

TD
694

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE QUIMICA

DEPARTAMENTO DE CRISTALOGRAFIA, MINERALOGIA
Y QUIMICA AGRICOLA

ESTUDIO DE LAS LEVADURAS PRESENTES EN LOS PROCESOS DE
VINIFICACION DE LA ZONA VITIVINICOLA DE BOLLULLOS PAR DEL
CONDADO (HUELVA).

TRINIDAD MARIA LORENZO GOMEZ

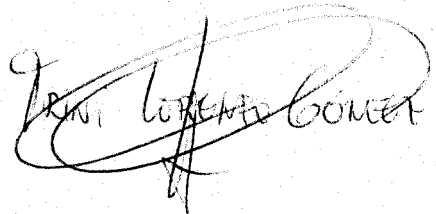
TD
694

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGIA
13-6-94
ENTRADAN.º

ESTUDIO DE LAS LEVADURAS PRESENTES EN LOS PROCESOS DE
VINIFICACION DE LA ZONA VITIVINICOLA DE BOLLULLOS PAR DEL
CONDADO (HUELVA).

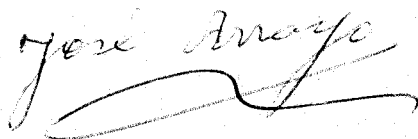
Trabajo presentado por

Trinidad M^a Lorenzo Gomez



EL DIRECTOR

Prof. Dr. José Arroyo López, Prof. en Comisión de
Servicio del Departamento de Cris., Min., y Química Agrícola
de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla.



AGRADECIMIENTOS

Hago patente mi agradecimiento al Dr. D. José Arroyo López por su eficaz dirección y constante estímulo en el desarrollo de la presente tesina.

A los Drs. D. Guillermo Paneque Guerrero y D. Luis Corral Mora por las facilidades prestadas en la realización del trabajo.

A la Dra. Dña. Celia Espino Gonzalo por su entrega personal y apoyo, sobre todo en los momentos más difíciles de mi investigación.

A todos los compañeros del Departamento por las facilidades prestadas en la realización del trabajo.

A la Universidad de BROOKES (Oxford) por la oportunidad que me ofreció de poder realizar determinadas fases de este trabajo.

A D. Santiago Agüero Muñoz por su constante entrega y ayuda en la realización del trabajo, tanto en la redacción como en la mecanografía del mismo, así como, por su apoyo, ánimo y estímulo en los momentos más difíciles de éste.

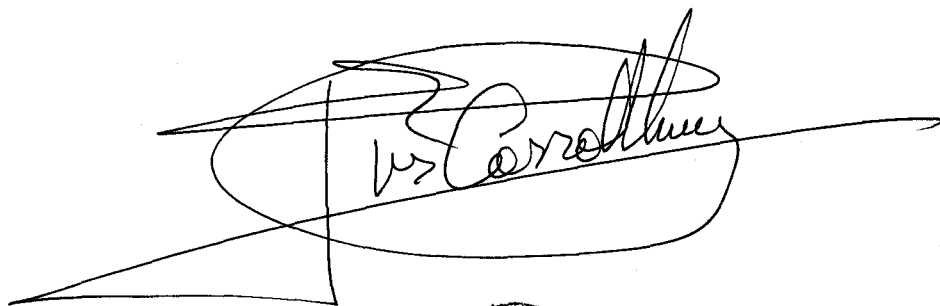
A mi familia por su paciencia y ayuda en el arduo camino de la investigación.

A SANTI

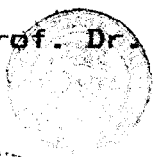
PROFESOR DR. D. LUIS EUGENIO CORRAL MORA, COMO SECRETARIO DEL
DEPARTAMENTO DE CRISTALOGRAFIA, MINERALOGIA Y QUIMICA AGRICOLA

CERTIFICA:

Que Dña. Trinidad M^a Lorenzo Gómez, Lda. en Biología ha
realizado el presente trabajo sobre ESTUDIO DE LAS LEVADURAS
PRESENTES EN LOS PROCESOS DE VINIFICACION DE LA ZONA
VITIVINICOLA DE BOLLULLOS PAR DEL CONDADO (HUELVA), en los
laboratorios de la cátedra de Edafología y Química Agrícola de
la Facultad de Química, bajo la dirección del Doctor D. José
Arroyo López. Y para que conste, firma la presente en Sevilla
a 3 de Junio de 1994.



Fdo. Prof. Dr. D. L. E. Corral



DEPARTAMENTO DE CRISTALOGRAFIA
MINERALOGIA Y QUIMICA AGRICOLA

INDICE

	Pág.
1. INTRODUCCION	1
1.1. SITUACION GEOGRAFICA DE BOLLULLOS PAR DEL CONDADO ...	1
1.1.1. PARALELOS Y MERIDIANOS	2
1.2. LA OCUPACION DEL SUELO. CLIMATOLOGIA. CARACTERISTICAS DEL SUELO	2
1.3. LA EVOLUCION DEL VINEDO DEL CONDADO DESDE EL SIGLO XVIII. LA DENOMINACION DE LOS VINOS	5
1.4. IMPORTANCIA DEL MATERIAL VEGETAL	13
1.5. LA UVA. ESTRUCTURA Y COMPOSICION	15
1.5.1. EL MOSTO. NORMAS DE ELABORACION	16
1.5.2. COMPOSICION DEL MOSTO	21
1.6. LAS LEVADURAS	22
1.6.1. CITOLOGIA	23
1.6.2. REPRODUCCION	29
1.6.3. COMPOSICION QUIMICA	32
1.6.4. METABOLISMO	33
1.6.5. CRECIMIENTO	34
1.7. DIFICULTAD EN LA CLASIFICACION Y EN LA NOMENCLATURA	36
1.7.1. CLASIFICACIONES OBJETIVAS	38
1.7.2. RAZONES PARA UNA CLASIFICACION	39
1.7.3. CARACTERISTICAS USADAS EN LA CLASIFICACION DE LEVADURAS	40

1.7.4. CLASIFICACION DE LAS LEVADURAS SEGUN KREGER-VAN RIF (1987)	43
1.7.5. CARACTERISTICAS DE ALGUNOS GENEROS	47
1.8. LA FERMENTACION ALCOHOLICA	50
1.8.1. MECANISMO QUIMICO	53
1.8.2. COMPOSICION DEL VINO	56
1.8.3. INFLUENCIA DE LOS AGENTES FISICOS EN LA FEMENTACION	58
2. MATERIAL Y METODOS	63
2.1. MATERIAL	63
2.1.1. MOSTOS SIN FERMENTAR Y EN DISTINTAS FASES DE FERMENTACION	63
2.2. METODOS	64
2.2.1. METODOS DE CULTIVO DE LEVADURAS	64
2.2.1.1. MEDIOS DE AISLAMIENTO	64
2.2.1.1.1. MOSTO-GELATINA	64
2.2.1.1.2. VINO-GELATINA	64
2.2.1.2. MEDIOS DE CRECIMIENTO Y CONSERVACION	65
2.2.1.2.1. AGAR-NAGAI	65
2.2.1.2.2. YEPD	65
2.2.1.3. MEDIOS PARA ESTUDIAR LA MORFOLOGIA	66
2.2.1.3.1. MORFOLOGIA CELULAR	66
2.2.1.3.1.1. YEPD LIQUIDO	66

2.2.1.3.2. MORFOLOGIA DE LA COLONIA	66
2.2.1.3.2.1. AGAR MORFOLOGICO	66
2.2.1.3.2.2. MEDIO WLN	67
2.2.1.4. MEDIO PARA LA ESPORULACION	67
2.2.1.5. MEDIOS PARA LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS	68
2.2.1.5.1. MEDIO DE ASIMILACION DE NO ₃	68
2.2.1.5.2. MEDIO DE FERMENTACION (AZUCARES)	68
2.2.1.5.2.1. MEDIO HUGH-LEIFSON	68
2.2.1.5.3. MEDIO ID 32 C	69
2.2.1.6. MEDIO YM (YEAST MALT)	69
2.2.1.7. MEDIO ALCIEN BLUE	70
2.3. TOMA DE MUESTRA Y TECNICAS DE AISLAMIENTO	71
2.4. METODOS USADOS EN TAXONOMIA	72
2.4.1. CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS	72
2.4.1.1. CARACTERISTICAS DE LAS COLONIAS	72
2.4.1.2. CARACTERISTICAS DE LAS CELULAS VEGETATIVAS	72
2.4.1.3. FORMACION DE MICELIO Y PSEUDOMICELIO	72
2.4.1.4. FORMACION DE ESPORAS	72
2.4.2. CARACTERISTICAS FISIOLOGICAS	73
2.4.2.1. UTILIAZCION FERMENTATIVA DE COMPUESTOS DE C	73
2.4.2.2. UTILIZACION OXIDATIVA DE COMPUESTOS DE C	73
2.4.2.3. UTILIZACION DE COMPUESTOS NITROGENADOS	74
2.4.4. PRUEBAS BIOQUIMICAS ID 32 C	74

3. RESULTADOS	75
3.1. BODEGA CI DEL CONDADO	75
3.2. BODEGA CII DEL CONDADO	76
3.3. BODEGA CIII DEL CONDADO	77
3.4. BODEGA CIV DEL CONDADO	78
3.5. BODEGA CV DEL CONDADO	78
TABLA I. ESPECIES AISLADAS	79
TABLA II. CARACTERISTICAS CELULARES	80
TABLA III. NITRATOS. SULFATO DE COBRE. ESPORULACION	81
TABLA IV. FERMENTACION DE AZUCARES	82
TABLA V. RESULTADOS DE ID 32 C	83
TABLA VI. RESULTADOS DE ID 32 C	84
4. DISCUSION	86
5. CONCLUSION	94
6. BIBLIOGRAFIA	96

1. INTRODUCCION

1.1. SITUACION GEOGRAFICA DE BOLLULLOS DEL CONDADO.

Bollullos par del Condado, por estar al lado, junto al Condado pero no formando parte de él (FOURNEAU, 1975). Se trata en este caso del Condado "histórico" el Condado de Niebla que comprendían, como recuerda Amador de los Ríos (1891): La Villa de Niebla y todas las tierras que de ella dependían: Trigueros, Beas, Rociana del Condado, Villarasa, Bonares, Valverde del Camino, El Portichuelo y Paimogo. Bollullos Par del Condado no ha formado nunca parte del Condado de Niebla, ni tampoco La Palma del Condado, Villalba del Alcor, Manzanilla, Chucena, Hinojos, Almonte, Lucena del Puerto, San Juan del Puerto, Moguer y Palos de la Frontera, que componen hoy la comarca del Condado de Huelva, junto a los seis primeros municipios citados.

Si esta comarca no ha tenido unidad histórica, tampoco posee unidad geográfica muy caracterizada. Ocupa el sector sud-oriental de la provincia de Huelva y está limitada al Oeste por el río Odiel, al Sur por las inmensas dunas y playas del Atlántico, al Norte por El Andévalo y al Este por la provincia de Sevilla (fig.1). La unidad del Condado de Huelva es, pues, de signo económico: es una zona de viñedo. Este tiene por capital a Bollullo Par del Condado. Los 17 municipios anteriormente citados forman el Consejo Regulador de los vinos de Huelva, Bollullos cuenta con el 25% de los cosecheros y con 22 de las 30 bodegas exportadoras de la zona. En su término municipal se produce un tercio del vino del Condado, es decir, cerca de 250.000 Hls., en la sexta parte del total de la superficie

plantada de viña en el Condado, 340.000 Has.. Se consagra prácticamente al monocultivo de la vid que cubre el 72,5% de la superficie total del término y el 85% de la superficie cultivada.

Condiciones geográficas favorables, como la posición central en el viñedo de la zona o las vicisitudes históricas y el dinamismo de sus habitantes, son algunas de las razones que han hecho de Bollullos la capital del viñedo del Condado de Huelva. La descripción de los paisajes y de las estructuras agrarias de Bollullos, así como el estudio de sus vinos y de su comercialización actual y el análisis evolutivo en los dos últimos siglos, nos permitirán apreciar mejor las realidades geográficas y económicas de todo el viñedo del Condado de Huelva.

1.1.1. PARALELOS Y MERIDIANOS.

Bollullos par del Condado está ubicado entre el paralelo Norte 37º 21' 47" 4 y el paralelo Sur de 37º 17' 18" 96 así como al Este por el meridiano 6º 29' 64" 7 y al Oeste por el 6º 35' 24" 90, datos extraídos de un mapa 1:20.000 con todos los detalles de 1:10.000, pues ha sido elaborado por reducción y montaje del mapa topográfico de Andalucía 1:10.000, de la Junta de Andalucía. Centro de Estudios territoriales y Urbanos.

1.2. LA OCUPACION DEL SUELO. CLIMATOLOGIA Y CARACTERISTICAS DEL SUELO.

El municipio de Bollullos practica el monocultivo de la vid, ya que posee 3.400 ha. de viñas sobre las 4.900 ha. de superficie total. Los otros cultivos son en efecto casi

insignificantes: 8,5% de olivar, 4,5% de tierras de labor, 1,5% de huertas y zonas de regadíos y un 13% de plantaciones de eucaliptos o de dehesas con encinas y alcornoques.

Estamos, pues, en presencia de una ocupación del suelo completa (82%) y minuciosa, en pequeñas parcelas que atestiguan la importancia de la pequeña propiedad.

Pero sí la vid es el cultivo exclusivo en Bollullos y sus alrededores, es también el cultivo predominante en el conjunto del Condado, con 20.000 ha. sobre las 60.000 de la superficie cultivada. Por otra parte, el Condado es por antonomasia el viñedo de Huelva, puesto que totaliza cerca del 95% de la superficie plantada de vid en la provincia.

CLIMATOLOGIA

Las condiciones climáticas de la zona están en concordancia con las exigidas por la vid, con lluvias a finales de otoño y al comienzo de la primavera, temperaturas elevadas para el brote y la formación de las uvas sin el menor riesgo de heladas; un verano cálido, soleado y seco favorece la maduración y limita los riesgos de enfermedades criptogámicas. Son, pues, condiciones ideales para que las cepas crezcan y se desarrollen bien.

LOS SUELOS:

Fourneau (1975) distingue estos suelos en tres categorías:

- Suelos arenosos (arenas).
- Suelos arcillo-arenosos (barros)
- Suelos arenosos alcalinos (albarizas).

Estas divisiones empíricas hechas a partir de la textura o el color son realidades edafológicas evidentes. Las arenas

contienen alrededor de un 75% de arenas finas o groseras con tendencia a formar corazas que impiden la aireación y necesitan frecuentes labores superficiales. Su permeabilidad es muy buena y dan excelentes rendimientos cuantitativos (de 13 a 15 bocoyes de 600 l/ha.). Los barros corresponden a los suelos rojos mediterráneos (61,70% de arenas finas, 26,50 de arcillas, textura arenosa y permeabilidad bastante buena) y, sobre todo, a los suelos abigarrados de tipo pseudogley de color gris verdoso (46,80% de arcilla, 42,60% de arenas finas, textura pesada y escasa permeabilidad). Los primeros son más favorables a la vid (pero especialmente para el olivar) se sitúan siempre en las partes altas de las colinas y en las primeras pendientes. Los segundos, por el contrario, menos favorables, aparecen siempre en el fondo de los valles.

Los suelos de albarizas de color blanquecino, son ricos en calizas (38%, junto a 32,8% de arenas finas y 20,2% de arcillas), son de textura franca y poseen una permeabilidad muy buena. Dan los mejores vinos, aunque también cantidades más débiles (10 bocoyes/ha.). Estos diversos tipos de suelos están muy mezclados y es bastante difícil determinar zonas precisas para cada uno de ellos.

En Bollullos los tres tipos de suelos están cuantitativamente igual expandidos. Es necesario resaltar que subsisten zonas forestales sobre suelos arenosos. Los barros ocupan los alrededores del pueblo, hasta las zonas de olivar, mientras que las albarizas dominan al Sur y al Sureste. Si en la actualidad son muy apreciados estos suelos, sobre todo por los grandes propietarios, los pequeños han preferido durante mucho

tiempo los suelos arenosos, por sus altos rendimientos y su mayor facilidad de cultivo (sector norte del término).

En conjunto, los barros y albarizas se encuentran en la zona oriental de la campiña de Huelva en torno a Bollullos. Los vertisuelos ocupan el Norte de la Palma y los suelos arenosos puros o aluviales el Sur de Almonte. En la zona de Moguer las albarizas no constituyen más que una delgada orla al Sur de los suelos aluviales del río Tinto. Los suelos tienen, pues, un gran papel en la localización de la viña en el sector central del Condado (FOURNEAU, 1975).

1.3. LA EVOLUCION DEL VIÑEDO DEL CONDADO DESDE EL SIGLO XVIII. LA DENOMINACION DE LOS VINOS.

En Bollullos en 1751 ya era un municipio importante en el cultivo vitivinícola, el 18% de la superficie cultivada y el 8% de la total estaban plantadas de vid. Los cereales ocupaban el 79,5% de la superficie cultivada y el 34,75% de la superficie total (fig.2). Las campiñas del Condado estaban, pues, dominadas por la producción cerealista correspondientes a las necesidades de subsistencia.

Pero es la vid el cultivo que juega por excelencia el papel de elemento de diversificación, acrecentando las posibilidades del secano de cara al mercado y absorbiendo los excedentes de mano de obra eventual.

En el Condado del siglo XVIII, Moguer es el gran municipio vitivinícola junto a Bollullos y Manzanilla (la vid es el 23% de la superficie cultivada). Además, Moguer era el gran puerto exportador de la provincia de Huelva desde el siglo XV, fecha

del descubrimiento de América. La apertura de los mercados del Nuevo Mundo, a partir del siglo XVI, es responsable del desarrollo del cultivo de la vid en el Condado en general y particularmente en Moguer (edad de oro) y Palos.

Moguer, Manzanilla y Bollullos concentraban hasta el siglo XIX cerca del 60% del viñedo y más del 50% de las prensas. Pero si Bollullos ha progresado y Manzanilla se ha mantenido, el viñedo de Moguer ha desaparecido totalmente, causa de ello son las grandes crisis de finales del XIX y principalmente la filoxera.

En total, los 17 municipios del Condado contaban con unas 6.600 ha., es decir, un aumento del 100% respecto a mediados del siglo XVIII. Este crecimiento habría sido más importante aún si el viñedo no hubiese sufrido una serie de crisis graves desde mediados del siglo XIX.

- Crisis comercial: en 1860 el mercado inglés, vital para el Condado, se cierra tras el tratado anglo-francés.

- En la misma fecha aparece en la región la terrible enfermedad del oidium, ya conocida en el Norte de España y Francia.

- Finalmente, los acontecimientos revolucionarios que en Septiembre de 1868 se inician en Cádiz y que repercuten sobre toda Andalucía, se hacen sentir también en el Condado. El problema esencialmente es el de la tierra que ha sido desigualmente repartida.

Por tanto, las superficies plantadas de vid tendrán tendencia a crecer, sobre todo a partir de 1870, momento en el que comienza, tanto aquí como en el resto de España, la edad de

oro del vino, que durará hasta finales del siglo XIX, correspondiendo a la gran crisis filoxérica que padece Francia. Durante este período, en efecto, la mayor parte de las exportaciones de vino de Huelva (90%) fueron a Francia. El tratado comercial franco-español de febrero de 1882 le favoreció mucho. Pero a partir de 1885, la prosperidad se amortigua y aparecerá la crisis. Ello se debe, principalmente, a dos razones: el hundimiento de los precios y la aparición de una nueva plaga: el mildiu, que comienza a atacar aquí a partir de 1888, se sabe combatir con sulfatados repetidos, pero ello supone un aumento de los costos de producción difícil de soportar para los pequeños propietarios y una necesidad de acrecentar la mano de obra, gravosa para las pequeñas explotaciones.

