a la mayor rapidez de *S. beticus* en formar el velo, dicha especie es la mayoritaria en las escalas jóvenes. La proporción de *S. beticus*, especie que presenta la distribución más amplia, decrece al avanzar las escalas, es decir conforme aumenta el tiempo de envejecimiento de un soleraje. La distribución de *S. montuliensis* sigue una tendencia inversa a la de la especie anterior, ya que su proporción aumenta en las escalas de mayor vejez.

- El acetaldehído, a ciertos niveles, ejerce un efecto tóxico e inhibitorio del crecimiento en las células de levaduras. La tolerancia a dicho compuesto varía entre las diferentes cepas de levaduras de velo de flor aunque aquellas cepas pertenecientes a las especies *S. montuliensis* y *S. rouxii* presentan un nivel crítico de tolerancia superior a las cepas de *S. beticus* y *S. cheresiensis*.

- La concentración de acetaldehído aumenta progresivamente conforme aumenta el tiempo de envejecimiento y a medida que aumenta la proporción de *S. montuliensis* en el velo de flor, debido a que dicha especie produce niveles mayores

de este compuesto durante su metabolismo oxidativo en la crianza biológica. *S. beticus* al ser menos tolerante al acetaldehído que *S. montuliensis* se ve desplazada, seleccionándose ésta última a favor.

- El aumento progresivo del contenido en acetaldehído registrado durante los últimos años en las soleras de algunos solerajes se debe a un aumento paralelo en la proporción de *S. montuliensis* en la población de los velos de flor, favorecido por la práctica de "injerción de velo" llevada a cabo en la bodega.

6 . BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J., Puskas-Rozsa, S., Simlar, J. y Wilke, C.M. 1992. Adaptation and major chromosomal changes in populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 22, pp: 13-19.
- Aguilera, A., y Benítez, T. 1989. Synergistic effects of ethanol and temperature on yeast mitochondria. *Curr. Microbiol.* 18, pp: 179-188.
- Alexandre, H., Nguyen van Long, T., Feuillat, M. y Charpentier, C. 1994. Contribution a l'étude des bourbes: influence sur la fermentescibilité des mounts. *Rev. Fr. Oenol. Cahier scientifique*, 146, pp:11-20.
- American Society of Enologist. 1972. Uniform Methods of Analysis for Wine and Spirits. ASE (Davis, USA).
- Amerine, M.A. y Kunkee, R.E. 1968. Microbiology of winemaking. *Ann. Rev.. Microb.* 22, pp: 323-358.
- Arnold, W.N. 1972. The structure of the yeast cell wall. *J.Biol.Chemistry*, 247, pp: 1161-1169.
- Avakians, S. 1990. La theorie du vieillissement du vin. Inst. de l'Industrie Alimentaire de Moscow. Comunicación Jerez de la Frontera.
- Bakalinky, A.T. y Snow, R. 1990. The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 6, pp: 367-382.
- Bandas, E.L., y Zakharov, I.A. 1980. Induction of rho mutations in yeast *Saccharomyces cerevisiae* by ethanol. *Mutat.Res.* 71, pp: 193-199.
- Barnett, J.A. 1992. The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyen ex Reess: a short review for non-taxonomists. *Yeast*, 8, pp: 1-23.



- Barnett, J.A.; Payne, R.W., y Yarrow, D. 1990. Yeast: characteristics and identification. 2th ed. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Barre, P. 1992. Les moyens d'intervention su l'expression des caractères des souches de levures. *Biologia Oggi* VI (1-2), pp: 117-126.
- Bidenne, C., Blondin, B., Dequin, S. y Vezinhet, F. 1992. Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 22, pp: 1-7.
- Botella, M.A.; Pérez, L.; Domecq, B. y Valpuesta, V. 1990. Amino acid content of fino and Olorosos Sherry Wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 41, 1, pp: 12-15.
- Botsein, D. y Fink, G.R. 1988. Yeast: an experimental organism for modern biology. *Science*, 240, pp: 1439-1443.
- Brandriss, M.C. y Magasanik, B. 1979. Genetics and physiology of proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*; enzyme induction by proline. *J. Bacteriol.*, 140, pp: 498-503.
- Bravo, F. 1984. Consumo de glicerina por levaduras de flor en vinos finos. *Alimentaria*, 156. pp: 19-24
- Bravo, F. 1986. Crianza biológica del vino: procedimiento tradicional de vinos finos de D.O. Jerez y D.O. Montilla-Moriles. *Enol. y Enotec.*, Marzo, pp: 15-19.
- Bussey, H. 1991. K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast. *Mol. Microbiol.*, 5, pp: 2339-2343.
- Byers, B., y Goetsch, L.. 1991. Preperation of yeast cells for thin- section electron microscopy, p:602-608. *En* C. Guthrie, y G.F. Fink (ed.), *Methods in enzymology: guide to yeast genetics and molecular biology*. Academia Press, INC.,

San Diego, California.

-Cabezudo, M^a.D.; Llaguno, C. y Garrido, J.M^a. 1967. Aspectos de la crianza de vinos finos por levaduras de flor. Rev. Cienc. Aplic. 119, pp: 501-512.

-Cabezudo, M.D.; Llaguno, C. y Garrido, J.M. 1968. Accelerated aging of fino wines by submerged culture using film-forming yeasts. Am. J. Enol. Vitic., 19, 1, pp: 63-69.

-Campbell, I. y Duffus, J.H. 1988. Standar media for cultivation of yeast, pp: 277-279. En D. Rickwood and B.D. Hames (ed.), Yeast: a practical approach. IRL Press, Oxford, England.

