

Biológicas
321
T.D
j21615329

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

**ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE LA FORMACIÓN
DE LOS COMPONENTES DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL
EN VINOS DE LA VARIEDAD MONASTRELL**

Memoria presentada por
José Juan Mateo Tolosa
para optar al título de
Doctor en Ciencias Biológicas
por la Universidad de Valencia.



UMI Number: U607668

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

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

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



UMI U607668

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

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



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

A mi esposa y a mi hijo.

A mis padres y hermanos.



AGRADECIMIENTOS

- En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento y cariño a mi esposa, Antonia Isabel, por la enorme comprensión mostrada a lo largo de este tiempo y por su constante y desinteresado apoyo y ánimo en los momentos difíciles que se me han presentado a lo largo de la elaboración de la presente Tesis Doctoral. También quiero agradecer a mi hijo, Rafael, los momentos agradables que me ha proporcionado desde su nacimiento sin los cuales hubiese sido más difícil la terminación de este trabajo.

- También mi gratitud para mis padres y hermanos por no haber dudado de mi capacidad para realizar este trabajo y porque han sabido sufrir conmigo en los momentos difíciles y por haberse acordado de mí en sus oraciones.

- Quiero agradecer a los Drs. Tomás Huerta Grau y Agustín Pastor García su dirección en esta Tesis Doctoral, por la ilusión que han tenido en todo momento, la confianza que han depositado en mí y por haber conseguido la financiación y colaboración necesaria para que este proyecto pudiese llevarse a cabo..

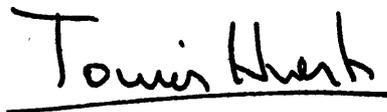
- A la Dra. Misericordia Jiménez Escamilla, por el apoyo e interés mostrado hacia este trabajo desde su incorporación al Departamento de Microbiología.

- A todas las personas que han colaborado conmigo en la realización del presente trabajo, en especial a José-Vicente, por el apoyo y ayuda que me han prestado.

- A Daniel Belda por proporcionarnos el mosto utilizado, siempre de forma desinteresada.

-A todos los compañeros del Departamento de Microbiología por acogerme y hacerme más fácil la estancia en el mismo y a todas las personas que de forma directa o indirecta han hecho posible la culminación de este trabajo.

La Tesis Doctoral ha sido dirigida por el Dr. Tomás Huerta Grau, Profesor Titular del Departamento de Microbiología de la Universidad de Valencia y por el Dr. Agustín Pastor García, Profesor Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia.

Handwritten signature of Tomás Huerta Grau, written in black ink and underlined.

Tomás Huerta Grau

Handwritten signature of Agustín Pastor García, written in black ink.

Agustín Pastor García

MATERIAL Y MÉTODOS	37
2.1.- Levaduras	38
2.2.- Medios de cultivo	39
2.3.- Identificación de las levaduras	39
2.4.- Fenotipo killer	40
2.5.- Mosto	41
2.6.- Inoculaciones	41
2.7.- Fermentaciones	43
2.8.- Valoración de azúcares reductores	44
2.9.- Extracción de la fracción volátil	44
2.10.- Análisis cromatográfico	44
2.11.- Identificación de los compuestos volátiles	45
2.12.- Cuantificación de los compuestos volátiles	46
2.13.- Determinación de la repetitividad de las experiencias	46
2.14.- Tratamiento estadístico de los datos	47
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
3.1.- Análisis de la fracción volátil	49
3.1.1.- Identificación de los componentes de la fracción volátil	49
3.1.1.1.- Identificación por tiempos de retención relativos	49
3.1.1.2.- Identificación por CG-EM	49
3.1.2.- Cuantificación de los componentes de la fracción volátil	49
3.1.2.1.- Cálculo de los factores cromatográficos de respuesta	49
3.1.2.2.- Cuantificación mediante rectas de calibrado	49
3.2.- Fermentación espontánea del mosto de la variedad Monastrell	55
3.2.1.- Evolución de la población levaduriforme	55
3.2.2.- Cinética de fermentación	56
3.2.3.- Estudio de la fracción volátil	57
3.2.3.1.- Componentes volátiles del mosto	57
3.2.3.2.- Formación de la fracción volátil	59
3.2.3.2.1.- Alcoholes superiores	59
3.2.3.2.1.1.- Alcoholes superiores mayoritarios	59
3.2.3.2.1.2.- Alcoholes superiores minoritarios	66
3.2.3.2.1.3.- Otros alcoholes superiores	68
3.2.3.2.1.4.- Discusión	69
3.2.3.2.2.- Ácidos grasos	69

3.2.3.2.3.- Ésteres	73
3.2.3.2.3.1.- Acetato de etilo	73
3.2.3.2.3.2.- Ésteres etílicos	73
3.2.3.2.3.3.- Acetatos	79
3.2.3.2.3.4.- Ésteres de isoamilo	81
3.2.3.2.3.5.- Discusión	82
3.2.3.2.4.- Glicoles	83
3.2.3.2.5.- Otros componentes	85
3.2.4.- Discusión	87
3.3.- Inoculación de mostos frescos de la variedad Monastrell con levaduras seleccionadas	89
3.3.1.- Inoculación con la cepa T73 de <i>Saccharomyces bayanus</i>	89
3.3.1.1.- Cinética de la fermentación	90
3.3.1.2.- Formación de la fracción volátil	90
3.3.1.2.1.- Alcoholes superiores	95
3.3.1.2.2.- Ácidos grasos	96
3.3.1.2.3.- Ésteres	96
3.3.1.2.3.1.- Acetato de etilo	96
3.3.1.2.3.2.- Ésteres etílicos	96
3.3.1.2.3.3.- Acetatos	97
3.3.1.2.3.4.- Ésteres de isoamilo	97
3.3.1.2.3.5.- Discusión	98
3.3.1.2.4.- Glicoles	98
3.3.1.2.5.- Otros componentes	98
3.3.1.3.- Discusión	99
3.3.2.- Inoculación con la cepa L2226 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
3.3.2.1.- Cinética de la fermentación	100
3.3.2.2.- Formación de la fracción volátil	101
3.3.2.2.1.- Alcoholes superiores	105
3.3.2.2.2.- Ácidos grasos	106
3.3.2.2.3.- Ésteres	106
3.3.2.2.3.1.- Acetato de etilo	106
3.3.2.2.3.2.- Ésteres etílicos	107
3.3.2.2.3.3.- Acetatos	107
3.3.2.2.3.4.- Ésteres de isoamilo	108
3.3.2.2.3.5.- Discusión	108
3.3.2.2.4.- Glicoles	108
3.3.2.2.5.- Otros componentes	109

3.3.2.3.- Discusión	109
3.3.3.- Inoculación con la cepa V de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	110
3.3.3.1.- Cinética de la fermentación	110
3.3.3.2.- Formación de la fracción volátil	111
3.3.3.2.1.- Alcoholes superiores	111
3.3.3.2.2.- Ácidos grasos	116
3.3.3.2.3.- Ésteres	116
3.3.3.2.3.1.- Acetato de etilo	116
3.3.3.2.3.2.- Ésteres etílicos	117
3.3.3.2.3.3.- Acetatos	117
3.3.3.2.3.4.- Ésteres de isoamilo	118
3.3.3.2.3.5.- Discusión	118
3.3.3.2.4.- Glicoles	118
3.3.3.2.5.- Otros componentes	119
3.3.3.3.- Discusión	119
3.3.4.- Inoculación con la cepa C.G.L. de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	120
3.3.4.1.- Cinética de la fermentación	120
3.3.4.2.- Formación de la fracción volátil	120
3.3.4.2.1.- Alcoholes superiores	125
3.3.4.2.2.- Ácidos grasos	126
3.3.4.2.3.- Ésteres	126
3.3.4.2.3.1.- Acetato de etilo	126
3.3.4.2.3.2.- Ésteres etílicos	126
3.3.4.2.3.3.- Acetatos	127
3.3.4.2.3.4.- Ésteres de isoamilo	127
3.3.4.2.3.5.- Discusión	128
3.3.4.2.4.- Glicoles	128
3.3.4.2.5.- Otros componentes	128
3.3.4.3.- Discusión	128
3.3.5.- Discusión	129
3.3.5.1.- Cinética de fermentación	129
3.3.5.2.- Formación de la fracción volátil	130
3.3.5.2.1.- Alcoholes superiores	130
3.3.5.2.2.- Ácidos grasos	133
3.3.5.2.3.- Ésteres	135
3.3.5.2.4.- Glicoles	137
3.3.5.2.5.- Otros componentes	138
3.3.6.- Conclusiones	138

3.4.- Fermentaciones de mosto estéril de la variedad Monastrell	143
3.4.1.- Fermentaciones de mosto estéril inducidas con cultivos puros de levaduras	143
3.4.1.1.- Fenotipo killer de las levaduras empleadas	143
3.4.1.2.- Evolución de la población levaduriforme	144
3.4.1.3.- Cinética de fermentación	145
3.4.1.4.- Formación de la fracción volátil	146
3.4.1.4.1.- Alcoholes superiores	146
3.4.1.4.1.1.- Alcoholes superiores mayoritarios	151
3.4.1.4.1.2.- Alcoholes superiores minoritarios	151
3.4.1.4.1.3.- Otros alcoholes superiores	151
3.4.1.4.1.4.- Discusión	152
3.4.1.4.2.- Ácidos grasos	153
3.4.1.4.3.- Ésteres	153
3.4.1.4.3.1.- Ésteres etílicos	153
3.4.1.4.3.2.- Acetatos	154
3.4.1.4.3.3.- Ésteres de isoamilo	154
3.4.1.4.3.4.- Discusión	155
3.4.1.4.4.- Glicoles	156
3.4.1.4.5.- Otros componentes	156
3.4.1.5.- Discusión	156
3.4.2.- Fermentaciones de mosto estéril inducidas con cultivos mixtos de levaduras	158
3.4.2.1.- Evolución de la población levaduriforme	158
3.4.2.2.- Cinética de fermentación	162
3.4.2.3.- Formación de la fracción volátil	163
3.4.2.3.1.- Alcoholes superiores	163
3.4.2.3.1.1.- Alcoholes superiores mayoritarios	163
3.4.2.3.1.2.- Alcoholes superiores minoritarios	169
3.4.2.3.1.3.- Otros alcoholes superiores	170
3.4.2.3.1.4.- Discusión	170
3.4.2.3.2.- Ácidos grasos	171
3.4.2.3.3.- Ésteres	172
3.4.2.3.3.1.- Ésteres etílicos	172
3.4.2.3.3.2.- Acetatos	173
3.4.2.3.3.3.- Ésteres de isoamilo	174
3.4.1.3.3.4.- Discusión	174
3.4.2.3.4.- Glicoles	175

3.4.2.3.5.- Otros componentes	175
3.4.2.4.- Discusión	175
3.4.3.- Conclusiones	177
CONCLUSIONES	183
BIBLIOGRAFÍA	187

JUSTIFICACIÓN Y OBJETO DEL TRABAJO



JUSTIFICACIÓN Y OBJETO DEL TRABAJO.

Un examen desde la perspectiva microbiológica de las diversas tecnologías aplicadas actualmente en la vinificación del mosto de uva conduce a conclusiones no totalmente satisfactorias. La mayoría tiene como fundamento el control primordial de factores físico-químicos: condiciones de presión de extracción el mosto, reducción de la microflora natural del mismo, siembra o no de una levadura pura seleccionada con arreglo a criterios científicamente no justificados, control térmico de la vinificación. Casi todo ello muy plausible y de resultados ciertos; sin embargo, el factor microbiológico, a mi entender, el más determinante de la estabilidad y peculiaridad del vino resultante, no se aborda en ellas con el énfasis y relevancia requeridos.

El vino es el resultado de la acción secuenciada de varias especies de levaduras que se desarrollan en un orden preciso establecido a partir de la microflora epifítica de la uva, inscrita y adherida a la piel de la pruina y la presente en el ecosistema donde se transforma el mosto en vino (ambiente, equipamientos de la bodega,...). Es, por tanto, un proceso ordenado desde dicha microflora. Tales especies se hallan condicionadas en las diferentes comarcas por factores ecológicos, lo mismo que lo están las variedades de vid dominantes en las distintas regiones de la Tierra. De todo ello se infiere que los vinos de cada comarca son diferentes por razones ecológicas, es decir, que estos factores condicionaran la presencia de unas u otras especies en la microflora epifítica original.

En el presente trabajo pretendemos abordar el estudio de la fermentación de mostos de la variedad Monastrell de la D.O. Jumilla, caracterizados fundamentalmente por su elevado contenido inicial en azúcares y la influencia que sobre el proceso va a tener la adición de levaduras seleccionadas, tanto en mosto fresco como en mosto estéril, a fin de determinar tanto los cambios en el proceso fermentativo como las alteraciones que puede sufrir la fracción volátil en base a criterios objetivos (cinética de fermentación, contenido en alcoholes superiores y ésteres etílicos de alto peso molecular,...) y la influencia que las prácticas efectuadas van a tener sobre distintos parámetros químicos que nos pueden dar una idea sobre las características que pueda tener el producto final. Para ello, pretendemos hacer:

1.- Puesta a punto de la metodología analítica necesaria, estableciendo para ello tanto los criterios cualitativos que nos permitan identificar el mayor número posible de los componentes volátiles presentes en los productos obtenidos como las ecuaciones que nos permitan conocer, con la mayor precisión posible, las concentraciones que presentan cada

uno de ellos. Para ello abordaremos la identificación y cuantificación de los componentes volátiles del vino por diversas vías a fin de disminuir los errores cometidos.

2.- Control de la fermentación espontánea de los mostos objeto del estudio, tanto a nivel microbiológico como en la cinética de fermentación y evolución en la formación de la fracción volátil. Esta experiencia se utilizará como punto de referencia para el resto de fermentaciones realizadas.

3.- Influencia de la adición de levaduras seleccionadas sobre la fermentación y formación de la fracción volátil de mostos naturales, tanto en función de la cepa de levadura empleada como de diferentes concentraciones de inóculo. Para ello emplearemos varias levaduras seleccionadas comercializadas en la actualidad y de fácil acceso para los profesionales del sector vitivinícola.

4.- Estudio de la fermentación, evolución de la población levaduriforme y formación de la fracción volátil en la fermentación de mosto estéril inducida tanto con cultivos iniciadores puros como con cultivos iniciadores mixtos. Para estas experiencia se emplearan las levaduras que en el apartado anterior proporcionen unos resultados más satisfactorios y levaduras autóctonas del mosto empleado, aisladas, identificadas y seleccionadas por nuestro grupo de trabajo.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1.- Generalidades.

El vino es una bebida conocida desde tiempos remotos; así, ya se menciona en la Biblia, en los relatos épicos de Homero y en documentos egipcios y asirios. Sin embargo, es necesario esperar hasta la Edad Media para que los alquimistas descubran su principal principio activo: el etanol. A finales del siglo XVII, A. van Leeuwenhoek es el primero en observar las levaduras en el mosto de uva y en la cerveza, pero no llega a establecer ninguna relación entre su presencia y el proceso fermentativo que en ellas tiene lugar. Un siglo después, Lavoisier publica el primer trabajo científico sobre la fermentación, aunque la considera como un fenómeno puramente químico. Poco después Gay-Lussac establece la estequiometría de la reacción. Entre 1835 y 1837 Caignard-Latour, Schwan y Kützing, atribuyen el proceso fermentativo a los seres microscópicos descubiertos por Leeuwenhoek., naciendo así la teoría vitalista que se opondría durante algunos años a la teoría química defendida por químicos del prestigio de Wöhler, Liebig y Berzelius. En 1858 Pasteur acabó con la controversia demostrando la naturaleza biológica de la fermentación, afirmando que ésta es un proceso solidario con la actividad biológica de la levadura. Posteriormente publica su célebre trabajo "Etudes sur le vin" en el que analiza las alteraciones del vino y propone tratamientos adecuados. Este es considerado como el origen de la enología científica, ciencia que ha experimentado un enorme progreso hasta el día de hoy.

Desde los primeros años del siglo actual se han publicado numerosos trabajos taxonómicos y sistemáticos sobre los microorganismos específicos del vino, permitiéndonos alcanzar un alto grado de conocimiento sobre dicha microflora. Sin embargo, es a partir de 1950, gracias al desarrollo de las técnicas cromatográficas y enzimáticas, cuando se ha podido efectuar un análisis más profundo del vino, identificándose varios cientos de sus componentes y estableciéndose los procesos bioquímicos responsables de la transformación del mosto en vino.

Tradicionalmente, la obtención del vino ha sido un fenómeno espontáneo, inducido por los microorganismos autóctonos que se encuentran en la uva y en las bodegas. El mosto dentro del grano de uva sano e intacto está estéril y el inóculo para una fermentación natural o espontánea (en contraste con la fermentación iniciada por inoculación de un cultivo de levaduras) proviene de la población que se encuentra sobre el

grano de uva. Las levaduras son transportadas por el viento y por los insectos (Ribereau Gayon *et al.*, 1975). Las moscas de la fruta (Wolf y Benda, 1965) y las abejas (Stevic, 1982) juegan un importante papel en su diseminación. Las levaduras se encuentran en la vid desde el inicio de la maduración, alcanzándose la máxima población cuando la uva alcanza su madurez total. El crecimiento de los microorganismos se detiene en la zona de contacto con la capa cuticular del grano de uva.

El número de células de levadura que hay sobre la superficie de un grano de uva oscila entre 10^3 y 10^6 , dependiendo de la localización, condiciones sanitarias y condiciones climáticas, sobre todo la temperatura; el efecto de la variedad de uva es menor (Belin, 1981). Algunos productos químicos empleados para combatir enfermedades pueden afectar también a su distribución (Minarik y Rigala, 1975; Hadjinicolaou, 1981; Bureau *et al.*, 1982).

Las levaduras del vino pertenecen a las clases Ascomycetes (esporógenas) y Deuteromycetes (no esporógenas). Los trabajos publicados muestran que el número de especies que están presentes en el vino con una frecuencia superior al 1% no es mayor de 14. En su nicho ecológico, las levaduras se encuentran a menudo asociadas con hongos filamentosos y con bacterias lácticas y acéticas. Su aislamiento y recuento se realiza en medios con pH ácido, mientras que su identificación se realiza según la metodología propuesta por Barnett *et al.* (1983) y Kreger van Rij (1984), basados fundamentalmente en características morfológicas y fisiológicas, metabolismo de algunos azúcares y asimilación de diversos compuestos nitrogenados.

Sobre las uvas se encuentran esencialmente el hongo filamentoso *Areobasidium pullulans* y levaduras con metabolismo oxidativo (*Rhodotorula*). Además de esta última, predomina *Hanseniaspora uvarum* y su forma imperfecta, *Kloeckera apiculata*, representando todas ellas cerca del 99% de las levaduras aisladas. *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia membranaefaciens* y *Hansenula anomala* son menos frecuentes; otras especies sólo se encuentran de modo fortuito (Belin, 1982). Todos los estudios coinciden en señalar el bajo número de *Saccharomyces cerevisiae* en las uvas.

Durante las primeras horas de la fermentación se encuentran en el medio grandes cantidades de *Hanseniaspora uvarum* y *Kloeckera apiculata* (Ribereau Gayon *et al.*, 1975) que son posteriormente sustituidas por levaduras del género *Saccharomyces*. La especie *Turoloopsis stellata* parece ser característica de algunas regiones vitivinícolas (Domerq, 1957). Todos los autores están de acuerdo en la preponderancia de

Saccharomyces cerevisiae varios días después de que se ha iniciado la fermentación espontánea. *Saccharomyces bayanus*, a menudo considerada como la levadura que acaba la fermentación dada su alta tolerancia al etanol (Ribereau Gayon *et al.*, 1975) coexiste desde el principio con *Saccharomyces cerevisiae* (Bureau *et al.*, 1982). En condiciones particulares, se puede inducir el crecimiento de *Schizosaccharomyces* o de *Saccharomyces rosei* (Lafon Lafourcade *et al.*, 1981). Accidentalmente se pueden encontrar *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes ludwigii* y, en superficie, levaduras de los géneros *Pichia* y *Candida*.

1.2.- Área de cultivo y climatología.

La comarca vitivinícola del Vinalopó agrupa municipios de Alicante, Murcia y Albacete de características vitivinícolas comunes en cuanto a variedades de uva y condiciones climáticas y edafológicas. Existen en esta zona las denominaciones de origen Alicante, Jumilla, Yecla y Almansa caracterizadas por las variedades Monastrell, Garnacha y Bobal, siendo la primera de ellas la más importante.

La zona presenta rasgos de clima continental, aunque con indudable influencia mediterránea. Las precipitaciones anuales son de media 350 l/m² y ocurren sobre todo durante septiembre y octubre y, en menor cuantía, en abril. En general es un clima cálido y con pocas precipitaciones en la época de maduración de la uva, lo que se traduce en caldos con mucho color y alta graduación alcohólica (Catastro Vitícola y Vinícola, 1978).

1.2.1.- Características de la variedad Monastrell.

La variedad Monastrell es la tercera de España en cuanto a superficie de viñedo cultivado con un 7,17 % del total. Esta variedad es propia de regiones de escasas lluvias, en las que se adapta muy bien, si el portainjerto es apropiado. Tiene escasa producción por cepa, pero con altas graduaciones. Su calidad es muy buena, superior, sin duda, a la fama que tiene en España. Sus vinos son de alta graduación. Es una variedad muy conocida en Argelia, Australia y California. Sus granos son pequeños, negros, provistos de piel gruesa con abundante pruina y tiene un sabor algo áspero. Su brotación tardía la defiende de las heladas de primavera, al igual que su maduración se retrasa con respecto a otras variedades. Se defiende muy bien de la podredumbre gris, pero mal del oidium y del mildiu; un motivo adicional, este último por el que se adapta bien a climas secos (Enciclopedia del vino, 1988).

1.3.- Fermentación espontánea y fermentación controlada.

Al inicio de la fermentación espontánea existe en el mosto un claro predominio de levaduras apiculadas. La presencia de estas levaduras en el mosto de uva y su actividad fermentativa se describen ya en experiencias realizadas Tarantola (1945), Peynaud y Domerq (1953) y Castelli (1953). A pesar de esta bibliografía, no estaba todavía suficientemente claro la función que tales levaduras apiculadas podrían tener en la primera fase fermentativa de los mostos.

Sobre el papel desempeñado por el género *Kloeckera* en enología, se han realizados múltiples contribuciones experimentales. Tarantola (1945) afirma que tales levaduras eran inadecuadas para la buena marcha de la fermentación vínica. Son estos resultados los que llevan a pensar en técnicas tendentes a su eliminación y vislumbran, ya a principios de siglo, los sistemas de fermentación con levadura única (fermentación en pureza).

La mayoría de los adelantos que se han producido en la industria vínica (Reed y Nagodawithana, 1988) durante los últimos 20 años, están relacionados con el desarrollo de levaduras seleccionadas como *starters* vínicos. Numerosos autores atribuyen a las fermentaciones inducidas con este tipo de levaduras, ventajas como un rápido comienzo, una fermentación uniforme y completa, nulos o muy bajos niveles de azúcares residuales, eliminación de productos indeseables, un total control microbiológico del proceso (Longo *et al.*, 1992), un vino de calidad más consistente (Rankine y Lloyd, 1963; Kunkee *et al.*, 1970, 1977), menor competencia por los nutrientes limitantes e, incluso, mayor calidad del producto final (Mínarik *et al.*, 1978; Cuinier, 1983).

En líneas generales, la técnica que se ha de aplicar en las fermentaciones en pureza, lleva implícita como primera operación el tratamiento del mosto, a fin de reducir o eliminar la flora autóctona y conseguir el desarrollo de la levadura seleccionada de forma que se pongan de manifiesto todas sus propiedades. No obstante, esta práctica no es fácil de realizar en las bodegas, haciendo, en muchos casos, inútil el hecho de aportar levaduras al vino.