Por otra parte los vinos españoles que eran comprados en Francia para mezclarlos, comienzan a tener que competir con los vinos argelinos, de igual calidad y uso.

La crisis es real: baja de los precios, aumento en los costos de producción, amenaza de superproducción y de mercado adverso. La exportaciones de vinos españoles a Francia alcanzan su punto culminante en 1891, aunque hasta finales de siglo el mercado francés continuará absorbiendo, mejor o peor, la producción del Condado. Se ha visto, además que las superficies plantadas de vid no dejaron de aumentar hasta 1900, fecha de la aparición de la filoxera en la región.

Este insecto alcanzó a España en 1878, entrando por Gerona, (procedente de Francia) y por Málaga, y no llegará al Condado hasta 1900.

En el Condado la calamidad es señalada, en primer lugar en San Juan del Puerto en 1900 (Junta Consultiva Agronómica, 1911). Procedía posiblemente del viñedo jerezano, afectado desde 1895. Bollullos y su región se ven afectadas en otoño del mismo año. En 1908 penetra una segunda oleada por Huelva y Moguer.

En 1910 la provincia de Huelva cuenta solamente con 945 ha. no afectadas en el litoral occidental, frente a 7.965 ha. destruidas en toda la provincia y 1.918 esencialmente dañadas en el Condado. Las variedades destruidas fueron, principalmente:

- "Garrido fino", en un 30%.

- "Garrido macho", en un 25%.

- Por el contrario "Zalema" resistió bien: sólo un 4% del total fue destruido. Esta fue pues la variedad que se injertó en las cepas americanas, hasta un 40% del total reconstruido. Además presentaba la ventaja de ofrecer mayores rendimientos cuantitativos. Por el contrario la variedad "Palomino" bastante resistente, pues sólo se destruyó en un 4%, y de mejores vinos (finos) pero de rendimiento débiles, no fue reconstruida más que en un 3% del total. Se buscó principalmente la cantidad y el viñedo actual adolece aún de ello.

El viñedo de la provincia se había reducido al 50% en menos de 10 años y la producción cesó prácticamente.

Esta reconstrucción fue soportada de forma diferente por los dos centros principales del Condado. En la zona de Bollullos, donde la variedad Zalema era muy importante antes de la crisis, las nuevas plantas se adaptan bien y prosperan. En Moguer sucede todo lo contrario, además de los terribles ataques del oidium en 1914 y del mildiu en 1915.

En 1913 la provincia no contaba con más de 6.200 ha. de vid (como en 1887), en 1922 los 17 municipios del Condado reúnen más de 14.000 ha.. La guerra permitió terminar la reconstrucción. Pero, durante 20 años de filoxera ha sido la causa de profundos cambios en la comarca, el más espectacular de ellos fue la ruina del viñedo de Moguer, cabeza del condado desde el descubrimiento de América. En 1922 el viñedo rebasa la superficie de 1900, el vino encuentra compradores e incluso en algunos casos se pueden atenuar el problema social causado por la ruina de numerosos pequeños propietarios que tienen que vender todo y pasar al rango de jornaleros de las grandes bodegas o incluso en algún caso de emigración, como ocurre en Bollullos.

Efectivamente, la figura 2 muestra que en este municipio la vid ha dado en 1922 un salto decisivo.

El progreso de la vid continúa:

- 59% de la superficie total en 1953 y el
- 72,5% en 1971.

Como podemos ver con el estudio de la evolución de las parcelas, hemos de reconocer que ha habido una verdadera colonización.

Concretamente en un análisis de las propiedades hecho en Bollullos entre 1855 y 1930, nos dice que al menos 2.000 familias pudieron acceder a la pequeña propiedad, es decir, que cerca del 80% de la población se vio beneficiada. Una nueva estructura social nació con el jornalero-propietario. Esto ha sido la garantía de estabilidad social y económica que ha permitido el desarrollo del viñedo de Bollullos.

- LA DENOMINACION DE LOS VINOS.

El carácter de un vino no depende tanto de la herencia como del entorno. En su conformación influye mucho más el lugar en que se planta una vid que la técnica adoptada o incluso el tipo de cepa. La importancia de la localización exacta viene ilustrada por la clasificación de los vinos en cuanto a calidad. La tierra, el único factor que permanece invariable, ha resultado ser decisivo. Parece lógico, pues, que los vinos se denominen de acuerdo con su lugar de origen; y más específicamente cuanto mayor es la calidad.

Las leyes de denominación de origen han simplificado enormemente la vida del consumidor, al establecer para cada comarca vitivinícola un sistema que, una vez dominado, se revela infalible. A parte de regular los nombres de los vinos, empero, tienen otro objetivo, que es controlar la calidad. Sólo tiene derecho a ostentar determinado nombre aquel vino que procede de una vid concreta cultivada a la edad correcta, podada debidamente, que logra el tenor alcohólico exacto y alcanza un nivel de aroma y sabor que se establece en la degustación.

El aspecto más importante, tanto desde el punto de vista del consumidor como del productor, estriba quizás en que la denominación se concede únicamente a determinada cantidad de vinos por hectárea de viña por año. En el caso de un gran crudo puede equivaler tan sólo a 30 Hl. por ha. (Hugh, 1983).

Los vinos de la Denominación de Origen "Huelva" serán: los vinos Blancos de 11º a 14º alcohólicos y los vinos generosos, dentro de los cuales tenemos el Condado Pálido de 14º a 17º alcohólico y el Condado Viejo de 15º a 23º alcohólico.

Cuando surgieron las Denominaciones de Origen y comenzaron a presionar para que cada una de ellas exportara sólo los vinos que producían las viñas encuadradas en sus propios límites, el Condado intentó liberarse de la influencia de Jerez, hacia donde afluían sus vinos para ser exportados.

Tras la creación de la Denominación de Origen "Huelva" (O.M. del 10-V y B.O. del 2-VI-62) y en el mismo año, la creación del Consejo Regulador de esta denominación los vinos de Huelva tuvieron una mayor aceptación, ya que los fines de esta organización eran: incrementar los viticultores sus plantaciones, con prioridad del tipo de uva fina, y abrirle mercados en el extranjero a sus propios vinos. Conseguir uniformidad de tipos, graduaciones, densidades, tonalidades de color, aromas y bouquet, así como trabajar aquellos mercados de fronteras con vinos generosos, abocados, semidulces. Controlarían, además, toda la producción y comercialización, tras mantener reuniones con las Juntas Rectoras de la Cooperativas, al objeto de estudiar la integración de estas en dicho Consejo Regulador. Su exportación en aquel año, 1962, aunque inferior, unos 60.000 l., marchó en progresión creciente, ya que en 1971 sumaban ya 300.000 l. exportados. Los pequeños viticultores esperan mantenerse gracias a las cooperativas en plena expansión. El gran problema residía en la salida de la producción: en el mercado español el vino blanco estaba en franca regresión, y el de los vinos viejos, lo controla Jerez. Tuvieron así que cerrar el 20% de las bodegas en 5 años, debido al envejecimiento de instalaciones, mala estructura empresarial, inadaptación a las condiciones del mercado... Las cooperativas

necesitaban producir cantidades masivas de vinos blancos y cantidades progresivas de vinos viejos al objeto de ser embotellados e introducirlos en el extranjero. Los esfuerzos del Consejo Regulador daban ya sus frutos. Se habian inscrito en él el 25% de viticultores y cosecheros y un 80% de los exportadores, y las cantidades de vino que salían al exterior totalizarán en 1973, 1.791.641 l. En 1974, las cifras de exportación crecieron de forma espectacular, 3.877.249 l. En el año siguiente, 1975, se bajó a 822.228 l., ya que la economía mundial se vio afectada por la subida del petróleo. Ya en 1976 se volvió a incrementar: 1.376.738 l. pero a precios menores. En 1977, suma un equivalente a 854.692 l. Sumando todas estas partidas, el total para el quinquenio eran 8.662.548 l. Los países importadores eran en el siguiente orden: Holanda, Inglaterra, Bélgica, EE.UU., Suecia, Alemania, Escocia, Irlanda del Norte, Puerto Rico, Rep. Dominicana, Ecuador...

La Denominación de Origen "Huelva", pasó a nombrarse definitivamente, Denominación de Origen "Condado de Huelva" por la O.M. del 27-XII-1976 (FOURNEAU, F. 1975).

En 1977 las oficinas del Consejo Regulador se trasladaron a Bollullos par del Condado, hoy por hoy, capital vitivinícola del Condado, dividida en zona de crianza, donde es indispensable envejecer los vinos y zona de producción.

En 1978, cuenta el Condado con tres fábricas de vinagre vinico, 675 bodegas con una capacidad aproximada de 1.200.000 Hls., de los cuales unos 400.000 están en envases de madera y 800.000 en envases de hormigón o subterráneos, ya que la mayoría son vinos blancos producidos y vendidos en el año.

1.4. IMPORTANCIA DEL MATERIAL VEGETAL.

Las características finales de la producción vitivinícola dependen de la acción de una serie de elementos que, actuando unidos, confieren al producto final, uva o vino, una calidad determinada. Estos elementos o factores de la producción se dividen en dos grupos: los llamados factores naturales y los factores humanos. Entre los primeros cabe distinguir el clima y el terreno y entre los segundos las variedades a cultivar, las técnicas de cultivo de la viña y los sistemas de elaboración del vino, esencialmente. La acción conjunta de todos estos factores proporcionan al vino sus caracteres propios, dotándoles de unas propiedades específicas (CONSEJERIA DE AGRIC. Y PESCA, 1982).

Las variedades de vid proporcionan el carácter propio a los vinos. Para un catador con cierta experiencia, no pasan desapercibidos el sabor y el aroma que una variedad transmite al producto final.

La influencia de la variedad se ve lógicamente modificada por la acción de otros factores como el clima o el terreno. Pero, sobre todo en variedades muy personales, permanece siempre, dotando al vino correspondiente de su aroma y sabor característico. La acción anual del clima y de los restantes factores de la producción altera la calidad final, fluctuante según campañas.

Las variedades se adaptan con mayor o menor éxito a los diferentes climas y terrenos. Hay algunas que tienen una plasticidad elevada y se desarrollan con facilidad en diversas situaciones, produciendo vinos de buena calidad.

Hay otras variedades que parecen estar especializadas en

casos muy concretos. Así, la Palomino en tierras albarizas para producir el Jerez.

La adaptación de una variedad a una zona determinada depende en gran medida de la temperatura. Las variedades de ciclo largo requieren regiones meridionales para completar convenientemente su proceso de maduración. Sin embargo, en zonas septentrionales es preferible variedades de ciclo más corto que puedan madurar aún sin altas temperaturas. Estas variedades, por el contrario, en regiones más calurosas, corren el riesgo de madurar excesivamente, perdiendo buena parte de sus aromas.

La importancia de las variedades en la producción final se refleja en la reglamentación de las zonas con Denominación de Origen. Se reconoce de esta forma la trascendencia de este factor de calidad, características y propiedades del producto final.

La Zalema es la variedad fundamental en El Condado. De madurez tardía, hacia la primera decena de octubre; sus mostos no son muy dulces y tienen buena acidez, dando vinos de 110-120.

1.5. LA UVA. ESTRUCTURA Y COMPOSICION.

En la uva pueden distinguirse tres partes (Cevicón, 1981):

-La piel u hollejo.

-La pulpa.

-La semilla.

El hollejo de la uva se compone de diferentes capas. Hay una epidermis externa o cutícula de consistencia celulósica, muy flexible, lo que permite el aumento de tamaño del fruto. Las cuatro o cinco capas sucesivas de células, que también forman

parte del hollejo, íntimamente adheridas entre sí y a la cutícula, contienen la mayor proporción de aromas primarios característicos de cada variedad de uva y también la mayor proporción de pigmentos, especialmente en las variedades tintas.

En la pulpa, que es la parte carnosa de la uva, constituida por una serie de capas de células, es donde está alojado el mosto o jugo de la uva. En la pulpa la proporción de pigmentos es mucho más reducida y su color normalmente es amarillo-verdoso o amarillo-dorado, con excepción de algunas variedades de uvas (tintoreras). La parte de la pulpa más interna, en contacto con la pepita o hueso es más rica en ácidos y en sustancias tánicas.

En el interior de la pulpa hay una serie de haces, como nerviaciones, que constituyen los canales de alimentación de la pulpa, por donde transcurre la savia desde el pedúnculo de la uva para nutrir la pulpa y la semilla.

Cuando el fruto está en proceso de formación y crecimiento es de color verde, realizando directamente una parte de la función clorofílica y por consiguiente de nutrición y transformación.

La pepita o semilla se compone de una cutícula exterior, que contiene abundancia de sustancias tánicas, de una capa leñosa, y de una parte interior o albumen muy graso, que contiene del 13% al 20% de aceites.

En el transcurso de la maduración se produce un complejo proceso de formación de ácidos, especialmente ácido tartárico y ácido málico y su transformación en azúcares (glucosa y fructosa). Durante este periodo además, y a partir del envero, es cuando se van produciendo los pigmentos característicos de

las variedades, ya sean de uva blanca o tinta.

1.5.1. EL MOSTO. NORMAS DE ELABORACION.

Esta breve descripción de la composición de la uva es muy importante para comprender el papel que desempeña el sistema de trituración, de prensado y de elaboración del mosto en general. Si la trituración de la uva es excesivamente energética, la uva queda convertida en una masa informe, como puré o papilla, en donde se han entremezclado todos los componentes del hollejo totalmente roto, e incluso de la cutícula de la pepita, de su albumen graso, etc. Este mosto jamás podría dar un vino de calidad. Debemos tener en cuenta que el aceite contenido en la pepita es del orden de medio litro por Hl. de mosto, que produciría sabores y clases degradantes del vino, facilitaría posteriores enranciamientos, etc.

El estrujado de la uva debe ser de tal naturaleza que permitan la extracción del mosto y su fermentación y una perfecta separación de la semilla, sin que esta última ceda ningún tipo de sustancias, inconvenientes para la futura calidad del vino. Además cubre otros objetivos; facilita la siembra de la levadura o de las esporas adheridas a la cutícula de la uva, pone en contacto esta levadura con el mosto, y también la rotura del hollejo facilita la salida de sustancias aromáticas y la materia colorante de la piel, o su posterior disolución. El estrujado debe ser lo suficientemente suave para que no afecte a la semilla ni siquiera se produzcan raspaduras de su cutícula externa.

Tanto en la máquina estrujadora como en las de prensas no

debe perseguirse exclusivamente el aspecto funcional de cara a un buen rendimiento cuantitativo, sino el aspecto cualitativo del tratamiento que dan a la vendimia (CEVICON, 1981).

Asimismo en la prensa debe graduarse perfectamente su acción para que puedan ser extraídas separadamente, el mosto de yema o de escurrido, después de éste, una primera fracción de baja presión, que es mosto procedente de la pulpa propiamente dicha y segunda fracción en que existe mayor proporción de jugo de las capas epidérmicas, y finalmente, las sucesivas fracciones que se componen de líquidos procedentes de los tejidos celulares que tienen ya exceso de taninos, gran cantidad de sales, e incluso aceites extravasados de la propia semilla.

Ahora bien, si la trituración ha sido excesivamente energética, entonces sería inútil todo intento de separación de fracciones del mosto, pues todas ellas tendrían una misma composición, y en su conjunto adolecerían de graves defectos de calidad.

El paso siguiente a la obtención del mosto es el desfangado que consiste en eliminar del mosto las impurezas más pesadas como tierra, pepitas de la uva, fragmentos de pedúnculos y de hojas, etc (CEVICON, 1981). Para lograr este efecto se puede utilizar la centrifuga o bien dejar el mosto en reposo para que se depositen dichas materias. Esta segunda modalidad es la más corriente en bodega, y para lograr el reposo del mosto es necesario aplicar una dosis de sulfuroso que retrase el inicio de la fermentación alcohólica durante 12 a 24 horas, pues en otro caso el desprendimiento de gas carbónico impediría la precipitación y depósito en el fondo del envase de tales

sustancias.

En el desfangado no conviene eliminar las posas intermedias que tienen consistencia mucilaginosa, turbias, porque en ellos hay parte de las sustancias sápidas que interesa mantener para conseguir las adecuadas cualidades organolépticas de los vinos.

La adición de sulfuroso, depende de las condiciones en que se encuentre la vendimia, de la temperatura, etc. Es condición indispensable para que el sulfuroso actúe correctamente que esté distribuido muy uniformemente en el conjunto de la masa del mosto, de lo contrario se iniciaría la fermentación en alguna parte del depósito, extendiéndose inmediatamente al resto del envase, haciendo imposible el desfangado.

No conviene que el desfangado sea excesivamente enérgico, sino limitarlo a las partículas más gruesas que estén en suspensión. En otro caso eliminaríamos del mosto demasiada cantidad de levaduras o de esporas de levadura y de sustancias nitrogenadas que son imprescindible para la buena fermentación alcohólica, provocando retrasos en la iniciación o paradas.

Si la uva ha sido excesivamente triturada durante el estrujado mecánico, entonces será inútil todo intento de desfangado. El desfangado es de gran utilidad también desde el punto de vista gustático de los vinos, pues se eliminan sabores a terruno y herbáceos, que son muy frecuentes en vinos blancos.

El pie de cuba es una parte del mosto que se mantiene en constante fermentación durante todo el periodo de la vendimia. Se debe tener siempre dispuesto en la bodega para activar las fermentaciones perezosas o paralizadas (CEVICON, 1981).

La cantidad de pie de cuba que debe agregarse a un mosto

cuya fermentación no arranca, o cuya fermentación está paralizada, es del orden del 2 al 5% del volumen. La cantidad a preparar de pie de cuba depende del volumen de la bodega y del volumen de los envases de fermentación.

Para iniciar la preparación del pie de cuba, dos o tres días antes de que comience la vendimia se eligen unos racimos perfectamente sanos, no excesivamente maduros, con un peso total de 50 a 100 kg.

Los racimos se desgranar, separando las pepitas, se estrujan, y se echa el mosto, aireándolo, en una cuba lavada cuidadosamente, e incluso esterilizada con vapor de agua.

Si es preciso se calienta el mosto hasta una temperatura de unos 25°C. Cuando comience la fermentación alcohólica se realiza un trasiego con aireación cada dos o tres horas; al cabo de dos días de iniciada la fermentación se completa la cuba con mosto estéril o bien mosto sulfitado con unos 25 gramos de anhídrido sulfuroso por Hl., es más, aún utilizando mosto estéril es conveniente agregar el sulfuroso para que la levadura del pie de cuba esté acostumbrada a trabajar con altas dosis de gas sulfuroso y así poder hacer arrancar una fermentación en las peores condiciones.

Si se agrega mosto sulfitado debe hacerse poco a poco, a fin de no paralizar la fermentación. A partir de este momento, y a diario, van sacándose fracciones de pie de cuba, de un cuarto o un quinto del volumen, completando la cuba con mosto sulfitado.

Si es necesario mayor volumen de pie de cuba entonces ésta misma bota puede servir para preparar 4, 5 ó 10 botas más, o

incluso un depósito de 50 Hl.

Insistimos en que el pie de cuba debe airearse muy frecuentemente, cada dos o tres horas, pues no perseguimos producción de alcohol, sino la multiplicación de la levadura.

Esto es un resumen de los preparativos previos, de una bodega para asegurar la marcha de la vendimia hacia la producción de un vino de calidad.

1.5.2. COMPOSICION DEL MOSTO.

El mosto es el zumo de la uva resultante de su pisado, prensado, etc. o cualquier otra operación que rompa los hollejos de las uvas y deje libre el líquido en ellos contenido.

Según el código alimentario, el mosto es el zumo obtenido por presión de la uva en tanto no haya comenzado su fermentación, sin hollejo, pepitas ni escobajos.