-Cansado, J.; Longo, E.; Agrelo, D. y Villa, T.G. 1989. Levaduras asociadas a procesos de fermentación espontánea en vinos de Ribeiro. Análisis del homo/heterotalismo y sistema killer de las cepas de *S. cerevisiae*. Microbiología SEM, 5, pp. 79-88.

-Cansado, J., Velázquez, J.B., Sieiro, C., Calao, P., Longo, E. y Villa, T.G. 1992. Role of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* in spontaneous fermentations, pp: 127-142. En Villa T.G. and Abalde, J. (Eds). Profiles on Biotechnology, Univ. Santiago Compostela.

-Casas, J. 1954. Acetoína y sus derivados en los vinos de crianza con flor. Comunicación al IX Congreso de Industrias Agrícolas y Alimenticias, Madrid.

-Casas Lucas, J.F. 1967. Procédés d'elaboration des vins de Xérèx. En: Fermentations et Vinifications, 2, pp: 495-508. INRA, Paris.

-Casas, J.F. 1973. Tecnología de la elaboración de los vinos generosos del sur de España. Procceding 53 Asamblea OIV., Madrid.

-Casas, J.F. 1984. Descripción resumida de la técnica enológica de los vinos de Jerez. Proceeding III Jornadas universitarias sobre el Jerez, pp: 333-362. U. de Cádiz.

-Codón, A.C. 1994. Cepas panaderas de *Saccharomyces cerevisiae*: caracterización y mejora de algunas de sus propiedades. Tesis doctoral, U. Sevilla.

-Codón, A.C.; Gasent, J.M. y Benítez, T. 1995. Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. Appl. Environ. Microbiol. *In press*.

-Cooper, T.G. 1982. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. En Strathern, J.N., Jones, E.W. and Broach, J.R. (eds). The molecular Biology of the yeast *Saccharomyces*. CSH, Cold Spring Harbor Laboratory, USA.

-Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Debeer, D., Caldwell, D., Korber, D. y James, G. (1994). Biofilms, the customized microniche. Minireview. J. Bacteriol. 176: 2137-2142.

-Courchesne, W.E. y Magasanik, B. 1983. Ammonia regulation of amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell Biol., 3, pp: 672-683.

-Cruess, W.V.; Weast, C. y Gilliland, R. 1938. Summary of practical investigations on film yeasts. The fruit products Journal and American vinager industry, abril, pp: 229-231.

-Cruess, W.V. 1948. Investigations of the flor Sherry process. Calif. Agric. Exp. Station. Boletín 710.

-De Jonge, P., De Jongh, F.C.M., Meijers, R., Steensma, Y.H. y Scheffers, W.A. 1986. Orthogonal-field-alternation gel electrophoresis banding patterns of DNA from yeasts. Yeast, 2, pp: 193-204.

-Delanoe, D.; Maillard, C. and Maisondieu, D. 1987. Le vin, de l'analyse à l'elaboration. Technique et documentation, Paris.

-Delfini, C. y Costa, A. 1993. Effects of the grape must lees and insoluble materials on the alcoholic fermentation rate and the production of acetic acid, pyruvic acid and acetaldehyde. *Am.J.Enol.Vitic.*, 44, pp: 86-92.

-Delfini, C., Cocito, C., Ravaglia, S. y Coterno, L. 1993. Influence of clarification and suspended grape solid materials on sterol content of free run and pressed grape must in the presence of growing yeast cells. *Am.J.Enol.Vitic.*, 44, pp: 452-459.

-Díaz Alonso, A.L. 1989. Técnicas de crianza de los vinos generosos andaluces. *Alimentación: Equipos y Tecnología*, 8, pp: 61-64.

-Domecq, B. 1989. Sherry: state of art on a very special fermentation product. *Proceeding International Symposium on Yeasts (ISSY XIII)*, Leuven.

-Estrella, I.; Hernández, T.; Olano, A. y Diez, C. 1983. Evolution of phenolic compounds of low molecular weight and polyalcohols during aging of Sherry wines. *Proceedings de 2nd. European conference on Food Chem. II*, pp: 231-236, Roma.

-Fénandez, M.J.E.; Llaguno, C. e Iñigo, B. 1964. Metabolismo de levaduras I: asimilación de los ácidos tartárico y láctico. *Rev. Cienc. Aplic.*, 98, pp: 223-233.

-Fénandez, M.J.E.; Llaguno, C. e Iñigo, B. 1966. Metabolismo de levaduras II: asimilación de los ácidos málico, cítrico y succínico. *Rev. Cienc. Aplic.*, 3, pp: 315-336.

-Fernandes, P.A., Sousa, M., y Moradas-Ferreira, P. 1993. Flocculation of *Kluyveromyces marxianus* is induced by a temperature upshift. *Yeast* 9, pp: 859-866.

-Fernandez de Bobadilla, G. 1943. Aplicaciones industriales de las levaduras de flor. *Agricultura*, 12, pp:203-207.

-Fernandez de Bobadilla, G. y Navarro, E. 1949. Vinos de Jerez. Estudios de sus ácidos desde el periodo de madurez de la uva hasta el envejecimiento del vino. *Bol. 21 del Ins. Nac. de Inv. Agron*, cuaderno 122, pp: 473-517.

-Fernandez de Bobadilla, G. y Navarro, E. 1952. Vinos de Jerez. Contribución al estudio de sus características. Analisis de varios tipos de vinos. *Bol. 27 del Ins. Nac. de Inv. Agron*, cuaderno 178, pp: 377-395.

-Fleet, G.H. 1991. Cell walls, pp:199-277. *En: A.H. Rose y J.S. Harrison (eds). The yeast*, 4, Ac. Press, Londres.

-Fornachon, J.C.M. 1953. Estudios on the Sherry flor. Australian Wine Board, Adelaida, Australia.