Mestre y Mestre (1946) y Amerine *et al.* (1982) consideran que en el caso de inocular el mosto con una levadura *starter*, la flora indígena debe ser reducida por decantación o, mejor, por centrifugación, evitando así los costos tanto económicos como organolépticos que produce la pasteurización y permitiendo que la flora salvaje se

desarrolle en alguna medida, resultando vinos con un espectro aromático más extenso.

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

Suárez *et al.*, (1987) han estudiado el comportamiento de varias combinaciones de levaduras como *Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora guilliermondii* y otras en asociaciones binarias, ternarias y cuaternarias, operando sobre mosto natural sin adición de SO_2 . Llegaron a la conclusión de que la acción depresiva, tantas veces citada, puede ser consecuencia de la alteración de la composición química del mosto cuando se somete a tratamientos de esterilización por calor. Estas acciones no se producirían, por tanto, cuando se opera con sustrato natural. Suárez e Íñigo (1990) argumentan que la técnica que se ha de aplicar en las fermentaciones en pureza lleva implícita como primera operación la esterilización del mosto, a fin de eliminar la flora salvaje. Una vez eliminada del sustrato, éste queda en condiciones de que desarrolle su actividad total la especie seleccionada. Esto significa, por tanto, la renuncia a cualquier tipo de efecto, tanto beneficioso como perjudicial, que pudiese desarrollar la flora salvaje.

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

En los países más recientes en la producción de vino tales como Estados Unidos,

Australia o Sudáfrica, donde no se ha establecido una flora deseable natural, hay una renuencia a confiar en la fermentación espontánea y se inoculan los mostos con levaduras seleccionadas para inducir la fermentación (Kunkee y Goswell, 1977), eliminando o inhibiendo previamente la flora no deseable por pasterización o mediante la adición de anhídrido sulfuroso. Esto puede ser debido a la escasa tradición vitivinícola desarrollada en estos países, que provoca que no dispongan de una flora levaduriforme autóctona arraigada, ideal para una fermentación espontánea favorable.

Sin embargo, entre los enólogos europeos predomina la idea de que la fermentación espontánea inducida por la flora autóctona, conduce a la obtención de vinos de mejor aroma y bouquet (Rankine, 1968; Marcus Gomes, 1969; Suarez e Iñigo, 1990), apoyando la idea de que la posesión de una flora autóctona consolidada a través de una ancestral tradición vitivinícola produce mejores caldos si se permite su actuación espontánea.

1.4.- Ciclo de crecimiento de las levaduras y cinética de la fermentación.

Una vez efectuado el estrujado de las uvas, las levaduras que se encuentran sobre la superficie de los granos de la uva inoculan el mosto con una población del orden de 10^6 células/ml. Durante el mantenimiento de las uvas en la bodega, la población levaduriforme se multiplica por un factor de 10, pero el sulfitado y la clarificación de los mostos vuelve a reducirlo. Sin embargo, el crecimiento de las levaduras no se detiene y en un periodo de tiempo relativamente corto se pueden encontrar poblaciones del orden de 10^7 células/ml una vez que se ha iniciado la fermentación (Lafon Lafourcade, 1983).

El ciclo de crecimiento de las levaduras durante la fermentación presenta tres etapas claramente diferenciadas:

a) fase de multiplicación limitada, con una duración de 2-5 días y en la que la población crece hasta 10^7 - 10^8 células/ml,

b) fase estacionaria que dura unos 8 días,

c) fase de declive, en la que la población se reduce hasta 10^5 células/ml. Esta fase puede durar varias semanas.

Como se puede ver, este ciclo se asemeja en cuanto a sus fases a la típica curva de crecimiento de los microorganismos (Kunkee y Amerine, 1970). Sin embargo, presenta varias diferencias: (1) la duración es particularmente larga, (2) el crecimiento total está

limitado y corresponde a un crecimiento de no más de 4-5 generaciones (3) el crecimiento cesa antes de que se consuma todo el azúcar, (4) hay una gran desproporción entre las fases; particularmente, la fase de declive puede ser 3 ó 4 veces más larga que en la curva de crecimiento. La cinética de fermentación está estrechamente ligada a este ciclo de crecimiento. Así, la velocidad de fermentación es prácticamente constante y alcanza su máximo en el día 11. En este punto hay una elevada población de levaduras viables (10^7 células/ml) pero han perdido parte de su actividad metabólica. La velocidad diaria de fermentación se reduce desde 15 g/l durante los 11 primeros días hasta 5 g/l en los 3 días siguientes. Si partimos de mostos con unos 320 g/l de azúcar inicial, al cabo de 14 días de fermentación el medio contiene todavía unos 150 g/l. La fermentación continúa pero a una velocidad mucho menor, de modo que tarda unos 24 días más en utilizar 35 g/l de azúcar adicionales. Al día 40, la fermentación se detiene con 100 g/l residuales de azúcar (Lafon Lafourcade *et al.*, 1979). Estos resultados muestran que la caída en la fermentación y su parada no son solamente debidos a un insuficiente crecimiento en la población de levaduras, sino a una inhibición metabólica de éstas. En realidad, tanto el crecimiento de las levaduras como la fermentación están controlados desde el principio por una doble inhibición, denominadas inhibición por azúcar seguida por una inhibición por alcohol (Lafon Lafourcade, 1983).

1.5.- Efecto de las levaduras sobre las características organolépticas del vino.

La influencia de las levaduras sobre las características organolépticas del vino ha sido un tema estudiado desde los tiempos de Pasteur. Así, en un trabajo publicado en 1876 sobre la cerveza, escribe: "el gusto y las propiedades de un vino dependen en gran medida de la naturaleza de las levaduras que se desarrollan durante la fermentación del mosto". Jaquemin reconoce en 1900 que las levaduras aisladas de regiones vitivinícolas de marcado prestigio no son suficientes para transformar un vino ordinario en un gran vino.

Las levaduras determinan la concentración de etanol y de productos secundarios de la fermentación en el vino. También hay levaduras que originan alteraciones desfavorables del vino; son especies que producen cantidades excesivas de ácido acético y acetaldehído, sustancias responsables del agriamiento de los vinos.

En la vinificación tradicional, la fermentación espontánea del vino está inducida por numerosas especies de levaduras que se desarrollan simultánea o sucesivamente. No se puede determinar el efecto de su metabolismo sobre la composición del vino aunque se conozcan sus propiedades fisiológicas, pero se conoce (Belin, 1982) que la sucesión

Hanseniaspora uvarum/ *Saccharomyces cerevisiae* afecta significativamente a la concentración de aminoácidos del vino, de los que un 10-30% pueden ser transformados en alcoholes superiores.

Sin duda, es cierto que *Saccharomyces cerevisiae* es el principal agente de la fermentación. Durante mucho tiempo se ha estado de acuerdo en que las diferencias que producen distintas cepas de esta levadura son pequeñas (Malan, 1956). Sin embargo, se han seleccionado ciertas cepas debido a sus propiedades aromáticas. Estudios en diferentes regiones vitivinícolas han mostrado mejoras perceptibles con el empleo de estas levaduras (Querol *et al.*, 1992) en la producción de vinos si la variedad de uva es "neutra", sin rasgos aromáticos característicos. En otros casos, los catadores perciben diferencias, pero las preferencias no son pronunciadas o contradictorias (Maugenet, 1981). Generalmente, las diferencias se suavizan durante la maduración; también hay que hacer notar que el tratamiento de las uvas (prensado, desfangado), las condiciones de fermentación (temperatura, pH) modifican la producción de sustancias volátiles por las levaduras (Ribereau Gayon *et al.*, 1975; Dubourdiou *et al.*, 1981).

Tradicionalmente, en enología se distinguen tres tipos de aromas, (a) aroma primario, (b) aroma secundario de la fermentación y (c) el "bouquet" que se desarrolla durante el envejecimiento de los vinos (Cordonnier, 1971). Cordonnier y Bayonove proponen en 1981 una nueva clasificación que incluya el aroma debido a las operaciones prefermentarias.

El aroma primario es el aroma aportado por la uva, específico de cada variedad. El aroma intenso y fácilmente reconocible de las variedades moscatel de *V. vinifera* es debido al linalool y al geraniol (Webb, 1970). El olor típico de las variedades americanas de *V. labrusca* y de algunos de sus híbridos es debido al antranilato de metilo. Ninguna otra variedad parece contener un componente o grupo de ellos que sean responsables en su totalidad de su aroma característico, aunque el Riesling blanco, que a menudo tiene un aroma parecido al moscatel, contiene bajas cantidades de linalool (van Wyk *et al.*, 1967). Se han hecho esfuerzos para encontrar distintivos varietales en base a la distinta composición química. Por ejemplo, Muller *et al.* (1971) han identificado la γ -lactona del ácido 4-etoxi-4-hidroxibutírico como uno de los componentes del aroma de los vinos Cabernet-Sauvignon y Ruby Cabernet.

Además de los componentes procedentes de la uva y de la fermentación, también hay otros cuyo origen hay que buscarlo en el proceso de envejecimiento, gracias a (a)

fermentación maloláctica bacteriana, (b) interacción con el aire y con la madera durante el envejecimiento en barrica y (c) interacción con los componentes del vino en la botella, formando lo que se denomina "bouquet de botella".

1.6.- Bioquímica de la formación de los compuestos volátiles del vino.

A comienzos de los años 60 se creía que el aroma de las bebidas alcohólicas estaba determinado por un número reducido de componentes, prestándose una atención especial a la formación de los alcoholes superiores durante la fermentación; a su vez, la cromatografía en fase gaseosa indicaba que estos componentes eran los mayoritarios en la fracción volátil. A lo largo de estos años, los investigadores especulaban con la posibilidad de que un componente o un grupo de ellos pudiesen determinar el aroma típico de cada tipo de bebida. Sin embargo, en los últimos 30 años, la forma de abordar el estudio de la fracción volátil de las bebidas alcohólicas ha cambiado radicalmente. Así, se sabe que los componentes de esta fracción (alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos,...) desempeñan un papel muy importante en la evaluación cualitativa de este tipo de alimentos.

Los listados de componentes volátiles del vino publicados hasta la fecha se caracterizan por el hecho de que cada componente puede encontrarse en un rango muy amplio de concentraciones. Varios estudios han mostrado que una parte de estas sustancias ya se encuentran presentes en las uvas (Ribereau-Gayon *et al.*, 1975; Rapp y Hastrich, 1976; Schreier *et al.*, 1976a), pero muchas de ellas son transformadas durante la fermentación, periodo en el que también se forman *de novo* gran número de componentes (Weeb y Muller, 1972; Amerine *et al.*, 1972; Schreier, 1979; Williams, 1982).

A lo largo de los años se han efectuado numerosos trabajos para determinar los mecanismos bioquímicos que permitan establecer las rutas metabólicas de formación de los compuestos volátiles del vino, trabajos que ponen de manifiesto que en el aroma del vino se refleja tanto el metabolismo de la uva como los cambios que ocurren a lo largo de la fermentación alcohólica.

1.6.1.- Alcoholes superiores.

Los alcoholes superiores están presentes en concentraciones del orden de 300-500 mg/l. Cuantitativamente son los constituyentes más importantes del aroma del vino, pero se está de acuerdo en que disminuyen la calidad de un vino cuando se encuentran presentes en concentraciones elevadas (Wagener y Wagener, 1968; Ribereau Gayon *et al.*, 1975). Este

grupo incluye alcoholes alifáticos como el 1-propanol, el 2-metil-1-propanol, el 2-metil-1-butanol y el 3-metil-1-butanol y alcoholes aromáticos, de los que el más importante es el 2-feniletanol. Su concentración es variable y pueden ser reconocidos por su gusto y olor fuerte y pungente. Su síntesis se lleva a cabo durante la fase de crecimiento exponencial de las levaduras (Vollbrecht y Radler, 1973) y su concentración relativa depende de las fuentes de nitrógeno presentes en el medio, aunque también es función de la especie de levadura (Cabrera *et al.*, 1988; Mateo *et al.*, 1991), e incluso la cepa (Webb y Kepner, 1961; Rankine, 1967; Sponholz y Dittrich, 1974; Singh y Kunkee, 1976; Mateo *et al.*, 1992), del transcurso de la fermentación, pH, temperatura y técnica de vinificación (Bertrand, 1978).

El mecanismo de su síntesis ha sido objeto de numerosos trabajos entre los que caben destacar los publicados por Äyräpää (1971, 1973), Usseglio Tomasset (1971) y Webb (1973). Los alcoholes superiores con origen fermentativo pueden formarse por dos vías: (a) por una vía biosintética anabólica a partir de azúcares o (b) por una vía catabólica a partir de aminoácidos exógenos (Äyräpää, 1973) (Figura 1.1); en ambos casos aparecen como intermediarios α -cetoácidos. Guymon *et al.* (1964) demuestran que el 1-propanol y los alcoholes ramificados de 4 y 5 átomos de carbono se forman a partir del metabolismo de la valina, leucina e isoleucina. El ácido 2-oxobutírico es el intermediario de la formación del 1-propanol, pero también se ha encontrado como intermediario en la síntesis de la isoleucina y en la formación de 2-metil-1-butanol.

Como ya se ha apuntado, los alcoholes superiores pueden formarse a partir de azúcares. De acuerdo con Webb e Ingraham (1963), el 2-metil-1-propanol se origina a partir del ácido pirúvico por medio del ácido 2-oxoisovaleriánico. Según el mecanismo propuesto el 2-metil-1-butanol se origina a partir del ácido 2-oxoisovaleriánico vía ácido 2-oxo-3-metilvaleriánico (Figura 1.2). Reazin *et al.* (1973) examinan el efecto de la treonina e isoleucina sobre la síntesis de alcoholes superiores y encuentran que, de un modo casi exclusivo, el 2-metil-1-butanol se origina a partir de isoleucina en fermentaciones con *Saccharomyces cerevisiae*; por el contrario, la treonina origina 1-propanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol. Las reacciones bioquímicas implicadas en el metabolismo de la treonina, leucina e isoleucina se muestran en la figura 1.3. En la vía A, cuyo producto final es el 1-propanol, la treonina origina ácido 2-amino-2-butenico por acción de la treonina deshidratasa que posteriormente se desamina a ácido 2-oxobutírico, un intermediario en la formación del 1-propanol. La ruta B conduce a la formación de 2-metil-1-butanol. El ácido 2-amino-2-butenico se desamina a ácido 2-oxobutírico activado, que a su vez reacciona

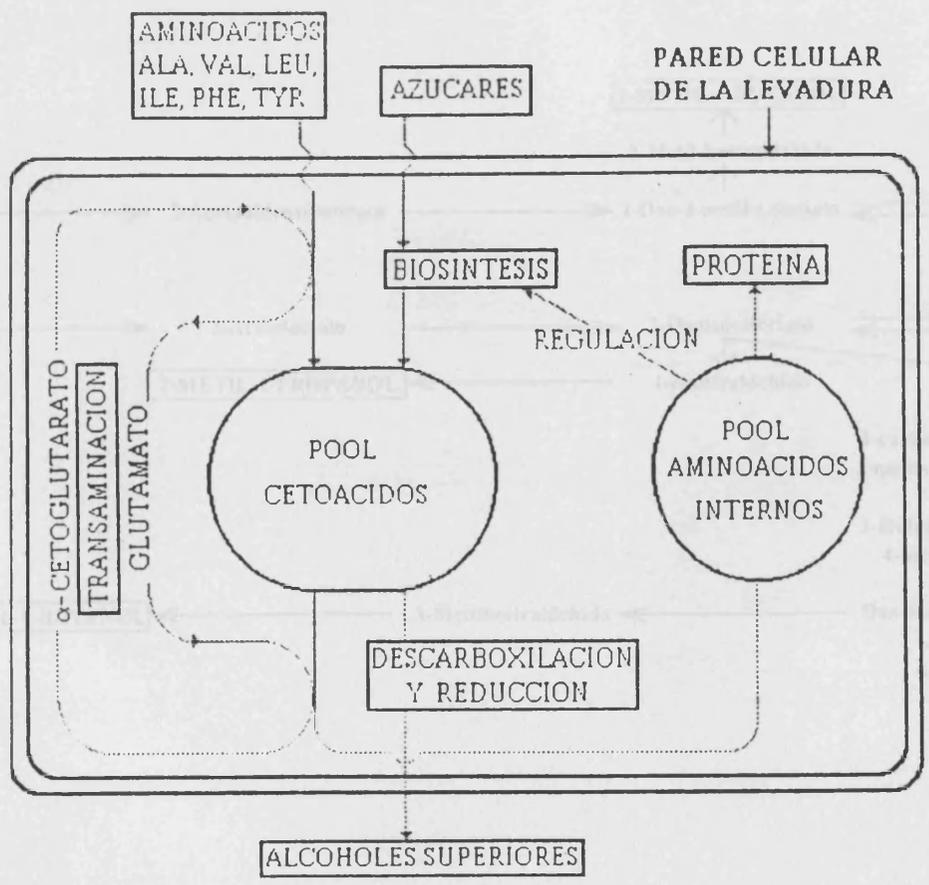


Figura 1.1.- Esquema de la síntesis intracelular de los alcoholes superiores.

Figura 1.2.- Esquema de la síntesis de los alcoholes superiores.

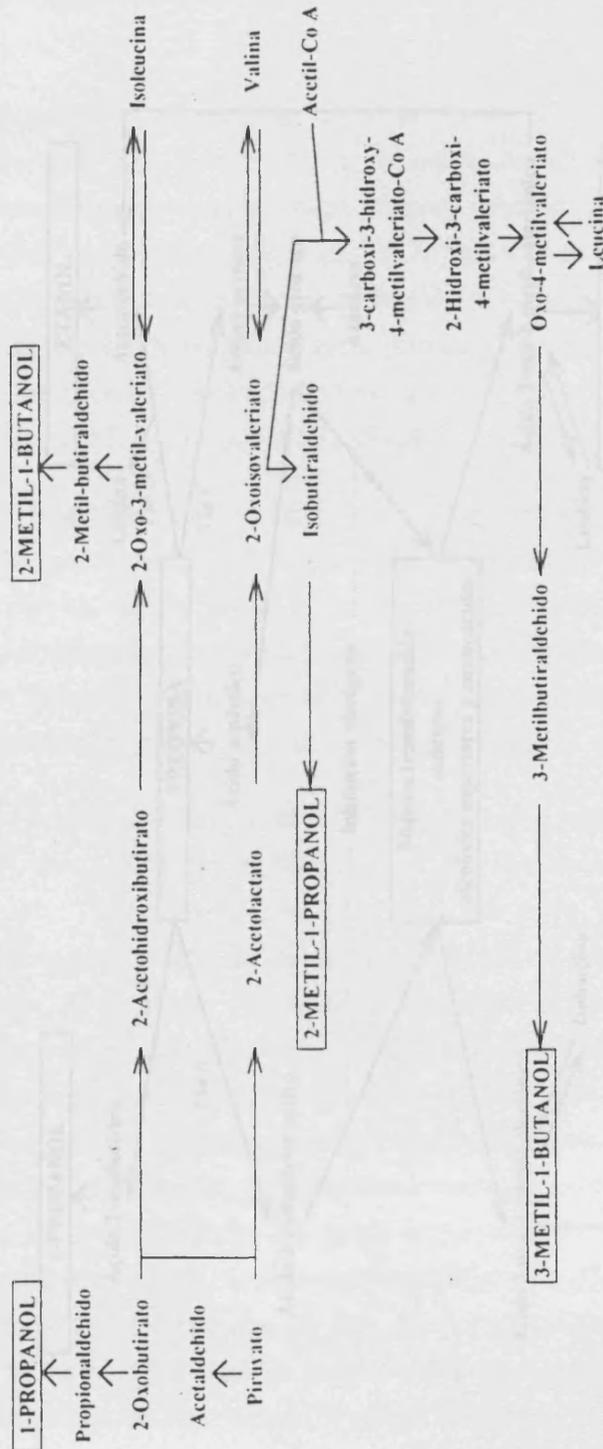
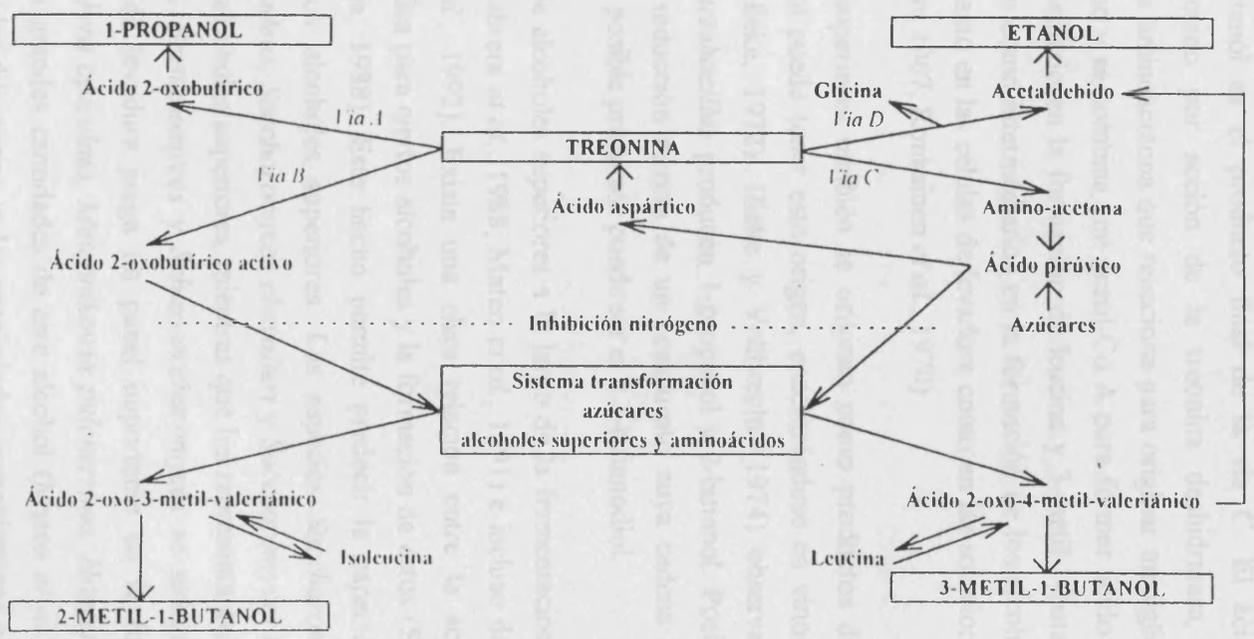


Figura 1.3.- Papel de treonina, leucina e isoleucina en la síntesis de los alcoholes superiores.



con acetil-Co A para formar acetohidroxibutil-Co A, un intermediario en la transformación de carbohidratos a 2-metil-1-butanol e isoleucina. El oxoácido correspondiente a la isoleucina, denominado ácido 2-oxo-3-metilvaleriánico actúa como un intermediario en la formación de 2-metil-1-butanol a partir de la isoleucina y la treonina (Guerzoni *et al.*, 1985)

El 3-metil-1-butanol es el producto final de la vía C. El ácido 2-amino-3-oxobutírico, lábil, formado por acción de la treonina deshidratasa, es fácilmente desaminado para formar aminoacetona que reacciona para originar metilglioxal, el cual es oxidado a ácido pirúvico y se combina con acetil-Co A para formar ácido 2-acetoláctico, que actúa como intermediario en la formación de leucina y 3-metil-1-butanol. Todos los oxoácidos que aparecen como intermediarios en la formación de los alcoholes superiores han sido identificados tanto en las células de levadura como en las soluciones fermentadas (Suomalainen y Keränen, 1967; Ronkainen *et al.*, 1970).

Los alcoholes superiores también se originan como productos del metabolismo bacteriano; el 2-butanol puede tener este origen, encontrándose en vinos alterados por hongos y bacterias (Hieke, 1972). Hieke y Vollbrecht (1974) observan que algunas especies del género *Lactobacillus* producen 1-propanol y 2-butanol. Posiblemente, el 2-butanol se forma por reducción directa de un compuesto cuya cadena hidrocarbonada permanezca intacta; un posible precursor puede ser el 2,3-butanodiol.