El mosto sin las sustancias colorantes propias del hollejo, es un líquido dulce, turbio, con colores variables y que oscilan del amarillo claro a un rojizo también claro y que tiene una densidad superior al agua (1,08 kg/dm aproximadamente, ya que depende de los sólidos totales contenido en la uva).

La determinación de azúcar en el mosto va en función de la densidad y es fácil de hallar. Pero no todo es azúcar en un mosto, sino que también hay sustancias minerales, proteínas, ácidos libres, etc.

Esto es de forma general, pues el verdadero contenido de azúcares de un mosto depende de bastantes factores como es el estado de madurez de la uva utilizada, de las condiciones climáticas que precedieron a la vendimia, etc.

En el caso de uva poco madura, el contenido en azúcares es bajo, del orden de 130 g/l D-glucosa y fructosa, son los dos azúcares contenidos en el mosto de uva. La sacarosa no se halla presente en la uva. Esto sirve para detectar adiciones fraudulentas de azúcares comerciales que suelen estar constituidos por moléculas de sacarosa.

Los ácidos y sales más importantes son el ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico y tartrato potásico. Todos estos ácidos se encuentran en forma libre y ligada.

Otras sales de importancia son los fosfatos de calcio, fósforo y magnesio, cloruro sódico, silicato potásico, etc.

Presentes en el mosto se encuentran sustancias nitrogenadas (albúminas y globulinas) que durante la fermentación serán utilizadas por las levaduras para su multiplicación y formación de estructuras celulares.

No se encuentran taninos y materias colorantes en la pulpa de la uva de donde sale el zumo, pero durante el prensado pequeñas cantidades de esas sustancias se escapan del hollejo, escobajos y pepitas transferiéndose al caldo.

Concluimos en un porcentaje de la composición media de un mosto de uva (MADRID, A. 1991):

- Azúcares	13	-	25%
- Acidos	0,7	-	1,2%
- Sust. minerales	0,2	-	0,5%
- Sust. nitrogenadas	0,05	-	0,4%
- Humedad	13	-	86%

1.6. LAS LEVADURAS.

En 1.860, Pasteur creó la Microbiología Enológica, al descubrir los microorganismos responsables de la fermentación alcohólica del mosto (IBAR, L.,1985). Estos son unos hongos unicelulares que se reproducen asexualmente por gemación y que taxonómicamente son muy heterogéneos correspondiendo a tres clases distintas. Aunque los más interesantes enologíaicamente pertenecen en su mayoría al grupo de los ascomicetos, cuya característica es su aparato reproductor en forma de asca, o sea, una célula especial de paredes recias que contienen, en su interior, una serie de otras pequeñas células, las ascosporas, reproductoras.

Dentro de la subdivisión de los ascomicetos, las levaduras de mayor interés en la enología pertenecen a la familia de las Saccharomycetaceae, cuyas características comunes son: unicelulares eucarióticas, de tamaño más grande que las bacterias, de formas esféricas, ovoides, elípticas, cilíndricas, alargadas, filamentosas, ... etc. En el interior de la membrana celular, se encuentra el protoplasma de constitución albuminoidea y, en el centro, el núcleo de forma esférica y junto a él una gran vacuola que contiene las sustancias de reserva para su metabolismo: enzimas, vitaminas, compuestos fosfóricos, hidratos de carbono, etc. Metabolismo: el de las células eucarióticas, dando lugar a diversas fermentaciones la más conocida la alcohólica. Reproducción por gemación y por fases alternadas sexuales, mediante ascosporas, y asexuales, por gemación (LARREA, A.,1983).

1.6.1. CITOLOGIA DE LAS LEVADURAS.

La estructura general de la célula de levadura se aproxima a la de la célula vegetal. Las levaduras jóvenes en pleno desarrollo no muestran al microscopio óptico una estructura interna bien diferenciada. Por el contrario, en las células más viejas o que contienen ascosporas, se distinguen directamente ciertos detalles de la estructura interna. La observación al microscopio electrónico permitió recientemente efectuar un estudio muy detallado de la célula para diversas especies de levaduras. Como en todo organismo eucariota, la célula de levaduras posee: Envolturas Celulares, Citoplasma y Núcleo (RIBEREAU-GAYON, J., 1989).

LAS ENVOLTURAS CELULARES.

Comprenden: 1) La Pared 2) La Membrana Citoplasmática.

1.- La Pared Celular de las levaduras es relativamente gruesa y rígida. Está formada por 3 capas de composición diferente y constituida químicamente por una red de dos polisacáridos en proporciones iguales (40% del peso seco de la pared celular), un manano y un glucano. El primero no existe en ciertas levaduras. La pared contiene además proteínas, lípidos, fosfatos, glucosamina y en la mayor parte de las especies, quitina, que es un polisacárido formado por una cadena larga de residuos de NAG unida por enlaces " β 1-4". Es sobre todo el manano el que forma la capa externa de la pared, formada por una cadena principal de unidades de manosa unidas mediante enlaces " α 1-6", y numerosas cadenas laterales con uniones " α 1-2" y en algunos casos " α 1-3".

El glucano es un polisacárido formado por un polímero

lineal de residuos de glucosa unidas por enlaces " β 1-3" con algunas cadenas laterales de glucosa con uniones " β 1-6", forma la capa intermedia, rica en proteínas (ROSE, A.H., 1991). Las proteínas de las paredes contienen la serie de aminoácidos, destacando en grandes proporciones el ácido glutámico y aspártico así como los aminoácidos azufrados que se encuentran en forma de complejos con los polisacáridos.

En la pared interna están localizados cierto número de sistema enzimático: invertasa, fosfatasa, peptidasa y otras hidrolasas.

La pared de las levaduras desempeña un papel protector, pues es resistente a la acción mecánica. Confiere a la célula su forma específica, pero sin embargo posee cierta elasticidad que aparece cuando la célula se contrae en un medio en que se ejerce una fuerte presión osmótica.

La pared posee poros relativamente tenues. Los coloides de un peso molecular superior a 4.500 no pueden atravesarla. Por esta razón las levaduras no utilizan directamente las proteínas de un medio. Se debe considerar a la pared celular como una especie de filtro que deja pasar solo las micromoléculas. El papel de las enzimas de la pared celular es precisamente el de asegurar la penetración de los materiales hidrolizables, así como la utilización de las respectivas fuentes de carbono (invertasa, fosfatasa, peptidasa... etc).

2.- La Membrana Citoplasmática. Rodeando al citoplasma e inmediatamente debajo de la pared celular, está la membrana citoplasmática; formada por tres capas muy delgadas constituidas por fosfolípidos, proteínas y polisacáridos.

El papel de esta membrana es el de controlar el movimiento de las sustancias contenidas en el medio exterior hacia el interior de la célula y viceversa. Por un lado, permite el paso de los alimentos del medio exterior hacia los sitios de asimilación: iones, azúcares, aminoácidos, vitaminas, etc. Por otro lado, controla la liberación, al medio exterior, de los productos del metabolismo, como el etanol y una gran cantidad de sustancias excretadas durante la fermentación. Estos cambios continuos entre la levadura y su medio se efectúan por medio de sistemas transportadores. Confieren a la membrana citoplasmática las propiedades de un filtro muy selectivo.

- El citoplasma y sus orgánulos u organoides:

Por lo general el citoplasma ocupa la mayor parte de la célula. Parece relativamente denso. Está compuesto por sustancias proteicas de base, en las cuales están incluidos cierto número de orgánulos. El citoplasma es el lugar principal de la actividad celular. Contiene enzimas solubles, que intervienen en particular en el proceso de la glucólisis.

Se distinguen los siguientes orgánulos principalmente:

1.- Los Ribosomas; 2.- Los Gránulos de Glucógeno; 3.- Las Vacuolas; 4.- Las Mitocondrias (RIBEREAU-GAYON, J., 1989) . Vamos a desentrañar ciertos aspectos de ellos.

1.- Los Ribosomas de las levaduras son orgánulos que al microscopio electrónico aparecen expandidos en la masa del citoplasma y a veces unidos a las membranas del R.E.R. Su constitución química está formada por partes iguales de proteínas y de ácidos nucleicos, (RNA). Son el asiento de las síntesis de proteínas.

2.- Los Gránulos de Glucógeno; polisacárido bastante parecido al almidón de las plantas, puede existir en casi todas las levaduras, salvo en algunas apiculadas; en determinadas condiciones, puede constituir hasta el 40% de su materia seca. Aparece al comienzo de la fermentación en forma de pequeñas manchas de contornos regulares diseminados en el citoplasma, que terminan por confluír rápidamente en una gruesa masa que desplaza vacuola y núcleo hacia la periferia. El glucógeno desaparece poco a poco al final de la fermentación. Cuando la levadura esporula se acumula en las ascas y las ascosporas lo absorben durante su maduración. Constituye una sustancia de reserva.

Otros productos de reserva encontrados en ciertas especies, son los lípidos, presentándose en forma de granulaciones en el citoplasma. Estos puntos refringentes se observan muy bien al microscopio en las levaduras micodérmicas que se desarrollan en la superficie del vino.

3.- Las Vacuolas se presentan como orgánulos de forma irregular, limitados por una sola membrana semipermeables. El citoplasma de las levaduras jóvenes encierra una sola vacuola, si las células son esféricas o elípticas cortas, y dos vacuolas si las células son alargadas. En este último caso, las vacuolas se sitúan respectivamente en cada polo y entre ambas se encuentra el núcleo. Estas vacuolas, que desempeñan un importante papel en los fenómenos osmóticos de la célula, contienen diferentes sustancias, sales, ácidos, azúcares, prótidos, etc.

Durante la fase del crecimiento del jugo vacuolar es fluido

y no contiene elementos estructurados visibles. En las células viejas, la vacuola presenta glóbulos constituidos por polimetafosfatos, llamados corpúsculos metacromáticos; y polifosfatos llamados volutina.

También se encuentran allí lípidos y muchas enzimas hidrolíticas: proteasas, ribonucleasas, esterases, etc. La localización de estas hidrolasas en las vacuolas sugiere que estos orgánulos son un lugar privilegiado donde se efectúan las reacciones de degradación. También son el lugar de acumulación de las purinas, de ciertos aminoácidos, iones potasio y otros materiales que se almacenan allí antes de ser metabolizados.

4.- Las Mitocondrias, se presentan en morfologías diferentes: esférica, en bastones o filiforme. La célula de levadura posee una docena de mitocondrias que tienen tendencia a ordenarse en contacto con el núcleo. Ricas en lípidos, fosfolípidos y ergosterol, las mitocondrias contienen ácidos nucleicos diferentes de los del núcleo y ribosomas. Contienen enzimas respiratorias, citocromos, flavinas, hierro y cobre implicados en los fenómenos respiratorios, cuando la levadura se cultiva en anaerobiosis o en un medio desprovisto de esteroides.

-El Aparato de Golgi, es un agregado de membranas y organizadas en dictiosomas que se ven a menudo en ciertas regiones de la célula. Se ha demostrado que tiene una conexión directa con la síntesis de la pared celular de la levadura, decreciendo rápidamente el número de dictiosomas con la terminación de la pared celular.

-El Núcleo: es voluminoso, fácilmente visible en el microscopio óptico una vez teñido (Método Feulgen).

El núcleo está rodeado por una doble envoltura, sobre la cual se pueden observar al microscopio electrónico poros que desaparecen y se vuelven a formar en puntos cualesquiera de esta membrana nuclear. Estos poros permiten el intercambio de moléculas con el citoplasma.

En el núcleo durante la interfase se distingue: el nucleolo y el nucleoplasma.

El nucleolo contiene altas dosis de RNA, por lo que se tiñe de modo distinto al resto del núcleo. Es el lugar de la acumulación del RNA ribosómico.

Por el contrario, el DNA se encuentra en estructuras más complejas, en cromosomas, de los que siempre hay más de uno por núcleo, y este DNA está unido con proteínas básicas denominadas histonas.

Los cromosomas también contienen pequeña cantidad, pero muy significativa, de RNA. Los cromosomas de las levaduras en reposo reproductivo son muy delgadas y no se aprecian bien; en cambio durante la división mitótica del núcleo están contraídos y se hacen visibles (SUAREZ, J.,1990).

1.6.2. REPRODUCCION DE LAS LEVADURAS.

La reproducción es el proceso por el cual un nuevo individuo idéntico al original adquiere existencia. Para la levadura, esto significa la formación de células nuevas por vía sexual o asexual a partir de las células ya existentes (RIBEREAU-GAYON, J.,1989).

1. Reproducción Asexual.

La reproducción asexual, generalmente se efectúa por

gemación mediante el brote de unas yemas.

El ciclo celular de las levaduras es un proceso muy ordenado e idéntico al ciclo celular de las restantes células eucariotas, y en él suceden las siguientes etapas (RINE, J., 1989):

La fase S, en la cual hay una síntesis de DNA, que conduce a la duplicación del material genético de la célula. Esta fase está separada de la fase M, donde ocurre la mitosis o división nuclear, por dos espacios temporales referidos a G1 y G2 (fig.3). Convencionalmente, la posición de la célula en el ciclo puede ser determinada por el tamaño de la yema. La salida de la yema coincide con el inicio de la replicación del DNA, la yema crece progresivamente durante G2 y M, y la citocinesis o división celular, que implica la formación de una membrana separando las dos partes de la célula dividida, ocurre inmediatamente al término de la fase M y al inicio de la G1, produciéndose a continuación la separación de las dos células quedando independientes una de la otra. Durante la fase G1 las decisiones en cuanto a la división celular están hechas. En esta fase G1, las células tienen disponibles alimentos y por tanto aumentan de tamaño. Si la célula es suficientemente grande y se alimenta bien, posiblemente comience otro ciclo de división celular. Si la célula está pasando hambre por falta de nutrientes o no ha alcanzado el tamaño crítico, las células se detienen en G1. Ellas pueden permanecer en G1 por periodos largos de tiempo y con muy poca pérdida en disponibilidad. Si ciertas células tienen necesidad de nitrógeno, entonces, ellas abandonan el ciclo celular en G1 y entran en meiosis, en el cual, provocan la esporulación.

Otro modo de reproducción asexual es por escisión binaria, la célula madre se alarga y el núcleo se estira y se divide, formándose un tabique que separa en dos partes iguales a la célula madre. Las dos células hijas resultante se separan por un desdoblamiento de la membrana, sin que la forma general de la levadura haya cambiado. Las dos células hijas son iguales cada una con su núcleo, y aumentarán de tamaño hasta alcanzar el tamaño natural de las levaduras, formando nuevas colonias de levaduras (SUAREZ, J.,1990).

2. Reproducción Sexuada.

Cuando el medio en el cual se desarrollan se vuelve desfavorable para las levaduras esporógenas, dejan de multiplicarse por gemación, pasándose en estas ocasiones a una reproducción sexual. La reproducción sexual de levaduras es en esencia similar a la de cualquier célula eucariota como podemos ver en la ilustración de la figura 4 (RINE, J.,1989).

Las células haploides son de dos tipos para el apareamiento, a y/o α . Las células de cualquiera de los dos tipos de apareamiento puede reproducirse asexualmente por gemación, pero cuando dos células de apareamientos opuestos contactan, las células se funden para formar un cigoto. Esta célula diploide puede además reproducirse asexualmente por gemación. No obstante, la célula a/ α tiene la capacidad única de responder a la necesidad de nitrógeno, sufriendo una meiosis y esporulación cuando los nutrientes están de nuevo disponible. las esporas germinan y vuelven a entrar en el ciclo mitótico. El aspecto más importante del ciclo de vida de la levadura es que los cuatro productos de una meiosis simple están empaquetados en

el interior del mismo asca. Cada espora en el asca puede estar separada de la otra y crecer dando una colonia independiente que muestra sus propiedades.

No todas las levaduras esporulan e incluso entre especies que esporulan no todas las células de un mismo cultivo esporulan; aún en los casos más favorables a la esporulación no hay más que una pequeña proporción de levaduras que se transforman en ascas.

La esporulación exige, además de las reservas celulares suficientes, condiciones fisicoquímicas bien determinadas: una humedad y temperatura conveniente, un medio nutritivo pobre y sobre todo la presencia de oxígeno. Es por esta última razón que la esporulación se efectúa adecuadamente más que nada en la superficie de los medios nutritivos sólidos. En las condiciones habituales, las levaduras no pueden esporular en el vino; las levaduras llenas de granulaciones que se observan en la borra son viejas o están muertas, no son levaduras esporuladas.

La forma de las esporas varían según la especie de levadura: es esférica, con pared lisa o verrugosa, remiforme, fusiforme, hemisférica, en forma de sombrero, etc. (RIBEREAU-GAYON, J., 1989).

1.6.3. COMPOSICION QUIMICA DE LAS LEVADURAS.

Las levaduras tienen una composición química muy variable según la especie y el medio de cultivo; esta composición presenta interés por mostrar la importancia de las cantidades de sustancias del mosto que las levaduras pueden fijar y exportar, especialmente en lo que concierne a las sustancias minerales y

nitrogenadas. Las levaduras contienen como término medio el 75% de agua y el 25% de materias seca (RIBREREAU-GAYON, J.,1989).

Esta última se constituye aproximadamente así:

- Sustancias minerales	5 a 10%.
- Glúcidos	25 a 50%.
- Nitrógeno	4,8 a 12%.
- Prótidos (Nx6,25)	30 a 75%.
- Lípidos	2 a 5%.

Las levaduras encuentran todos estos componentes en cantidad suficiente en el mosto.

Las fracciones principales de las sustancias minerales son el ácido fosfórico (alrededor del 50%) y el potasio (aprox.25%).

Los glúcidos de las levaduras están compuestos por polisacáridos y glucógeno. Los próticos varían a la inversa de la tasa de glucógeno; un fuerte porcentaje de nitrógeno se da a la par de un fuerte tenor de cenizas. Las levaduras contienen todos los aminoácidos indispensables.

Las formas de Nitrógeno púrico y pirimidico, constituyentes de los ácidos nucleicos de las levaduras representan respectivamente el 8 y el 4% de la totalidad del Nitrógeno.

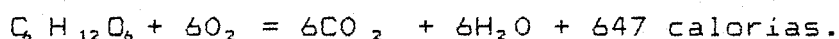
1.6.4. METABOLISMO DE LAS LEVADURAS.

El metabolismo de las levaduras, al carecer de clorofila, no pueden realizar la síntesis de los hidratos de carbono, sino que tienen que tomarlos del medio donde se desarrollan, en este caso del mosto.

Para su respiración, las levaduras pueden coger el oxígeno del aire, respiración aerobia o bien de una sustancia donde se

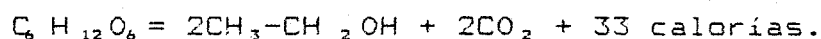
encuentre combinado, respiración anaerobia, en este caso, de los azúcares.

En la respiración aerobia, se produce combustión total de los azúcares en anhídrido carbónico y agua, con fuerte desprendimiento de energía según (IBAR, L.,1980):



En ésta se reproducen rápidamente las levaduras con poco consumo de azúcar; 1 g de levadura sólo puede transformar 4 g de azúcar.

En la respiración anaerobia, la combustión es incompleta, sólo se produce alcohol y anhídrido carbónico con menos desprendimiento de energía (IBAR, L.,1980):



En esta reacción, basta 1 g de levadura para transformar 100 g de azúcar.

Los disacáridos, como en el caso de la sacarosa que está formada por la unión de la glucosa y la fructosa, tienen que sufrir una hidrólisis bajo la acción de la enzima unida a las levaduras, dando lugar a los dos monosacáridos antes indicados, sobre los que actuarán las levaduras produciendo la fermentación alcohólica.

El nitrógeno preciso para la formación de las proteínas celulares lo encuentran en el mosto en forma de proteínas, las cuales deben ser degradadas a aminoácidos para que puedan ser asimilados. Además del oxígeno procedente de los azúcares, las levaduras precisan del oxígeno libre para poder desarrollarse, actuando como acelerantes de su proceso metabólico.