-Freiberg, J. y Cruess, W.V. 1955. A study of certain factors affecting the growth of flor yeast. *Appl. Microbiol.*, 3, pp: 208-212.

-García Maíquez, E., 1982. Evolución de levaduras durante la fermentación alcohólica del Jerez. *Actas de las II Jornadas Universitarias sobre el Jerez*. Cádiz.

-González Gordón, M.M^a. 1948. Jerez-Xerez-Sherish. Jerez de la Frontera, Cádiz.

-Guijo, S., Millán, C. y Ortega, J.M. 1986. Fermentative features of vinification and maturation yeasts isolated in the Montilla-Moriles region of Southern Spain. *Food Microbiology*, 3, pp: 133-142.

-Guillén, D.A. 1994. Estudio del fraccionamiento previo al HPLC en el análisis de polifenoles del vino de Jerez. Tesis doctoral, U. Cádiz.

- Iimura, Y., Hara, S. y Otsuka, K.. 1980a. Cell surface hydrophobicity as a pellicle formation factor in film strain of *Saccharomyces*. *Agric. Biol. Chem.* 44: 1215-1222.
- Iimura, Y., Hara, S., y Otsuka, K. 1980b. Fatty Acids as hidrophobic Substance on cell surface of film strain of *Saccharomyces*. *Agric. Biol. Chem.* 44, pp: 1223-1229.
- Ingledew, W.M., y Kunkee, R.E. 1985. Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.*, 36, pp: 65-76.
- Ingledew, W.M., Magnus, C.A. y Sosulski, F.W. 1987. Influence of Oxygen on proline utilization during the wine fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, 38, 3, pp: 246-248.
- Iñigo Leal, B. 1980. La crianza biológica del vino. Conferencia presentada en las I Jornadas Universitarias sobre el Jere. U. Cádiz.
- Iñigo Leal, B. 1992. El análisis microbiológico en la investigación y control del vino. *VitiVinicultura*, 2, pp: 51-54.
- Iñigo Leal, B y Arrollo Varela, V. 1964. Microbiología de los velos desarrollados sobre vinos de la zona de Montilla y Los Moriles. *Rev. Cienc. Apli.*, 18, pp: 23-29.
- Iñigo Leal, B y Arrollo Varela, V. 1964. Contribución al estudio del metabolismo de levaduras filmógenas y no filmógenas de la zona de Montilla y Los Moriles. *Rev. Cienc. Apli.*, 99, pp: 305-314.
- Iñigo Leal, B. y Bravo, F. 1963. Acidez y levaduras vnicas VI: Ensayos sobre la metabolización aeróbica de la acidez orgánica fija del vino por especies de

levaduras vínicas. Rev. Cienc. Aplic., 17, pp. 406-409.

-**Iñigo Leal, B. y Bravo, F.** 1993. Vinificación ecológica industrial como proceso fermentativo de biología múltiple. Alimentación: Equipos y Tecnología, 2, pp: 85-89.

-**Iñigo Leal, B.; Vazquez, D. y Arroyo, V.** 1963. Los agentes de fermentación vínica en la zona de Jerez. Revista de Ciencias Aplicadas, 93, 296-305.

-**Iñigo Leal, B., Suarez, J.A., Aldana, J^a. y Bravo Abad, F.** 1990. Microorganismos residuales desarrollados en vinos ahilados. VitiVinicultura, 3, pp: 62-63.

-**Jiménez, J.** 1986. Caracterización genética de cepas de levaduras para la producción industrial de etanol. Tesis Doctoral, U. Sevilla.

-**Jiménez, J., y T. Benítez.** 1987a. Adaptation of yeast cell membranes to ethanol. Appl. Environ. Microbiol. 53, pp: 1196-1198.

-**Jiménez, J., y Benítez, T.** 1987b. Genetic analysis of highly ethanol-tolerant wine yeast. Curr. Genet. 12, pp: 421- 428.

-**Jiménez, J., y Benítez, T.** 1988. Yeast cell viability under conditions of high temperature and ethanol concentrations depends on the mitochondrial genome. Curr. Genet. 13, pp: 461-469.

-**Jiménez, J., Longo, E., y T. Benítez.** 1988. Induction of petite yeast mutants by membrane-active agents. Appl. Environ. Microbiol. 54, pp: 3126-3132.

-**John, P. y Rankiine, B.C.** 1977. Influence of temperature during surface film growth on quality of flor Sherry. Annual Technical Issue, Australian grapegrower and winemaker, 160, pp: 44-47.

- Keiding, A.K.** 1988. Genetic analysis and transformation of distiller's yeast. *En: Beer analysis. Modern methods of plant analysis, New Series, 6*, pp: 145-163, Linskens, H.F. y Jackson, J.F. (Eds). Springer-Verlag, Berlin.
- Khayat, N.; Esteban, M.C. y Arroyo, V.** 1980. Contribución al estudio de levaduras de velo I, II. *Microbiol. Española*, 32-33, pp: 85-95.
- Kitamoto, K., Gomi, K., Goto, K. y Hara, S.** 1991. Genetic transfer applied to traditional sake brewing. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 9, pp: 89-125.
- Krejer-van Rij, N.J.W.** 1984. *The yeast, a taxonomic study.* Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Kreuz, R.** 1993. Nuevos desarrollos en la aplicación de levaduras en enología y panadería. *Alimentación: Equipos y Tecnología*, 2, pp: 98-102.
- Kunkee, R.E. y Amerine, M.A.** 1970. Yeasts in wine-making, pp: 5-71. *En: A.H. Rose y J.S. Harrison (Eds), The yeasts*, Ac.Press, Londres.
- Larue, F., Lafon-Lafourcade, S., y Ribereau-Gayon, P.** 1980. Relationship between the sterol content of yeast cells and their fermentation activity in grape must. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, pp: 808-811.
- Larue, F. y Froudiere, I.** 1989. Influencia de la clarificación de mostos de vendimias blancas sobre la fermentación alcohólica. *En Fermentaciones lentas, paradas de fermentaciones en vinos blancos y rosados, IV cursos Rioja, Haro, Rioja.*
- Lodder, J. y Krejer van Rig, N.J.W.** 1952. *The Yeast, a taxonomic study.* North Holland Pub. Co. Amsterdam, The Netherlands.