La formación de alcoholes superiores a lo largo de la fermentación depende de la especie de levadura (Cabrera *et al.*, 1988; Mateo *et al.*, 1991) e incluso de la variedad de levadura (Mateo *et al.*, 1992). Existe una clara relación entre la actividad alcohol deshidrogenasa específica para ciertos alcoholes y la formación de éstos (Singh y Kunkee, 1976; Millan y Ortega, 1988). Este hecho permite predecir la capacidad de algunas levaduras para producir alcoholes superiores. Las especies *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces chevalieri* y *Saccharomyces baillii* producen grandes cantidades de alcoholes superiores, mientras que los representantes de los géneros *Turolopsis*, *Kloeckera*, *Brettanomyces* y *Schizosaccharomyces* se sitúan en el extremo opuesto. La especie de levadura juega un papel importante en la formación de 2-feniletanol. Así, *Kloeckera apiculata*, *Metchnikowia pulcherrima*, *Hansenula anomala* y *Rhodotorula* producen grandes cantidades de este alcohol (Mateo *et al.*, 1991), lo que puede explicar parte de las diferencias en las propiedades organolépticas que presentan los vinos obtenidos por fermentación espontánea (Sponholz y Dittrich, 1974).

Las mutaciones también pueden afectar a la formación de alcoholes superiores. Guymon *et al.* (1964) encuentran que, mientras un mutante de una cepa Thr- de *Saccharomyces cerevisiae* no produce ni 1-propanol ni 2-metil-1-butanol, los restantes mutantes estudiados pueden formar ambos alcoholes. Webb y Kepner (1961) encuentran el mismo hecho con cultivos puros de *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura Burgundy produce elevadas cantidades de 1-propanol y, correspondientemente, menos 3-metil-1-butanol. Por el contrario, la cepa Montrachet produce una cantidad normal de 1-propanol y relativamente más 3-metil-1-butanol.

La infección con *Botrytis cinerea* produce una disminución en la concentración de tiamina, lo cual a su vez se traduce en una mayor degradación de aminoácidos y, consecuentemente, un incremento en la concentración de alcoholes superiores (Dittrich y Sponholz, 1975).

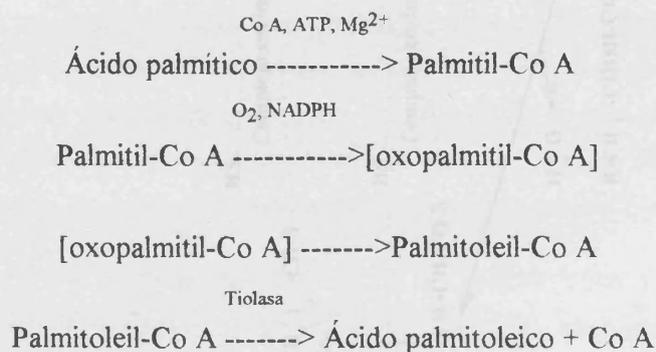
La cantidad y la naturaleza de los nutrientes también afecta a la formación de alcoholes superiores. De acuerdo con Äyräpää (1973), la cantidad de alcoholes formada es función del contenido en nitrógeno del medio a baja concentración de este elemento. A elevadas concentraciones, pero capaces de limitar el crecimiento de las levaduras por su accesibilidad, las cantidades de alcoholes decrecen proporcionalmente al incremento en la concentración de nitrógeno del medio. En presencia de un exceso de nitrógeno, la formación de alcoholes superiores es reducida y relativamente independiente de la concentración de compuestos de nitrógeno en el medio. La formación de 1-propanol no parece seguir unas reglas concretas pero, a concentraciones limitantes de fuentes de nitrógeno, se incrementa con el contenido de este elemento y, a concentraciones elevadas, se produce en grandes cantidades independientemente del contenido en nitrógeno del medio.

La temperatura de fermentación también influye en la formación de alcoholes superiores; la temperatura óptima es 30°C. Las cantidades de 1-propanol y 2-metil-1-butanol formadas están claramente influidas por la temperatura en el rango 25-35°C. Por otra parte, las cantidades formadas de 2-metil-1-propanol y 3-metil-1-butanol son prácticamente insensibles a la temperatura del medio (Parfait y Jouret, 1975). Äyräpää (1971) observa que *Saccharomyces carlsbergensis* produce elevadas cantidades de alcoholes superiores a 20°C, pero la producción es máxima a 28°C.

1.6.2.- Ácidos grasos.

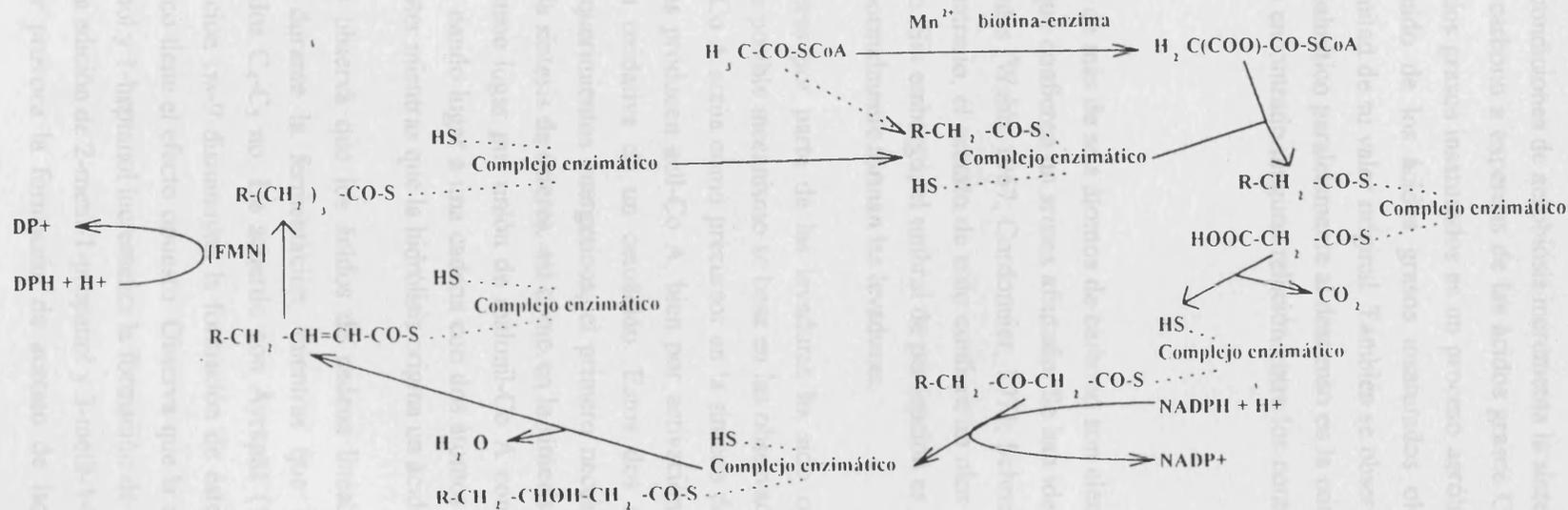
Los ácidos grasos de 4 a 6 átomos de carbono afectan al aroma del vino a pesar de su reducida concentración (Webb *et al.*, 1967). Los ácidos grasos de 6, 8 y 10 átomos de carbono también participan del aroma del vino y están presentes en concentraciones relativamente mayores (Drawert *et al.*, 1974). La concentración de estos componentes depende de la especie de levadura (Usseglio Tomasset, 1967).

El acetil-Co A actúa como punto de partida en la biosíntesis de los ácidos grasos en las levaduras. Se origina por descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico en el catabolismo aeróbico de los azúcares (Lynen, 1973). Por medio de la acción de la carboxilasa, la reacción prosigue con la síntesis de malonil-Co A (Figura 1.4). Los ácidos grasos de cadena larga se forman con ayuda de acetil-Co A, malonil-Co A y NADPH. La reacción tiene lugar con la intervención de un complejo multienzimático que une el malonil-CoA y el acetil-Co A. El acetil-Co A es sustituido por el propionil-Co A en la formación de ácidos grasos de número impar de átomos de carbono. Los ácidos grasos insaturados se forman a partir del ácido graso saturado correspondiente por vía del palmitil-Co A y estearil-Co A en presencia de oxígeno molecular y NADPH (Bloomfield y Bloch, 1960). El primer paso de la reacción es la activación del ácido graso para formar un acil-Co A. En el siguiente paso, se produce una desaturación en posición 9-10, transcurriendo la reacción del modo siguiente



Bloomfield y Bloch (1960) también examinan el papel de la biotina en estas reacciones. Una deficiencia de biotina, aunque no tiene efecto alguno sobre el grado de insaturación, disminuye la cantidad de ácidos grasos e incrementa la síntesis de esteroides; la

Figura 1.4- Esquema de la síntesis de los ácidos grasos.



deficiencia de biotina bajo condiciones de aerobiosis incrementa la síntesis de ácidos grasos mayores de 16 átomos de carbono a expensas de los ácidos grasos C_{18} . Como ya hemos dicho, la formación de ácidos grasos insaturados es un proceso aeróbico. En condiciones de anaerobiosis, el contenido de los ácidos grasos insaturados oleico y palmitoleico disminuyen a menos de la mitad de su valor original. También se observa un incremento en la concentración de ácido palmítico paralelamente al descenso en la concentración de ácido palmitoléico, pero no se ha encontrado ninguna relación entre los contenidos de los ácidos oléico y esteárico.

1.6.3.- Ésteres.

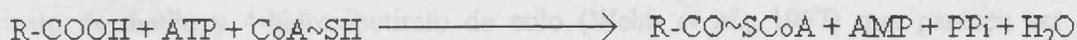
Los ésteres etílicos de más de seis átomos de carbono son elementos deseables del aroma de los vinos, a los que confieren un aroma afrutado. Se han identificado un elevado número de estos componentes (Webb, 1967; Cordonnier, 1971; Schreier y Drawert, 1974; Bertrand, 1975). Por el contrario, el acetato de etilo confiere un olor desagradable que es específicamente avinagrado. Sin embargo, el umbral de percepción es generalmente mayor que la concentración que normalmente forman las levaduras.

La síntesis de ésteres por parte de las levaduras ha sido objeto de numerosas polémicas (Figura 1.5). Un posible mecanismo se basa en las observaciones de Nordstrom (1964), en el cual un acil-Co A actúa como precursor en la síntesis de ésteres. Durante la fermentación, las levaduras producen acil-Co A, bien por activación de un ácido graso, bien por descarboxilación oxidativa de un cetoácido. Estos dos mecanismos difieren principalmente por sus requerimientos energéticos; el primero necesita ATP mientras el segundo no. Más aun, en la síntesis de ésteres, así como en la síntesis de ácidos grasos, la elongación de la cadena tiene lugar por unión de malonil-Co A con el acil-Co A en un complejo multienzimático, dando lugar a una cadena con dos átomos de carbono más. La alcoholisis da lugar a un éster mientras que la hidrólisis origina un ácido graso.

Nordstrom (1964) observa que los ácidos de cadena lineal C_4 - C_{11} forman sus correspondientes ésteres durante la fermentación, mientras que los ácidos fórmico, propiónico y los ramificados C_4 - C_5 no. De acuerdo con Äyräpää (1973), ácidos grasos insaturados con configuración *cis*-9 disminuyen la formación de ésteres, mientras que el ácido *trans*-9-octadecenóico tiene el efecto opuesto. Observa que la adición de 1-butanol, 3-metil-1-butanol, 1-hexanol y 1-heptanol incrementa la formación de sus correspondientes acetatos. Se observa que la adición de 2-metil-1-propanol y 3-metil-1-butanol al medio con *Saccharomyces cerevisiae* provoca la formación de acetato de isobutilo y acetato de

isoamilo. Mientras investigaban por qué no se forman ésteres de ácidos mayores que el acético encuentran que la adición de 1-propanol impide la formación de ácidos superiores al acético.

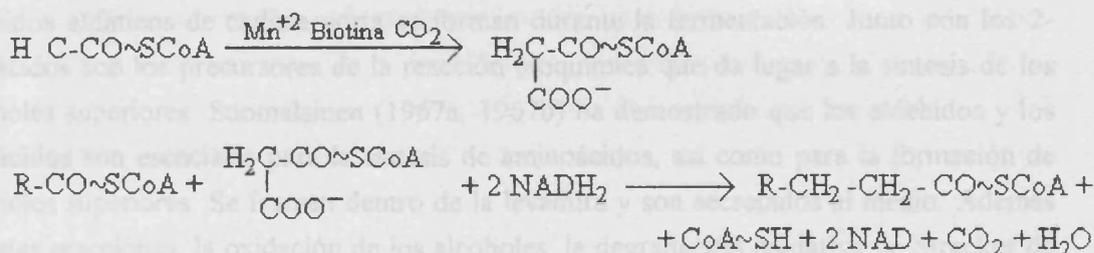
Activación de los ácidos monocarboxílicos:



Descarboxilación oxidativa de los 2-oxo ácidos:



Síntesis a partir de intermediarios de ácidos de larga cadena:



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



Figura 1.5.- Formación de ésteres de ácidos alifáticos monocarboxílicos.

Parfait *et al.* (1972), trabajando con *Pichia membranaefaciens*, *Hansenula anomala*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida krusei* y *Saccharomyces cerevisiae* examina el papel de estas levaduras en la formación de ésteres. *Schizosaccharomyces pombe* forma las mayores cantidades de ésteres mientras que *Candida krusei* la menor. Estudiando el efecto de la destilación sobre el aroma en soluciones azucaradas fermentadas, Suomalainen y Nykänen (1966) encuentran que la destilación en presencia de levaduras incrementa el contenido en algunos ésteres, particularmente los ésteres de los ácidos octanoico, decanoico y palmitoleico. Parfait *et al.* (1972) observan el mismo efecto al estudiar los ésteres del ron.

La biosíntesis de ésteres depende de la aireación del mosto, la temperatura de fermentación, la técnica de vinificación (Bertrand, 1975), pero también de la fertilización de las viñas y la madurez de las uvas (Houtman *et al.*, 1980). Los vinos obtenidos a partir de mostos infectados con *Botrytis cinerea* contienen ésteres de cetohidroxiácidos y ácidos dicarboxílicos que no se encuentran en vinos obtenidos de uvas maduras (Schreier *et al.*, 1976b). En vinos de Jerez se puede encontrar altas concentraciones de acetato de etilo, succinato de dietilo y 4-hidroxibutirato de etilo (Webb *et al.*, 1967) que parecen ser específicas del aroma de este vino.

1.6.4.- Aldehídos.

La fracción del aroma de las bebidas alcohólicas más volátil está formada por compuestos carbonílicos. Evidentemente, las mayores cantidades de acetaldehído y otros aldehídos alifáticos de cadena corta se forman durante la fermentación. Junto con los 2-cetoácidos son los precursores de la reacción bioquímica que da lugar a la síntesis de los alcoholes superiores. Suomalainen (1967a, 1967b) ha demostrado que los aldehídos y los cetoácidos son esenciales para la síntesis de aminoácidos, así como para la formación de alcoholes superiores. Se forman dentro de la levadura y son secretados al medio. Además de estas reacciones, la oxidación de los alcoholes, la degradación oxidativa de Strecker de los aminoácidos y la autooxidación de los ácidos grasos pueden producir también aldehídos. Así, en vinos de Jerez, el etanol es lentamente oxidado por el aire para formar acetaldehído; esta reacción tiene lugar durante el proceso de solera.

El acetaldehído es el componente más importante y representa más del 90% del contenido total de aldehídos en vinos y destilados. Wucherpfenning y Semmler (1973) observan que los vinos blancos contienen 74-118 mg/l de acetaldehído, mientras que en tintos la concentración oscila entre 34-94 mg/l.

1.6.5.- Dicetonas vecinales.

Las dicetonas vecinales 2,3-butanodiona (diacetilo) y 2,3-pentanodiona son componentes importantes del aroma del vino y destilados debido, entre otras cosas, a su bajo umbral de percepción. El mecanismo de síntesis de la 2,3-butanodiona durante la fermentación ha sido propuesto a fines de los 70. La ruta metabólica sugerida implica, inicialmente, la formación de acetolactato y su degradación a 2-hidroxi-3-butanona, pero este mecanismo no ha podido ser confirmado experimentalmente. Por el contrario, sí se ha demostrado (Portno, 1966) que la 2,3-butanodiona no se forma por oxidación de la 2-

hidroxi-3-butanona en la fermentación.

De acuerdo con Suomalainen y Ronkainen (1968), la 2,3-butanodiona se forma fuera de la célula por descomposición espontánea del 2-acetolactato, que es segregado al medio por las células. El 2-acetolactato es un intermediario en la síntesis del 2-cetoisovalerianato, que, a su vez, es un precursor de la formación de valina, leucina y 2-metil-1-propanol.

Se ha propuesto otro mecanismo para la formación de la 2,3-butanodiona (Inoue, 1974). Su etapa principal implica una descarboxilación oxidativa del 2-acetolactato para producir 2,3-butanodiona. También se ha demostrado que la descomposición del 2-acetolactato en el medio de fermentación tiene lugar a una velocidad definida bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas, pero se incrementa con un descenso de la temperatura o un incremento en la acidez del medio. La descomposición sigue una cinética de 1^{er} orden y no hay diferencias en la velocidad de descomposición del 2-acetolactato y del 2-aceto-2-hidroxi-3-butanodiona para producir, respectivamente, 2,3-butanodiona y 2,3-pentanodiona.

1.6.6.- Lactonas.

Las γ - y δ -lactonas son componentes importantes del aroma de varios alimentos. En este sentido, Maga (1976) publica una detallada revisión. Sin embargo, excepto en un caso, hasta el momento sólo se han identificado γ -lactonas en vinos (Muller *et al.*, 1973).

La γ -butirolactona fue identificada en primer lugar en vinos de Jerez (Webb y Kepner, 1962) y posteriormente en vinos Riesling (Van Wyk *et al.*, 1967); en la actualidad se ha detectado en todos los vinos estudiados (Schreier, 1979). Se considera que el ácido glutámico es el precursor de su síntesis (Pietruszko y Fowden, 1961).

La pantolactona parece ser exclusiva de los vinos de Jerez (Webb *et al.*, 1967; Masuda y Nishimura, 1971). Muller *et al.* (1973) proponen que este compuesto se forma reducción de la 2-cetopantolil-lactona. La pantolactona, junto con su forma isomérica, la γ -lactona del ácido 4,5-dihidroxihexanoico, no han podido ser detectadas en vinos blancos.

El metabolismo de las levaduras desempeña un papel importante en la formación de las lactonas en vinos. Los productos intermediarios, el ácido 4-oxobutanoico (succinsemialdehído) y el 2-cetoglutarato, juegan un papel esencial (Muller *et al.*, 1973). Más aún, el ácido 4-oxobutanoico parece ser la clave de la vía de síntesis. La reacción



directa de este compuesto con alcoholes conduce a la formación de alcoxilactonas, posiblemente vía los correspondiente acetales o hemiacetales. La condensación "cabeza-cabeza" con α -cetoácidos y una descarboxilación posterior origina la aparición de las correspondientes acil-lactonas. Este mecanismo es meramente hipotético, careciendo de evidencias experimentales de la ruta propuesta.

Varias γ -lactonas se caracterizan por su remarcable eficiencia aromática. Keith y Powers (1968), así como Siek *et al.* (1971) establecen correlaciones entre los umbrales de percepción de las γ -lactonas y el tamaño de su cadena. Esta longitud también afecta a las características de olor y gusto. La posibilidad de que el carácter varietal de diferentes vinos esté influenciado por lactonas con cadenas de longitud variable parece tener una escasa importancia (Muller *et al.*, 1973).

1.6.7.- Aminas y N-acetilaminas.

Las investigaciones llevadas a cabo sobre el contenido en compuestos de nitrógeno en vinos han revelado que, además de aminoácidos y sus formas supramoleculares, existen otros compuestos que contribuyen al contenido total de nitrógeno. Una parte de este nitrógeno procede de las aminas. Después de los primeros trabajos sobre la presencia en vinos de histamina (Marquardt *et al.*, 1963; Schneyder, 1973) y otras aminas (Drawert, 1965), se han llevado a cabo numerosas investigaciones en busca de estas sustancias en bebidas alcohólicas (Schneyder, 1973). Otra porción de compuestos que contienen nitrógeno está formada por componentes con estructura de amida. Por medio de la cromatografía de gases se han identificado varias N-acetilaminas en vinos. Schreier *et al.* (1975) detectan acetamidas secundarias en fermentaciones modelo, las cuales se originan en el curso de la fermentación a partir de aminas primarias y no según la reacción aminoácidos \rightarrow Ácido N-acetiamínico \rightarrow N-acetilamina. La reacción catalizada por la aminoacetilasa exhibe una especificidad relativamente elevada para producir 2- y 3-metilbutilamina, mientras que sólo se acetilan pequeñas cantidades de 2-fenetilamina. Las aminas alifáticas de cadena larga únicamente se forman en cantidades de traza.

1.6.8.- Compuestos de azufre.

Entre los compuestos responsables del carácter aromático, son especialmente importantes aquellos que tienen un bajo umbral de percepción. A este grupo pertenecen los compuestos orgánicos volátiles que contienen azufre. Con umbrales de percepción de 10⁻⁹ % en peso o menos (Stahl, 1973), estos compuestos pueden ser considerados como parte

integrante del aroma de muchos alimentos. En los últimos años se han hecho grandes esfuerzos para identificar este tipo de sustancias en numerosos sustratos. Sin embargo, dada su concentración extremadamente baja, estos trabajos no han dado fruto hasta la introducción de los detectores fotométricos de llama (FPD) en la cromatografía de gases (Schutte, 1974). Esta técnica selectiva de análisis puede detectar hasta 10⁻¹³% en peso de sustancias volátiles, de modo que han podido identificarse en alimentos numerosos compuestos que contienen azufre. Utilizando la inyección "on-column", más adecuada para compuestos muy volátiles (Schreier *et al.*, 1974), se han detectado en vinos distintos componentes que contienen azufre, como el H₂S y otros sulfuros. El sulfuro de dimetilo se encuentra en vinos blancos con una concentración de 0-400 µg/l. A lo largo de la fermentación, el H₂S procede fundamentalmente de azufre inorgánico; sin embargo, en casos especiales, puede originarse también a partir de cisteína por desulfhidratación vía ácido α-aminoacrilico, actuando como coenzima el fosfato de piridoxal.

El sulfuro de dimetilo, el principal componente de los sulfuros volátiles, puede ser formado por las levaduras a partir de cisteína, cistina y glutatión. Los conceptos iniciales de Brenner *et al.* (1955) que implicaban una síntesis a partir de la metionina deben ser revisados, debido a los resultados obtenidos por varios grupos con fermentaciones modelo (Bärwald y Kliem, 1971; Schreier *et al.*, 1976). Los trabajos de Schreier *et al.* (1974) establecen que el 3-(metiltio)-1-propanol, el componente que contiene azufre más importante cuantitativamente en vinos (0.5-2 mg/l), sí se origina a partir de la metionina vía metionol. Se han detectado el acetato de 3-(metiltio)-1-propilo y la 2-metiltiofen-3-ona como productos secundarios de la formación del metionol. La explicación de la formación de compuestos cíclicos es más compleja. Generalmente, los derivados del tiofeno se forman en los alimentos cuando se cocinan, por reacción de cisteína con compuestos α-dicarbonílicos (Walradt y Lindasy, 1970). Así, el derivado se identifica después de la reacción de la cisteína (o cistina) con piruvaldehído a elevadas temperaturas (Kato *et al.*, 1973). La 2-metiltiofen-3-ona también se forma en un proceso en el que interviene H₂S, por ejemplo, durante la interacción de la 4-hidroxi-5-metil-3(2H)-furanona con H₂S (Van der Ouweland y Peer, 1975).