1.6.5. CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS.

El crecimiento de las levaduras, como el de todos los microorganismos, está condicionado por una serie de factores. Las levaduras no pueden vivir y desarrollarse más que en condiciones determinadas. Son muy sensibles a las condiciones de aireación y temperatura; manifiestan necesidades nutritivas precisas en alimentos carbonados, nitrogenados, minerales y exigen ciertos factores de crecimiento. Se llama "factor limitante" a todo factor o condición cuya ausencia o modificación acarrea la detención del crecimiento. Si se siembran algunas levaduras en un medio de cultivo conveniente, éstas se multiplican hasta el agotamiento del factor limitante (del azúcar, por ejemplo) o hasta el momento en que un factor limitativo alcanza un valor crítico (concentración de alcohol producido, por ejemplo). Ese fenómeno se desarrolla pasando por diferentes etapas que teóricamente son las siguientes (fig.5) (RIBEREAU-GAYON, J.,1989):

Primera fase: DE LATENCIA.

Durante esta fase, la tasa de crecimiento (es decir, el número de divisiones celulares por unidad de tiempo) es nula; las células utilizadas para la siembra deben adaptarse a ese nuevo medio o, si son viejas, reconstruir su potencial enzimático.

Segunda fase: DE ACELERACION.

Al iniciarse el crecimiento, los microorganismos comienzan a multiplicarse. Sobre el gráfico 5 la curva de crecimiento, hasta aquí paralela al eje de abscisas, adquiere una forma cóncava ascendente.

Estas dos primeras fases son facultativas, y tanto más cortas cuanto más favorables son las condiciones del crecimiento.

Tercera fase: EXPONENCIAL O LOGARITMICA.

La tasa de crecimiento es constante y máxima, la mortalidad nula. La curva es exponencial, lo que se traduce en coordenadas semilogarítmicas por una recta. El número de las levaduras vivas es idéntico al de las células totales.

Cuarta fase: DE RETARDO.

Uno de los factores está casi agotado o tiende hacia su valor crítico; la tasa de crecimiento disminuye; la curva se inclina hacia abajo.

Quinta fase: ESTACIONARIA.

Uno de los factores limitantes está agotado o llegó a su nivel crítico; la tasa de crecimiento se hace cero. Gráficamente la curva se vuelve paralela al eje de abscisas. La población permanece estacionaria en un lapso más o menos largo, según las condiciones experimentales y el microorganismo implicado.

Sexta fase: DE DECLINACION.

La tasa de crecimiento se hace negativa. La población decrece. Las células mueren. Liberan productos de excreción, se autolisan, se disuelven de alguna manera en el medio liberando sus componentes, que por otra parte son retomados por los microorganismos aún vivos que los utilizan para sobrevivir, hasta la extinción total.

1.7. DIFICULTADES EN LA CLASIFICACION DE LAS LEVADURAS Y NOMENCLATURA.

La descripción de casi 4000 especies de levaduras diferentes dificulta a la hora de identificar las especies encontradas.

Además, los nombres de levaduras han cambiado tan a menudo que es muy difícil conocer, para los no taxonomistas, qué clase de levadura se remite en las diferentes clasificaciones (BARNETT, J. A., 1990).

- Zygosaccharomyces fermentati (Naganishi, 1928), por ejemplo, fue cambiado por Saccharomyces cerevisiae, por Lodder & Kreger-van Rij, en 1952, volviendo al nombre de Zygosaccharomyces fermentati por Kudriavzev en 1954; pasa a Saccharomyces montanus por Phaff, Miller & Shifrina en 1956; a Torulaspota manchurica (Van der Walt & Johannsen, 1975) y finalmente regresa de nuevo a Zygosaccharomyces fermentati (Van Arx et al. 1977). De acuerdo con Ernst Mayor (1989), el desorden que resulta de estos cambios, no ayuda al estudio de las levaduras. Algunas de las etiquetaciones de la nomenclatura de levaduras, provienen de confundir la taxonomía con estudios evolutivos. Cada vez hay una idea nueva formulada sobre las antiguas o ancestrales relaciones de algunas levaduras, sus nombres han cambiado.

El principio de Pitter Miller, 1970, adherido al famoso dictamen de Mayor, 1942: "Las especies son grupos de actual o potencial creación de poblaciones naturales, las cuales están aisladas reproductivamente de otros grupos semejantes". Este principio ha limitado la aplicación para clasificar las levaduras, ya que en muchas levaduras sólo se conoce la

reproducción asexual y muchas variedades son fértiles por si mismas.

1.7.1. CLASIFICACIONES OBJETIVAS.

Durante algunos años, decisiones intuitivas y subjetivas han sido predominantes en la clasificación de levaduras. No obstante, desde los progresos en la taxonomía numérica de bacterias, algunos taxonomistas de levaduras han intentado introducir una mayor objetividad en su práctica. Han sido tomadas medidas de similitudes y diferencias entre las numerosas variedades, analizando cuantitativamente los resultados de muchos test. Otros taxonomistas han deseado basar su clasificación en la capacidad de intercrecimiento (Johannsen & Van der Walt 1978) o complementariedad en las secuencias de DNA (Mayor & col. 1978).

Pero como se ha podido comprobar en distintas ocasiones, hasta estas dos proposiciones "objetivas" pueden dar resultados conflictivos. Esto no debería provocar sorpresas ya que los dos tipos de clasificaciones están basados en diferentes características, fenotípicas y genotípicas (BARNETT, J.A., 1990).

1.7.2. RAZONES PARA UNA CLASIFICACION.

La mayoría de las personas que están trabajando con levaduras necesitan una clasificación estable; por razones análogas a aquellas que requieren nombres geográficos estables. No obstante, mientras es fácil condenar a los taxonomistas de levaduras, por aparente desprecio a ésta necesidad, es importante entender que las razones fundamentales para los

cambios que ellos hacen no son solamente de simple aplicación.

Hay tres razones respetables para cambiar los nombres taxonómicos de las levaduras (BARNETT, J.A.,1992):

1a.-Una levadura que inicialmente haya sido inadecuadamente descrita o nombrada.

2a.-Nuevas observaciones importantes hechas sobre la levadura.

3a.-Un nombre legítimo puede ser encontrado para una especie de levadura, desplazando al nombre usualmente utilizado.

Muchos cambios de nomenclatura han sido asociados a cambios en las ideas de los taxonomistas, sobre el criterio que debería ser usado para delimitar las especies. En un principio, estos criterios eran aquellos de características fenotípicas, tal como; aspecto al microscopio y la capacidad de usar ciertos sustratos. La comprensión de que las características nutricionales sean sumamente mutable, las ha hecho, que parezcan, recientemente, como un criterio insatisfactorio para dividir especies. Por tanto, para aquellas levaduras a las que pueda ser aplicada la infertilidad, generalmente, ha sido considerado como un criterio más aceptable. Tal criterio es consecuente con la sostenida opinión de que la clasificación debe reflejar, en la medida de lo posible, las relaciones evolutivas entre las levaduras. Desde este punto de vista, los cambios de nomenclatura asociados con recientes progresos en biología molecular son reconocidos, tal que, cuanto más cercana sea la relación, más secuencias de bases serán comunes. Usando el criterio de reasociación, de simples hebras de DNA nuclear fragmentado y desnaturalizado, de diferentes variedades o razas,

aquellas con aproximadamente un 80% de secuencias de bases en común, han sido consideradas como pertenecientes a la misma especie. No obstante, el análisis de la reasociación de DNA de una parte y la fertilidad por otra parte, no siempre conduce a las mismas conclusiones sobre las relaciones. Aunque los métodos de biología molecular y genéticos, puedan proporcionar medidas del número de diferencias mutacionales entre levaduras, aceptado como criterio taxonómico, estos estudios no dan información sobre genealogía. Esto es por lo que dos especies A y B, que se separan antes en la evolución que A y C y sin embargo, pueden tener menos diferencias entre ellas que A y C.

1.7.3. CARACTERISTICAS USADAS EN LA CLASIFICACION DE LEVADURAS.

Las principales características usadas para clasificar las levaduras son (BARNETT, J.A. 1990):

- Aspectos macroscópicos de las colonias.
- Aspectos microscópicos de las células.
- Modo de reproducción sexual.
- Ciertas actividades fisiológicas, especialmente las nutricionales.
- Algunos rasgos bioquímicos.
- Las comparaciones de los genomas en término de secuencias de bases, por la reasociación de DNA-DNA o DNA-RNA.

Los taxonomistas examinan las células de levaduras microscópicamente y consideran su tamaño y forma, como se reproducen vegetativamente (por gemación multilateral, bipolar o simple, por fisión o formando filamento) y la forma, estructura y modo de formación de ascosporas y teliosporas, si alguna de

estas se encuentran. La forma de las células a menudo indican el modo de reproducción vegetativa.

Algunas levaduras se reproducen sexualmente por ascosporas, otras por teliosporas e incluso por basidios.

Las características fisiológicas usadas para clasificar levaduras son principalmente las siguientes (BARNETT, J.A.1990):

-La habilidad para "fermentar" algunos azúcares semianaeróticamente; para crecer aeróticamente con varios componentes, cada uno como una única fuente principal de cualquier carbono o nitrógeno (test de asimilación), para crecer en la presencia de un 50-60% (w/v) D-glucosa o un 10% (w/v) NaCl+5% (w/v) D-glucosa, para crecer a 37°C., etc.

-Estudio de ciertos caracteres bioquímicos también pueden influir en decisiones taxonómicas, por ejemplo: la estructura química de las paredes celulares, particularmente, de los mananos de la pared.

1.7.4. CLASIFICACION DE LAS LEVADURAS SEGUN KREGER-VAN RIJ
1987.

- Fungi (Reino)
- Eumycota (División)
- Ascomycotina (Subdivisión)
- Hemiascomycetes (Clase)
- Endomycetales (Orden)
- Spermophthoraceae (Familia)

Holleya

Nematospora

- Saccharomycetaceae (Familia)
- Schizosaccharomycetoideae (Sub-familia)

Hasegawaea

Schizosaccharomyces

- Nadsonioideae (Sub-familia)

Hanseniaspora

Nadsonia

Saccharomycodes

Wickerhamia

- Lipomycetoideae (Sub-familia)

Lipomyces

Waltomyces

- Saccharomycetoideae (Sub-familia)

Ambrosiozyma

Arthroascus

Arxiozyma

Botryoascus

Citeromyces

Clavispora
Cyniclomyces
Debaryomyces
Dekkera
Dipodascus
Endomyces
Endomycopsisella
Galactomyces
Guilliermondella
Hansenula
Hormoascus
Hyphopichia
Issatchenkia
Kluyveromyces
Lodderomyces
Pachysolen
Pachytichospora
Pichia
Saccharomyces
Saccharomycopsis
Schwanniomyces
Sporopachydermia
Stephanoascus
Torulaspora
Wickerhamiella
Williopsis
Wingea
Yarrowia

Zigoascus

Zygosaccharomyces

Zygozoma

- Basidiomycotina (Subdivisión)

Ustilaginales (Orden)

Filobasidiaceae (Familia)

Chionosphaera

Filobasidiella

Filobasidium

Tremellales (Orden)

Tremellaceae (Familia)

Holtermannia

Tremella

Levaduras formando Teliosporas

Cystofilobasidium

Leucosporidium

Mrakia

Rhodosporidium

Sporidiobolus

No clasificado

Sterigmatosporidium

- Deuteromycotina (Subdivisión)

Blastomycetes (Clase)

Cryptococcaceae (Familia)

Aciculoconidium

Candida

Cryptococcus

Eeniella

Fellomyces

Geotrichum

Kloeckera

Malassezia

Mastigomyces

Myxozyma

Oosporidium

Phaffia

Rhodotorula

Saitoella

Sarcinosporon

Schizoblastosporion

Sterigmatomyces

Sympodiomyces

Trichosporon

Trigonopsis

- Sporobolomycetaceae (Familia)

Bensingtonia

Bullera

Fibulobasidium

Sporobolomyces

1.7.5. CARACTERISTICAS DE LOS GENEROS ENCONTRADOS.

- CANDIDA (166 especies). Berkhout.

Células vegetativas: células gemando, algunas veces pseudohifas septadas.

Reproducción sexual: No se da.

Fisiología: Fermentación +/-

Nitrato +/-

Hidrolisis urea -

DBB -

Comentario: este género está restringido al grupo de levaduras asexuales, con características típicas de los ascomicetos, tal como doble capa de la pared celular. DBB- e hidrolisis de la urea-.

Nota: DBB, es un test para ver si reacciona con aminoácidos aromáticos, residuales de proteína cambiando de color. El nombre es Diazonuim blue B test.

Referencias: Berkhout 1923; Kreger-van Rij 1984, p.585. y Weijman et al. 1988.

KLOECKERA (1 especie). Janke.

Célula vegetal: gemación polar, en forma de limón o células ovaladas, raramente pseudomicelio.

Reproducción sexual: No se conoce.

Fisiología: Fermentación +

Nitratos -

Hidrolisis de urea -

DBB -

Comentario: Se ha comentado los estados asexuales de

Hanseniaspora y Wickerhamia. Kloeckera lindneri es la única especie de este género que no se ha descrito el estado asexual.

Referencias: Janke 1928; Mayer et al. 1978.

PICHIA (95 especies) Hansen.

Célula vegetal: células en gemación, usualmente pseudomicelios, ocasionalmente hifas septadas.

Reproducción sexual: asca, con 1 a 4 ascosporas (ocasionalmente hasta 8) y con forma lisa, circular, en forma de sombrero o de saturno.

Fisiología: - Fermentación +/-

- Nitrato -

- Hidrólisis de urea -

- DBB -

Referencias: Hansen 1904, Kreger Van Rij 1984, p.295, Kurtzman 1984 b.

RHODOTORULA (34 especies) Harrison.

Célula vegetal: células gemando.

Reproducción sexual: ninguna.

Fisiología: - Con pigmentos carotenoides. Colonias de color rosa, rojo,...

- Fermentación -

- Inositol +/-

- Nitrato +/-

- Hidrólisis de urea +

- DBB +

- Producción de almidón +/-

- Xilosa no es un componente en los polisacáridos de la célula.

Referencias: Harrison 1927; Yamazaki & Komageta 1981; Weijman et al. 1988.

SACCHAROMYCES (10 especies). (Mayer ex Reess).

Reproducción vegetativa por células en gemación; algunas veces pseudomicelio. Células esféricas, elipsoidales, cilíndricas o alargadas. Nunca forman micelios verdaderos, aunque si pueden, algunas veces formar pseudomicelios.

Reproducción sexual: Asca persistentes; cada una formada directamente de una célula diploide, con 1 a 4 ascosporas (ocasionalmente más) lisas, esféricas u ovaladas.

Fisiología: Fermentación +

Nitrato -

Hidrólisis de urea -

DBB -

Referencias: Reess 1870; Kreger-van Rij 1984, p. 379; Vanhan Mortuui & Martini 1987; de Hoog et al. 1987.

Nota: Saccharomyces bayanus, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces paradoxus y Saccharomyces pastorianus, sólo pueden ser distinguidas unas de otras midiéndoles la reasociación de DNA, entonces metemos todas estas especies en Saccharomyces cerevisiae.

TORULASPORA (3 especies) Lindner.

Célula vegetal: células en gemación, ni hifa.

Reproducción sexual: Ascas persistentes, con 1 a 4

ascosporas circulares; usualmente hay conjugación entre la yema (célula hija) y la célula.

Fisiología: Fermentación +

Nitrato -

Hidrólisis de urea -

DBB -

Referencia: Lindner 1904; Van der Walt & Johannsen, 1975; Kreger-van Rij, 1984, p.434.

ZYGOSACCHAROMYCES (8 especies) Barker.

Célula vegetal: células en gemación, algunas veces pseudomicelio.

Reproducción sexual: Asca, formada por conjugación de células, cada una con 1 a 4 ascosporas esféricas u ovaladas.

Fisiología: Fermentación +

Nitrato -

Hidrólisis de urea -

DBB -

Referencias: Barker 1901 a,b; Kreger-van Rij, 1984, p.449.

1.8. LA FERMENTACION ALCOHOLICA.

El proceso de transformación de los azúcares de la uva en alcohol con desprendimiento de gas carbónico es muy complejo, pues se forman una serie de cuerpos intermedios como el ácido pirúvico, el etanol o acetaldehído, etc, y también se forma un conjunto de sustancias secundarias que acompañan a la fermentación alcohólica, como son la glicerina, el ácido

acético, alcoholes superiores, diacetilo, etc.

Este proceso es exotérmico y esta es la razón por la que se eleva la temperatura de los mostos en fermentación. Las burbujas que se observan en la superficie de un mosto que fermenta son debidas simplemente al desprendimiento de gas carbónico que se produce (PEYNAUD, E.,1989).

Los agentes de la fermentación son las levaduras. La levadura se encuentra adherida al hollejo de la uva, a la cera o pruina que recubre la piel o cutícula. Esta levadura puede estar en forma de vida más o menos latente, incluso en forma de espora, revitalizándose y multiplicándose cuando entra en contacto con el mosto. Para que la fermentación se aprecie claramente, es necesario que actúe un elevado número de levaduras, y por esto la primera función que tienen que realizar es la multiplicación, es decir, la producción de sucesivas y múltiples generaciones de levaduras para aumentar rápidamente el número de individuos.

Esta primera fase de multiplicación de la levadura es aerobia, necesita oxígeno, por lo cual los mostos deben de ser ligeramente aireados para facilitar este primer proceso. Sin embargo, el proceso de la fermentación alcohólica es anaerobio. El propio gas carbónico que se desprende y burbujea a través del mosto, elimina totalmente las trazas de oxígeno que pudiera contener (SUAREZ, J.,1990).

Hay multitud de cepas de levaduras. Las más importante en la fermentación alcohólica pertenecen al género Saccharomyces. También hay otras levaduras que no son convenientes para la correcta fermentación alcohólica, son por consiguiente

indeseables.

Para que se inicie la fermentación alcohólica y para que ésta evolucione normalmente, es preciso que el mosto cumpla una serie de condiciones respecto a temperatura, presencia de levaduras, pH, presencia de aminoácidos y vitaminas, etc. Cuando estos factores y sustancias no cumplen los límites aceptables, entonces se produce la inhibición de la levadura, es decir, la falta de arranque de la fermentación o bien su paralización.

Para resolver estos problemas es necesario restablecer los índices normales de estos factores y aportar levaduras en plena actividad (pie de cuba), para que inicie o restablezca el proceso fermentativo.

La fermentación alcohólica provoca además una serie de fenómenos colaterales y simultáneos, entre los que debemos destacar los siguientes:

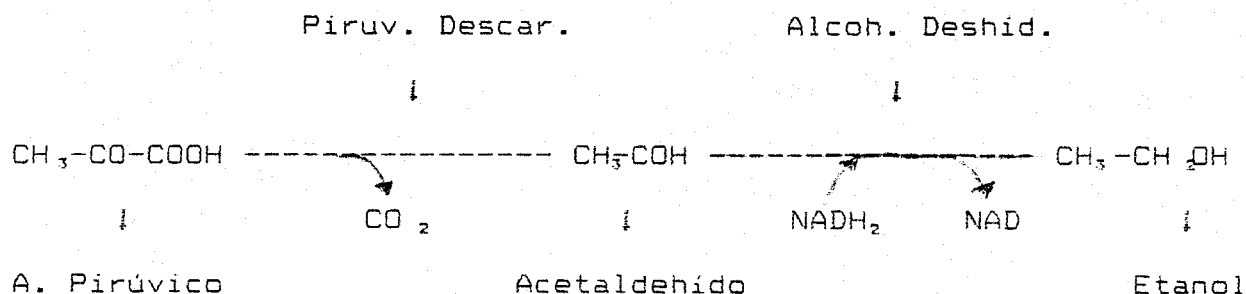
El aumento progresivo de la graduación alcohólica determina la insolubilización o precipitación de una parte de los ácidos del vino, en forma de sales. Asimismo la constante elevación del grado alcohólico va dificultando el trabajo fermentativo de las levaduras, decayendo el ritmo de transformación de azúcar en alcohol a partir de cierta graduación. Podríamos decir de forma gráfica que a partir de cierto grado de alcohol la levadura se fatiga, frenándose la velocidad del proceso y dando lugar al comienzo de la fermentación lenta.