- Mantachian, E.A.** 1984. Synthesis of proline oxidase in *Saccharomyces vini*: Regulation by the introduction of repressing factor. *Biol. J. Armenia*, 37, pp: 46-50.
- Marcilla, J.; Alas, G. y Feduchy, E.** 1936. Contribución al estudio de las levaduras que forman velo sobre ciertos vinos de elevado grado alcohólico. *Anales Centro Inv. Vinícolas de Madrid*, 1,1.
- Martínez, J., Millan, C. y Ortega, J.M.** 1989. Growth of natural flora during the fermentation of inoculated musts from "Pedro Ximenez" grapes. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 10, pp: 31-35.
- Martínez de la Ossa, E., Caro, I., Bonat, M., Pérez, L. y Domecq, B.** 1987a. Dry extract in Sherry and its evolution in the aging process. *Am. J. Enol. Vitic.* 38, pp: 293-297.
- Martínez de la Ossa, E.; Pérez, L. y Caro, I.** 1987b. Variations of the major volatiles through aging of Sherry. *Am. J. Enol. Vitic.*, 38, pp: 293-297.
- Martínez, P., Valcárcel, M.J., González, P., Benítez, T. y Pérez, L.** 1993. Consumo de etanol, glicerina y aminoácidos totales en vinos finos durante la crianza biológica bajo velo de flor. *Alimentación: Equipos y Tecnología*, 2, pp: 61-65.
- Mauricio, J.C., Arroyo, M., Millan, C., y J.M. Ortega.** 1990. Relationship between the phospholipid and sterols contents in *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*, and their permanence during the fermentation of must from grapes of the Pedro Ximenez variety. *Biotechnol. Letters*, 12, pp: 265-270.
- Mauricio, J.C, Guijo, S., y J.M. Ortega.** 1991. Relationship between phospholipid and sterol contents in *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* and their fermentation activity in grape musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, pp: 301-308.

- Moreno, J.J, Millan, C., Ortega, M. y Medina, M. 1991. Analytical differentiation of wine fermentations sing pure and mixed yeast culture. J. Ind. Microbiol., 7, pp: 181-190.
- Naumov, G.I., Naumova, E.S., Lantto, R.A., Louis, E.J. y Korhola, M. 1992. Genetic homology between *Saccharomyces cerevisiae* and its sibling species *S. paradoxus* and *S. bayanus*: Electrophoretic Karyotypes. Yeast, 8, pp: 599-612.
- Novella, M^a.A. 1992. Degradación microbiológica del ácido acético en vinos. IV Congreso Nacional y I Congreso Hispano -Luso de Biotecnología, Santiago de Compostela.
- Oda, Y. y Ouchi, K. 1989. Genetic analysis of haploids from industrial strains of baker's yeast. Appl. Environ. Microbiol., 55, pp: 1742-1747.
- Office International de la Vigne et du Vin. 1978. Recueil des Methodes Internationales d'Analysis des Vin (4th ed). OIV (Paris, Francia).
- Owades, J.L., y J.M. Dono. 1968. Determination of volatile acids in wine by microdiffusion. Am. J. Enol. Vitic. 19, pp:46-51.
- Pedersen, M.B. 1988. The use of nucleotide sequence polymorphisms and DNA Karyotyping in the identification of brewer's yeast strains and microbiological control. En H.F. Linskens y J.F. Jackson (ed). Beer analysis. Modern methods of plant analysis, New Series vol.7, pp: 180-194, Springer-Verlag, Berlin.
- Pérez, L. 1979. Formación y evolución de los alcoholes superiores y otros componentes en vinos de Jerez. Tesis doctoral, U. Sevilla.
- Pérez, L. 1982. Consideraciones técnicas en la elaboración del Jerez. II Jornadas universitarias sobre el Jerez, pp 167-197. Universidad de Cádiz.

-Pérez, L. 1984. Consideraciones técnicas en la elaboración del Jerez. Proceeding III. Jornadas Universitarias sobre el Jerez, Universidad de Cádiz. pp. 333-62.

-Pérez, L. 1991. La crianza del vino de jerez. Vitivinicultura, 9, pp: 19-22.

-Pérez, L. 1994. La historia del vino de Jerez. Conferencia presentada en el curso "El vino de Jerez", U. Menendez Pelayo, Puerto de Santa María, Cádiz.

-Pérez, L.; Rámirez, J.; Navarrete, J.L. y Flores, V. 1982. Estudio sobre la formación y evolución de los ácidos orgánicos en los vinos de Jerez. Rumasa (Ed), Madrid.

-Pérez, L.; Ramírez, J.; Navarrete, J.L. y Flores, V. 1982. Evolución de los ácidos orgánicos en los vinos de Jerez. II Jornadas Universitarias sobre el Jerez, U. Cádiz, pp: 304-312.

-Pérez, L.; Sanchez, L. y Domecq, B. 1984. Stockage et conservation des eaux-de-vie et vins de jerez. Symposium international sur "Le stockage et la conservation des vins et des eaux-de-vie d'origine vinicole". Toulouse, France.