1.6.9.- Compuestos fenólicos volátiles.

El interés sobre los fenoles como constituyentes de la fracción volátil de las bebidas alcohólicas obtenidas por fermentación ha ido en continuo aumento desde que Braus y Miller (1958) identificaron guayacol, 4-metil-guayacol, 4-etil-guayacol, fenol, *o*-cresol y vanillina en la fracción volátil de los destilados para obtener whisky. Steinke y Paulson

(1964) proponen que el 4-vinil-guayacol y el 4-vinil-fenol, detectados en varios vinos, pueden originarse a partir de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico por descarboxilación, que puede ser provocada enzimáticamente por bacterias y levaduras (Albagnac, 1975). Este tipo de compuestos también pueden aparecer como intermediarios en la formación de los análogos etílicos.

Excepto la acetovanillona, el resto de componentes fenólicos volátiles se detectan en vinos, pero no en uvas. Estos compuestos pueden originarse como productos del metabolismo de bacterias y levaduras, o bien por rotura de los polifenoles que se encuentran en uvas.

1.7.- Análisis de la fracción volátil del vino.

La aplicación de la cromatografía en fase gaseosa ha permitido la identificación de más de 400 sustancias que aparecen en el vino como consecuencia de la fermentación, algunas de las cuales están presentes en trazas, aunque sólo se conoce el efecto de algunas de ellas en el aroma.

Sin embargo, a veces es importante utilizar el olfato humano "acoplado" a la cromatografía de gases, ya que puede ser mejor detector de compuestos. También aparecen dificultades cuando se intenta asociar la presencia de un/varios componentes con la propiedad que denominamos "aroma del vino". Algunos de los componentes presentan umbrales de percepción extremadamente bajos y concentraciones muy reducidas, casi indetectables con los medios físico-químicos de los que se dispone en la actualidad. Por otra parte, estos compuestos son a menudo extremadamente volátiles, por lo que esta cualidad solamente puede ser apreciada por un catador experimentado, que puede detectar los cambios (para bueno o para malo) que a menudo ocurren cuando se deja a un vino "respirar" después que se ha descorchado una botella.

1.7.1.- Análisis sensorial.

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

En el momento en que una pequeña porción de vino se contempla, se huele o se introduce en la boca, se desencadenan una serie de efectos que están relacionados entre sí y que dependen de la calidad, intensidad y duración del estímulo, de la modalidad de la sensación producida, de las características de los receptores sensoriales y de la atención y

conocimientos básicos del individuo (Cabezudo, 1982). El éxito del análisis sensorial depende de que se logre la mayor proximidad entre la calidad e intensidad del estímulo y la respuesta dada por el individuo a la sensación percibida.

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

1.7.2.- Análisis por vía química.

La gran mayoría de los análisis químicos de la fracción volátil, fundamentalmente volumétricos, proporcionan una información global sobre la misma, o bien sobre un grupo de compuestos químicamente afines. Aunque esta información pueda no estar directamente relacionada con la calidad del aroma, resulta útil si se utiliza adecuadamente para ciertos objetivos concretos, como el estudio comparativo del contenido total en sustancias volátiles de distintos vinos o la comparación de los efectos producidos por los diferentes procesos a que se somete el vino. Entre estos métodos de análisis cabe destacar los de determinación de ésteres totales (método Peynaud), aldehidos (Método de Jaulmes y Hamelle), acidez volátil (método Duclaux-Gayon), grado alcohólico (método Nicloux), alcoholes superiores (método Guymon-Heitz) (Ribereau-Gayon *et al.*, 1972).

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

1.7.3.- Análisis por cromatografía de gases.

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

De este modo, para realizar el análisis individualizado de la fracción volátil de los

vinos, se requieren varias etapas bien definidas:

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

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

La separación de los compuestos se realiza fundamentalmente por cromatografía gaseosa.

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

1.8.- Métodos de extracción de los compuestos volátiles del vino.

En los últimos años se han publicado varias revisiones comparativas sobre los principales métodos de extracción de compuestos volátiles en vinos (Gassiot *et al.*, 1982; Mesías y Ough, 1985; Etievant *et al.*, 1987; Blanch *et al.*, 1991). Los principales métodos son:

1.8.1.- Inyección directa del vino.

Se utiliza para determinar compuestos que se encuentran en el vino a una concentración superior a 10 mg/l. El principal inconveniente que presenta es que introducimos en el cromatógrafo de gases sustancias poco o nada volátiles que deterioran rápidamente el sistema de inyección, originando "artefactos" en los cromatogramas y una línea base más inestable.

1.8.2.- Destilación.

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

Mediante este procedimiento se concentran unas siete veces los componentes que

aparecen en la zona media del cromatograma respecto a la inyección directa, excepto en el caso del 1-butanol, para el que no se consigue un incremento notable de su concentración en el destilado, sin que se conozcan bien las causas (Gassiot *et al.*, 1982).

1.8.3.- Desmixtura.

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

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

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

1.8.4.- Espacio de cabeza.

Consiste en analizar únicamente el vapor en equilibrio con el vino objeto del estudio, a una temperatura determinada y controlable. Los componentes de este vapor se arrastran por una corriente de N₂ a la misma temperatura del líquido. Posteriormente las sustancias volátiles pueden ser inyectadas directamente a un cromatógrafo de gases o recuperadas por retención en trampas de polímero poroso (Bertuccioli y Montedoro, 1984; Ortega *et al.*, 1987), por condensación a bajas temperaturas (Etievant y Bayonove, 1983) o sobre un solvente apropiado y posterior concentración (Guichard y Ducret, 1984; Craig, 1988).

1.8.5.- Extracción con gas inerte.

La extracción con gas inerte quizás sea el mejor método para el estudio de la fracción volátil de un vino, ya que se consigue reproducibilidad muy elevada. Además

permite una correcta separación de los componentes más volátiles ya que no se enmascaran por el frente del eluyente. Sin embargo su utilización resulta ser muy compleja y por ello su uso no está muy extendido. La extracción con gas inerte lleva consigo una gran cantidad de etanol y acetato de etilo que enmascara varios picos del cromatograma, puestos en evidencia más fácilmente a partir de una extracción con disolventes. Consiste en arrastrar los restos más volátiles por medio de una corriente de gas inerte, siendo después condensado en trampas frías (Bertrand, 1967), retenidos en polímeros porosos del tipo Poropak Q o Tenax GC (Comellas *et al.*, 1988), o bien recogiendo los compuestos extraídos sobre un líquido adecuado, seguido de una extracción con disolventes (Craig, 1988).

1.8.6.- Extracción con disolventes.

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

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

1.8.6.1.- Extracción discontinua.

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

Bertrand *et al.*, (1978) efectúan la extracción discontinua por agitación en un embudo de decantación de 100 ml de vino con 6 ml de disolvente éter-hexano, 2/1 v/v dos

veces consecutivas, une las fases orgánicas y evapora los disolventes calentando sin ebullición.

1.8.6.2.- Extracción continua.

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

Boidron (1966) ha estudiado sistemáticamente las ventajas de numerosos disolventes: éter etílico-acetona (1/1 v/v), hexano-acetona (2/1 v/v), éter de petróleo, cloroformo, cloruro de metileno y éter-pentano. Propone una primera extracción con pentano durante 200 horas seguida de una segunda extracción con cloruro de metileno (30 horas), indicando que la mezcla azeotrópica éter-pentano extrae una cantidad excesiva de etanol y que el diclorometano es más adecuado para componentes menos volátiles que el 1-propanol.

Terrier (1972) compara el cloruro de metileno, pentano, cloroformo, éter de petróleo y la mezcla éter-pentano, llegando a la conclusión de que los disolventes más adecuados son el diclorometano y el pentano.

El pentano se considera el disolvente más interesante pues extrae muy poco etanol y no forma azeótropos con las sustancias del extracto, lo que permite concentrar la muestra hasta 15000 veces (Cordonnier, 1971). Por el contrario, requiere extracciones en continuo de larga duración (140-240 horas).

La mezcla diclorometano-pentano es citada por muchos autores, ya que presenta la ventaja de reducir considerablemente el tiempo de extracción, pudiendo concluirse en 24 horas. En la bibliografía se encuentran distintas relaciones volumétricas entre ambos disolventes: 1/1 (Drawert y Rapp, 1966), 3/7 (Bertrand, 1968; Gassiot, 1982) ó 2/3 (Usseglio Tomasset, 1969). De ellas, quizás la más empleada es la citada en último lugar.

Más recientemente se ha tendido a utilizar disolventes de bajo punto de ebullición, destacando sobre todo el triclorofluorometano (Freon 11). El Freon 11 se caracteriza por alcanzar elevados rendimientos en la extracción. Sin embargo, tiene la desventaja de

requerir la extracción en cámara fría. Además, no es conveniente su uso debido a su efecto perjudicial sobre la capa de ozono. Marais y Houtman (1979) describen un nuevo método cuantitativo para la determinación de alcoholes y ésteres utilizando este disolvente. Mesías y Ough (1985) comparan el método de extracción destilación con el método de extracción continua con diclorometano y con Freon 11 para el estudio de la fracción volátil de las uvas.

1.9.- Sistemas de detección.

1.9.1.- Generalidades.

El cromatógrafo de gases posee un sistema continuo de detección por el que pasa el gas portador con los solutos separados procedentes de la columna. Su misión es poner de manifiesto el paso de los solutos originando una señal eléctrica que, debidamente amplificada, es registrada o enviada a un microprocesador. El fundamento del detector es medir de forma continua una propiedad física o química del gas que circula a su través. Dependiendo del tipo de detector la propiedad registrada puede ser proporcional a la concentración absoluta del soluto o a su velocidad de flujo. Realiza dos funciones primordiales:

- a) Indicar el momento exacto en que pasa el soluto (o su máxima concentración), definiendo los tiempos de retención para el análisis cualitativo.
- b) Originar una señal proporcional a la cantidad de soluto que pasa a su través, para fines cuantitativos.

1.9.2.- Detector de ionización de llama (F.I.D.).

El detector más ampliamente utilizado es el de ionización de llama (F.I.D.) Realiza medidas absolutas, pero es un método de detección destructivo (se produce la combustión de la muestra) y de tipo universal para sustancias orgánicas, aunque en algunos casos puede hacerse selectivo, y responde a la velocidad de flujo del soluto. Está basado en la relación directa que existe entre la concentración de un gas y la concentración de partículas cargadas (iones positivos, negativos y electrones) existentes en el mismo. Se utiliza una llama de hidrógeno como fuente de ionización de las moléculas orgánicas que fluyen a su través. El detector dispone de un sistema de electrodos, situado el negativo en la base de la llama y el positivo, en forma de cilindro, alrededor de la misma, cargado con +300V. La corriente gaseosa que sale de la columna se mezcla con una corriente de hidrógeno que

entra en el detector donde se produce la combustión. Para soportar la llama se introduce aire por la base del detector. Durante la combustión producida al llegar el compuesto orgánico a la llama, se forman partículas cargadas, lo que origina un flujo de corriente y disminuye la resistencia entre los electrodos. Esta corriente es débil ya que la resistencia de la llama es elevada (10^{12} ohmios), por lo que debe ser amplificada y posteriormente registrada. La magnitud de esta corriente es proporcional al número de especies cargadas que dependen de la naturaleza y velocidad del soluto, y por tanto directamente relacionado con la concentración del mismo.

1.9.3.- Cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM).

El propósito básico del espectrómetro de masas es convertir la muestra del problema en productos medibles, que indican la molécula original. En este método, el "reactivo" que inicia la reacción es un haz de electrones de alta energía (unos 70 V). Los productos formados son poco corrientes (iones positivos gaseosos) cuyas masas y abundancias relativas muestra el espectrómetro de masas.

El corazón de éste es la fuente iónica. La presión de fondo (presión sin la muestra problema) de la muestra es normalmente inferior a 10^{-7} torr. Los electrones que actúan como proyectiles son expulsados por un filamento incandescente y atraviesan la cámara iónica en dirección de un ánodo situado en el lado opuesto. La corriente de moléculas de problema vaporizadas que entra en la fuente iónica interactúa con el haz de electrones formando una variedad de productos, entre los cuales hay iones positivos. Éstos se ven obligados a salir de la fuente iónica por un potencial de "repulsión" (o de "extracción), relativamente pequeño, y entonces son acelerados por la gran diferencia de potencial entre los electrodos. A las placas de "repulsión" o de "enfoco de iones" pueden aplicarse potenciales bajos para producir un haz bien definido de iones positivos, de la misma forma que se enfoca el rayo de luz en un espectrofotómetro. La mayor parte de las moléculas de problema y de los productos de los impactos electrónicos es eliminada continuamente por bombas de vacío conectadas a la envoltura de la fuente iónica. El haz iónico que sale colimado de ésta puede dividirse según las masas respectivas (en realidad, relación de carga a masa, m/z) de los iones por una variedad de técnicas (deflexión magnética, radiofrecuencia, resonancia en ciclotrón, enfoque coloidal). Los iones positivos que chocan con el colector producen una corriente de electrones proporcional a la abundancia iónica, y esta corriente puede medirse con gran precisión y sensibilidad. La amplificación de la señal iónica de un multiplicador electrónico puede permitir la detección de un solo ión llegado al colector. Así, aunque la eficacia de la ionización y transmisión del espectrómetro de masas

es de sólo un ión llegado al colector por cada 10^6 moléculas de muestra, pueden obtenerse excelentes resultados partiendo de submicrogramos de muestra.

Estos iones se detectan y someten a un tratamiento de datos para ofrecer un espectro de masas que, en realidad, es un histograma de abundancia relativa de los diferentes iones producidos, clasificados según su relación m/z . Potentes sistemas informáticos, con amplia memoria, comparan estos espectros con los introducidos previamente (de 40000 a 140000) y se ofrece la identificación del compuesto con una determinada probabilidad. Las dos librerías de datos empleadas en la actualidad son la NIST y la WILEY, que presentan varias entradas para un mismo componente con las pequeñas variaciones que puede presentar su espectro de masas.

Es de destacar la elevada fiabilidad a la hora de asignar los picos cromatográficos a un compuesto determinado, de modo que se dispone de un detector que nos permite conocer, de un modo más seguro, los componentes de la fracción volátil del vino. Por otra parte, también hay que hacer notar la elevada sensibilidad de los espectrómetros de masas respecto a los detectores convencionales de cromatografía de gases, pudiendo confirmar la presencia de una sustancia que se encuentra presente en cantidades de trazas. Esta ventaja hace que, hoy en día, el empleo de EM-CG sea la técnica más empleada a la hora de efectuar estudios cualitativos de la fracción volátil de los vinos.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1.- Levaduras

Se han empleado levaduras tanto secas activas como a partir de cultivos frescos que se pueden agrupar en dos clases en función de su capacidad fermentativa:

a) Levaduras de bajo poder fermentativo. Son mayoritarias en las primeras fases de la fermentación espontánea de los mostos de esta zona.

- *Kloeckera apiculata*, cepa salvaje aislada, identificada y seleccionada en trabajos anteriores por nuestro grupo de investigación, a partir de un mosto de la misma variedad y zona que el utilizado en el trabajo.

- *Hanseniaspora uvarum*, cepa salvaje aislada, identificada y seleccionada en trabajos anteriores por nuestro grupo de investigación, a partir de un mosto de la misma variedad y zona que el utilizado en el trabajo.

b) Levaduras de elevado poder fermentativo. Son las levaduras responsables de finalizar la fermentación, encontrándose de forma casi exclusiva en los periodos medio y final de la fermentación.

- *Saccharomyces cerevisiae*, cepa salvaje aislada, identificada y seleccionada en trabajos anteriores por nuestro grupo de investigación, a partir de un mosto de la misma variedad y zona que el utilizado en el trabajo.

- *Saccharomyces cerevisiae*, cepa L-2226 seleccionada por el C.I.C.D.R.U.T. Avignon y comercializada por LALVIN® Lallemand Inc., Montreal H1W 2N8, Canadá.

- *Saccharomyces cerevisiae*, cepa V seleccionada por ICV(KI) y INRA, Montpellier y comercializada por LALVIN® Lallemand Inc., Montreal H1W 2N8, Canadá.

- *Saccharomyces cerevisiae*, cepa comercializada por la Compañía General de Levaduras (CGL) y destinada al uso en panificación.

- *Saccharomyces bayanus*, cepa T73, seleccionada por el Dpto. de Microbiología de la Facultad de CC. Biológicas de la Universidad de Valencia y comercializada por LALVIN® Lallemand Inc., Montreal H1W 2N8, Canadá.

2.2.- Medios de cultivo.

a) Agar extracto de malta 2%

- Extracto de malta (Difco)	20 g
- Glucosa (Panreac)	20 g
- Peptona micológica (Oxoid)	1 g
- Agar	20 g
- Agua destilada	1000 ml

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

b) Medio para la fermentación de carbohidratos

- Extracto de levadura (Difco)	2.50 g
- Peptona micológica (Oxoid)	7.50 g
- Azul de bromotimol (Panreac)	0.04 g
- Agua destilada	1000 ml

Se ajusta el pH 6.8 y se distribuyen 4 ml en tubos de ensayo incluyendo campanas Dürham. Se esteriliza a 121°C 20 minutos y se añaden, en condiciones estériles, 2 ml de una solución estéril al 6% del azúcar problema (12% en el caso de la rafinosa).

c) Yeast Peptone Dextrose (YPD)

- Extracto de levadura (Difco)	10 g
- Peptona micológica (Oxoid)	20 g
- Glucosa (Panreac)	20 g
- Agua destilada	1000 ml

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

2.3.- Identificación de las levaduras.

Las identificaciones se realizaron a dos niveles:

1. Las levaduras de bajo poder fermentativo se distinguían de las de alto poder

fermentativo en la morfología de las colonias crecidas sobre placas de agar-extracto de malta durante 7 días a 28°C. Las diferencias entre ambos tipos de colonias son;

- a) Colonias de flora apiculada: Colonias planas, de contorno irregular y coloración gris más claro en el borde.
- b) Colonias del género *Saccharomyces*: Colonias globosas, de contorno circular perfecto y coloración crema brillante.

2. Dentro de las levaduras de alto poder fermentativo se procedió a identificar las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus*, de acuerdo con los criterios expuestos por Kreger van Rij (1984). En la tabla 2.1.1 se puede apreciar que ambas variedades de levaduras únicamente se diferencian en la fermentación del monosacárido galactosa. Dado el gran número de muestras a analizar se optó por seguir los criterios descritos por Suárez e Iñigo (1990).

	Fermentación					
	Ga	Sa	Ma	Ra	Me	Al
<i>Saccharomyces bayanus</i>	-	+	+	+	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+	-	-

Tabla 2.2.1.- Fermentación de diversos azúcares por parte de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus* (Ga = galactosa, Sa = sacarosa, Ma = maltosa, Ra = rafinosa, Me = melibiosa, Al = almidón).

2.4.- Determinación del factor *killer*.

Los tres fenotipos referentes al factor *killer* de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* fueron descubiertos por Bevan y Makower (1963). Las levaduras *killer* (fenotipo K⁺R⁺), matan a las sensibles (fenotipo K⁻R⁻) al segregar una toxina proteica al medio (Woods y Bevan, 1968) ante la cual ellas mismas son inmunes. Las levaduras neutras (fenotipo K⁻R⁺) son inmunes a la toxina y no matan a las levaduras sensibles. Más tarde se descubrieron cepas *killer*-sensibles. Estas cepas eran inmunes a sus propias toxinas pero sensibles ante toxinas de otras cepas *killer* (Van Vuuren y Jacobs, 1992).

La producción de factor *killer* es mayor en medio con peptona y extracto de carne o levadura, y con poca agitación. Por tanto las pruebas de producción y resistencia a la

toxina se realizaron en medio YPD al cual se le añade agar (25 g/l), (ver apartado 2) tamponado a pH 4.5 con tampón citrato-fosfato. Para establecer las comparaciones se utiliza una cepa control sensible a la toxina (cepa S288C proporcionada por la C.E.C.T.) y otra cepa control productora de factor *killer*. Se siembran céspedes con ambas cepas sobre placas del medio de cultivo citado anteriormente y se hacen sobre ellos estrías con las cepas problema, comprobando a los 6 días si existen o no halos de inhibición sobre el césped de la cepa sensible y si hay inhibición del crecimiento sobre el césped de la cepa *killer*.

2.5.- Mosto.

El mosto utilizado proviene de uvas de la variedad Monastrell cultivadas en la D.O. Jumilla durante la campaña 1990/91 y con un contenido inicial de azúcares reductores de 296 g/l. Se conservó congelado a -20°C hasta el momento de realizar las distintas experiencias planificadas.

Para obtener el mosto estéril empleado en las experiencias se procedió, en primer lugar, a centrifugar el mosto a 10.000 rpm 10 minutos a fin de eliminar las partículas sólidas en suspensión y reducir la carga microbiana. A continuación, se esterilizó el mosto con ayuda de un equipo de filtración compuesto por un filtro de tierras seguido por otros de tamaño de poro menor (hasta 0.22 µm) y una bomba de vacío.

La correcta esterilización del mosto se comprobó por siembra de 0.1 ml sobre placas de Agar Malta, no observándose crecimiento en ningún caso tras una semana de incubación a 28°C.

2.6.- Inoculaciones

En todos los casos, el inóculo se ha obtenido a partir de cultivos de levaduras crecidos en agitación 24 horas en medio YPD a 28°C; si partimos de levaduras secas activas, previamente se ha procedido a una hidratación de las células en solución salina 0.9% durante 48 horas a 28°C. Para determinar el número de células en los cultivos se realizaron recuentos de totales en cámara cuentaglobulos, comprobándose los resultados por siembra de diluciones sucesivas en placas de agar malta.

Las distintas experiencias realizadas han sido:

1.- Experiencias con mosto fresco.

a) Análisis de la evolución de la formación de los distintos componentes de la fracción volátil a lo largo de una fermentación espontánea a nivel de laboratorio. En este caso, hemos puesto a fermentar el mosto en las condiciones empleadas sin añadir ninguna levadura, empleando esta experiencia como referencia para el resto de fermentaciones. En esta experiencia realizaremos un seguimiento del consumo de azúcares reductores y de la evolución de la población levaduriforme principal a lo largo del tiempo que dure el proceso

b) Estudio de la cinética de fermentación y formación de los componentes volátiles estudiados en mostos inoculados con las levaduras T73, L2226, V y CGL, ensayándose aportes de 10^5 , 10^6 y 10^7 células/ml. Se emplean estas levaduras por ser, en el caso de las tres primeras, levaduras seleccionadas comercializadas para realizar la fermentación alcohólica de mostos y de fácil adquisición, mientras que la cepa CGL, a pesar de estar indicada para su uso en panadería, su uso ha conducido a la obtención de resultados satisfactorios por parte de algunos autores (Suarez e Iñigo, 1990). Las concentraciones de inóculo se encuentran dentro de los límites en que se encuentra la población levaduriforme total al inicio de la fermentación; no se emplean las indicaciones de la empresa distribuidora porque (10-15 g/hl) porque ignoramos la viabilidad de las levaduras dentro del envase en que se distribuyen, de modo que se haría difícil un control sobre el aporte microbiano real.

2.- Experiencias con mosto estéril

a) Estudio del aporte a la fracción volátil de cultivos puros de las levaduras *Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae* salvaje, *Saccharomyces cerevisiae* cepa L-2226 y *Saccharomyces bayanus* cepa T73. Para ello se hacen inóculos de 10^6 células/ml y se determinan los componentes de la fracción volátil a día 21 de fermentación, al tiempo que se va a seguir el consumo de azúcar y la evolución de la población a lo largo del periodo de tiempo considerado.

b) Estudio de la fracción volátil producida por distintos cultivos iniciadores mixtos. Las mezclas ensayadas se muestran en la Tabla 2.2.2.