Hay cepas de levaduras excepcionales, en algunas zonas vitivinícolas donde la uva alcanza riqueza de azúcar muy elevada que son capaces de remontar fácilmente los 15º ó 16º de alcohol, e incluso se dan casos en que se superan los 17º de alcohol por

fermentación natural.

1.8.1. MECANISMO QUIMICO DE LA FERMENTACION ALCOHOLICA.

Como primer estadio químico de la fermentación alcohólica lo constituye el conjunto de reacciones seriadas que da ácido pirúvico. Con posterioridad las células de levaduras actúan sobre el ácido pirúvico descarboxilándolo por la piruvato deshidrogenasa y transformándolo en acetaldehído o etanal que finalmente es reducido a alcohol, merced a la alcohol-deshidrogenasa en presencia de NAD reducido (SUAREZ, J., 1990):

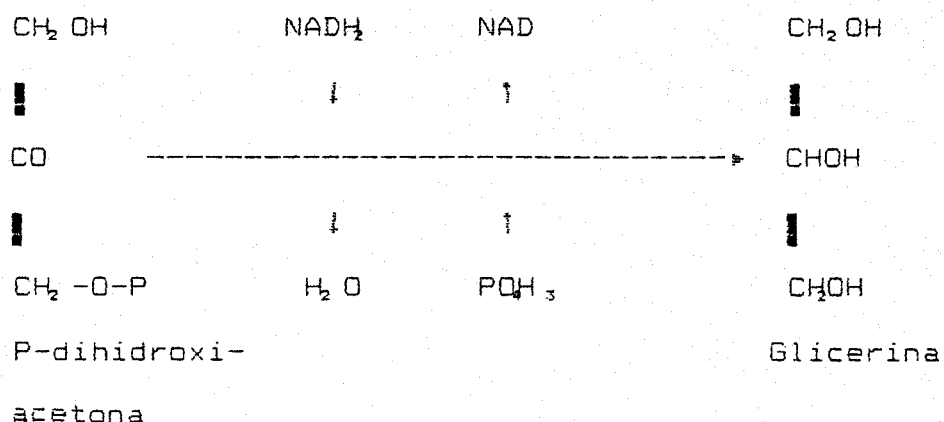


No todas las moléculas de azúcares del mosto van a descomponerse en dos moléculas de etanol y otras dos de CO_2 por molécula de glucosa metabolizada, sino que dependiendo del propio metabolismo de las levaduras fermentativas, un determinado número de moléculas de azúcar van a ser degradadas mediante fermentación gliceropirúvica.



La fermentación gliceropirúvica se lleva a cabo a expensas de la reducción de la dihidroxiacetona-fosfato resultante de la

rotura de la fructosa 1-6 difosfato (SUAREZ, J., 1990).



Los mecanismos bioquímicos de la fermentación alcohólica y gliceropirúvica están estrechamente relacionados.

La fermentación gliceropirúvica y en consecuencia la formación de la glicerina, predomina a principio del desarrollo de la levadura, pero aún en un periodo de plena fermentación no hay nunca fermentación alcohólica pura.

Se calcula que en la fermentación vinaria, alrededor del 8% de las moléculas de azúcar siguen la vía de la fermentación gliceropirúvica y en consecuencia el 92% de la fermentación alcohólica propiamente dicha.

La fermentación gliceropirúvica surge ante la necesidad de la reoxidación de NADH₂, pues de no ser así la glucólisis se detendrá cuando todo el NAD presente en la célula si hubiese reducido. La confrontación de las fermentaciones alcohólicas y gliceropirúvica nos muestra muy bien la competencia entre los dos aceptores de H, el acetaldehído por una parte y la dihidroxiacetona-fosfato por otra. El primero es más fácil de reducir y es el que fija preferencialmente los 2H⁺ provenientes de NADH₂, cuando estos dos cuerpos están en concentraciones equivalentes. Pero si no hay acetaldehído, que es lo que sucede

al principio del desarrollo de la levadura en un medio azucarado, entonces es la dihidroxiacetona-fosfato la que actúa de aceptor de H y al mismo tiempo permite la acumulación de acetaldehído, que servirá para atraer a la fermentación alcohólica propiamente dicha.

ESQUEMA DE LA FERMENTACION ALCOHOLICA (RIBEREAU-GAYON, J.,1989):

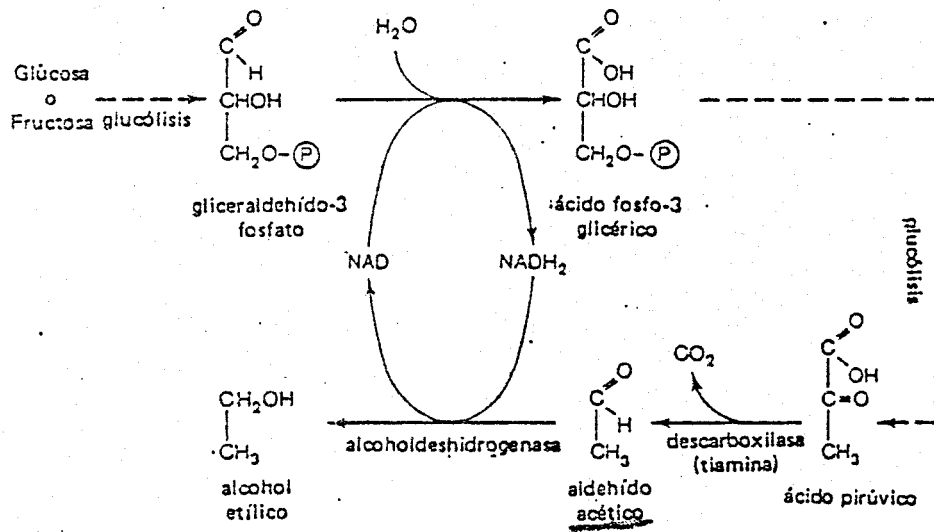


Figura 15.12. Esquema de la fermentación alcohólica.

ESQUEMA DE LA FERMENTACION GLICEROPIRUVICA (RIBEREAU-GAYON, J., 1989):

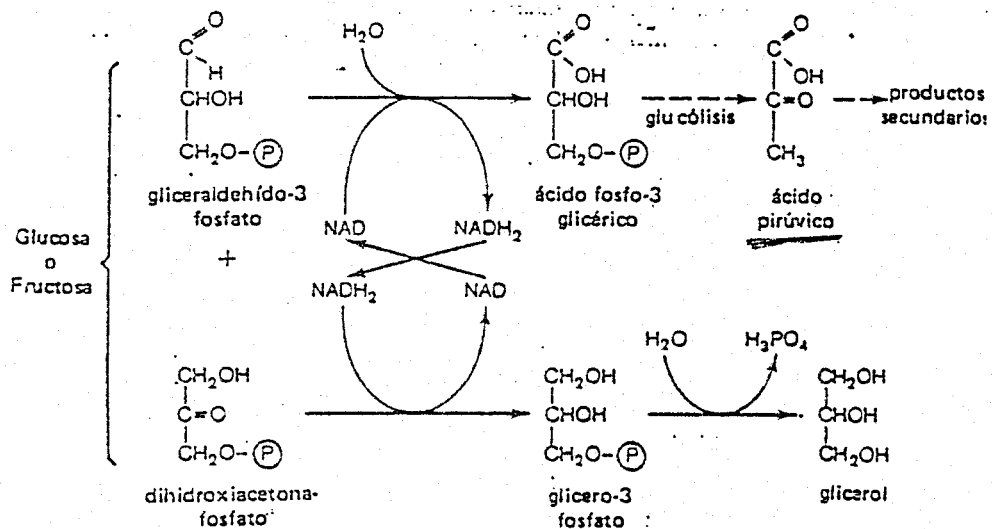


Figura 15.14. Esquema de la fermentación gliceropirúvica.

1.8.2. COMPOSICION DEL VINO.

El vino ya formado, y terminadas las fermentaciones tanto tumultuosa como lenta, tendrá como componentes básicos el agua y el alcohol etílico, éste último como resultante de la fermentación alcohólica de la glucosa, y también otros muchos componentes en cantidades variables, unas procedentes del mosto y que continúan inalterables, y otras procedentes de diversas fermentaciones, paralela a la alcohólica, producidas por diversos microorganismos, a partir de los componentes del mosto o de las sustancias producidas en las fases intermedias de la fermentación alcohólica.

Principales componentes del vino (IBAR, L.,1980):

1.- Agua :

Se encuentra en una proporción del 70-90% y cuanto más maduro está el fruto en el momento de la vendimia y mejores sean las condiciones de fermentación, mayor será la cantidad de alcohol y menor la de agua. El vino con una excesiva proporción de agua es difícil de conservar y se agria con facilidad. El total de las sustancias contenidas en el vino se determina evaporando el agua y el alcohol a una temperatura inferior a 100°C , obteniendo el extracto seco.

2.- Alcohol etílico y otros alcoholes:

El alcohol etílico se encuentra en el vino en una proporción del 8-18%, además contribuye eficazmente en la disolución de los otros componentes del vino. Una concentración alcohólica elevada impide el desarrollo de gérmenes no deseables, causantes ocasionales de las enfermedades del vino. La cantidad de otros alcoholes en el vino, con una sola función

alcohólica (OH-), es del orden del 0,05-0,1%, siendo todos de olor y sabor agradable, por tanto, contribuyen a las buenas características organolépticas del vino.

Existe una serie de polialcoholes, de los que el más importante es la glicerina o propanotriol. Es un alcohol poco volátil, de sabor dulce, y cuyo contenido en el vino oscila entre 0,1 y 0,2% en c.c., y proporciona una marcada suavidad.

3.- Ácidos:

A los ácidos orgánicos que se encuentran en la uva, y que se encontrarán en el vino, deben añadirse los ácidos producidos en el vino en los diversos procesos fermentativos, generalmente procedentes de la oxidación del alcohol.

Derivan del mosto: el ácido málico, el cítrico y el tartárico. El cítrico es poco abundante, el málico se encuentra en menor proporción en el vino que en el mosto y siempre en mayor cantidad en los vinos procedentes de uvas poco maduras, y el ácido tartárico libre o sin sales (bitartratos) se encuentran en menor proporción por ser insoluble en el alcohol.

Los ácidos lácticos, succínico y acético son originados por las distintas fermentaciones que tienen lugar en el vino. El ácido succínico en una proporción del 0,05-0,1% contribuye a dar sabor al vino.

La cantidad de ácido acético debe ser inferior a 0,13% para que no se considere picado.

La totalidad del ácido libre que contiene un vino recibe el nombre de acidez total y confiere al vino un pH=3,0.

4.- Aldehidos y Esteres:

Los primeros son resultantes de la oxidación intermedia de

los alcoholes, y los segundos de la combinación de los ácidos libres con los diversos alcoholes. Se encuentran en pequeñas cantidades en el vino. Ambos son productos volátiles y aromáticos que influyen mucho en la calidad del vino.

5.- Productos fijos:

Son los taninos que dan consistencia, pero un sabor astringente al vino en una proporción del 0,04-4%; los azúcares (glucosa y fructosa) en proporciones variables y las pectinas o sustancias mucilaginosas.

6.- Materias minerales:

Como elementos minerales se encuentran en el vino: potasio y calcio, que neutralizan los ácidos y el fósforo en forma de fosfato de sodio.

7.- Vitaminas:

En el vino sólo se encuentran las vitaminas hidrosolubles, estando en mayor proporción la vitamina B1 o Tiamina; la vitamina B2 o Riboflavina y la B5 o ácido Pantoténico, más abundante en el vino que en la uva, ya que le producen ciertas levaduras. También son importantes el ácido ascórbico o vitamina C y la vitamina PP.

1.8.3. INFLUENCIA DE LOS AGENTES FISICOS EN LA FERMENTACION.

La influencia del calor es muy importante en el desarrollo de las levaduras y, en consecuencia, en la marcha del proceso fermentativo. Las levaduras son incapaces de desarrollarse a temperaturas inferiores a los 10°C, pudiendo subsistir gracias a la gran resistencia de las ascosporas, que viven sin desarrollarse a temperaturas inferiores a los 0°C.

Según la especie, la levadura tiene una temperatura óptima de desarrollo y una temperatura crítica mínima y máxima, por debajo y por encima de las cuales no pueden desarrollarse. Las temperaturas óptimas se encuentran entre 25 y 30°C, y las temperaturas extremas son como mínimo 6-9°C y como máximo 43°C, en la que pierden su facultad de multiplicarse (IBAR, L., 1985).

Hay que tener en cuenta unos parámetros como la velocidad de fermentación y el poder fermentativo. La velocidad de fermentación (SUAREZ, J., 1990) se refiere a la cantidad de alcohol o CO₂ producidos por unidad de tiempo y, en general, la velocidad aumenta y la fermentación se acorta, con la elevación de la temperatura; pero cuando se alcanzan los 38-40°C, se convierte en factor limitante, la fermentación, no se produce bien, pues a esta temperatura la actividad de las levaduras van cesando, hasta paralizarse la fermentación, quedando parte de los azúcares, sin transformar y en consecuencia, el grado alcohólico alcanzado es inferior.

-La influencia de la temperatura sobre el poder fermentativo, medida por el porcentaje de etanol que una cepa de levadura es capaz de producir, es diferente. Cuando se fermenta a temperatura baja o moderada, las fermentaciones son lentas, pero el grado alcohólico alcanzado es generalmente mayor que a temperaturas elevadas o superiores a los 30° ó 35°C.

Los peligros de altas temperaturas de fermentación no solo afectan al metabolismo celular de las levaduras y en consecuencia, a la disminución del poder fermentativo, sino que además se ve favorecido el rango de temperatura óptima de muchas bacterias etimológicamente responsables de las alteraciones del

vino; se pierden aromas primarios procedentes de la uva, se embastecen los vinos y también se pierde etanol por evaporación.

En forma muy general, puede decirse que para la obtención de vinos blancos la temperatura ideal es 20-25°C y para tintos es mejor de 25 a 30°C (IBAR, L.,1985).

Las temperaturas pueden regularse por el sistema directo de enfriar el mosto mediante su ventilación, por la práctica del remontado o el empleo de sistemas de refrigeración; o bien indirectamente, frenando el desarrollo de las levaduras por el empleo de inhibidores, el más corriente es el gas sulfuroso.

-La influencia de la aireación.

La velocidad de fermentación al comienzo depende estrechamente de las condiciones de aireación. Comienza más deprisa y se desarrolla más rápidamente cuando las levaduras están mejor aireadas. Por tanto, es conveniente airear el mosto sano al máximo. Este límite superior coincidirá con el límite de solubilidad de un gas (oxígeno) en un líquido (mosto) y que es muy bajo. La saturación del mosto en oxígeno se alcanza muy pronto.

La utilización de oxígeno por las levaduras sólo tiene lugar al comienzo de la fermentación. Una vez arrancada ésta no necesita oxigenación, ya que si no se producirá el efecto Pasteur (inhibición de la fermentación) y se desviará el proceso alcohólico (SUAREZ, J.,1990).

-La influencia de la acidez.

Las levaduras no necesitan de la acidez para multiplicarse, incluso fermentan mejor los azúcares en un medio neutro o poco ácido. Trabajan mejor con un pH 4,0 que con un pH 3,0.

Generalmente, cuando una fermentación se detiene no se debe a una falta de acidez, sino a un exceso de temperatura que asfixia a las levaduras. Pero sin embargo, una acidez débil puede convertir en muy grave las consecuencias de esa detención, pues las bacterias productoras de enfermedades del vino se desarrollan más fácilmente cuanto más débil es el medio ácido del mosto (PEYNAUD, E.,1989).

- Necesidades nutritivas de las levaduras.

A las levaduras les es totalmente necesario encontrar ciertos alimentos en el mosto, donde se desarrollan. Sus necesidades de azúcar, de sustancias minerales, son fácilmente satisfechas, pero los mostos están peor provistos de sustancias nitrogenadas asimilables.

Las levaduras de vinificación están constituidas por un 25 a un 60% de materias nitrogenadas. Por lo tanto, para formar sus células y para reproducirse necesitan encontrar en el medio en que viven suficiente nitrógeno fácilmente asimilable. En 36 horas de fermentación las levaduras agotan literalmente el nitrógeno asimilable del mosto, así como otros factores nutritivos. El resto de la fermentación prosigue con levaduras hambrientas condenadas a vivir de ellas mismas (PEYNAUD, E.1989).

Por tanto, las disponibilidades de nitrógeno asimilable resultan determinantes para la reproducción de las levaduras, la velocidad de fermentación y la tolerancia al etanol, siendo el balance fermentativo muy diverso según las formas de nitrógeno disponible y asimilable.

- Necesidades en factores de crecimiento.

Las levaduras para desarrollarse necesitan también de otras

sustancias, factores de crecimiento, que no son otra cosa que vitaminas: biotina, tiamina, ácido pantoténico, minoinositol y nicotinamida.

La uva está en las condiciones normales suficientemente provista de los factores de crecimiento para asegurar una buena multiplicación de las levaduras. Pero a medida que el mosto fermenta y se suceden las generaciones de levaduras, los factores de crecimiento se agotan y la facilidad de fermentación disminuye.

Estas sustancias indispensables a las levaduras, son activas en dosis extremadamente pequeña; algunas décimas o centésimas de mg. por litro. La más importante es la vitamina B1 o tiamina. Los mostos de uva sana contienen de 0,1 a 0,5 mg/l. Por el contrario, las sulfitadas, los mostos de uva podrida, pueden carecer de dicha vitamina. La adición de pequeñas cantidades que no sobrepasa 0,6 mg/l. activa considerablemente la fermentación de esos mostos pobres y los de una mayor regularidad. Las levaduras resisten mejor las condiciones defectuosas y apurarán más la transformación del azúcar.

Por tanto el contenido vitamínico tanto del mosto como del vino es de gran interés para el enólogo, así como para el consumidor, ya que contribuye a activar la fermentación además de definir el valor del vino como alimento (PEINAUD, E., 1989).

2. MATERIAL Y METODOS.

2.1. MATERIAL

2.1.1. MOSTOS SIN FERMENTAR Y EN DISTINTAS FASES DE FERMENTACION.

Los materiales con los que hemos trabajado han sido los siguientes:

-Mostos recién elaborados, sin fermentar, obtenidos de uvas de la variedad Zalema y recogidas las muestras a la salida de la prensa de cinco bodegas de Bollullos par del Condado (Huelva).

-Mostos en distintas fases consecutivas de fermentación, procedentes de las mismas bodegas: la primera muestra se tomó cuando la fermentación estaba en sus inicios, a cuarenta y ocho horas de la anterior; la segunda cuando la fermentación era tumultuosa, o sea a los seis días de la primera; la tercera a los nueve días de la segunda, cuando la fermentación del mosto prácticamente había terminado y por último, un muestreo en la fase residual, previo al embotellado o a la conservación de estos vinos.

2.2. METODOS

2.2.1. METODOS DE CULTIVO DE LEVADURAS.

2.2.1.1. MEDIOS DE AISLAMIENTO.

2.2.1.1.1. MOSTO-GELATINA.

El medio de aislamiento de las levaduras se realizó en medio Mosto-Gelatina, preparado con los compuestos y cantidades que se indican a continuación:

Mosto 500cc.

Agua-gelatina al 25% 500cc.

Para su elaboración se procedió de la siguiente forma: se distribuyen 10cc. de mosto estéril en tubos de ensayo y se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos.