-Pérez, L.; Valcarcel, M.J.; González, P. y Domecq, B. 1991. Influence of *Botrytis* infection of the grapes on the biological aging process of fino Sherry. Am. J. Enol. Vitic., 42, 1, pp: 58-62.

-Pérez Juan, P.M. 1988. Evolución de la acidez durante la crianza bajo velo de flor. Semana vitivinícola, 4, pp: 941-947.

-Petering, J.E., Symons, M.R., Langridge, P. y Henschke, P.A. 1991. Determination of killer yeast activity in fermenting grape juice by using a marked *Saccharomyces* wine yeast strain. Appl. Environ. Microbiol., 57, pp: 3232-3236.

-Pinedo, J.M.; Maiquez, E.G. y Corral, L. 1994. Compuestos fenólicos en vinos

jóvenes procedentes de la variedad Palomino Fino en la zona de Jerez.

-Polo, M.C. 1973. Evolución de los aminoácidos libres en mostos y en vinos por la acción de las levaduras de flor. Tesis doctoral. U. Farmacia, Madrid.

-Polo, M.C. y Llaguno, C. 1971. Determinación de compuestos nitrogenados en mostos de uva y vino, y su influencia en los procesos de crianza de vinos. Simposio Internazionale Technicon, "Automocione per la medicina e per L'industria, Roma.

-Poulard, A., Simon, L. y Cuinier, C. 1981. Caractères de la microflore levurienne du vignoble Nantais. *Vignes Vins*, 300, pp: 14-18.

-Querol, A., Barrio, E., y Ramón, D. 1992a. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *System. Appl. Microbiol.*, 15, pp: 439-446.

-Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., y Ramón, D. 1992b. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, pp: 2948- 2953.

-Querol, A., Huerta, T., Barrio, E., y Ramón, D. 1992c. Dry yeast strain for use in fermentation of Alicante wines: Selection and DNA patterns. *J. Food. Sci.*, 57, pp: 183-185 y 216.

-Querol, A., Jiménez, m. y Huerta, T. 1990. Microbiological and enological parameters during fermentation of must from poor and normal grape-harvests in the region of Alicante (Spain). *J. Food. Scienc.*, 57, pp: 1603-1606.

-Rand, D. M. 1994. Thermal habit, metabolic rate and the evolution of mitochondrial DNA. *TREE*, 9, pp: 125-131.

-Rank, G.H., Casey, G.P., Xiao, W. y Pringle, A.T. 1991. Polymorphism

within the nuclear and 2 μ m genomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 20, pp: 189-194.

-Rankine, B.C. 1982. *Flor: Developments on the classic process*. Institute of masters of wine's International Symposium on viticulture, vinification & The treatment & Handling of wine.

-Ronald, E.; Subden, R.E. y Osothsilp, C. 1987. Malic acid metabolism in wine yeasts. En G.S. Graham, I. Russell, R.D. Klein y R.R. Hiebsch (ed.), *Biological Research on Industrial yeasts*, II, cap:7, pp: 67-76. CRC Press, Inc; Boca ratón, Florida.

-Roon, R.J; Larimore, F. and Levy, J.S. 1975. Inhibition of amino acid transport by ammonium ion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 124, pp: 325-331.

-Russell, I., Jones, R. y Stewart, G.G. 1987. Yeast-The primary industrial microorganism. En G.S. Graham, I. Russell, R.D. Klein y R.R. Hiebsch (ed.), *Biological Research on Industrial yeasts*, CRC Press, Inc; Boca ratón, Florida.

-Saavedra, I.J. 1959. *La levadura de flor en la crianza de vinos*. Tesis doctoral. U. Madrid.

-Saavedra, I.J. y Garrido, J.M. 1959. *La levaduras de flor en la crianza de vinos. Estudio analítico de la evolución de algunos componentes del vino durante la crianza en bodega*. *Rev, Cienc. Aplic.*, 69.

-Saavedra, I.J. y Garrido, J.M. 1961. *La levadura de flor en la crianza de vinos. Estudio experimental de la crianza en el laboratorio. I crianza de vinos blancos con flor*. *Rev. Cienc. Aplic.*, 79.

-Saavedra, I.J. y Garrido, J.M. 1962. *La levadura de flor en la crianza del vino. Evolución de la acidez por la acción del velo en medios sintéticos*. *A.T.A.*, 2,2.

- Saavedra, I.J. y Garrido, J.M^a. 1963. La levadura de flor en la crianza del vino. El etanol en el metabolismo en fase de velo. Rev. Cienc. Aplic., 95.
- Sancho, E.D., Hernandez, E. y Rodríguez-Navarro, A. 1986. Presumed sexual isolation in yeast populations during production of Sherrylike wine. Appl. Environ. Microbiol., 51, pp: 395-397.
- Santa María, J. 1968. *Saccharomyces hispanica*, nov. spec. Nueva especie de levadura de "flor". Bol. Inst. Nac. Inv. Agron. 28, pp:21-32.
- Santa María, J. 1970. *Saccharomyces gaditensis* y *Saccharomyces cordubensis*, dos nuevas especies de levaduras de "flor". Bol. Inst. Nac. Inv. Agron. 30, pp: 57-66.
- Santa Maria, J., y D. Vidal. 1973. Genetic control of "flor" formation by *Saccharomyces*. J. Bacteriol. 113, pp: 1078-1080.
- Sawyer. 1968. The automatic determination of original gravity of beer. Analyst. 93, pp:669-679.
- Schwartz, D.H. y Cantor, C.R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell, 37, pp: 67-75.
- Sherman, F., Fink, G.R. y Hicks, J.B. 1986. Laboratory course manual for: Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor, USA.
- Singleton, V.L., y Rossi, J.A. 1965. The official A.O.A.C. procedure with Folin-Ciocalteu reagent. Am.J.Enol.Vitic., 16, pp: 144-158.
- Spencer, J.F.T. y Spencer, D.M. 1983. Genetic improvement of industrial yeasts. Ann. Rev. Microbiol., 37, pp: 121-142.