Las muestras M1 y M2 tienden a imitar, de forma simplificada, las proporciones iniciales en las que se encuentran las levaduras de forma espontánea en un mosto al comienzo de la fermentación. La diferencia entre ellas radica en que M1 posee como levadura de alto poder fermentativo mayoritaria una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*

autóctona seleccionada a partir de un mosto de la misma variedad y zona que el empleado, y M2 posee la levadura seleccionada L-2226 no perteneciente a la zona de origen del mosto. M3 tiende a imitar una inoculación masiva con la levadura seleccionada T73, M4 lo mismo con la levadura seleccionada L-2226 y M5 con la cepa salvaje. De todas las mezclas efectuadas se extrajeron muestras a los días de fermentación 1, 2, 4, 7, 10, 15 y 21, a partir de las cuales se realizaron recuentos de viables, identificación de las cepas levaduriformes presentes y determinación de azúcares reductores.

Porcentaje de levadura / Mezcla	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5
<i>Kloeckera apiculata</i>	47.5	47.5	5	5	5
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	47.5	47.5	5	5	5
<i>Saccharomyces bayanus</i> (T73)	1	1	89	5	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (L2226)		4		85	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Autóctona)	4		1		90

Tabla 2.2.2.- Composición de los distintos cultivos mixtos empleados en la fermentación de mosto estéril.

2.7.- Fermentaciones.

En todos los casos se ha procedido a fermentar 500 ml de mosto en recipientes de 1000 ml esterilizados por calor; las fermentaciones han tenido lugar a 21°C.

La parada en la fermentación en aquellas muestras que así lo requieren se ha efectuado por centrifugación a 10000 rpm 10 minutos 0°C y congelación a -20°C, observándose una completa solidificación del medio al cabo de 30 minutos.

Como experiencia control se ha efectuado una fermentación espontánea en las condiciones ya indicadas, tomando muestras en los días 0, 1, 2, 4, 7, 10, 15 y 21 de fermentación.

2.8.- Valoración de los azúcares reductores.

Para la valoración de los azúcares reductores se utiliza el método descrito por Amerine *et al.* (1972). La solución de Fehling consiste en una disolución alcalina de ión cúprico (Cu^{2+}) acomplejada con ión tartrato. Así, el carbono carboxílico se oxida a ión carbonato y el ión cúprico se reduce a ión cuproso (Cu_2O) que precipita en forma de un sólido de color rojo ladrillo.

Se colocan en un matraz 10 ml de reactivo de Fehling A, 10 ml de reactivo de Fehling B, 5 ml de una disolución de ferrocianuro potásico al 10% y 25 ml de agua destilada, colocándolo sobre una fuente de calor hasta alcanzar la ebullición, momento en el cual se comienza a añadir, con ayuda de una bureta, la muestra, que debe contener 2-5 g/l de azúcares valorables. El momento de la valoración viene indicado por el cambio de color de la mezcla desde azul intenso a amarillo oro.

2.9.- Extracción de la fracción volátil.

La extracción de los componentes volátiles se efectúa por un procedimiento análogo al descrito por Rapp *et al.* (1976) y por Usseglio Tomasset y Di Stefano (1980), utilizando un extractor líquido-líquido continuo (Afora, ref. 5156) y empleando como mezcla extractora la formada por diclorometano y pentano en una relación volumétrica 2:3.

Una vez descongeladas las muestras, se les añade CINa 8% para disminuir la solubilidad en el agua de las sustancias poco polares (Lamikanra, 1987) y se le añade 0.1 ml de una disolución etanólica 1% de 4-metil-2-pentanol como patrón interno. Durante la extracción, el baño se mantiene a 50°C y el proceso se mantiene 24 horas.

El extracto obtenido se deseca sobre sulfato sódico anhidro, se filtra y se concentra por evaporación con ayuda de una columna Vigreux hasta un volumen final de 1 ml, guardándose a -20°C hasta el momento del análisis cromatográfico.

2.10.- Análisis cromatográfico.

Se emplea un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Series II equipado con detector de ionización de llama (F.I.D.). Como gas portador se emplea He 99.998% puro (SEO). La señal cromatográfica es analizada en un ordenador personal Hewlett Packard Vectra QS/16S mediante el software HP 3365 (Alice).

Se ha utilizado una columna HP 20M (Carbowax 20M) de 50 m de longitud y 0.2 mm de diámetro interno, con un espesor de fase de 0.2 μm .

Las condiciones cromatográficas empleadas han sido:

- Temperatura inicial 60°C
- Tiempo inicial 5 minutos
- Gradiente de temperatura 2.5 °C/minuto
- Temperatura final 190°C
- Tiempo final 22 minutos
- Discriminación de flujo 1:50
- Presión cabeza de columna 138 KPa (20 Psi)
- Temperatura inyector 250°C
- Temperatura detector 250°C
- Flujo de aire 400 ml/minuto
- Flujo de hidrógeno 30 ml/minuto
- Make-up 30 ml/minuto
- Volumen inyección 0.5 μl

2.11.- Identificación de los compuestos volátiles.

La identificación de los componentes de la fracción volátil del vino se efectúa por:

- Estudio comparativo de los valores de tiempo de retención relativos (TRR) respecto a patrones. Como componente de referencia se emplea, siempre que es posible, la γ -butirolactona, por aparecer en la zona intermedia de los cromatogramas y no solapar con ningún otro pico. Cuando no es posible, se utiliza como referencia el patrón interno.

- Estudio por espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (EM-CG). Hemos empleado los espectrómetros de masas Concept H de la marca Kratos y el Mat-9S de la casa Finnigan acoplados a un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 Series II y equipado con una columna capilar Carbowax 20M de 50 m de longitud y 0.2 mm de diámetro interno, con un espesor de fase de 0.2 μm . Las condiciones cromatográficas son las indicadas anteriormente.

2.12.- Cuantificación de los compuestos volátiles

La cuantificación de los componentes de la fracción volátil del vino se efectúa por el método del patrón interno, comprobándose los resultados por interpolación en rectas de calibrado obtenidas por análisis cromatográfico del resultado de la extracción de disoluciones patrón que contiene cantidades conocidas de los distintos compuestos estudiados y que siempre se encuentran dentro de los límites de concentración que para ellos se han propuesto en el vino.

En el primer caso, es necesario conocer los factores de respuesta cromatográficos, que se calculan a partir de los cromatogramas obtenidos por inyección de las disoluciones patrón según la expresión

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

donde

Fr_i = Factor de respuesta cromatográfico del componente i

C_i = Concentración del componente i

C_{pi} = Concentración del patrón interno

A_i = Área cromatográfica del componente i

A_{pi} = Área cromatográfica del patrón interno.

Conocido el factor de respuesta respecto al patrón interno, las concentraciones de cada componente en las muestras problema se calculan mediante la expresión

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

2.13.- Determinación de la repetitividad de las experiencias.

Se efectúan dos experiencias de extracción, en idénticas condiciones, para cada muestra, haciéndose tres análisis cromatográficos de cada extracto. Para cada componente se expresa el valor medio entre las distintas experiencias, indicándose la variabilidad por medio del coeficiente de variación.

2.14.- Tratamiento estadístico de los datos.

Para realizar la normalización de las concentraciones, aplicar las ecuaciones de cuantificación, calcular medias y coeficientes de variación y presentar los datos tanto en tablas como en gráficas se ha utilizado el programa MICROSOFT EXCEL 3.0. Los coeficientes de variación se calcularon mediante la expresión:

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

Las matrices de distancias para la realización de los análisis de agrupamiento se realizaron mediante el programa estadístico STATGRAPHICS v. 4.2 (STSC Inc. y Statistical Graphics Corp.) y los árboles fueron efectuados mediante el programa NTSYS-pc v. 1.5 (Applied Biostatistics Inc.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis de la fracción volátil.

3.1.1.- Identificación de los componentes de la fracción volátil.

3.1.1.1.- Identificación por tiempos de retención relativos.

Para identificar los distintos compuestos volátiles en cada una de las muestras estudiadas se procedió, por una parte, a calcular los tiempos de retención relativos respecto al patrón interno (4-metil-2-pentanol) y la γ -butirolactona. Este compuesto fue escogido por encontrarse en la zona media del cromatograma. En la Tabla 3.1.1 se pueden observar los intervalos de tiempos de retención relativos calculados para cada compuesto.

3.1.1.2.- Identificación por CG-EM.

Como segundo criterio de identificación se usó la cromatografía de gases asociada a la espectrometría de masas. En la Tabla 3.1.1 se muestra el número de cada compuesto identificado en las librerías en las que se encontró, así como la probabilidad de identificación correcta. El acetato de butilo y el 1-decanol no se identificaron por este método, únicamente se usó para estos dos compuestos el método de comparación de los tiempos de retención relativos. En la Figura 3.1.1 se muestra la situación de todos los componentes estudiados en los cromatogramas.

3.1.2 Cuantificación de los componentes de la fracción volátil.

3.1.2.1.- Cálculo de los factores de respuesta cromatográficos.

En la Tabla 3.1.2 se muestran los valores de los factores de respuesta cromatográficos de todos los componentes estudiados, calculados según se describe en Material y Métodos. Para acetona, 1-propanol, dioles, acetato de 1,2-propanodiol y, sobre todo glicerol, se obtienen valores muy elevados debido a que su elevada polaridad hace que la extracción por el procedimiento empleado sea muy baja.

3.1.2.2.- Cuantificación mediante rectas de calibrado.

Para la cuantificación de los compuestos identificados se construyeron las rectas de calibrado para cada uno de ellos a partir de cuatro disoluciones patrón con

concentraciones crecientes de cada uno de los compuestos a cuantificar que siempre se encuentran dentro de los márgenes de concentración en que dichos compuestos se encuentran presentes en el vino. Estas expresiones de cuantificación se muestran en la Tabla 3.1.2. En aquellas expresiones en que no aparece ordenada en el origen es debido a que su valor era despreciable frente a la concentración obtenida.

Tabla 3.1.1.- Criterios de identificación de los componentes de la fracción volátil.

	COMPONENTE	Librería Willey		Librería Nist		TRR1		TRR2	
		Número	Prob.	Número	Prob.	min.	max.	min.	max.
1	Acetona	67328	70	93	83.6	0.500	0.503	0.185	0.187
2	Acetato de etilo	68204	70	764	82.2	0.538	0.540	0.200	0.201
3	2,4-Dimetil-1,3-dioxolano			2939	82.0	0.590	0.591	0.219	0.221
4	Isobutirato de etilo	69709	94	2893	80.6	0.633	0.635	0.235	0.236
5	Acetato de propilo	68955	35			0.663	0.664	0.245	0.247
6	Acetato de isobutilo	3498	92			0.674	0.677	0.250	0.251
7	1-Propanol	64708	92	124	87.3	0.699	0.701	0.259	0.261
8	Butirato de etilo	69728	93	2890	94.1	0.748	0.748	0.277	0.280
9	Isovaleriato de etilo	5677	91			0.774	0.776	0.286	0.290
10	Isobutanol	67741	98	323	87.5	0.806	0.808	0.300	0.304
11	Acetato de butilo					0.843	0.846	0.312	0.315
12	Acetato de isoamilo	70671	92			0.902	0.905	0.334	0.337
13	1-Butanol	67751	94	322	85.1	0.926	0.927	0.343	0.345
pi	4-Metil-2-pentanol	1987	82	1601	88.6	1.000	1.000	0.370	0.372
14	Alcohol isoamílico	1021	92			1.188	1.190	0.437	0.439
15	Hexanoato de etilo	71814	93	7237	93.8	1.257	1.260	0.468	0.471
16	Alcohol amílico	68297	68			1.266	1.269	0.471	0.473
17	Isobutirato de isoamilo	84887	64	10299	86.6	1.338	1.341	0.497	0.499
18	Acetato de hexilo	71816	92	7253	87.4	1.377	1.383	0.512	0.515
19	Isovaleriato de isoamilo	73691	35			1.509	1.512	0.560	0.564
20	Lactato de etilo	80795	89			1.599	1.600	0.595	0.598
21	1-Hexanol	69043	92	1609	85.8	1.648	1.650	0.613	0.615
22	trans 3-Hexen-1-ol	68836	64			1.682	1.685	0.625	0.627
23	cis 3-Hexen-1-ol	68832	59			1.757	1.758	0.653	0.655
24	4,5-Dimetil-1,3-dioxolano	46579	60	37860	82.5	1.859	1.863	0.690	0.691
25	Octanoato de etilo	73112	93	13494	94.4	1.992	1.995	0.740	0.743
26	1-Heptanol	69827	90			2.036	2.039	0.756	0.759
27	Hexanoato de isoamilo			16589	86.9	2.102	2.104	0.781	0.784
28	2,4-dimetil-3-pentanona	69590	25			2.113	2.118	0.785	0.790
29	Octanoato de isoamilo	75354	91			2.169	2.172	0.805	0.809
30	Benzaldehído	69177	60			2.229	2.230	0.827	0.829
31	3-Hidroxibutirato de etilo	70860	93	5058	90.9	2.262	2.265	0.840	0.843
32	Linalool	11229	99			2.301	2.301	0.853	0.856
33	1-Octanol	70777	93			2.323	2.323	0.861	0.864
34	treo-2,3-Butanodiol	68345	92	852	65.9	2.378	2.381	0.884	0.886
35	Ácido isobutírico	68189	94	763	89.3	2.424	2.426	0.897	0.900

TRR1 = Tiempo de retención relativo respecto al patrón interno.

TRR2 = Tiempo de retención relativo respecto a la γ -butirolactona.

Tabla 3.1.1 (cont.).- Criterios de identificación de los componentes de la fracción volátil.

	COMPONENTE	Librería	Wiley	Librería	Nist	TRR1		TRR2	
		Número	Prob.	Número	Prob.	min.	max.	min.	max.
36	<i>eritro</i> -2,3-Butanodiol	68345	89	849	85.1	2.435	2.438	0.905	0.909
37	1,2-Propanodiol	482	93			2.494	2.499	0.926	0.929
38	γ -Butirolactona	68038	94			2.689	2.691	1.000	1.000
39	N-Etlacetamida	910	94			2.739	2.743	1.019	1.019
40	1-Metoxi-2-butanol	2122	55	1723	87.0	2.776	2.780	1.031	1.034
41	Decanoato de etilo	23502	92	19464	93.4	2.803	2.807	1.039	1.043
42	Ácido isovaleriánico	1915	70	1552	81.3	2.866	2.872	1.063	1.065
43	Succinato de dietilo	16521	93	13777	95.0	2.971	2.974	1.102	1.105
44	α -Terpineol	72591	99			3.007	3.009	1.116	1.120
45	9-Decenoato de etilo	23031	70			3.026	3.030	1.123	1.126
46	3-Metiltio-1-propanol	2206	97			3.051	3.055	1.133	1.138
47	Diacetato de 1,2-propanodiol	12619	35	10575	71.6	3.140	3.145	1.165	1.170
48	1-Decanol					3.219	3.220	1.197	1.200
49	Acetato de 2-fenetilo	73204	89	11549	81.8	3.453	3.456	1.281	1.284
50	Ácido hexanoico	69694	92	2881	90.9	3.506	3.509	1.301	1.305
51	Dodecanoato de etilo	30549	94			3.538	3.540	1.312	1.315
52	Alcohol bencílico	69274	99	1913	82.0	3.556	3.556	1.319	1.321
53	Isobutirato de 2-fenetilo			17662	90.6	3.586	3.590	1.333	1.335
54	Decanoato de isoamilo	33532	90			3.602	3.605	1.343	1.344
55	2-Feniletanol	70180	94	3513	80.4	3.672	3.675	1.364	1.366
56	β -Ionona	21270	92			3.901	3.905	1.446	1.448
57	Ácido octanoico	8653	92	7277	86.8	4.235	4.239	1.571	1.573
58	Malato de dietilo			17211	71.9	4.512	4.513	1.673	1.678
59	Ácido decanoico	73687	96	13508	88.4	4.667	4.671	1.731	1.736
60	Amilbenzaldehído			14344	58.4	4.758	4.758	1.764	1.770
61	Glicerol			881	75.0	4.832	4.835	1.792	1.797
62	Benzoato de 2-fenetilo			24754	79.7	5.087	5.089	1.887	1.892

TRR1 = Tiempo de retención relativo respecto al patrón interno.

TRR2 = Tiempo de retención relativo respecto a la γ -butirolactona.

Figura 3.1.1.- Cromatograma obtenido del análisis cromatográfico del extracto de la fracción volátil del vino. Los números indican la posición de cada componente en el cromatograma.

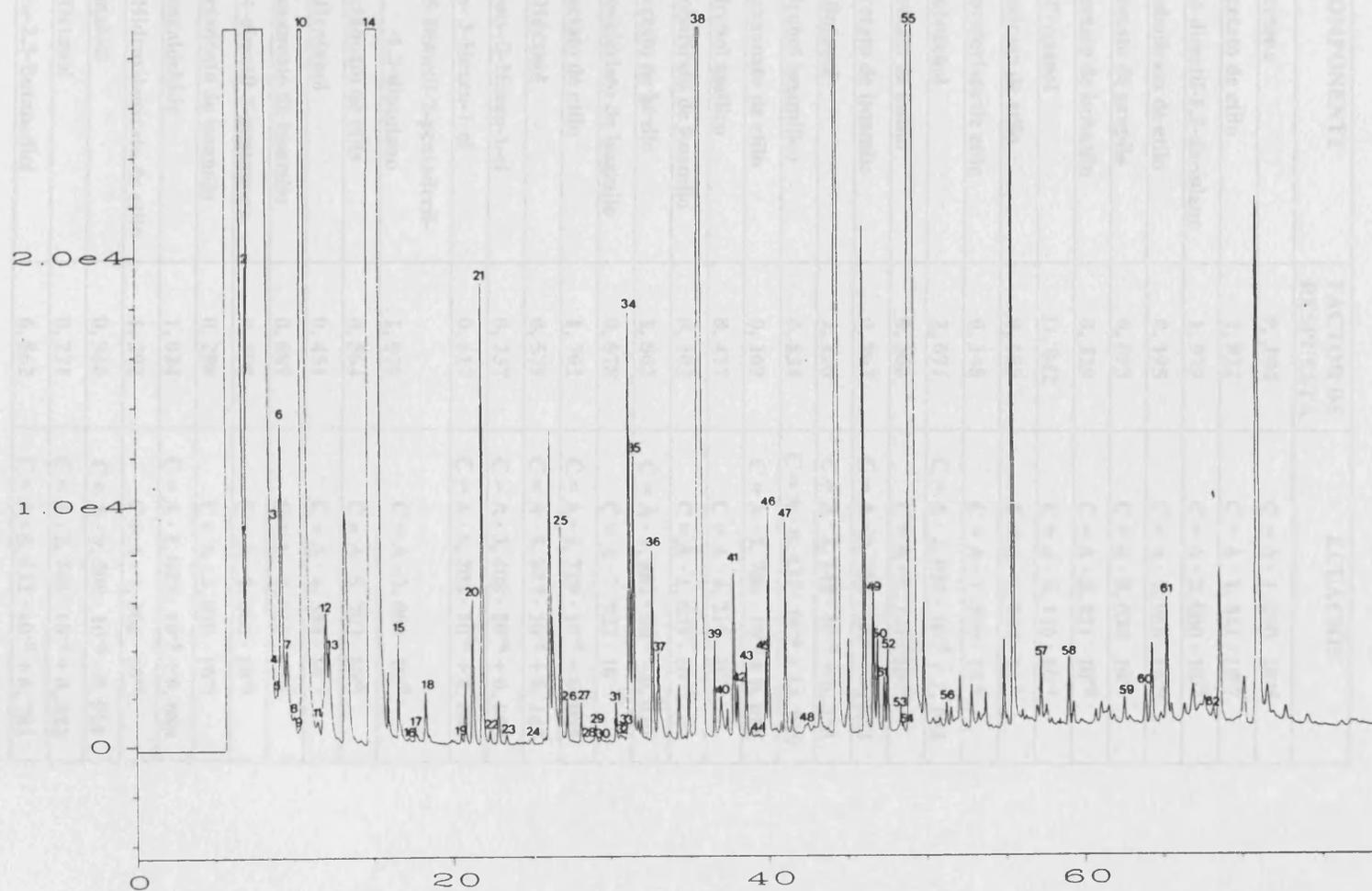


Tabla 3.1.2.- Factor de respuesta y ecuación de cuantificación para cada componente estudiado.

n °	COMPONENTE	FACTOR DE RESPUESTA	ECUACIÓN
1	Acetona	9, .894	$C = A \cdot 1, 000 \cdot 10^{-4}$
2	Acetato de etilo	1, 822	$C = A \cdot 1, 841 \cdot 10^{-5}$
3	2,4-dimetil-1,3-dioxolano	1, 979	$C = A \cdot 2, 000 \cdot 10^{-5}$
4	Isobutirato de etilo	0, 195	$C = A \cdot 1, 968 \cdot 10^{-6}$
5	Acetato de propilo	0, 095	$C = A \cdot 9, 634 \cdot 10^{-7}$
6	Acetato de isobutilo	0, 328	$C = A \cdot 3, 311 \cdot 10^{-6}$
7	1-Propanol	11, 042	$C = A \cdot 1, 116 \cdot 10^{-4}$
8	Butirato de etilo	0, 189	$C = A \cdot 1, 910 \cdot 10^{-6}$
9	Isovaleriato de etilo	0, 148	$C = A \cdot 1, 500 \cdot 10^{-6}$
10	Isobutanol	2, 071	$C = A \cdot 2, 094 \cdot 10^{-5} + 7, 103$
11	Acetato de butilo	0, 566	$C = A \cdot 5, 721 \cdot 10^{-6}$
12	Acetato de isoamilo	0, 962	$C = A \cdot 9, 725 \cdot 10^{-6} + 0, 253$
13	1-Butanol	2, 126	$C = A \cdot 2, 149 \cdot 10^{-5} + 0, 355$
14	Alcohol isoamílico	0, 834	$C = A \cdot 8, 432 \cdot 10^{-6} + 14, 029$
15	Hexanoato de etilo	0, 169	$C = A \cdot 1, 706 \cdot 10^{-6} + 0, 019$
16	Alcohol amílico	0, 417	$C = A \cdot 4, 216 \cdot 10^{-6}$
17	Isobutirato de isoamilo	0, 103	$C = A \cdot 1, 039 \cdot 10^{-6}$
18	Acetato de hexilo	1, 862	$C = A \cdot 1, 882 \cdot 10^{-5} - 0, 020$
19	Isovaleriato de isoamilo	0, 078	$C = A \cdot 7, 922 \cdot 10^{-7}$
20	Lactato de etilo	1, 701	$C = A \cdot 1, 719 \cdot 10^{-5} + 0, 085$
21	1-Hexanol	0, 579	$C = A \cdot 5, 847 \cdot 10^{-6} + 0, 143$
22	<i>trans</i> - 3-Hexen-1-ol	0, 337	$C = A \cdot 3, 408 \cdot 10^{-6} + 0, 005$
23	<i>cis</i> - 3-Hexen-1-ol	0, 617	$C = A \cdot 6, 203 \cdot 10^{-6} + 0, 009$
24	4,5-Dimetil-2-pentadecil- -1,3-dioxolano	1, 979	$C = A \cdot 2, 000 \cdot 10^{-5}$
25	Octanoato de etilo	0, 564	$C = A \cdot 5, 703 \cdot 10^{-6}$
26	1-Heptanol	0, 451	$C = A \cdot 4, 554 \cdot 10^{-6}$
27	Hexanoato de isoamilo	0, 089	$C = A \cdot 9, 010 \cdot 10^{-7}$
28	2,4-dimetil-3-pentanona	0, 198	$C = A \cdot 2, 000 \cdot 10^{-6}$
29	Octanoato de isoamilo	0, 298	$C = A \cdot 3, 010 \cdot 10^{-6}$
30	Benzaldehido	1, 034	$C = A \cdot 1, 045 \cdot 10^{-5} + 0, 088$
31	3-Hidroxibutirato de etilo	1, 292	$C = A \cdot 1, 306 \cdot 10^{-5}$
32	Linalool	0, 940	$C = A \cdot 9, 500 \cdot 10^{-6} - 0, 014$
33	1-Octanol	0, 271	$C = A \cdot 2, 740 \cdot 10^{-4} + 0, 022$
34	<i>treo</i> -2,3-Butanodiol	6, 562	$C = A \cdot 6, 632 \cdot 10^{-5} + 6, 781$