El mosto estéril anterior se siembra con un número determinado de asas del material en estudio, proporcional a la cantidad de microflora existente en él. Tras esto se le añade los 10cc. de agua gelatina líquida (25-30°C) y el total del líquido resultante de 20cc. se vierte a una caja de petri estéril, dejándose solidificar e incubándose a 20°C.

2.2.1.1.2. VINO-GELATINA.

La composición de este medio es la siguiente:

Vino 500cc.

Agua-Gelatina al 25% 500cc.

Para la elaboración del medio vino-gelatina se tomaron, con pipetas estériles, 10cc. de los mencionados vinos estériles, procediendo a continuación de igual forma que en el medio anteriormente descrito: se añaden 10cc. de agua gelatina líquida y el total del líquido resultante de 20cc. se vierte a

una caja de petri estéril, dejándose solidificar e incubar a 20°C.

2.2.1.2. MEDIOS DE CRECIMIENTO Y CONSERVACION.

2.2.1.2.1. AGAR-NAGAI.

Como medio de crecimiento y de conservación de las levaduras utilizamos este medio.

EXTRACTO DE LEVADURAS.....	2 g.
PEPTONA BACTERIOLOGICA.....	1,8 g.
SULFATO DE AMONIO.....	1,5 g.
FOSTATO MONOPOTASICO.....	1 g.
GLUCOSA.....	10 g.
AGAR.....	18 g.

A todo ello se le añade 1000cc. de agua destilada. Se ajusta el pH a 5,5. A continuación se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 minutos y se deja enfriar hasta aproximadamente 50°C. y entonces se distribuye y vierten 20cc. por caja de petri estéril.

2.2.1.2.2. YEPD.

También lo hemos utilizado como medio de crecimiento y de conservación de los cultivos de levaduras. Su composición es la siguiente:

EXTRACTO DE LEVADURAS.....	10 g.
PEPTONA BACTERIOLOGICA.....	5 g.
GLUCOSA.....	10 g.
AGAR.....	20 g.

Todo ello para 1000 cc. de agua destilada, se ajusta

el pH a 7,0. Se esterilizó en autoclave y se enfría a unos 50°C., vertiéndose 20cc. por caja de petri estéril.

2.2.1.3. MEDIOS PARA ESTUDIAR LA MORFOLOGIA.

2.2.1.3.1. MORFOLOGIA CELULAR.

2.2.1.3.1.1. MEDIO YEPD LIQUIDO.

Se prepara YEPD, pero sin agar, se reparte 50 ml. de este medio en matraces de 250cc. de capacidad y se esteriliza en autoclave. Se inoculan, procurando tomar en cada caso una sola colonia por placa de petri. Estos matraces inoculados se colocan en un agitador durante dos días a 25°C y a 25 rev./min., para favorecer el crecimiento, mediante la oxigenación del medio. Este es el momento que hemos elegido para el estudio de la morfología celular. Para ello se toma una o más asa de este medio inoculado y se vierte en un porta, colocándole a continuación un cubreobjeto. Una vez realizada esta preparación se lleva al microscopio óptico con el fin de poder observar y estudiar una serie de aspectos del microorganismo presente, así como;

- Forma de la célula.
- Flocculación.
- Gemación.

2.2.1.3.2. MORFOLOGIA DE LA COLONIA.

2.2.1.3.2.1. MEDIO AGAR MORFOLOGICO.

AGAR MORFOLOGICO..... 35 g.
AGUA DESTILADA..... 1000 cc.
pH..... 6,5-7,0.

2.2.1.3.2.2. MEDIO WLN AGAR.

Es un medio muy complejo formado por los siguientes compuestos:

EXTRACTO DE LEVADURAS.....	4,0 g.
TRIPTONA.....	5,0 g.
GLUCOSA.....	50,0 g.
FOSFATO DIHIDROGENO DE POTASIO.....	0,55 g.
CLORURO DE POTASIO.....	0,425 g.
CLORURO DE CALCIO.....	0,125 g.
SULFATO DE MAGNESIO.....	0,125 g.
CLORURO FERRICO.....	0,0025 g.
SULFATO DE MANGANESO.....	0.0025 g.
BROMOCRESOL VERDE.....	0,022 g.
AGAR.....	15,0 g.
AGUA DESTILADA.....	1000 cc.

El pH debe estar entre 5,3 - 5,7. Este es un buen medio para distinguir especies de levaduras, debido a la morfología y color que adquieren las colonias que forman dichas levaduras.

2.2.1.4. MEDIO PARA LA ESPORULACION.

EXTRACTO DE LEVADURA.....	1 g.
GLUCOSA.....	0,5 g.
ACETATO POTASICO.....	10 g.
AGAR.....	20 g.
AGUA DESTILADA.....	1000 cc.

Este medio permite que las levaduras que forman esporas



las produzcan entre 7-15 días.

2.2.1.5. MEDIOS PARA LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS.

2.2.1.5.1. MEDIO DE ASIMILACION DE NO₃.

PEPTONA..... 10 g.

ClNa..... 5 g.

NO₃K..... 2 g.

Todo ello para 1000 cc. de agua destilada y a un pH de 7,0.

2.2.1.5.2. MEDIO DE FERMENTACION (DE LOS AZUCARES)

2.2.1.5.2.1. MEDIO HUGH-LEIFSON.

PEPTONA..... 20 g.

ClNa..... 0,3 g.

PO₄HK₂..... 0,3 g.

PURPURA DE

BROMOCRESOL..... 0,032 g.

AZUCAR..... 5 g.

Todo se añade a 1000 cc. de agua destilada y se mide el pH, cuidando sea aproximadamente 7,0.

Se esterilizó en autoclave, procurando enfriar con rapidez, tras consumir los 20 minutos a 120° C., pues se corre el riesgo de que se caramelize el azúcar.

Los azúcares que hemos utilizado son: glucosa, maltosa y sacarosa.

2.2.1.5.3. MEDIO ID 32 C.

ID 32 C es un sistema compuesto por tests de

asimilación estandarizados y miniaturizados.

La galería ID 32 C se compone de 32 cúpulas conteniendo cada una un substrato carbonado deshidratado. La levadura a testar se pone en suspensión en un medio sintético semisólido. Después de 24-48 horas de incubación a 30°C, el crecimiento en cada cúpula se lee, considerando positivas, todas aquellas cúpulas que aparecen con turbidez, comparadas con la del control (0). Con la suma de estas reacciones positivas, se obtiene un perfil numérico, que se compara con los valores establecidos en el Catálogo Analítico ID 32 C. Esto nos lleva a la identificación del microorganismo, destacando que: "La interpretación de los resultados de la galería debe hacerse teniendo en cuenta el origen de la muestra, el aspecto de las colonias, el examen microscópico directo entre cubre y porta, la morfología (búsqueda de micelio o pseudomicelio) y la investigación de la forma sexuada en medio de esporulación.

2.2.1.6. MEDIO YM (YEAST MALT).

La composición de este medio es:

EXTRACTO DE LEVADURA.....	3,0 g.
EXTRACTO DE MALTA.....	3,0 g.
PEPTONA.....	5,0 g.
GLUCOSA.....	10,0 g.
AGAR.....	20,0 g.
AGUA DESTILADA.....	1000 cc.

Este medio tiene que estar a un pH entre 6,0-6,4 y una vez esterilizado en autoclave a 120°C durante 20 minutos, se deja enfriar hasta unos 50°C para añadirle sulfato de cobre en

las proporciones siguientes:

1.56 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 100cc. de agua esteril.

Una vez mezclado homogéneamente, se reparte 20cc. por caja de petri y se deja enfriar para sembrar las diferentes cepas de levaduras.

La cantidad de solución de sulfato de cobre por placa es de 0,4 ml.

Con este medio vemos las cepas que son resistentes al Sulfato de Cobre.

2.2.1.7. MEDIO ALCIEN BLUE.

Este es un medio poco conocido en la identificación de levaduras vínicas. Algunos trabajos realizados con este método en el campo de la cerveza, apunta ser efectivo.

Este método nos permite distinguir entre algunos géneros de levaduras, basándose en la carga electrónica de la pared celular.

Con este método averiguamos los microgramos de Alcien Blue absorbido por miligramos de levaduras, que son puntos de una curva, comparativa de otra previamente construida y estandarizada de la solución de Alcien Blue. La interpretación de los datos de nuestra curva, respecto a la estándar, nos lleva a distinguir entre diferentes géneros de levaduras, ya que en unas dominan la hidrofobicidad y en otras la carga de la pared celular.

2.3. TOMA DE MUESTRA Y TECNICAS DE AISLAMIENTO.

Para tomar las muestras se utilizaron frascos de vidrio, de boca ancha con rosca de 75cc. de capacidad, y que ha sido esterilizado en el autoclave previamente.

Una vez en la bodega se tomaba la muestra de forma aséptica. Efectuada la toma, se llevaba al laboratorio, en una nevera y en el menor tiempo posible, donde se procedía a aislar en caja de Petri los microbios contenidos en estas muestras.

Se tomaron muestras de 5 bodegas diferentes de Bollullos Par del Condado: Andrade (CI), Cooperativa (CII), José M^a (CIII), Santi (CIV) y Sovicosa (CV).

Se tomaron un total de 30 muestras diferentes, entre ellas tenemos: mostos sin fermentar (MSF), mostos en 1^a fase de fermentación (1^aFF), mostos en 2^a fase de fermentación (2^aFF), mostos en 3^a fase de fermentación (3^aFF) y mostos en fase residual (FR). Estos mostos estaban destinados a la elaboración y embotellado de vinos blancos de mesa, cosecha 1992, recogidos en diversas tomas, desde mitad de Septiembre a mitad de Diciembre, de depósito de bodegas, de las cuales hemos hechos reseñas anteriormente.

Como medio de aislamiento se utilizaron: "mosto-gelatina" (m-g) y "vino-gelatina" (v-g). En estos medios se hicieron tres siembras en m-g y una en v-g, en cajas de Petri.

De las colonias obtenidas se volvieron a sembrar a nuevas placas en Agar Nagai, de manera que crezca de nuevo colonias aisladas. A partir de estas colonias se sembraron en tubos inclinados de colección (con Agar-Nagai) que una vez crecidos se guardaron en frigorífico a 4°C. La biomasa para estudios

posteriores se tomaron de estos tubos de colección, que son de tapón de rosca para evitar la desecación.

Estos tubos de colección se refrescaron con una periodicidad máxima de 6 meses.

2.4. MÉTODOS USADOS EN TAXONOMIA.

2.4.1. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.

2.4.1.1. CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS.

En el examen morfológico se tuvieron en cuenta las características de las colonias, una vez crecidas en un medio como es el Agar-Nagai o YEPD y en el medio WLN, donde se observa la forma, tamaño, color, elevación, superficie y bordes de las colonias. Así como la formación de velo en medios líquidos.

2.4.1.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS CELULAS VEGETATIVAS.

Se debe examinar la biomasa procedente de un cultivo joven, creciendo activamente en medio líquido o sólido (preferentemente en Agar morfológico). Las células se observa "in vivo", con microscopio de contraste de fases entre porta y cubre, teniéndose en cuenta la forma y tamaño de la célula.

2.4.1.3. FORMACION DE MICELIO Y PSEUDOMICELIO.

2.4.1.4. FORMACION DE ESPORAS.

Se siembra primero en el medio de crecimiento (PRE-SP) de manera que crezca abundante biomasa, y se incuba a 28º C, durante 6 u 8 días. Después, y a partir de estas placas, se inoculan en placas con medios de esporulación, de manera que la

biomasa quede bien extendida. Estas placas de esporulación se incuban a 25°C. durante 1 a 3 semanas. Las esporas se pueden observar al microscopio óptico con campo oscuro o con contraste de fases.

2.4.2. CARACTERISTICAS FISIOLÓGICAS.

2.4.2.1. UTILIZACIÓN FERMENTATIVA DE COMPUESTOS DE C.

La fermentación de los azúcares se realizó en soluciones que contenía un 0,2% del azúcar a estudiar, se distribuyó a razón de 5cc. en tubos tapados con algodón hidrófobo y que contenían campana Durham.

Se esterilizan al autoclave durante 20 min. y a 120°C.

Los medios de fermentación son inoculados a partir de un tubo inclinado con Agar-Nagai y biomasa fresca, incubándose a continuación a 28°C.

Los tubos se agitan regularmente, observándose el desprendimiento de gas y el cambio de color del indicador de pH del medio de un periodo de 24 horas (2-4 días).

2.4.2.2. UTILIZACIÓN OXIDATIVA DE COMPUESTOS DE C.

Siguiendo el mismo proceder que en el caso anterior, pero en esta ocasión no hay cambio de color del indicador de pH del medio y si hay un aumento numeroso de la biomasa, debido a la utilización de este azúcar para el crecimiento del organismo, y ello se comprueba echando unas gotas de licor de Fehling, que cambia el color hacia rojo ladrillo, si la fuente de C no se ha utilizado por vía oxidativa o midiendo la D.O., para ver si existea crecimiento.

2.4.2.3. UTILIZACION DE COMPUESTOS NITROGENADOS.

La utilización de compuestos nitrogenados se realizó en soluciones nutritivas que contenía un 0,2% de NO_3K , se distribuye a razón de 5cc. en tubos tapados con algodón hidrófobo y que llevan insertos campana de Durham para observar el desprendimiento de gases.

Se esterilizan al autoclave durante 20 minutos a 120°C .

Los medios de utilización de NO_3 son inoculados a partir de un tubo inclinado de Agar-Nagai y biomasa fresca, incubándose a continuación a 28°C durante 7-10 días.

Para ver si ha habido reducción de los nitratos se añade:

- Primeramente 5 gotas de ác. Sulfanílico, solución al 0,8% de dicho ácido en acético 5N, 99% de pureza.

- Y seguidamente 5 gotas de α -Naftilamina, solución al 0,5% de α -Naftilamina en acético 5N, 99% de pureza.

Si al añadir estos dos reactivos, en este orden, cambia el color del medio a rojo, indica que se ha reducido el nitrato a nitrito. La presencia de gases en la campana de Durham indica la formación de N_2 .

2.4.3. PRUEBAS BIOQUIMICAS ID 32 C.

3. RESULTADOS.

Haciendo uso de la metodología descrita se obtuvieron los siguientes resultados en los materiales que a continuación se indican:

* BODEGA CI DEL CONDADO.

El mosto utilizado es de uva Zalema, está sulfitado y filtrado al frío. El pie de cuba empleado en un caso es con levaduras comerciales (LC) y en el otro caso, con levaduras autóctonas (LA). En ambas ocasiones, la fermentación tuvo lugar en cono de cemento con una capacidad de 12.000 l. A continuación presentamos las distintas cepas de levaduras aisladas en estos dos estudios por separados y en sus distintas fases.

1. Mosto de CI-LC. Fases:

- Mosto sin fermentar (MSF).

Saccharomyces cerevisiae cepa V

- Mosto en 1ª fase de fermentación (1ªFF).

Saccharomyces cerevisiae cepa I y V

- Mosto en 2ª fase de fermentación (2ªFF).

Saccharomyces cerevisiae cepa I y V

- Mosto en 3ª fase de fermentación (3ªFF).

Saccharomyces cerevisiae cepa V

- Mosto fermentado en fase residual (FR).

Saccharomyces cerevisiae cepa V y Saccharomyces exiguus cepa II

2. Mosto de CI-LA. Fases:

- Mosto en 2ªFF.

Saccharomyces cerevisiae cepa I y Saccharomyces exiguus cepa II

- Mosto en 3ªFF.

Saccharomyces cerevisiae cepa V, Saccharomyces exiguus cepa II y Zygosaccharomyces sp. cepa III

- Mosto fermentado en FR.

Zygosaccharomyces sp. cepa V

* BODEGA CII DEL CONDADO.

El mosto empleado es de uva Zalema, sulfitado. El pie de cuba utilizado es de levaduras autóctonas (LA). La fermentación tiene lugar en cono de cemento. Fases:

- Mosto sin fermentar (MSF).

Saccharomyces cerevisiae cepa V

- Mosto en 1ªFF.

Pichia membranaefaciens cepa I, Saccharomyces cerevisiae cepa V y Saccharomyces exiguus cepa I

- Mosto en 2ªFF.

Saccharomyces cerevisiae cepa I y V

- Mosto en 3ªFF.

Candida sake

- Mosto fermentado en FR.

Candida valida cepa I y Saccharomyces exiguus cepa II

De la campaña de recolección prematura de uva, también de la variedad Zalema, el mosto sulfitado y el pie de cuba de levaduras autóctonas. La fermentación se lleva a cabo en cono de acero inoxidable. Aparece con este símbolo CII* para distinguirla de la campaña anterior. Fases:

- Mosto en 3ªFF.

Saccharomyces cerevisiae cepa V

- Mosto fermentado en FR.

Candida valida cepa I y Saccharomyces exiguus
cepa II

* BODEGA CIII DEL CONDADO.

Mosto de uva Zalema y sulfitado. El pie de cuba utilizado es con levaduras autóctonas.

En este apartado hacemos una distinción entre el tipo de estrujado del mosto, y en su destino posterior. Tenemos; mosto de yema o de escurrido destinado a la fermentación en cono y mosto de prensa utilizado para la fermentación en bota de madera.

1. Mosto CIII en bota. Fases:

- Mosto sin fermentar (MSF).

Kloeckera apis

- Mosto en 1ªFF.

Saccharomyces cereviseae cepa I y V y
Saccharomyces exiguus cepa II

- Mosto en 2ªFF.

Saccharomyces cereviseae cepa V

- Mosto en 3ªFF.

Candida pelliculosa y Zygosaccharomyces sp.
cepa III

- Mosto fermentado en FR.

Candida colliculosa, Pichia membranaefaciens cepa
I y Saccharomyces exiguus cepa II

2. Mosto CIII en cono. Fases:

- Mosto en 2ªFF.

Saccharomyces exiguus cepa III

- Mosto en 3ªFF.

Saccharomyces cerevisiae cepa V

* BODEGA CIV DEL CONDADO.

El mosto procede de uva Zalema y está sulfitado. El pie de cuba empleado es de levaduras autóctonas y la fermentación se da en cono de cemento. Fases:

- Mosto sin fermentar (MSF).

Kloeckera apiculata y Candida pulcherrima cepa I

- Mosto en 1ªFF.

Candida colliculosa

- Mosto en 2ªFF.

Saccharomyces cerevisiae cepa V y Saccharomyces exiguus cepa II

- Mosto en 3ªFF.

Saccharomyces cerevisiae cepa V

- Mosto fermentado en FR.

No creció ninguna levadura.

* BODEGA CV DEL CONDADO.

El mosto utilizado procede de la recolección prematura de uva variedad Zalema. Dicho mosto sin filtrar, pero sí desfangado y sulfitado pasó a cono de acero inoxidable, de donde pudimos tomar estas dos fases:

- Mosto en 3ªFF.

Saccharomyces cerevisiae cepa V

- Mosto fermentado en FR.

Candida holmii

El número total de cepas diferentes aisladas es de 16. La fase y bodega de donde se aislaron, se presenta en la tabla I.

Tabla I. ESPECIES AISLADAS EN LA VENDIMIA DE 1992 EN B.C.