- Spencer, J.F.T. y Spencer, D.M. 1990. Yeast Technology. Springer-Verlag.
- Stratford, M. 1992a. Yeast Flocculation: reconciliation of physiological and genetic viewpoints. *Yeast*, 8, pp: 25-38.
- Stratford, M. 1992b. Yeast flocculation: receptor definition by *mnn* mutants and concanavalin A. *Yeast*, 8, pp: 635-645.
- Straver, M. H., Kijne, J.W. y Smit, G. 1993. Cause and control of flocculation in yeast. *Tibtech*, 11, pp: 228-232.
- Suarez, J.A e Iñigo, B., 1990. Microbiología Enológica: Fundamentos de Vinificación. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Subden, R.E. 1991. Wine yeast: Selection y Modification. *En*: Panchal, C.J. (Ed.), Yeast strain selection, Marcel Dekker, New York, pp: 113-137.
- Subden, R.E., Irwin, D., Cunningham, J.D., y Meiring, A.G. 1982. Wine yeast isozymes I. Genetic differences in 18 stock cultures. *Can. J. Microbiol.*, 28, pp: 1047-1050.
- Templeton, M.D., Rikkerink, E.H.A., and R.E. Beever. 1994. Small, cysteine-rich proteins and recognition in fungal-plant interactions. *Molecular plant-microbe interactions*, 7, pp: 320-325.
- Teunissen, A. W. R. H., Holub, E., Van Der Hucht, J., Van Den Berg, J. A. y Steensma, H. Y. 1993. Sequence of the open reading frame of the *FLO1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 9, pp: 423-427
- Thomas, D.S., Hossack, J.A., y A.H. Rose. 1978. Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 117, pp: 239-245.

- Valcarcel, M.J., González, P., Pérez, L., Asencio, A. y Domecq, B. 1990. Control de calidad del estudio sanitario de la uva en la zona del Jerez. *Vitivinicultura*, 5, pp: 42-49.
- Valcárcel, M.J.; Pérez, L.; González, P. y Domecq, B. 1990. Efecto de las práctica enológicas en vendimia sobre las levaduras responsables de la fermentación de mostos de Jerez, IV: Estudio industrial. *Alimentación, equipos y tecnología*, 3, 171-174.
- van Vuuren, M.J.J. y van der Mur, I. 1987. Fingerprinting yeasts by protein electrophoresis. *Am. J. Enol. Vitic.*, 38, pp: 49-53.
- van der Walt , J.P. 1987. The typological yeast species, and its delimitation. *En The yeasts*. A.H. Rose and J.S. Harrison Ed. 1, pp: 95-117.
- Venzihet, F., Blondin, B. y Hallet, J.N. 1990. Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32, pp: 568-571.
- Webb, A.D. y Noble, A. 1976. Aroma of Sherry Wine. *Biot. Bioeng.* 18, pp: 939-952.
- Yamamoto, N., Yamamoto, N., Amemiya, H., Yokomori, Y., Shimizu, K., y Totosuka, A. 1991. Electrophoretic Karyotypes of wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42, pp: 358-363.
- Yamazaki, M., Croto, S. y Komagata, K. 1982. Comparison of enzymes from strains of wine yeast and their related yeast on electrophoresis. *J. Inst. Enol. Vitic.*, 17, pp: 11-19.

-Zajara,J., 1957. Contribución al estudio de las levaduras del Jerez. Tesis Doctoral. Universidad de Madrid.

7 . APÉNDICE

Contenidos en los diferentes aminoácidos registrados en las escalas de envejecimiento de los solerajes industriales y durante la crianza biológica con cultivos puros.

SOLERAJES

ESCALAS	ASP	GLU	H-PRO	P-ETA	SER	ASN	GLI	HIS	GABA	THR	ALA	ARG	PRO	TYR	VAL	MET	ILE	LEU	PHE	TRP	ORN	LYS
3°CRA	47	155	12	76	52	211	116	34	82	35	324	125	3162	45	43	25	22	106	62	0	21	110
2°CRA	50	155	13	74	48	132	104	26	108	32	290	126	1969	44	43	18	23	87	54	0	39	82
1°CRA	37	115	13	81	29	71	82	25	113	21	255	91	1104	31	23	10	11	51	33	0	42	48
SOLERA	32	94	15	83	21	36	66	26	116	17	232	70	785	23	16	8	6	35	25	0	40	29

REFERENCIA

MESES	ASP	GLU	H-PRO	P-ETA	SER	ASN	GLI	HIS	GABA	THR	ALA	ARG	PRO	TYR	VAL	MET	ILE	LEU	PHE	TRP	ORN	LYS
0	69	306	10	72	88	511	284	63	144	68	562	277	7190	79	77	42	39	175	98	2	159	171
1	54	282	11	71	57	361	249	56	140	39	462	253	6869	71	67	26	32	125	83	2	154	143
2	53	313	10	74	57	375	246	53	143	35	426	237	6578	67	59	23	27	109	74	2	135	120
3	52	302	10	70	54	370	242	52	144	34	434	237	6594	66	59	23	27	109	72	1	134	116
4	54	305	10	74	58	376	256	54	149	37	438	235	6864	69	59	24	27	111	76	2	140	115
6	50	282	8	71	55	340	243	50	141	35	430	232	6698	65	54	22	27	108	73	3	135	107
8	50	288	9	72	50	344	254	53	151	31	426	237	6584	67	59	20	26	106	73	1	139	111
10	51	287	9	71	51	341	254	49	147	31	425	239	6580	68	56	19	24	104	73	2	139	114
11	53	283	9	74	51	352	256	53	153	32	425	238	6706	68	57	20	24	102	71	2	137	110
12	59	287	10	71	52	352	257	48	142	39	426	235	6706	69	57	23	27	105	72	2	133	110