Tabla 3.1.2 (cont.)- Factor de respuesta y ecuación de cuantificación para cada componente estudiado.

n°	COMPONENTE	FACTOR DE RESPUESTA	ECUACIÓN
35	Ácido isobutírico	0,198	$C = A \cdot 2,000 \cdot 10^{-6}$
36	eritro-2,3-Butanodiol	6,562	$C = A \cdot 6,632 \cdot 10^{-5} + 6,781$
37	1,2-Propanodiol	3,408	$C = A \cdot 3,444 \cdot 10^{-5}$
38	γ -Butirolactona	0,121	$C = A \cdot 1,227 \cdot 10^{-6}$
39	N-Etilacetamida	0,099	$C = A \cdot 1,000 \cdot 10^{-6}$
40	1-Metoxi-2-butanol	1,490	$C = A \cdot 1,506 \cdot 10^{-5}$
41	Decanoato de etilo	0,715	$C = A \cdot 7,221 \cdot 10^{-6} - 0,019$
42	Ácido isovaleriánico	0,792	$C = A \cdot 8,000 \cdot 10^{-6}$
43	Succinato de dietilo	1,813	$C = A \cdot 1,832 \cdot 10^{-5} - 0,045$
44	α -Terpineol	0,989	$C = A \cdot 1,000 \cdot 10^{-5}$
45	9-Decenoato de etilo	0,696	$C = A \cdot 7,031 \cdot 10^{-6}$
46	3-Metiltio-1-propanol	0,827	$C = A \cdot 8,536 \cdot 10^{-6} + 0,028$
47	Diacetato de 1,2-propanodiol	19,997	$C = A \cdot 2,021 \cdot 10^{-4}$
48	1-Decanol	1,094	$C = A \cdot 1,106 \cdot 10^{-5}$
49	Acetato de 2-fenitilo	0,441	$C = A \cdot 4,458 \cdot 10^{-6}$
50	Ácido hexanoico	0,494	$C = A \cdot 5,000 \cdot 10^{-6}$
51	Dodecanoato de etilo	0,525	$C = A \cdot 5,309 \cdot 10^{-6} + 0,003$
52	Alcohol bencílico	0,552	$C = A \cdot 5,581 \cdot 10^{-6}$
53	Isobutirato de 2-fenitilo	0,047	$C = A \cdot 4,764 \cdot 10^{-7}$
54	Decanoato de isoamilo	0,377	$C = A \cdot 3,814 \cdot 10^{-6}$
55	2-Feniletanol	0,481	$C = A \cdot 4,861 \cdot 10^{-6}$
56	β -Ionona	0,893	$C = A \cdot 9,027 \cdot 10^{-6}$
57	Ácido octanoico	0,297	$C = A \cdot 3,000 \cdot 10^{-6}$
58	Malato de dietilo	1,979	$C = A \cdot 2,000 \cdot 10^{-5}$
59	Ácido decanoico	0,099	$C = A \cdot 1,000 \cdot 10^{-6}$
60	Amilbenzaldehído	0,495	$C = A \cdot 5,000 \cdot 10^{-6}$
61	Glicerol	9894,000	$C = A \cdot 0,100$
62	Benzoato de 2-fenitilo	0,016	$C = A \cdot 1,269 \cdot 10^{-7}$

C = Concentración en mg/l.

A = Área cromatográfica.

3.2.- Fermentación espontánea del mosto de la variedad Monastrell.

La fermentación alcohólica no puede considerarse únicamente como un proceso por el cual el azúcar del mosto se transforma en etanol y CO₂ por acción de las levaduras. Así, asociada a ésta tiene lugar una evolución en la población levaduriforme que se desarrolla en el medio, pasando, en la elaboración tradicional del vino, de un predominio inicial de las levaduras de bajo poder fermentativo a una presencia casi exclusiva de levaduras del género *Saccharomyces* pocos días después de iniciado el proceso. El desarrollo de los distintos microorganismos va a alterar la composición inicial del mosto por eliminación de algunos componentes y por reacción de otros, además de enriquecerlo con la formación de nuevas sustancias. Estas transformaciones van a incidir fundamentalmente en los rasgos olfativos que serán detectados por el consumidor, de importancia crucial a la hora de apreciar un buen vino.

Aunque no se conoce la sensación provocada para gran parte de los componentes de la fracción volátil del vino, sí se está de acuerdo en que cantidades elevadas de alcoholes superiores provocarán un descenso en su calidad, los polioles van a producir sensación de dulzor y los ésteres etílicos de alto peso molecular (más de 6 átomos de carbono) son elementos deseables del aroma de los vinos, a los que confieren carácter afrutado (Wagener y Wagener, 1968; Lafon Lafourcade, 1983). De esta forma, se puede pensar que la relación entre ésteres totales y alcoholes superiores y la establecida entre el contenido de ésteres etílicos de alto peso molecular y el de alcoholes superiores pueden actuar como indicadores de la calidad aromática de los vinos.

En primer lugar vamos a abordar el estudio de la fermentación espontánea de mosto de la variedad Monastrell, con elevado contenido inicial de azúcares reductores, así como su comportamiento en función a los distintos parámetros mencionados, experiencia que nos servirá como referencia obligada para sucesivos estudios sobre el mismo.

3.2.1.- Evolución de la población levaduriforme.

En la Figura 3.2.1 se muestra el ciclo de crecimiento de las levaduras en el medio durante la fermentación. La población es inicialmente de 10⁶ células/ml, mostrando una corta fase de multiplicación de forma que se alcanza una población de 7.6 x 10⁸ células/ml al cabo de 4 días de fermentación, una fase estacionaria entre los días 4 y 15 y una fase final de declive. La fermentación se caracteriza por un crecimiento y muerte rápida de las

levaduras *Kloeckera apiculata/Hanseniaspora uvarum*, seguido por una fase de predominio de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, la levadura que realmente hace el vino. La levadura *Saccharomyces bayanus* es mayoritaria hacia el final de la fermentación.

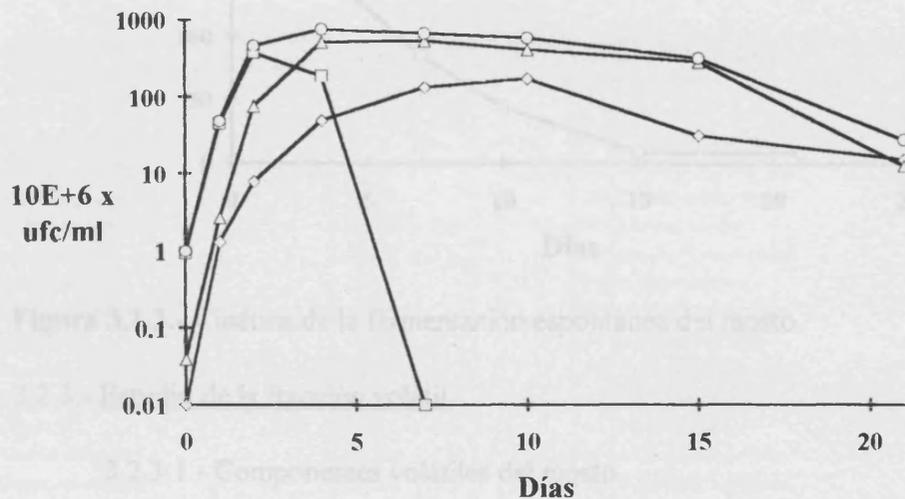


Figura 3.2.1.- Evolución de la población levaduriforme a lo largo de la fermentación (□ *Kloeckera apiculata+Hanseniaspora uvarum*; Δ *Saccharomyces cerevisiae*; ◇ *Saccharomyces bayanus*; O población total).

3.2.2.- Cinética de fermentación.

La fermentación muestra un rápido comienzo con consumo de unos 60 g/l de azúcar durante cada uno de los dos primeros días del proceso, finalizando al cabo de 15 días con una cantidad aproximada de 8.5 g/l de azúcares residuales en el medio (Figura 3.1.2). Esta cantidad de azúcar es elevada para un mosto con contenidos normales de azúcar, pero hay que tener en cuenta que el elevado contenido en etanol del medio al cabo de 21 días va a dificultar o impedir el desarrollo de las levaduras.

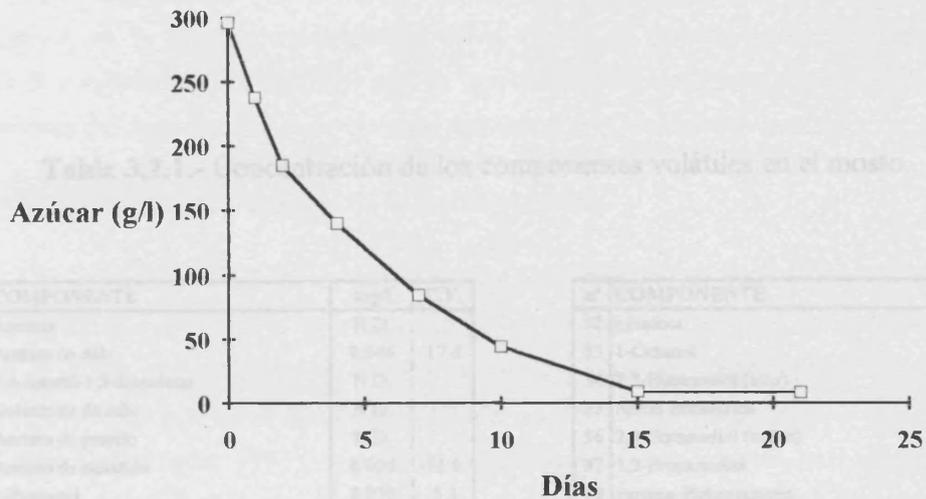


Figura 3.1.2.- Cinética de la fermentación espontánea del mosto.

3.2.3.- Estudio de la fracción volátil.

3.2.3.1.- Componentes volátiles del mosto.

En la Tabla 3.2.1 se muestra el contenido de los diferentes compuestos volátiles estudiados previamente a la realización de las experiencias programadas. En el mosto se detectan, a veces en concentraciones relativamente elevadas, algunos componentes típicos del metabolismo de las levaduras, como algunos alcoholes superiores y ésteres, por lo que, más que atribuir su presencia al aporte varietal de la uva, cabe pensar que ya se había iniciado la fermentación del mosto, probablemente por un estrujado excesivo en el transporte desde el punto de la vendimia hasta la bodega, puesto que una vez allí el mosto fue congelado inmediatamente y el proceso no fue revertido hasta el momento de realizar la diversas experiencias.

Sin embargo, se detectan otros compuestos que si parecen típicos de la variedad de uva empleada, o al menos, se encuentran presente en el mosto y no presentan un incremento apreciable en su concentración a lo largo de la fermentación en ninguna de las experiencias realizadas. Estos compuestos, descritos anteriormente como componentes de la fracción volátil varietal de mostos (Cordonnier, 1971; Schreier, 1979) son los alcoholes C_6 (1-hexanol, *trans*-3-hexen-1-ol, *cis*-3-hexen-1-ol), el acetato de hexilo, los terpenos (linalool y α -terpineol), el benzaldehído y el alcohol bencílico. Otros compuestos, cómo el 4,5-dimetil-2-pentadecil-1,3-dioxolano y el ácido hexanoico, aunque presentan

Tabla 3.2.1.- Concentración de los componentes volátiles en el mosto.

n°	COMPONENTE	mg/l	C.V.	n°	COMPONENTE	mg/l	C.V.
1	Acetona	N.D.		32	Linalool	0.005	11.2
2	Acetato de etilo	0.046	17.8	33	1-Octanol	N.D.	
3	2,4-dimetil-1,3-dioxolano	N.D.		34	2,3-Butanodiol (treo)	7.000	4.7
4	Isobutirato de etilo	N.D.		35	Ácido isobutírico	traz.	
5	Acetato de propilo	N.D.		36	2,3-Butanodiol (eritro)	6.800	6.1
6	Acetato de isobutilo	0.005	11.9	37	1,2-Propanodiol	0.069	6.8
7	1-Propanol	0.970	5.3	38	gamma-Butirolactona	N.D.	
8	Butirato de etilo	N.D.		39	N-Etilacetamida	traz.	
9	Isovalerato de etilo	N.D.		40	1-Metoxi-2-butanol	N.D.	
10	Isobutanol	7.600	6.2	41	Decanoato de etilo	traz.	
11	Acetato de butilo	traz.		42	Acido isovalerianico	traz.	
12	Acetato de isoamilo	0.250	6.7	43	Succinato de dietilo	0.013	2.9
13	1-Butanol	0.380	4.5	44	alfa-Terpineol	0.023	5.6
14	Alcohol isoamílico	14.800	0.9	45	9-Decenoato de etilo	N.D.	
15	Hexanoato de etilo	0.023	7.5	46	3-Metilitio-1-propanol	0.035	6.0
16	Alcohol amílico	traz.		47	Diacetato de 1,2-propanodiol	N.D.	
17	Isobutirato de isoamilo	N.D.		48	1-Decanol	N.D.	
18	Acetato de hexilo	0.650	3.0	49	Acetato de 2-fenitilo	0.014	3.2
19	Isovalerato de isoamilo	N.D.		50	Ácido hexanoico	0.124	3.4
20	Lactato de etilo	0.085	4.8	51	Dodecanoato de etilo	0.015	3.2
21	1-Hexanol	2.530	0.4	52	Alcohol bencilico	0.035	7.1
22	trans-3-Hexen-1-ol	0.033	2.0	53	Isobutirato de 2-fenitilo	traz.	
23	cis-3-Hexen-1-ol	0.035	1.5	54	Decanoato de isoamilo	traz.	
24	4,5-dimetil-2-pentadecil-1,3-dioxolano	0.080	0.7	55	2-Feniletanol	0.210	5.7
25	Octanoato de etilo	traz.		56	beta-Ionona	0.007	9.8
26	1-Heptanol	traz.		57	Ácido octanoico	traz.	
27	Hexanoato de isoamilo	N.D.		58	Malato de dietilo	N.D.	
28	2,4-Dimetil-3-pentanona	N.D.		59	Ácido decanoico	traz.	
29	Octanoato de isoamilo	N.D.		60	Amilbenzaldehido	N.D.	
30	Benzaldehido	0.088	6.4	61	Glicerol	N.D.	
31	3-Hidroxibutirato de etilo	0.008	5.7	62	Benzoato de 2-fenitilo	traz.	

C.V. = Coeficiente de variación.

N.D. = No detectado.

traz. = Trazas.

ligeras, pero significativas variaciones en su concentración a lo largo del proceso fermentativo, ya se encuentran presentes en el mosto en cantidades elevadas (cerca del 50% de la concentración máxima), por lo que también pueden ser considerados como componentes del aroma varietal de las uvas materia prima de nuestro estudio.

3.2.3.2.- Formación de la fracción volátil.

En la Tabla 3.2.2 se muestran las concentraciones de los componentes de la fracción volátil a lo largo de la fermentación, así como sus coeficientes de variación. Es de destacar que las concentraciones finales de todos ellos se encuentran dentro de los intervalos descritos por otros autores para cada uno de ellos (Cordonnier, 1971; Schreier, 1979; Lafon Lafourcade, 1983), aunque la tendencia más generalizada es a situarse en las proximidades de los límites superiores debido al elevado contenido inicial en azúcares que presenta el mosto. A su vez, en la Tabla 3.2.3 se muestra la evolución de cada grupo de compuestos a lo largo de la fermentación espontánea del mosto.

3.2.3.2.1.- Alcoholes superiores.

En las Figuras 3.2.3-3.2.12 se muestran la variación de la concentración de los alcoholes superiores estudiados, así como la evolución de la tasa de formación (dC/dt) a lo largo del periodo de tiempo considerado.

3.2.3.2.1.1.- Alcoholes superiores mayoritarios.

En el caso de los alcoholes superiores mayoritarios, con concentraciones finales superiores a 10 mg/l (1-propanol, isobutanol, alcohol isoamílico y 2-feniletanol), presentan una concentración prácticamente máxima al cabo de 10 días de fermentación; como puede verse, las tasas de formación de estos compuestos es, en el periodo final de la fermentación, cercana a cero o incluso negativa, ya que al final de la fermentación se produce un descenso en la concentración de isobutanol y de alcohol isoamílico). En todos los casos se observa la tasa máxima de formación en el intervalo 2-4 días de fermentación y valores menores en el resto del tiempo, excepto para el isobutanol con tasa elevadas hasta el décimo día de fermentación (Figuras 3.2.3-3.2.6).

Tabla 3.2.2.- Evolución de la concentración de los componentes de la fracción volátil a lo largo de la fermentación espontánea del mosto.

ALCOHOLES

n°	COMPONENTE	T=1		T=2		T=4		T=7		T=10		T=15		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
7	1-Propanol	1.600	1.3	4.900	2.5	8.500	1.9	15.000	13.8	16.000	7.6	16.400	4.1	17.000	17.2
10	Isobutanol	8.500	1.7	10.600	2.5	60.400	0.2	106.000	1.3	152.000	0.8	165.000	0.2	157.000	1.8
13	1-Butanol	0.500	9.3	0.670	2.2	1.300	1.2	2.050	1.3	2.590	0.8	2.640	0.5	2.740	2.0
14	Alcohol isoamílico	15.700	0.7	23.400	0.8	175.000	0.6	247.000	1.5	262.000	0.5	247.000	0.9	219.000	2.0
16	Alcohol amílico	0.014	1.7	0.032	4.4	0.044	5.8	0.058	12.4	0.060	10.0	0.065	3.9	0.067	6.4
21	1-Hexanol	2.482	0.2	2.400	1.7	2.420	0.2	2.400	1.1	2.493	0.2	2.460	3.4	2.430	3.8
22	trans-3-Hexen-1-ol	0.035	0.8	0.037	2.6	0.036	1.3	0.036	2.4	0.034	0.9	0.033	10.4	0.035	4.3
23	cis-3-Hexen-1-ol	0.034	1.1	0.033	2.1	0.033	2.5	0.034	1.1	0.035	3.7	0.034	9.1	0.035	1.9
26	1-Heptanol	traz.		0.007	5.9	0.016	2.2	0.040	2.1	0.078	9.0	0.086	2.5	0.095	10.1
32	Linalool	0.006	3.7	0.004	3.9	0.007	3.9	0.005	7.5	0.010	1.9	0.006	3.0	0.006	2.9
33	1-Octanol	traz.		0.013	4.7	0.037	6.3	0.064	3.0	0.087	1.6	0.096	8.0	0.100	8.5
40	1-Metoxi-2-butanol	0.012	1.0	0.012	3.0	0.032	22.5	0.059	11.5	0.064	7.3	0.070	0.9	0.067	2.3
44	alfa-Terpeneol	0.020	3.6	0.019	5.2	0.022	4.9	0.025	6.8	0.031	7.7	0.035	13.1	0.024	10.4
46	3-Metilitio-1-propanol	0.044	5.1	0.430	4.5	1.320	2.0	1.500	11.8	1.650	3.8	1.740	2.2	1.800	6.8
48	1-Decanol	N.D.		N.D.		0.036	11.3	0.056	7.8	0.068	2.7	0.069	8.2	0.079	10.3
52	Alcohol bencílico	0.029	8.1	0.023	6.6	0.030	0.6	0.025	3.9	0.031	7.0	0.037	7.3	0.035	5.9
55	2-Feniletanol	0.348	1.4	10.000	3.7	59.500	1.0	74.600	0.6	87.300	0.2	89.000	1.1	94.000	2.3

ÁCIDOS ORGÁNICOS

n°	COMPONENTE	T=1		T=2		T=4		T=7		T=10		T=15		T=21	
		mg/l	C.V.												
35	Ácido isobutírico	traz.		traz.		traz.		0.036	12.1	0.044	7.2	0.052	7.4	0.059	1.3
42	Ácido isovaleriánico	traz.		0.006	3.2	0.023	12.0	0.100	16.8	0.116	1.0	0.101	2.4	0.085	0.7
50	Ácido hexanoico	0.130	11.9	0.200	14.2	0.250	12.0	0.270	19.8	0.280	2.8	0.300	8.6	0.310	5.2
57	Ácido octanoico	traz.		0.005	0.2	0.011	5.5	0.024	2.0	0.035	18.9	0.048	4.6	0.059	3.0
59	Ácido decanoico	traz.		traz.		0.005	7.4	0.023	9.3	0.030	10.8	0.023	11.1	0.022	1.1

Tabla 3.2.2 (cont.).- Evolución de la concentración de los componentes de la fracción volátil a lo largo de la fermentación espontánea del mosto.

ÉSTERES

n°	COMPONENTE	T=1		T=2		T=4		T=7		T=10		T=15		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
2	Acetato de etilo	1.020	3.9	0.930	4.7	4.900	7.5	6.200	3.6	25.900	0.5	36.000	5.2	38.300	1.4
4	Isobutirato de etilo	traz.		traz.		0.005	6.3	0.011	8.4	0.045	4.3	0.077	3.2	0.101	5.1
8	Butirato de etilo	traz.		traz.		traz.		0.005	15.1	0.010	12.3	0.009	9.3	0.012	8.4
9	Isovalerato de etilo	traz.		traz.		traz.		traz.		0.007	12.7	0.008	13.0	0.006	6.0
15	Hexanoato de etilo	0.023	10.2	0.050	4.4	0.110	1.5	0.150	11.2	0.175	2.6	0.268	0.8	0.230	2.4
20	Lactato de etilo	0.138	0.7	0.228	1.5	1.110	3.9	4.000	4.3	6.050	0.9	7.000	3.4	7.100	1.9
25	Octanoato de etilo	0.018	0.6	0.031	4.5	0.135	0.8	0.279	1.4	0.470	2.9	0.494	1.1	0.540	8.1
31	3-Hidroxibutirato de etilo	0.014	4.0	0.015	16.8	0.070	15.0	0.108	2.2	0.276	0.4	0.411	0.2	0.460	8.1
41	Decanoato de etilo	0.009	0.7	0.029	2.9	0.230	9.5	0.220	0.9	0.342	1.6	0.336	2.5	0.380	4.9
43	Succinato de dietilo	0.037	1.2	0.091	3.0	0.180	4.0	0.340	4.0	0.730	3.5	0.900	13.2	0.800	11.3
45	9-Decenoato de etilo	0.008	8.8	0.040	9.8	0.157	3.8	0.390	18.9	0.620	3.2	0.846	0.5	0.980	7.6
51	Dodecanoato de etilo	0.031	1.5	0.039	3.8	0.189	2.0	0.216	3.7	0.294	3.8	0.363	0.3	0.340	6.0
58	Malato de dietilo	N.D.		0.031	19.9	0.094	6.6	0.187	1.8	0.290	18.2	0.310	10.2	0.300	4.1
5	Acetato de propilo	traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.	
6	Acetato de isobutilo	0.061	13.5	0.048	12.7	0.140	15.4	0.327	1.4	0.430	6.2	0.490	2.6	0.440	0.8
11	Acetato de butilo	traz.		traz.		traz.		traz.		0.005	9.2	0.007	8.7	0.006	2.0
12	Acetato de isoamilo	0.310	5.0	0.373	1.2	2.320	1.1	7.100	1.2	12.930	0.3	15.340	0.3	16.000	5.0
18	Acetato de hexilo	0.444	1.3	0.451	2.1	0.493	0.3	0.460	6.8	0.450	6.6	0.450	6.8	0.490	5.6
47	Diacetato de 1,2-propanodiol	0.038	5.3	0.035	9.3	0.164	1.5	0.340	0.9	0.420	3.4	0.490	6.2	0.540	5.9
49	Acetato de 2-fenitilo	0.022	0.9	0.022	3.4	0.076	3.7	0.164	0.7	0.215	1.1	0.294	3.2	0.270	8.1
17	Isobutirato de isoamilo	traz.		traz.		0.006	0.9	0.013	2.5	0.016	4.6	0.024	3.8	0.028	5.2
19	Isovalerato de isoamilo	traz.		traz.		traz.		0.006	10.7	0.004	5.7	0.007	0.2	0.008	5.8
27	Hexanoato de isoamilo	traz.		traz.		0.008	0.5	0.018	2.2	0.023	15.1	0.026	5.0	0.026	8.6
29	Octanoato de isoamilo	traz.		0.005	2.6	0.033	3.1	0.062	0.4	0.080	14.7	0.070	0.2	0.063	4.6
53	Isobutirato de 2-fenitilo	traz.		traz.		traz.		traz.		0.006	1.2	0.006	1.2	0.007	0.9
54	Decanoato de isoamilo	traz.		traz.		0.015	0.5	0.050	12.6	0.072	3.1	0.092	4.7	0.100	21.1
62	Benzoato de 2-fenitilo	traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.	