LEVADURAS	FASE	PROCEDENCIA
<u>Candida colliculosa</u>	1aFF CIV
	FRCIIIb
<u>Candida holmii</u>	FR CV
<u>Candida pelliculosa</u>	3aFF CIIIb
<u>Candida pulcherrima</u>	MSF CIV
<u>Candida sake</u>	3aFF CII
<u>Candida valida</u>	FR CII y CII*
<u>Kloeckera apiculata</u>	MSF CIV
<u>Kloeckera apis</u>	MSF CIIIb
<u>Pichia membranaefac.</u>	1aFF CII
	FR CIIIb
<u>Saccharomyces cerev. I</u>	1aFF CI-LC, CIIIb
	2aFF CI-LC y LA,CII
	FR CI-LC
<u>Saccharomyces cerev. V</u>	MSF CI-LC, CII
	1aFF CI-LC, CII, CIIIb
	2aFF CI-LC, CII, CIIIb,CIV
	3aFFCI-LCyLA,CII*,CIIIc,CIV,CV
<u>Saccharomyces exiguus I</u>	1aFF CII
<u>Sacch. exiguus II</u>	1aFF CIIIb
	2aFF CI-LA, CIV
	3aFF CI-LA
	FR CI-LC, CII y CII*, CIIIb
<u>Sacch. exiguus III</u>	2aFF CIIIc
<u>Zygosacch. sp. III</u>	3aFF CI-LA, CIIIb
<u>Zygosacch. sp. V</u>	FR CI-LA

Tabla II. CARACTERISTICAS CELULARES EN MEDIO YEPD LIQUIDO.

LEVADURA	FORMA	FLOCULACION	GEMACION
<u>Cand. collic.</u>	esférica	+	+
<u>Cand. holmii.</u>	esférica	+	+
<u>Cand. pellic.</u>	esférica	+	+
<u>Cand. pulcher.</u>	esf./elíptica	+	+
<u>Cand. sake</u>	esférica	+	+
<u>Cand. valida</u>	elipsoidal	+	+
<u>Kloeck. apicul.</u>	apiculada	+/-	+
<u>Kloeck. apis</u>	apiculada	+	+
<u>Pichia membr.</u>	elipsoidal	+/-	+
<u>Sacch. cerev. I</u>	esférica	+	+
<u>Sacch. cerev. V</u>	esférica	+	+
<u>Sacch. exiguus I</u>	elipsoidal	+	+
<u>Sacch. exigu. II</u>	esférica	+	+
<u>Sacch. exigu. III</u>	esférica	+	+
<u>Zygosac. sp. III</u>	esférica	+	+
<u>Zygosacch. sp. V</u>	elipsoidal	+	+

Tabla III. CAPACIDAD DE UTILIZAR COMPUESTOS NITROGENADOS (NO₂ Y NO₃), EL SULFATO DE COBRE Y DE ESPORULAR.

LEVADURA	NO ₂	NO ₃	SULF. Cu.	ESPORUL.
<u>Cand. coll.</u>	-	-	+	-
<u>Cand. holmii</u>	-	-	+	-
<u>Cand. pellic.</u>	-	-	+	-
<u>Cand. pulch.</u>	-	+/-	+	-
<u>Cand. sake</u>	-	-	+	-
<u>Cand. valida</u>	-	+/-	+	-
<u>Kloeck. apic.</u>	-	-	+	-
<u>Kloeck. apis</u>	-	+/-	+	-
<u>Pichia membr.</u>	-	-	+	+
<u>Sacch. cerev. I</u>	-	-	+	+
<u>Sacch. cerev. V</u>	-	-	+	+
<u>Sacch. exig. I</u>	-	-	+	+
<u>Sacch. exig. II</u>	-	-	+	+
<u>Sacch. exig. III</u>	-	-	+	+
<u>Zygosacc. sp. III</u>	-	-	+	+
<u>Zygosacc. sp. V</u>	-	-	+	+

Tabla IV. UTILIZACION FERMENTATIVA DE COMPUESTOS DE C, POR EL METODO DE HUGH-LEIFSON:

Levadura	Glucosa	Maltosa	Sacarosa
<u>Cand. coll.</u>	+/-	-	+/-
<u>Cand. holmii</u>	+/-	-	+/-
<u>Cand. pellic.</u>	+/-	+	+
<u>Cand. pulch.</u>	+	-	-
<u>Cand. sake</u>	+/-	-	+
<u>Cand. valida</u>	+	-	-
<u>Kloeck. apic.</u>	+	-	-
<u>Kloeck. apis</u>	+	-	-
<u>Pichia memb.</u>	+	-	-
<u>Sacch. cerev. I</u>	+	+	+/-
<u>Sacch. cerev. V</u>	+	+	+/-
<u>Sacch. exig. I</u>	+/-	-	+/-
<u>Sacch. exig. II</u>	+/-	-	+/-
<u>Sacch. exig. III</u>	+	-	+/-
<u>Zygosac. sp. III</u>	+	-	-
<u>Zygosac. sp. V</u>	+	-	-

Tabla V. PRUEBAS BIOQUIMICAS ID 32 C.

	C.col	C.hol	C.pel	C.pul	C.sak	C.val	K.api	K.aps
GALAC	-	-	-	+	+	-	-	-
ACTID	-	-	-	-	-	-	+	+
SACAR	+	+	+	+	+	-	-	-
NAG	-	-	-	+	+	-	-	-
LACTA	+	-	+	-	-	-	-	-
ARABI	-	-	-	-	-	-	-	-
CELOB	-	-	-	+	-	-	+	+
RAFIN	+	+	+	-	-	-	-	-
MALTO	-	-	+	+	-	-	-	-
TREHA	-	-	+	+	-	-	-	-
2KG	+	-	-	+	+	-	+	+
MDGLU	-	-	+	+	-	-	-	-
MANIT	+	-	+	+	+	-	-	-
LACTO	-	-	-	-	-	-	-	-
INOSI	-	-	-	-	-	-	-	-
SORBI	+	-	+	+	+	-	-	-
XILOS	-	-	-	+	-	-	-	-
RIBOS	-	-	-	+	-	-	-	-
GLICE	+	-	+	+	+	-	-	-
RAMNO	-	-	-	-	-	-	-	-
PALAT	-	-	+	+	+	-	-	-
ERITR	-	-	+	-	-	-	-	-
MELEZ	-	-	+	+	-	-	-	-
GNT	-	-	-	+	-	-	+	+
GLUCO	+	+	+	+	+	+	+	+
GLN	-	-	-	+	+	+	-	-
ESCUL	+/-	-	+	+	-	-	+	+

Tabla VI. PRUEBAS BIOQUIMICAS ID 32 C.

	<u>P.mem</u>	<u>S.cer</u>	<u>S.cer</u>	<u>S.exi</u>	<u>S.exi</u>	<u>S.exi</u>	<u>Z.sp.</u>	<u>Z.sp.</u>
GALAC.	-	-	+	-	+	+	-	-
ACTID.	-	-	-	-	-	-	-	-
SACAR.	-	+	+	+	+	+	-	-
N-A.G.	-	-	-	-	-	-	-	-
LACTAT	-	-	-	-	-	-	-	-
ARABI.	-	-	-	-	-	-	-	-
CELOB.	-	-	-	-	-	-	-	-
RAFIN.	-	+	+	+	+	-	-	-
MALTO.	-	+	+	-	-	-	-	-
TREHA.	-	-	-	-	-	-	-	-
2K-GLU	-	-	-	-	-	-	-	-
MD-GLU	-	-	-	-	-	-	-	-
MANIT.	-	-	-	-	-	-	-	+
LACTOS	-	-	-	-	-	-	-	-
INOSI.	-	-	-	-	-	-	-	-
SORBI.	-	-	-	-	-	-	-	+
XILOS.	-	-	-	-	-	-	-	-
RIBOSA	-	-	-	-	-	-	-	-
GLICER	-	-	-	-	-	-	-	+
RAMNO.	-	-	-	-	-	-	-	-
PALAT.	-	-	-	-	-	-	-	-
ERITRI	-	-	-	-	-	-	-	-
MELEZI	-	-	-	-	-	-	-	-
GLUCON	-	-	-	-	-	-	-	-
GLUCOS	+	+	+	+	+	+	+	+
GLN.	+	-	-	-	-	-	-	-
ESCUL.	-	-	-	-	-	+/-	-	-

Las abreviaturas utilizadas significan lo siguiente:

GALAC	GALACTOSA.
SACAR	SACAROSA.
NAG	N-ACETIL GLUCOSAMINA.
LACTA	LACTATO.
ARABI	ARABINOSA.
CELOB	CELOBIOSA.
RAFIN	RAFINOSA.
MALTO	MALTOSA.
TREHA	TREHALOSA.
2KG	2-CETO GLUCONATO.
MDGLU	_ -METIL-D-GLUCOSIDO.
MANIT	MANITOL.
LACTO	LACTOSA.
INOSI	INOSITOL.
SORBI	SORBITOL.
XILOS	D-XILOSA.
RIBOS	RIBOSA.
GLICE	GLICEROL.
RAMNO	RAMNOSA.
PALAT	PALATINOSA.
ERITR	ERITROSA.
MELEZ	MELEZITOSA.
GNT	GLUCONATO.
GLUCO	GLUCOSA.
GLN	GLUCOSAMINA.
ESCUL	ESCULINA.

5. DISCUSION

Nuestro objetivo es aislar e identificar las levaduras presentes en el mosto de la uva Zalema y a lo largo de las fases de fermentación, así como en la fase residual, previo al embotellado, de diversas bodegas de Bollullos Par del Condado (Huelva).

Estos estudios preliminares de aislamiento e identificación se pueden continuar con estudios posteriores con fines prácticos, a base de establecer las condiciones fisiológicas y su incidencia en el desarrollo óptimo, de las cepas seleccionadas de cada especie aislada.

Como hemos expuesto en la introducción, la vinificación y la conservación del vino están sometidos a problemas microbiológicos. La transformación correcta de la uva en vino sólo se logra a través de un conocimiento y una buena utilización de las levaduras y de las bacterias lácticas. El éxito de la vinificación está siempre subordinado a un comportamiento razonado de los fenómenos microbiológicos.

En el total de estos materiales estudiados se aislaron e identificaron levaduras clasificadas en 5 géneros:

Candida, Kloeckera, Pichia, Saccharomyces y Zygosaccharomyces.

De estos géneros, Candida sp. se aisló del mosto sin fermentar y de la 1ªFF de la bodega CIV, en la 3ªFF de las bodegas CII y CIII, y en la fase residual de las bodegas CII, CIII y CV. No aparece en el mosto ni en ninguna de las fases de la fermentación de la bodega CI, así como en la FR de dicha bodega. Kloeckera sp. está presente en los mostos sin fermentar

de las bodegas CIII y CIV. No se aisló de las bodegas CI, CII y CV. Pichia sp. se aísla de la 1ªFF y FR de los mostos de las bodegas CII y CIII. No se encontró en los estudios realizados en las bodegas CI, CIV y CV. Saccharomyces sp. está presente en todos los mostos analizados y en diversas fases de la fermentación de éstos, por tanto, se aisló de los materiales investigados de las 5 bodegas que han colaborado en estos estudios. Zygosaccharomyces sp. sólo se identificó en la 3ªFF y en la FR de las bodegas CI y CIII. Por tanto, no se identificó en los mostos de las bodegas CII, CIV y CV.

Como se ha indicado, Candida sp. suele aparecer en mostos sin fermentar o en 1ªFF y al final de la 3ªFF o en la FR, debido a que dentro de este género podemos encontrar especies que son fermentativas, aunque con bajo poder fermentativo, y otras especies que son oxidativas-filmógenas, suelen aparecer al final de la fermentación produciendo un velo o película fina.

La morfología de sus células es variada, presentando a veces pseudomicelio de diversos tipos. Algunas especies son algo fermentativa, otras sólo oxidativas. Fermentan algo el mosto, y otras especies de este género forman velo sobre el vino de bajo grado.

Una de las especies más llamativa de este género es Candida pulcherrima debido al pigmento rojizo que excreta alrededor de la colonia blanca, bien desarrollada, que presenta en cualquiera de los medios que hemos utilizado.

Candida pulcherrima tiene una baja producción en acidez, y la biotina juega un papel importante para su metabolismo, pues su carencia determina un escasisimo poder fermentativo y una

velocidad de fermentación muy lenta, incluso hay autores, quienes afirman que la única vitamina requerida por Candida pulcherrima es la biotina.

Entre los caracteres fisiológicos de esta especie tenemos que: No asimila los nitratos, se desarrolla bien en presencia de alcohol etílico. Escinde la arbutina. Fermenta solamente la glucosa. El poder fermentativo es muy bajo, en torno al 1%.

No aparecen en la bodega CI, si en alguna fase de las otras bodegas.

Kloeckera sp. está presente en el mosto sin fermentar en vías de la 1ªFF, de las bodegas CIII y CIV. La diferencia que existe entre las dos especies de Kloeckera que tenemos en los resultados es: que Kloeckera apis puede crecer a 37°C y Kloeckera apiculata no. El resto de las características que mencionaremos a continuación son comunes para ambas especies.

Kloeckera apiculata ha sido objeto de profundas investigaciones ecológicas y bioquímicas. Estas investigaciones han demostrado la presencia de esta especie en la 1ªFF vinica del mosto de uva. El metabolismo glucídico en Kloeckera apiculata viene dado por una fermentación que toma otra ruta metabólica de los azúcares, con acúmulo de glicerina y de productos volátiles como es el ácido acético, ésteres y otros productos, a los cuales se atribuía el efecto perjudicial de esta levadura al fermentar un mosto de uva. Todo ello conduce a una modesta producción de etanol.

Las especies de Kloeckera no son capaces, como hacen otras levaduras de alto poder fermentativo, de reducir la molécula de acetoina a 2-3 butanodiol en el curso de la transformación. Ello

se traduce también en el valor que adquiere el potencial de oxidación-reducción: elevado para mosto fermentado con levadura apiculada y netamente más bajo para mosto fermentado con levadura elíptica.

Otro aspecto destacable en el metabolismo de las levaduras apiculadas es el de asimilar ácidos orgánicos (tartárico, málico, succínico, cítrico, láctico) como fuente de carbono. El consumo de estos ácidos es hasta diez veces mayor que en las levaduras elípticas.

Las especies de levaduras apiculadas del género Kloeckera necesitan para su normal desarrollo de todos los factores vitamínicos hidrosolubles presentes en el extracto de levaduras.

Características destacables en un orden práctico del género Kloeckera son la consistencia harinosa del depósito celular, la no adherencia a las paredes del recipiente, la escasa tolerancia a los taninos, la incapacidad para desarrollarse a elevadas concentraciones de azúcar y en medio alcohólico, así como su extremada sensibilidad a los antisépticos; se ha demostrado la marcada sensibilidad de Kloeckera apiculata al anhídrido sulfuroso, lo que puede justificar su ausencia en los mostos sin fermentar de las bodegas CI y CII, evaluándose como diez veces mayor que la Saccharomyces cerevisiae. En cambio, la actidiona y la micosubtilina, antibióticos de elevada especificidad fungistática, ejercen una acción inversa a la observada con el sulfuroso, es decir, menos eficaz sobre las distintas especies del género Kloeckera y otras especies oxidativas que sobre las levaduras del género Saccharomyces, más fermentativas.

Las características fisiológicas de la especie Kloeckera

apiculata son: No asimila los nitratos ni escinde la arbutina. No se desarrolla en presencia de alcohol etílico como única fuente de alimento hidrocarbonado. Fermenta únicamente la glucosa. Poder fermentativo bajo, en torno al 4%. Fermenta el mosto de uva con fuerte producción en ácidos volátiles.

Pichia sp. la hemos aislado tanto de la 1ªFF como de la FR y tan sólo de dos bodegas CII y CIII. No se ha aislado de los materiales estudiados en las bodegas CI, CIV ni de CV.

La morfología de las células de esta especie es elípticas, ligeramente alargada, con formación de pseudomicelio. Ascas con 2 ó 4 ascosporas. No fermentan azúcares o muy ligeramente la glucosa. Levaduras oxidativas. Forman velo sobre vino de bajo grado y sobre mosto de uva.

En este caso la única especie aislada de este género es Pichia membranaefaciens cuyas características más destacada son: No fermentan los azúcares, ocasionalmente y de forma débil la glucosa, que es el único que asimila. No reduce los nitratos ni escinde arbutina; se desarrolla bien en presencia de etanol y su poder fermentativo es malo.

Pichia membranaefaciens es una de las levaduras que normalmente se desarrolla sobre el vino produciendo una alteración o enfermedad y que normalmente suelen ser de metabolismo aeróbico.

Pichia membranaefaciens se desarrolla en mosto de uva, pero sin fermentarlo. A veces puede iniciar una levisima fermentación; su desarrollo se debe a que asimila la glucosa del mostos por vía oxidativa y no fermentativa. Vive también a expensas del alcohol, sobre vinos de bajo grado alcohólico,

transformándolo en anhídrido carbónico y agua. También vive a expensas de los ácidos orgánicos del vino y, por tanto, hace bajar la acidez fija del mismo.

Saccharomyces sp., detectadas en todas las fases de todos materiales estudiados de las cinco bodegas con la que hemos trabajado. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por el Dr. Casas en su tesis doctoral, que aisló:

Bodega CII (1977):

- Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces chevalieri y Saccharomyces rosei.

Bodega CI (1978):

- Saccharomyces cerevisiae y Saccharomyces chevalieri.

Bodega CII (1978):

- Saccharomyces cerevisiae y Saccharomyces chevalieri.

Saccharomyces sp. está presente en todas las muestras analizadas de los mostos de la bodega CI, es decir, tanto de los mostos con inoculación de levaduras comerciales, como aquellos en los que sólo actuaban las levaduras autóctonas.

Aparecen dos cepas diferentes de Saccharomyces cerevisiae, la cepa I y la cepa V, además de tener en común Saccharomyces exiguus cepa II, que la encontramos solamente en la FR en el primer caso, o sea, en los mostos de CI-LC. Sin embargo, en el otro mosto analizado de la misma bodega, es decir, en mostos de CI-LA, encontramos estas mismas cepas, además de otras y en diversas fases de la fermentación.

Otro dato a destacar es que Saccharomyces cerevisiae cepa I se aisló en ambos casos de la 2ªFF y Saccharomyces cerevisiae

cepa V también se aisló en los dos mostos de la 3ªFF.

Podríamos concluir lo siguiente: Aún dándose mayor variedad de especies en los mostos CI-LA, y por tanto, contribuyendo mayor número de cepas en la formación del vino y en sus caracteres organolépticos, no dejan de estar presentes en ambos mostos, aquellas levaduras que se consideran esenciales en la fermentación, como es la Saccharomyces cerevisiae.

Saccharomyces sp. de morfología celular elíptica y esférica. Posee ascas abundantes con 4 esporas esféricas de paredes lisas. Son levaduras muy fermentativas cuali y cuantitativamente. Alto poder fermentativo en mosto de uva.

Interviene en la crianza biológica del vino (transformación bioquímica que sufre el vino, finalizada la fermentación alcohólica, previo alcoholizado a 15º - 15,5º por la acción de unas determinadas levaduras aerobias del género Saccharomyces, denominadas levaduras de flor).

Este proceso se verifica en botas de excelente madera de roble y en unas condiciones técnicas específicamente originales, y tiene lugar industrialmente en el Condado de Huelva, Jerez, ... La etapa de crianza biológica resulta estar constituida por 8 especies diferentes: 4 especies del género Saccharomyces y las especies Zygosaccharomyces acidificiens, Hansenula anomala, Candida mycoderma y Pichia membranaefaciens. De todas ellas sólo prevalecen las 4 especies de Saccharomyces al aumentar el grado alcohólico de 11º a 15º.

Saccharomyces cerevisiae tiene los siguientes caracteres fisiológicos: Negativa la asimilación de nitratos y buen desarrollo en presencia de alcohol etílico como única fuente de

alimento hidrocarbonado. Fermenta glucosa, galactosa, maltosa, sacarosa y rafinosa 1/3. Asimila los mismos azúcares y no fermenta ni asimila la lactosa. No escinde la arbutina. Los poderes fermentativos suelen estar comprendidos entre 12,25 y 19% de alcohol en volumen.

Zygosaccharomyces sp. se ha aislado de la 3ªFF y de la FR de tan sólo dos bodegas; CI y CIII. No está presente en ninguna de las fases en las bodegas restantes; CII, CIV y CV.