B2

MESES	ASP	GLU	H-PRO	P-ETA	SER	ASN	GLI	HIS	GABA	THR	ALA	ARG	PRO	TYR	VAL	MEI	ILE	LEU	PHE	TRP	ORN	LYS
0	69	306	10	72	88	511	284	63	144	68	562	277	7190	79	77	42	39	175	98	2	159	171
1	50	240	10	68	57	321	225	55	135	42	430	231	6284	71	63	27	28	121	75	1	135	127
2	36	275	10	74	43	274	198	41	176	27	321	185	5747	61	46	16	18	77	61	2	110	74
3	22	183	10	66	25	159	131	27	155	14	187	153	3960	40	28	11	11	49	41	2	76	50
4	7	64	9	56	18	63	75	11	105	10	62	69	1011	20	12	7	3	25	20	2	23	24
6	3	35	8	71	13	22	61	7	30	9	37	31	46	12	8	6	3	19	15	2	3	24
8	3	38	8	70	14	23	60	7	22	9	35	30	26	9	7	6	3	19	15	2	2	25
10	3	38	8	79	15	20	63	7	20	10	34	31	25	9	6	5	3	21	18	2	3	28
11	4	40	9	77	15	22	64	8	20	2	37	29	24	7	8	5	3	20	18	2	3	26
12	2	39	9	74	13	21	62	7	20	1	36	26	22	5	6	5	3	20	16	2	2	24

B3

MESES	ASP	GLU	H-PRO	P-ETA	SER	ASN	GLI	HIS	GABA	THR	ALA	ARG	PRO	TYR	VAL	MEI	ILE	LEU	PHE	TRP	ORN	LYS
0	48	188	9	108	57	317	157	47	64	29	311	160	7969	53	62	21	30	106	62	2	19	116
1	30	164	7	104	35	230	143	48	72	19	256	158	7561	51	56	10	20	66	50	1	21	86
2	38	200	8	108	33	225	146	44	76	17	259	160	7461	49	50	10	21	70	52	1	19	86
3	38	196	6	104	30	212	143	46	72	18	253	155	7212	48	50	11	20	70	49	2	18	83
4	31	161	7	91	33	176	114	38	60	16	205	134	6305	41	42	10	17	54	44	2	15	69
6	18	96	6	87	18	86	68	24	45	11	95	81	3402	24	29	7	9	32	26	1	8	46
8	3	45	8	94	20	40	62	15	33	3	30	50	83	15	20	6	5	21	18	1	6	41
10	0	34	6	99	10	18	46	12	23	4	34	45	51	10	18	5	3	13	16	2	3	36
11	0	33	5	100	11	23	44	12	20	4	32	41	46	9	17	3	4	13	13	2	4	36
12	0	34	5	101	12	21	43	13	16	5	37	29	44	8	16	5	4	14	13	1	4	34

B16

MESES	ASP	GLU	H-PRO	P-ETA	SER	ASN	GLI	HIS	GABA	THR	ALA	ARG	PRO	TYR	VAL	MET	ILE	LEU	PHE	TRP	ORN	LYS
0	69	306	10	72	88	511	284	63	144	68	562	277	7190	79	77	42	39	175	98	2	159	171
1	50	292	12	81	59	354	246	54	164	38	391	224	6581	76	73	24	30	126	82	2	141	113
2	20	235	11	82	22	199	194	38	204	20	231	174	5632	63	45	11	13	58	52	3	112	49
3	15	157	10	77	22	141	123	19	200	16	133	90	3954	43	28	9	8	41	36	3	60	30
4	4	56	8	76	20	58	61	5	101	8	48	30	916	20	12	6	2	21	19	3	15	23
6	2	45	7	83	17	28	54	2	13	8	36	28	76	17	8	8	2	22	20	2	2	23
8	2	44	5	77	18	24	52	0	13	9	38	26	69	15	9	7	2	19	17	2	3	24
10	3	45	5	79	20	29	57	0	11	9	38	30	54	15	10	7	3	20	18	3	4	24
11	3	48	6	81	21	25	59	0	12	11	39	28	35	17	11	8	3	23	20	2	4	25
12	4	49	5	77	18	25	55	0	10	10	38	30	20	16	10	8	4	23	21	3	3	25

M10

MESES	ASP	GLU	H-PRO	P-ETA	SER	ASN	GLI	HIS	GABA	THR	ALA	ARG	PRO	TYR	VAL	MET	ILE	LEU	PHE	TRP	ORN	LYS
0	59	247	10	90	73	414	221	55	104	49	437	219	7580	66	70	32	35	141	80	2	89	144
1	34	197	11	98	45	224	164	43	103	32	247	153	6461	66	66	15	22	89	63	2	82	89
2	32	239	10	105	49	195	138	33	100	32	184	94	5620	63	58	14	18	79	65	3	81	58
3	22	184	11	107	34	137	115	21	100	21	126	61	5080	54	44	10	11	54	49	3	61	43
4	10	100	10	102	22	71	72	13	83	11	69	39	3467	39	28	7	6	31	30	2	41	31
6	2	46	6	86	18	27	50	6	10	10	40	21	66	19	19	5	3	16	16	2	4	31
8	2	45	6	88	19	26	49	3	9	10	39	21	55	17	21	4	4	16	15	2	4	27
10	2	48	7	88	19	28	51	0	10	12	40	23	53	16	21	4	4	17	15	2	3	28
11	3	46	7	88	21	27	50	0	9	11	42	24	34	15	21	5	5	19	16	2	3	30
12	2	47	7	84	19	24	48	0	4	10	41	21	30	16	22	3	3	19	16	2	2	28