Tabla 3.2.2 (cont.).- Evolución de la concentración de los componentes de la fracción volátil a lo largo de la fermentación espontánea del mosto.

POLIOLES

n°	COMPONENTE	T=1		T=2		T=4		T=7		T=10		T=15		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
34	2,3-Butanodiol (treo)	12.670	0.6	11.300	3.1	138.000	1.5	310.000	8.7	432.000	0.9	539.000	0.6	570.000	3.7
36	2,3-Butanodiol (eritro)	7.000	5.6	6.900	6.8	13.900	0.8	16.100	1.1	18.100	2.3	19.000	2.4	19.000	13.3
37	1,2-Propanodiol	0.104	1.6	0.680	3.7	1.800	3.1	9.200	1.5	21.000	8.1	21.000	4.9	23.000	7.2
61	Glicerol	180.000	6.2	360.000	4.7	1480.000	4.9	3800.000	8.6	5200.000	0.5	5600.000	4.9	6300.000	1.7

OTROS

n°	COMPONENTE	T=1		T=2		T=4		T=7		T=10		T=15		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
1	Acetona	N.D.		1.130	2.7	6.400	7.5	9.100	6.3	10.700	5.4	13.169		13.000	5.3
3	2,4-dimetil-1,3-dioxolano	0.027	8.9	0.082	7.6	0.380	5.4	2.000	8.4	3.000	5.6	3.300	2.9	3.000	6.7
24	4,5-dimetil-2-pentadecil-1,3-dioxolano	0.141	0.3	0.110	2.1	0.135	2.6	0.111	1.7	0.110	3.2	0.108	8.8	0.071	1.1
28	2,4-Dimetil-3-pentanona	traz.		traz.		traz.		0.005	0.4	0.006	15.0	0.005	2.5	0.006	9.1
30	Benzaldehido	0.096	1.2	0.098	3.3	0.093	2.8	0.114	1.7	0.114	0.3	0.112	3.7	0.100	4.7
38	gamma-Butirolactona	traz.		traz.		0.074	0.4	1.060	2.8	2.530	2.2	2.300	5.9	2.230	1.2
39	N-Etilacetamida	traz.		traz.		0.006	7.5	0.038	11.2	0.048	6.7	0.047	4.3	0.047	2.8
56	beta-Ionona	0.015	1.3	0.034	6.2	0.056	6.7	0.080	4.8	0.115	5.2	0.128	0.7	0.133	3.1
60	Amilbenzaldehido	0.011	5.2	0.014	5.1	0.019	7.0	0.055	13.3	0.129	4.4	0.131	6.3	0.122	4.0

C.V. = coeficiente de variación

N.D. = No detectado

traz. = trazas

Tabla 3.2.3.- Evolución de la concentración de los distintos grupos de componentes de la fracción volátil a lo largo de la fermentación espontánea del mosto.

		T=1		T=2		T=4		T=7		T=10		T=15		T=21	
		mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Fracción volátil		51.679		75.542		480.286		817.811		1062.542		1187.683		1193.054	
Componentes constantes		3.146	6.09	3.064	4.06	3.134	0.65	3.099	0.38	3.198	0.30	3.166	0.27	3.154	0.26
Alcoholes superiores	Mayoritarios	26.148	50.60	48.900	64.73	303.400	63.17	442.600	54.12	517.300	48.69	517.400	43.56	487.000	40.82
	Minoritarios	0.014	0.03	0.052	0.07	0.133	0.03	0.218	0.03	0.293	0.03	0.316	0.03	0.341	0.03
	Totales	26.706	51.68	50.052	66.26	306.153	63.74	446.369	54.58	521.833	49.11	522.096	43.96	491.881	41.23
Ácidos orgánicos		0.130	0.25	0.211	0.28	0.189	0.04	0.354	0.04	0.505	0.05	0.534	0.04	0.535	0.04
Ésteres	Acetato de etilo	1.020	1.97	0.930	1.23	4.900	1.02	6.200	0.76	25.900	2.44	36.000	3.03	38.300	3.21
	Etílicos*	0.278	0.54	0.553	0.73	2.280	0.47	5.905	0.72	9.310	0.88	11.022	0.93	11.248	0.94
	Acetatos*	0.431	0.83	0.478	0.63	2.700	0.56	7.931	0.97	14.000	1.32	16.621	1.40	17.256	1.45
	Isoamílicos	0.000	0.00	0.005	0.01	0.046	0.01	0.099	0.01	0.124	0.01	0.128	0.01	0.126	0.01
	Totales*	0.709	1.37	1.036	1.37	5.027	1.05	13.936	1.70	23.433	2.21	27.771	2.34	28.629	2.40
Dioles		19.774	38.26	18.880	24.99	153.700	32.00	335.300	41.00	471.100	44.34	579.000	48.75	612.000	51.30

* = menos Acetato de etilo

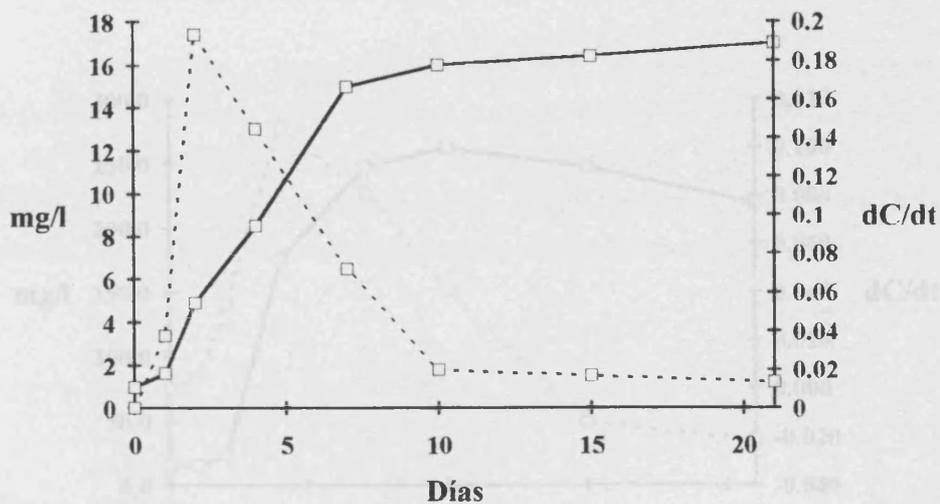


Figura 3.2.3.- Variación de la concentración y tasa de formación de 1-propanol durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

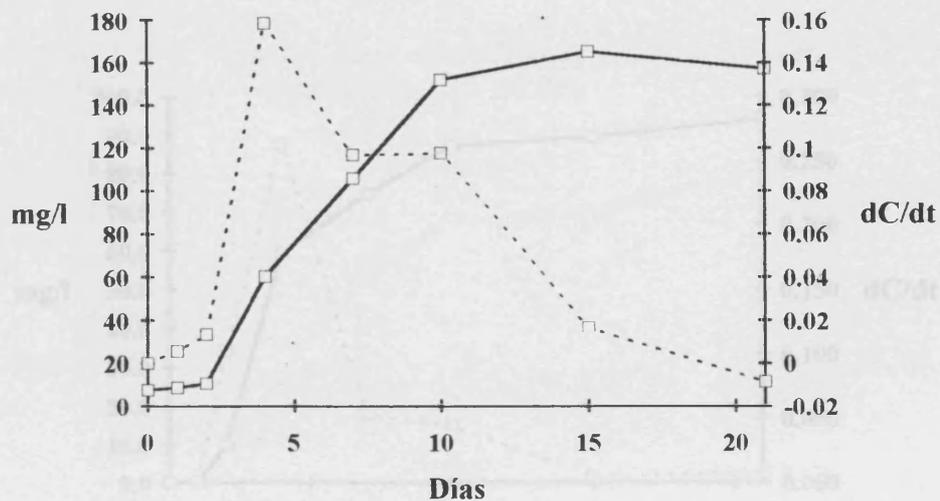


Figura 3.2.4.- Variación de la concentración y tasa de formación de isobutanol durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

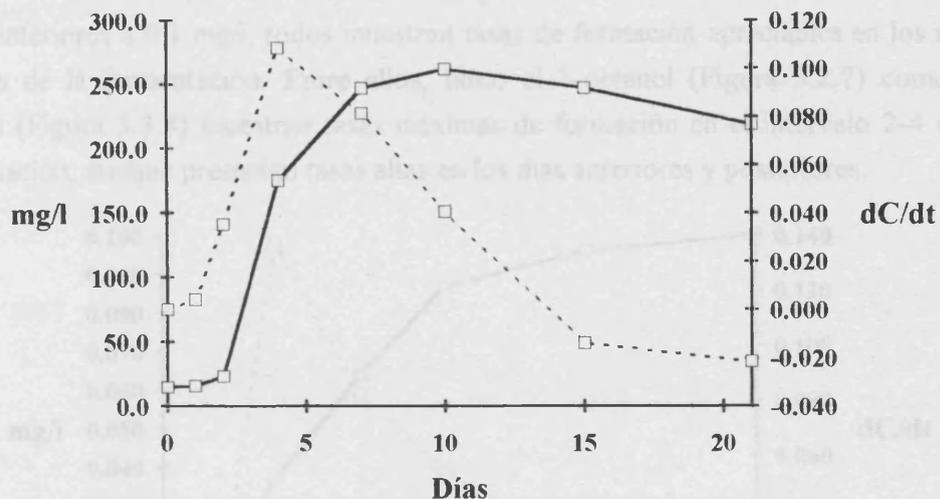


Figura 3.2.5.- Variación de la concentración y tasa de formación de alcohol isoamílico durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

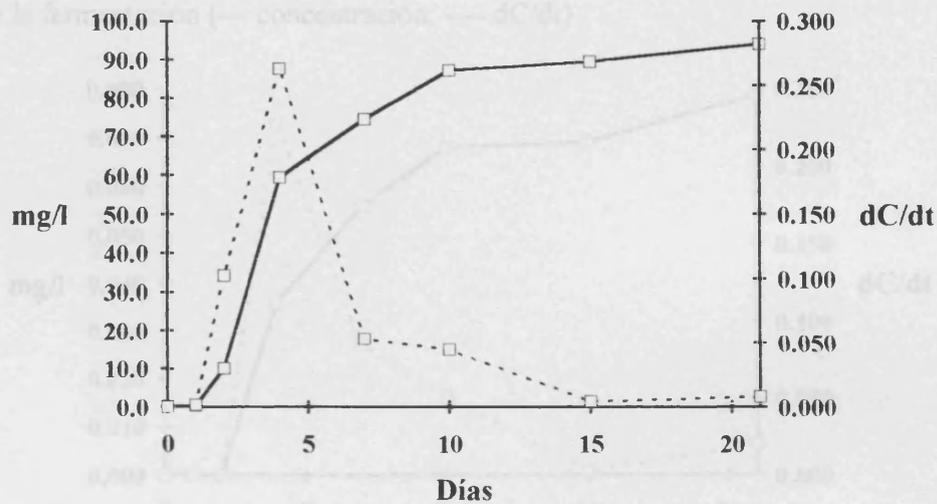


Figura 3.2.6.- Variación de la concentración y tasa de formación de 2-feniletanol durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

3.2.3.2.1.2.- Alcoholes superiores minoritarios.

En cuanto a los alcoholes superiores minoritarios, con concentraciones finales inferiores a 0.1 mg/l, todos muestran tasas de formación apreciables en los últimos estadios de la fermentación. Entre ellos, tanto el 1-octanol (Figura 3.2.7) como el 1-decanol (Figura 3.3.8) muestran tasas máximas de formación en el intervalo 2-4 días de fermentación, aunque presentan tasas altas en los días anteriores y posteriores.

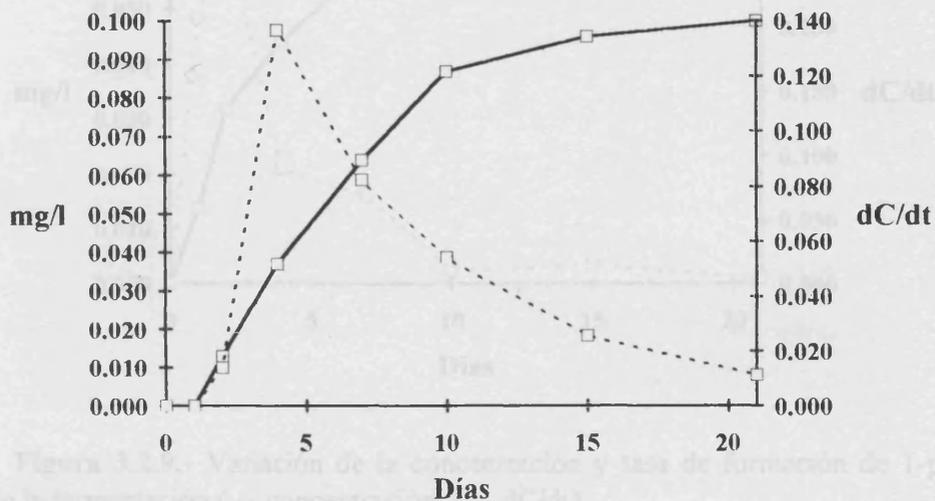


Figura 3.2.7.- Variación de la concentración y tasa de formación de 1-octanol durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

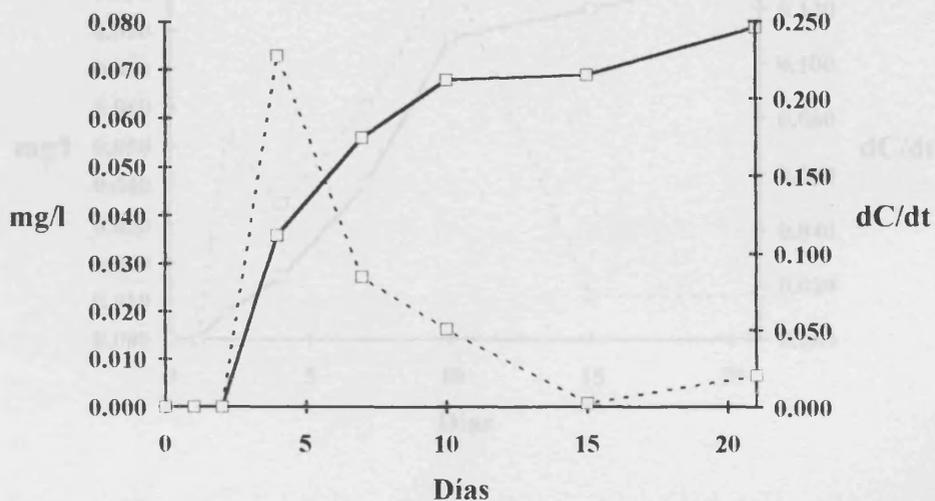


Figura 3.2.8.- Variación de la concentración y tasa de formación de 1-decanol durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

Por su parte, el 1-pentanol muestra una tasa muy elevada al inicio del proceso (Figura 3.2.9), mientras el 1-heptanol (Figura 3.2.10) presenta la máxima formación en el intervalo 2-10 días de fermentación.

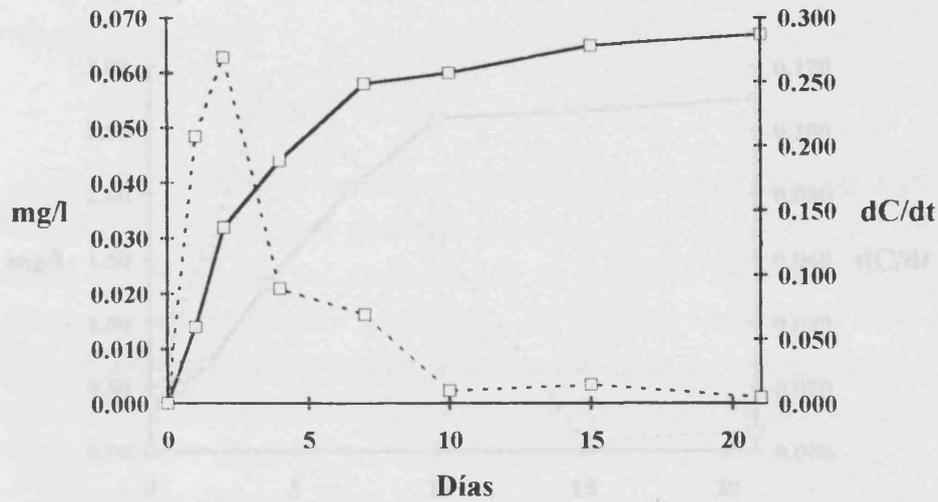


Figura 3.2.9.- Variación de la concentración y tasa de formación de 1-pentanol durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

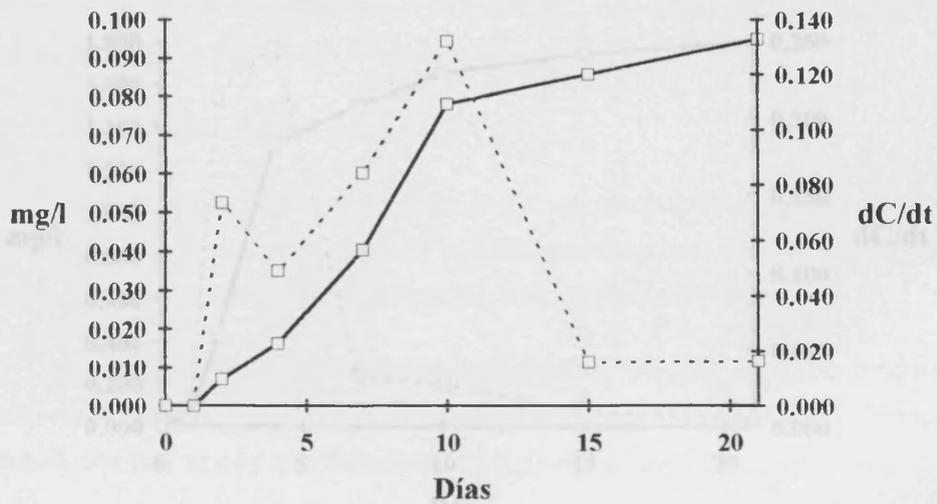


Figura 3.2.10.- Variación de la concentración y tasa de formación de 1-heptanol durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

3.2.3.2.1.3.- Otros alcoholes superiores.

El 1-butanol, que puede ser considerado como un alcohol de concentración intermedia, muestra un comportamiento similar al de los alcoholes superiores mayoritarios (Figura 3.2.11), pero presenta tasas de formación elevadas hasta el día 10 de fermentación.

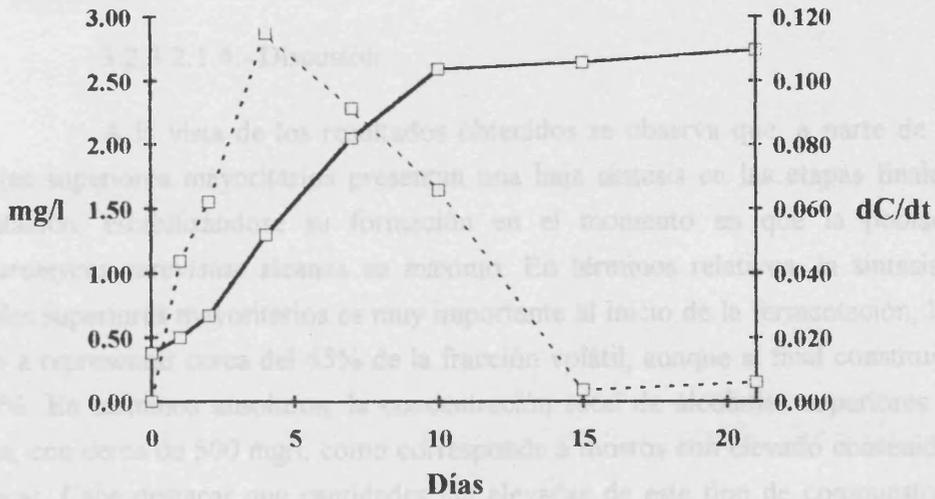


Figura 3.2.11.- Variación de la concentración y tasa de formación de 1-butanol durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

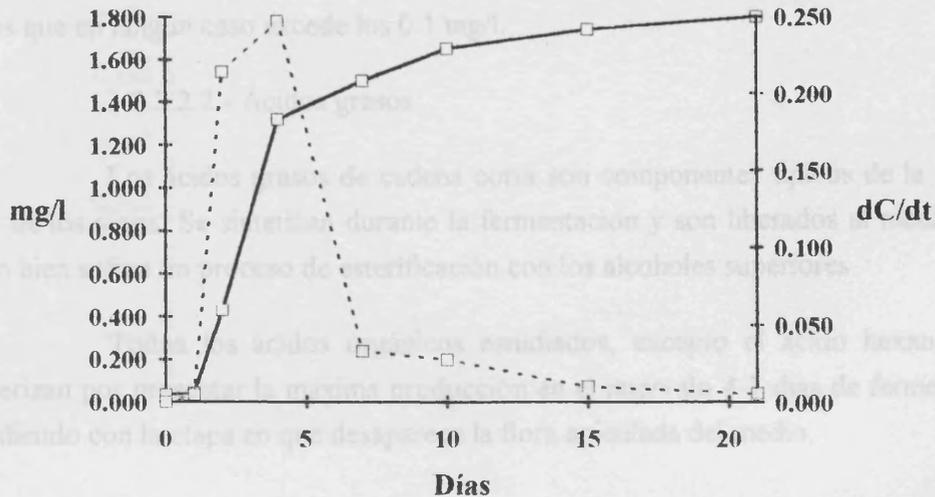


Figura 3.2.12.- Variación de la concentración y tasa de formación de 3-metiltio-1-propanol durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

Mención aparte merece el caso del 3-metiltio-1-propanol. Este alcohol, producto del metabolismo de la metionina, se sintetiza en su práctica totalidad en los 4 primeros días de la fermentación, para permanecer relativamente constante durante el resto de periodo fermentativo (Figura 3.2.12).

3.2.3.2.1.4.- Discusión.

A la vista de los resultados obtenidos se observa que, a parte de que los alcoholes superiores mayoritarios presentan una baja síntesis en las etapas finales de la fermentación, estabilizándose su formación en el momento en que la población de *Saccharomyces cerevisiae* alcanza su máximo. En términos relativos, la síntesis de los alcoholes superiores mayoritarios es muy importante al inicio de la fermentación, llegando incluso a representar cerca del 65% de la fracción volátil, aunque al final constituye cerca del 40%. En términos absolutos, la concentración total de alcoholes superiores es muy elevada, con cerca de 500 mg/l, como corresponde a mostos con elevado contenido inicial de azúcar. Cabe destacar que cantidades tan elevadas de este tipo de compuestos puede provocar efectos desfavorables en las características organolépticas del vino.