Zygosaccharomyces sp. presenta una serie de características a nivel de género, que son: Células con morfología elíptica aunque con frecuencia posee polimorfismo celular. Dos o cuatro ascosporas por asca. Medianamente fermentativas. Homoalcohólicas.

Este género suele constituir velos blastomicéticos, acompañado de otros géneros, en vinos de grado alcohólico inferior a 13º.

En este caso sólo hemos llegado en la identificación al género.



6. CONCLUSION

Como consideraciones o conclusiones finales del trabajo expuesto y comentado, se pueden destacar las siguientes:

1.- Hemos identificado en el mosto analizado, durante las distintas fases de vinificación, levaduras de 5 géneros; Candida, Kloeckera, Pichia, Saccharomyces y Zygosaccharomyces. Sin embargo no se han encontrado cepas del género Rhodotorula, a pesar de ser muy frecuente su presencia en los mostos sin fermentar e incluso en las primeras fases de fermentación.

2.- No obstante, las fermentaciones de los mostos de uva Zalema estudiadas en todas sus fases, como en algunos mostos sin fermentar y en las fases residuales de varias fermentaciones, se observa la presencia continua del género Saccharomyces, que comprende muchas especies o cepas capaces de producir en mayor o menor grado la fermentación alcohólica. Además de tener especies con un papel importante en la crianza biológica de estos vinos.

3.- Se ha observado que Pichia sp., Candida sp. y Zygosacchaoryces sp., forman velos blastomicéticos en vinos de grado alcohólico alrededor de 10º, pues poseen carácter de filmógenas.

4.- Las características organolépticas de los mostos estaban de acuerdo con la microflora encontrada, por lo que deberá tenerse un cuidadoso control de toda la operación en sus distintas fases. Los datos recogidos deben referirse tanto a la

obtención del mosto como a los procesos de fermentación.

5.- El ácido acético y sus ésteres son elementos negativos en la apreciación organoléptica de cualquier vino; exceptuando la producción de acético por vía bacteriana, a las levaduras fermentativas encontradas de primera fase (Kloeckera sp. y Candida sp.) y a las de metabolismo aerobio respiratorio estricto (Pichia sp.) se les atribuye el principal protagonismo en la formación de estos compuestos.

6. BIBLIOGRAFIA

AMADOR DE LOS RIOS, F.(1891): "España, sus monumentos y artes. Su naturaleza e historia. Huelva. Barcelona.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. (1990): "Yeasts: Characteristics and identification". 2nd. Ed. Cambridge University. Cambridge.

BARNETT, J.A. (1992): "The Taxonomy of the Genus Saccharomyces Meyen ex Reess: a Short Review for Non-taxonomists". Yeast 8:1-23.

BONED, F.; COLOMO, B.; SUAREZ, J.A. (1992/93): "Selección de levaduras vnicas de la D.O. Bierzo". I. Caracterización de cepas autóctonas. Vitivinicultura, 37-40.

BOOTH, C. (1971): "Methods in Microbiology". Vol.4. Academic Press. London and New York.

BRADBURY, R. (1972): "Vino de estío". Ed. Minotauro. Buenos Aires.

BRILLET, A. (1940): "Vinos, Industria y Comercio". 2ª Ed.. Ed. F. Susanna. Barcelona.

CASAS, J.A. (1982): "Contribución al estudio del factor matador de levaduras vnicas". Tesis Doctoral. Sevilla.

CEVICON, (1981): "Guía de elaboración de vinos". Comisión para el estudio de la Vitivinicultura del Condado de Huelva (CEVICON). Consejería de Agricultura y pesca. Junta de Andalucía. Huelva.

CONSEJERIA DE AGRICULTURA Y PESCA, (1982): "La Vitivinicultura del Condado de Huelva". I Jornadas Técnicas de la Vid y del Vino Condado de Huelva. Junta de Andalucía. Huelva.

ENCICLOPEDIA DEL VINO, (1987): "Enología, viticultura y cata". Ed. Orbis, S.A. Barcelona.

FOURNEAU, F. (1975): "El Condado de Huelva: BOLLULLOS Capital del viñedo". Instituto de estudios onubenses. Excma. Diputación Provincial de Huelva.

FOURNEAU, F. (1975): "La Palma del Condado". Un ejemplo de estructuras agrarias y de organización urbana en la campaña de Huelva. Instituto de estudios onubenses. Excma. Diputación Provincial de Huelva.

GARCIA DE LUJAN, A.; PUERTAS, B.; LARA, M. (1990): "Variedades de Vid de Andalucía". Consejería de Agric. y Pesca. Direc. Gen. de Invest. y ext. Agrarias. Junta de Andalucía.

HUBRECHT DUIJKER, (1992): "Gran libro de los vinos de España". Ed. Círculo de Lectores. Barcelona.

HUGH, J. (1984): "El vino". Ed. Folio. Barcelona.

IBAR, L. (1982): "El libro del vino. Cómo hacerlo, embotellarlo y envejecerlo". Ed. De Vecchi. Barcelona.

IBAR, L. (1985): "Como se hace un buen vino". Manual completo de enología moderna. Ed. De Vecchi. Barcelona.

IBAR, L. (1985): "Vinos-Elaboración-Obras de divulgación". Ed. De Vecchi. Barcelona.

ID 32 C (1990): "Catálogo Analítico". Bio Mérieux S.A.

IÑIGO, B.; VAZQUEZ, D. (1964): "Los agentes de fermentación vinica en las zonas de El Condado y El Aljarafe". Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. 4:246. Departamento de Fermentaciones Industriales. Madrid.

JUNTA CONSULTIVA AGRONOMICA, (1911): "La invasión filoxérica en España y estado en 1909 de la reconstrucción del

viñedo. Madrid.

LARREA REDONDO, A. (1983): "Enología básica". Ed. Aedos. Barcelona.

LODDER, J. (1970): "The Yeasts". North-Holland. Publishing Company, Amsterdam.

LORENZO, T. M^a; ARROYO, J. Y PANEQUE, G. (1992): "Notas sobre levaduras presentes en vinos blancos afrutados de Andalucía Occidental: Metodología, Criterios de Identificación y Ecología Microbiana". XIV Jornadas de Viticultura y Enología. Almendralejo (Badajoz).

LLAGUNO, C. (1982): "Enología. Temas actuales". Ed. Anque. Madrid.

MADRID, A. (1991): "Tecnología del vino y bebidas derivadas". AMV Ediciones. Mundi-Prensa. Madrid.

MARECA, I. (1969): "Enología. Enfoques científicos y técnicos sobre la vid y el vino". Ed. Alhambra S.A. Madrid.

MARECA, I. (1983): "Origen, composición y evolución del vino". Ed. Alhambra S.A. Madrid.

MINISTERIO DE AGRICULTURA (1981): "El viñedo español". 2^a Edición. Madrid.

NEIDLEMAN, S. L. (1991): "Advances in Microbiology". Vol.36 Academic Press. Vacaville, California.

PEYNAUD, E. (1989): "Enología Practica". Conocimiento y elaboración del vino. 3^a Ed.. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.

RAPPORT, A.I.; BEKER, M.E. (1985): "Changes in the surface of yeast cells during their dehydration and rehydration. Mikrobiologiya, 54:450-453.

RIBEREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E.; RIBEREAU-GAYON, P.;

SUDRAUD, P. (1989): "Tratado de enología. Ciencias y Técnicas del vino". Tomo 2. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires.

RINE, J. (1989): "The Yeast Saccharomyces cerevisiae in Molecular and Cellula Biology: A Smaller but not Lower Eucaryote". Department of Biochemistry, University of California. Amer. Zool. 29:605-616.

ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (1987): "The Yeasts". Vol.I: Biology of Yeasts. 2nd Ed. Academic Press. London.

ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (1991): "The Yeasts". Vol.IV: Yeast Organelles. Academic Press. London.

SANINO, A. F. (1963): "Vino - Elaboración". Tratado de enología. Ed. Gustavo Gili. Buenos Aires.

SERVICIO CARTOGRAFICO DE LA CONSEJERIA DE OBRAS PUBLICAS Y TRANSPORTE: "Mapa topográfico de Andalucía (Hoja 1001:IV) E:1:20.000". Junta de Andalucía.

SUAREZ, J.; IÑIGO, B. (1990). "Microbiología Enológica". Ed. Mundi-Prensa. Madrid.

VEGA, L. A. (1970): "Vino - España". Guía vinícola de España. 3ª Ed. Editorial Nacional. Madrid.

VILA - SAN JUAN, J. F. (1971): "Vinos España". Ed. Plaza & Janés. Barcelona.

VOGT, E. (1971): "Fabricación de vinos". Versión española. Ed. Acribia. Zaragoza.

FIG. 1

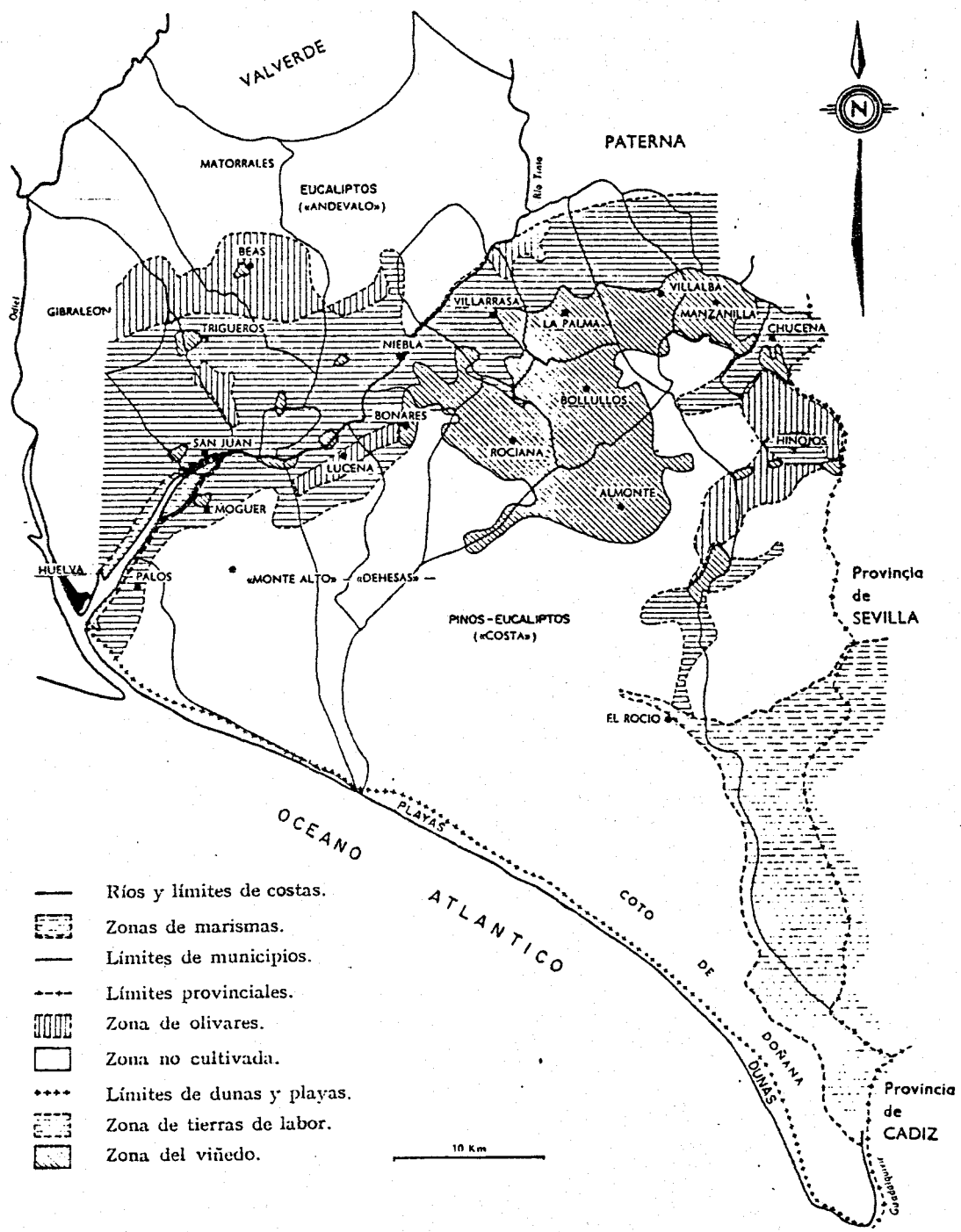


Figura 1.—Los paisajes agrícolas del Condado.

BIBLIOTECA PÚBLICA

Fig. 2

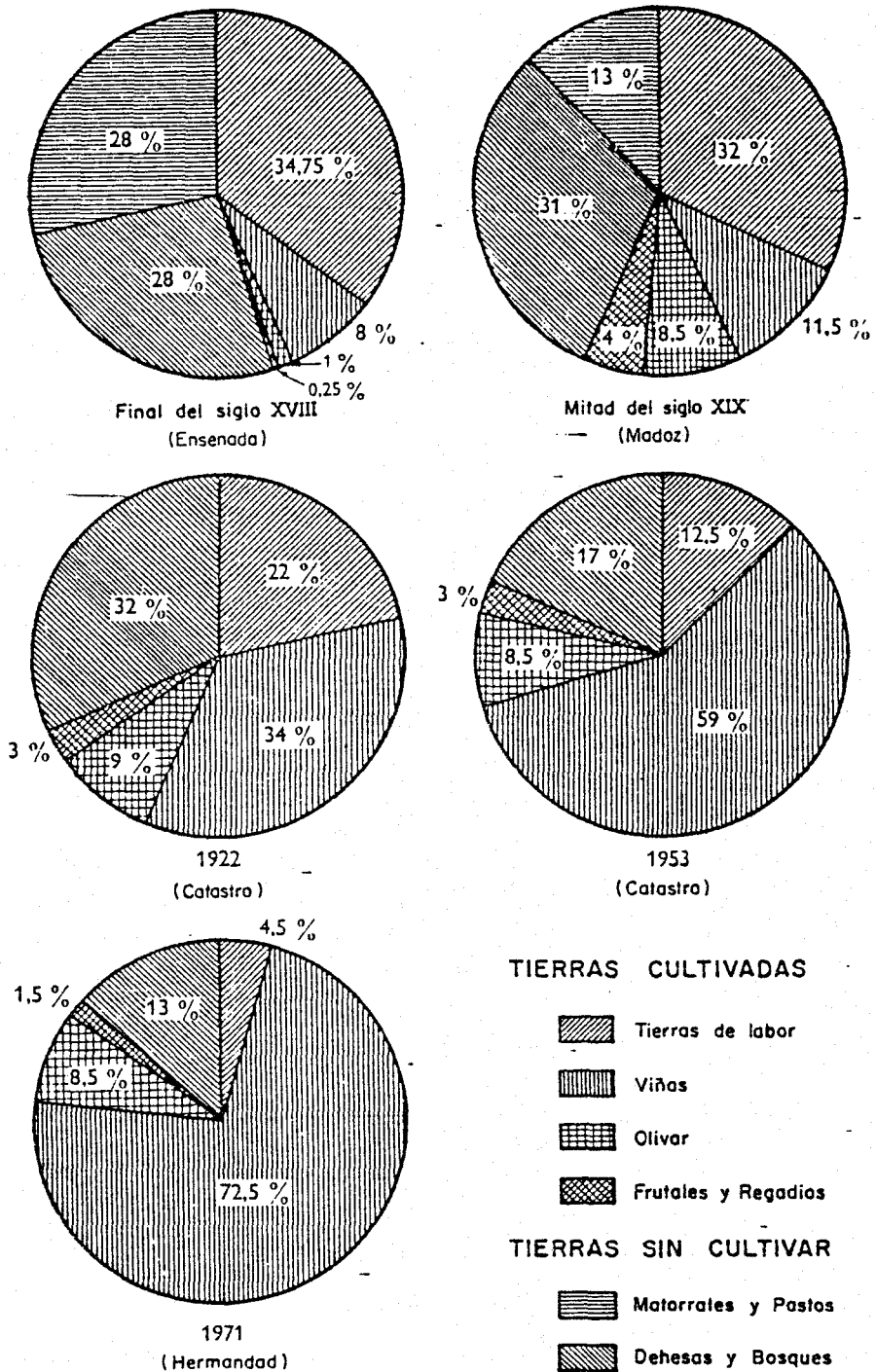


Figura 2.—Evolución de la distribución de los cultivos en Bollullos par del Condado.

Fig. 3

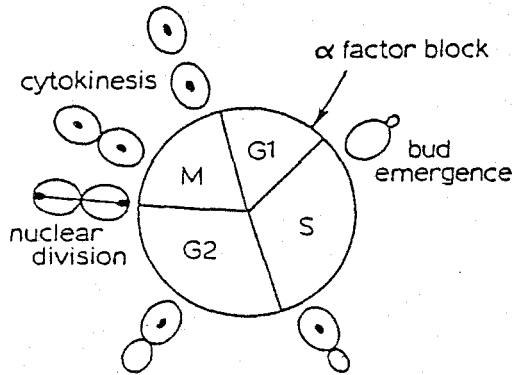


FIG. 3 Yeast cell cycle. G1 and G2 are gaps between the S phase (DNA synthesis) and the M phase (mitosis). The position of a cell in the cell cycle can be inferred from the size of the bud.

Fig. 4

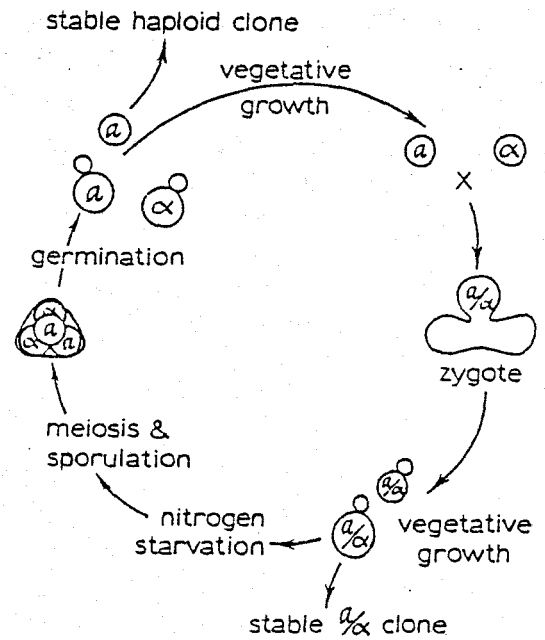


FIG. 4 Yeast life cycle. The sexual reproduction of yeast involves mating between cells of complementary (opposite) mating types to form a cell type capable of meiosis. The haploid products of meiosis are each packaged in spores within an ascus.

FIG. 5

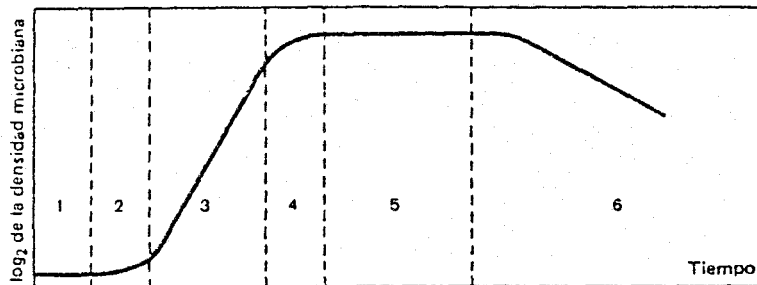


Figura 5. Curvas del crecimiento microbiano en coordenadas semilogarítmicas. 1) Fase de latencia; 2) fase de aceleración; 3) fase exponencial o logarítmica; 4) fase de retardo; 5) fase estacionaria; 6) fase de declinación (según Senez, 1968; ver también Monod, 1942); \log_2 : logaritmo de base 2; el tiempo medio de división celular o de generación es el intervalo durante el cual el \log_2 de la población aumenta una unidad.