CH15

MESES	ASP	GLU	H-PRO	P-ETA	SER	ASN	GLI	HIS	GABA	THR	ALA	ARG	PRO	TYR	VAL	MET	ILE	LEU	PHE	TRP	ORN	LYS
0	69	306	10	72	88	511	284	63	144	68	562	277	7190	79	77	42	39	175	98	2	159	171
1	46	262	12	73	50	336	223	47	150	30	396	228	6257	67	61	21	25	107	71	1	137	122
2	35	285	12	79	40	281	195	37	192	22	313	189	5835	59	41	16	15	66	51	1	108	63
3	14	156	11	76	21	172	118	16	210	9	195	104	4184	37	19	8	6	30	28	1	52	18
4	10	102	13	73	18	99	80	9	176	7	183	63	2025	26	14	8	4	28	25	1	27	19
6	4	43	10	69	15	31	54	0	32	7	161	35	84	14	9	7	2	20	16	1	4	21
8	3	40	8	72	17	29	53	0	15	8	160	36	49	13	9	7	2	21	19	3	5	27
10	4	41	9	71	17	27	55	0	11	8	137	35	45	14	9	8	3	22	17	1	5	29
11	5	44	7	75	18	28	56	0	10	8	131	41	40	15	10	7	3	26	20	1	4	34
12	5	49	8	74	17	27	54	0	8	7	98	40	34	14	9	7	3	25	21	2	3	27

R13

MESES	ASP	GLU	H-PRO	P-ETA	SER	ASN	GLI	HIS	GABA	THR	ALA	ARG	PRO	TYR	VAL	MET	ILE	LEU	PHE	TRP	ORN	LYS
0	64	277	10	81	81	463	363	59	124	59	500	248	7385	73	74	37	37	158	89	2	124	158
1	44	233	12	82	57	255	177	43	125	39	311	172	6134	62	56	20	23	99	66	1	115	113
2	33	259	11	82	48	201	142	29	121	36	216	101	5071	56	50	13	17	77	62	2	105	70
3	23	208	11	83	34	150	121	25	102	27	164	84	4045	49	41	9	12	60	50	1	93	54
4	12	123	9	81	21	82	82	15	80	12	113	58	2856	35	24	6	6	35	32	2	74	33
6	3	50	5	73	18	33	50	8	14	6	90	24	179	14	12	5	2	18	16	2	9	24
8	2	52	4	70	17	27	52	3	12	6	78	22	46	11	11	4	2	17	12	1	4	25
10	2	50	4	71	19	23	51	3	6	7	76	23	47	12	12	4	2	18	14	1	4	28
11	2	54	4	70	18	24	52	2	8	8	68	24	39	12	12	4	3	18	15	1	4	30
12	2	51	4	67	16	18	49	1	4	7	71	21	37	10	11	5	3	19	14	2	3	25

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Pérez Rodríguez y a la Dra. Tahía Benítez Fernández, Directores de esta tesis, por la dedicación, ilusión e interés prestado en este trabajo y por su apoyo en todo momento. A Luis y a Tahía, por ser grandes amigos y por muchas cosas más.

A Pedro Domecq S.A., por permitir la realización de la tesis y haber ofrecido todas las prestaciones y servicios requeridos; especialmente, al jefe del laboratorio y al Director de Calidad, Manuel José Valcarcel y Pedro González, por sus sugerencias, colaboración e interés en el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de Pedro Domecq S.A., Alicia, M^a Sol, Alberto, Miguel Angel, Fernando, Ignacio, Pepe Narváez, Paco, Eduardo, Antonio, Pepe Rosa y Manolo Fuentes, por la gran ayuda técnica prestada, su apoyo moral y sobre todo por ofrecerme su amistad y cariño. A otros compañeros, Andrés, Perico, Manolo Ramos y Pepa, que no por trabajar en otros Departamentos colaboraron menos.

A mis compañeros del Departamento de Genética, Paco, Manolo, M^aCarmen, Jose M^a, por aguantarme educadamente en mis numerosas visitas a Sevilla; y especialmente, a A. C. Codón, por su infinita ayuda científica y su amistad.

A Juan Jiménez e Ignacio Ibeas, por la colaboración en los trabajos de citometría de flujo.

Al centro de Microscopía electrónica de la U. de Sevilla, por el trabajo allí realizado.

A las Bodegas Barbadillo S.A., por permitir el estudio de algunos de sus sistemas de crianza biológica.

Al ministerio de Educación y Ciencia, y a la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, por la concesión de la beca del programa "Ayudas al intercambio de personal investigador entre industrias y Organismos Públicos" y por el Proyecto BIO93-0423, respectivamente.

A Anders, por su larga y paciente espera, aguantar muchos ratos de mal humor y por otras muchas cosas más.

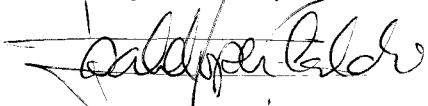
Y por último, a mis padres, por darme la oportunidad de adquirir una educación, y por que sin ellos nada de esto hubiera sido posible.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. PAULA MARTINEZ RODRIGUEZ titulada Evolución y Caracterización de las poblaciones de levaduras responsables de la crianza biológica del vino de Jerez. acordó otorgarle la calificación de APTO CON LAUDE

Sevilla, 29 de Marzo 1993

El Vocal,



El Presidente

El Vocal,



El Secretario,



El Vocal,



El Doctorado,