Por su parte, se observa que los alcoholes superiores minoritarios representan en todo momento un 0.03% de la fracción volátil del vino, con concentraciones para cada uno de ellos que en ningún caso excede los 0.1 mg/l.

3.2.3.2.2.- Ácidos grasos.

Los ácidos grasos de cadena corta son componentes típicos de la fracción volátil de los vinos. Se sintetizan durante la fermentación y son liberados al medio como tales, o bien sufren un proceso de esterificación con los alcoholes superiores.

Todos los ácidos orgánicos estudiados, excepto el ácido hexanóico, se caracterizan por presentar la máxima producción en el intervalo 4-7 días de fermentación, coincidiendo con la etapa en que desaparece la flora apiculada del medio.

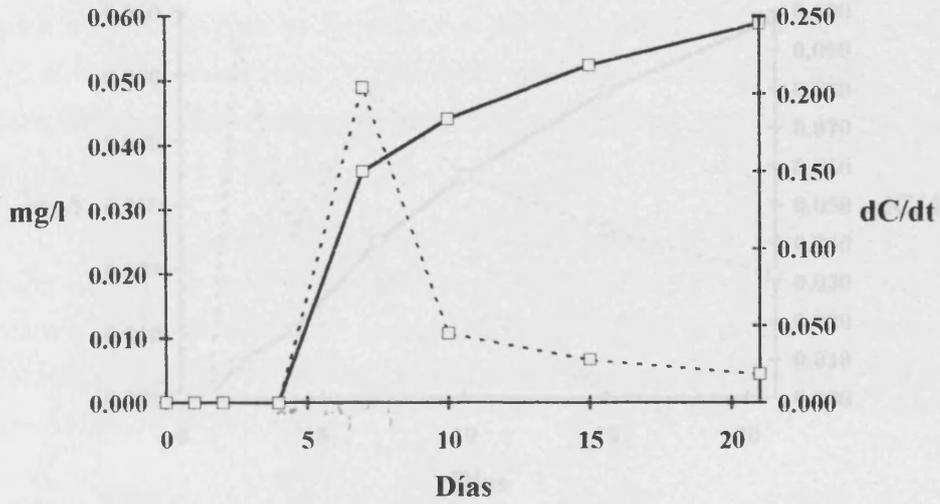


Figura 3.2.13.- Variación de la concentración y tasa de formación de ácido isobutírico durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

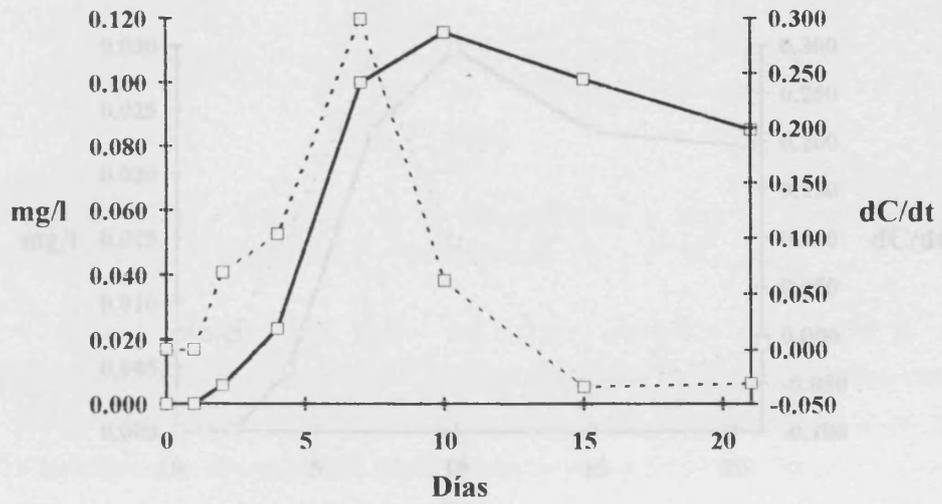


Figura 3.2.14.- Variación de la concentración y tasa de formación de ácido isovaleriánico durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

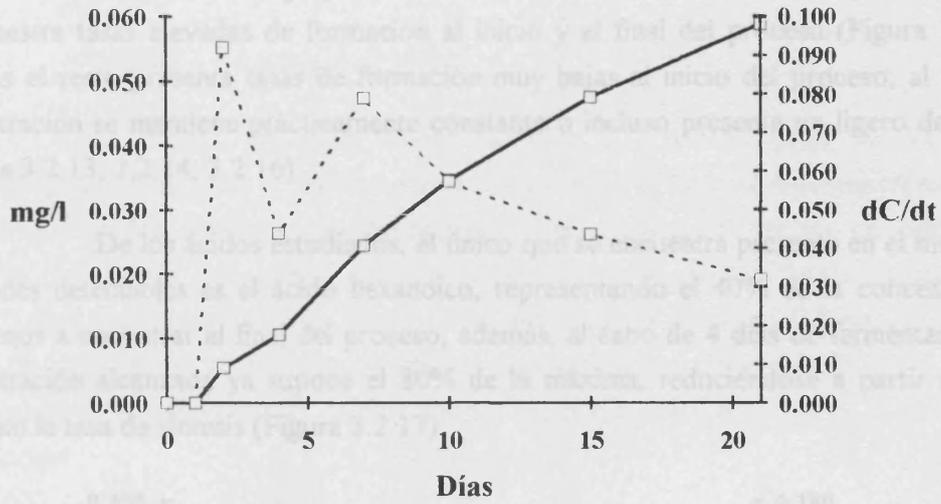


Figura 3.2.15.- Variación de la concentración y tasa de formación de ácido octanoico durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

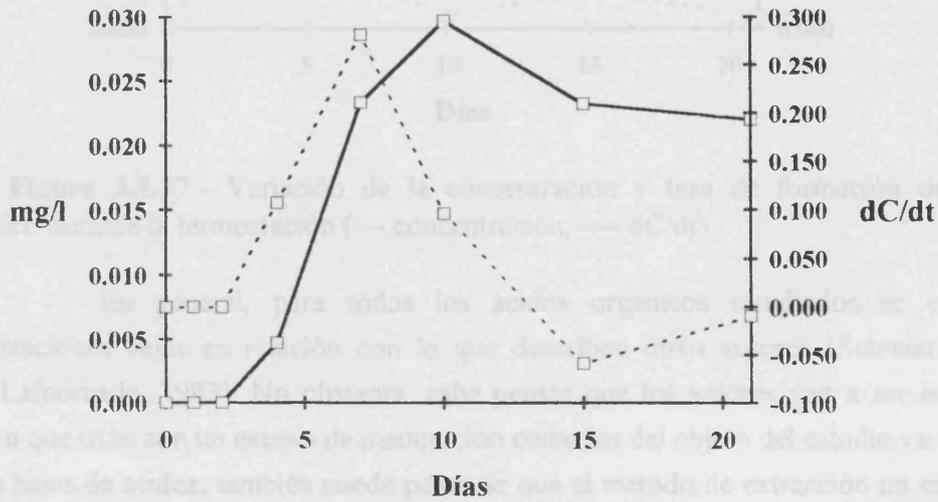


Figura 3.2.16.- Variación de la concentración y tasa de formación de ácido decanoico durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

Dentro de este grupo cabe diferenciar el ácido octanoico, ya que es el único que muestra tasas elevadas de formación al inicio y al final del proceso (Figura 3.2.15) mientras el resto presenta tasas de formación muy bajas al inicio del proceso; al final la concentración se mantiene prácticamente constante o incluso presenta un ligero descenso (Figuras 3.2.13, 3.2.14, 3.2.16).

De los ácidos estudiados, el único que se encuentra presente en el mosto en cantidades detectables es el ácido hexanoico, representando el 40% de la concentración que vamos a encontrar al final del proceso; además, al cabo de 4 días de fermentación, la concentración alcanzada ya supone el 80% de la máxima, reduciéndose a partir de este momento la tasa de síntesis (Figura 3.2.17).

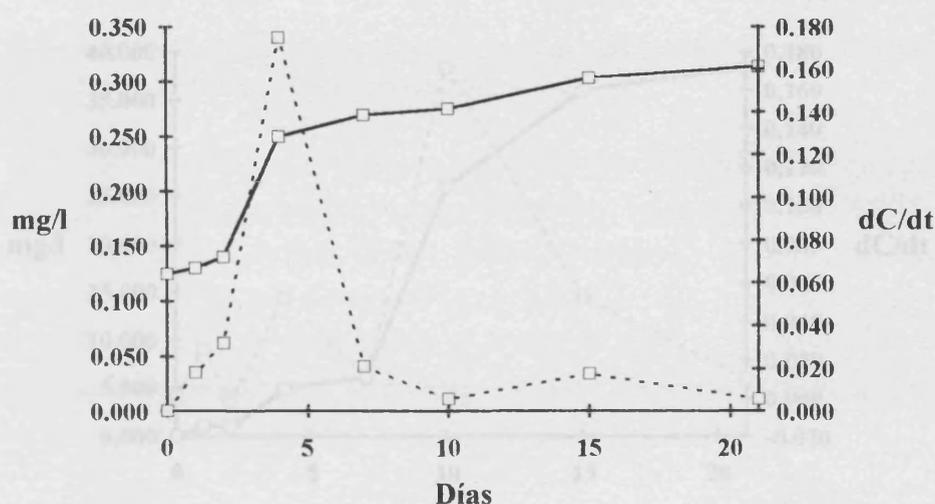


Figura 3.2.17.- Variación de la concentración y tasa de formación de ácido hexanoico durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

En general, para todos los ácidos orgánicos estudiados se obtienen concentraciones bajas en relación con lo que describen otros autores (Schreier, 1979; Lafon Lafourcade, 1983). No obstante, cabe pensar que los valores van a ser normales debido a que uvas con un exceso de maduración como las del objeto del estudio van a tener valores bajos de acidez; también puede pensarse que el método de extracción no es el más adecuado para la determinación de componentes polares. El conjunto de los ácidos grasos solamente representan una parte importante de la fracción volátil al inicio del proceso, situándose en torno al 0.04% a partir del día 4 de fermentación.

3.2.3.2.3.- Ésteres.

3.2.3.2.3.1.- Acetato de etilo.

El acetato de etilo, componente de la fracción volátil de los vinos responsable del agriamiento cuando se encuentra presente en concentraciones elevadas, se haya en la muestra obtenida por fermentación espontánea del mosto en cantidades normales, por debajo del umbral necesario para provocar efectos desfavorables en el producto final (Lafon Lafourcade, 1983). Como de puede observar en la Figura 3.2.16, la síntesis es máxima en el periodo de tiempo que transcurre entre los días 7 y 10 de fermentación, presentando tasas de formación cercanas a cero en la etapas finales de la fermentación.

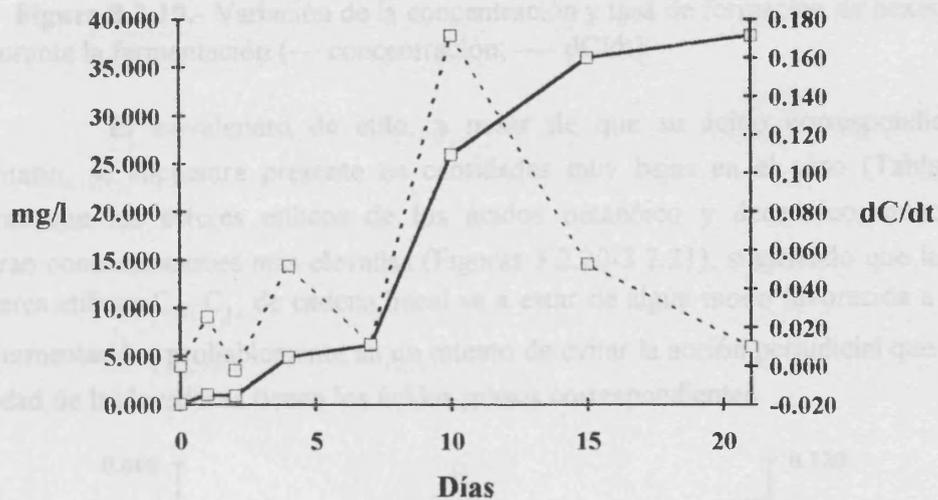


Figura 3.2.18.- Variación de la concentración y tasa de formación de acetato de etilo durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

3.2.3.2.3.2.-Ésteres etílicos.

En primer lugar, vamos a considerar los ésteres etílicos de los ácidos estudiados en el apartado anterior. Así, igual que sucedió con ellos, el hexanoato de etilo es el único presente en el mosto al inicio del proceso, presentando la tasa máxima de formación entre los días 2-4 de fermentación (Figura 3.2.19).

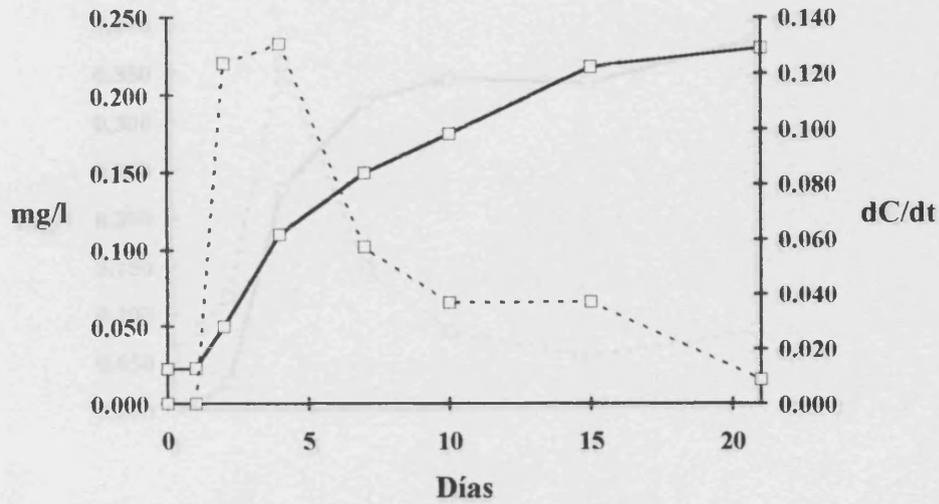


Figura 3.2.19.- Variación de la concentración y tasa de formación de hexanoato de etilo durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

El isovalerato de etilo, a pesar de que su ácido correspondiente era mayoritario, se encuentra presente en cantidades muy bajas en el vino (Tabla 3.3.2), mientras que los ésteres etílicos de los ácidos octanoico y decanoico, minoritarios, muestran concentraciones más elevadas (Figuras 3.2.20-3.2.21), sugiriendo que la síntesis de ésteres etílicos C₁₀-C₁₂ de cadena lineal va a estar de algún modo favorecida a lo largo de la fermentación, probablemente en un intento de evitar la acción perjudicial que sobre la viabilidad de las levaduras tienen los ácidos grasos correspondientes.

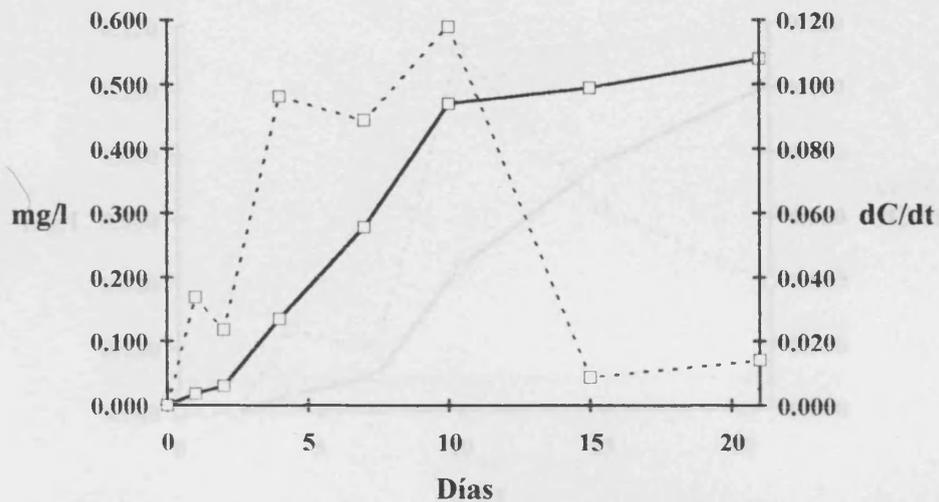


Figura 3.2.20.- Variación de la concentración y tasa de formación de octanoato de etilo durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

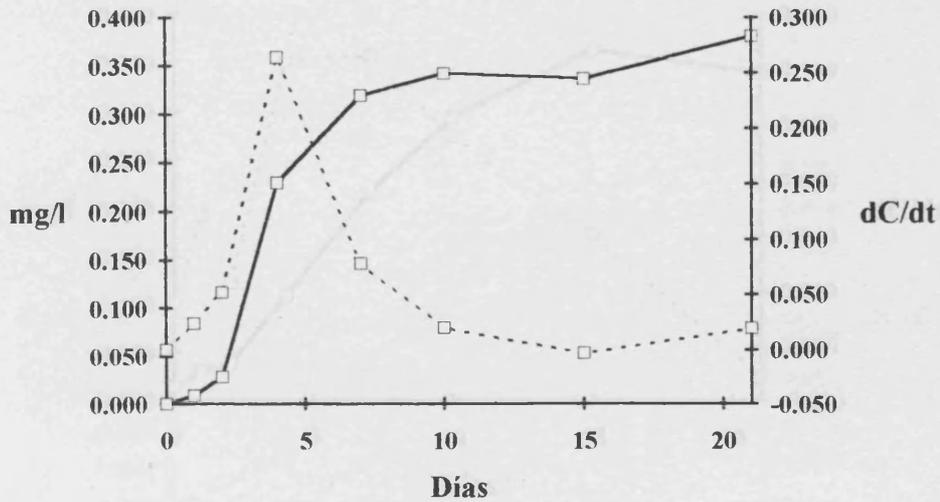


Figura 3.2.21.- Variación de la concentración y tasa de formación de decanoato de etilo durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

El isobutirato de etilo muestra, al igual que el hexanoato de etilo, la tasa máxima de formación corrida hacia tiempos más elevados siendo, de este grupo de ésteres, el que presenta una tasa de formación más elevada al final de la fermentación, por lo que cabe pensar que en el tiempo considerado no se habrá alcanzado la concentración máxima (Figura 3.2.22). El dodecanoato de etilo muestra una síntesis constante hasta el día 10 de fermentación, mostrando cantidades apreciables al inicio del periodo considerado y una producción casi nula al final de la etapa fermentativa (Figura 3.2.23).

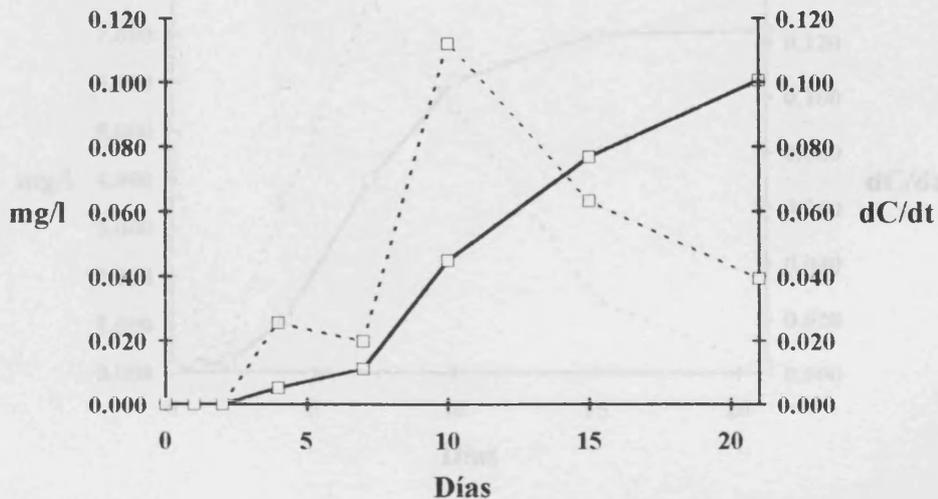


Figura 3.2.22.- Variación de la concentración y tasa de formación de isobutirato de etilo durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).



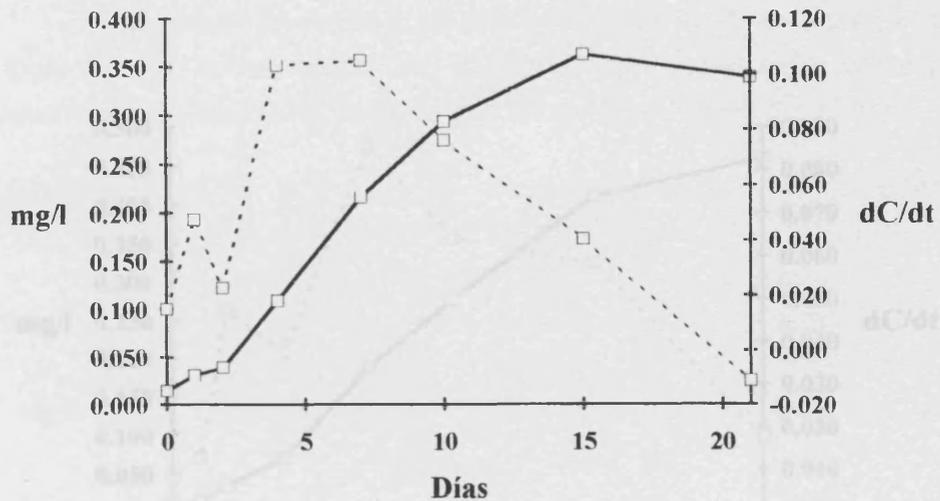


Figura 3.2.23.- Variación de la concentración y tasa de formación de dodecanoato de etilo durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

En cuanto al 2-hidroxi-propanoato de etilo (lactato de etilo) y 3-hidroxi-butirato de etilo, muestran un comportamiento similar (Figuras 3.2.24-3.2.25) en cuanto a que se sintetizan fundamentalmente en las etapas intermedias de la fermentación, con máximos entre los días 4 y 10 del proceso. Sin embargo, la concentración de lactato de etilo es mucho mayor, mientras que la formación de 3-hidroxibutirato de etilo es mucho más homogénea.

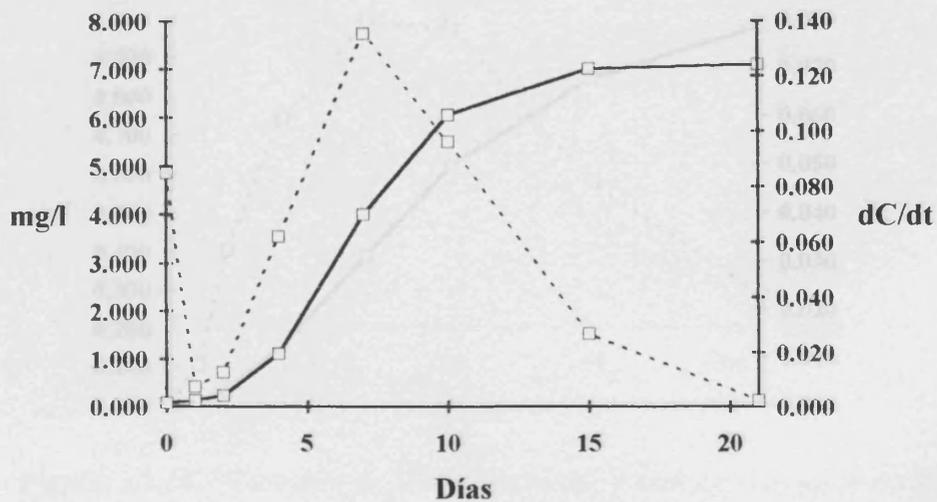


Figura 3.2.24.- Variación de la concentración y tasa de formación de 2-hidroxi-propionato de etilo durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

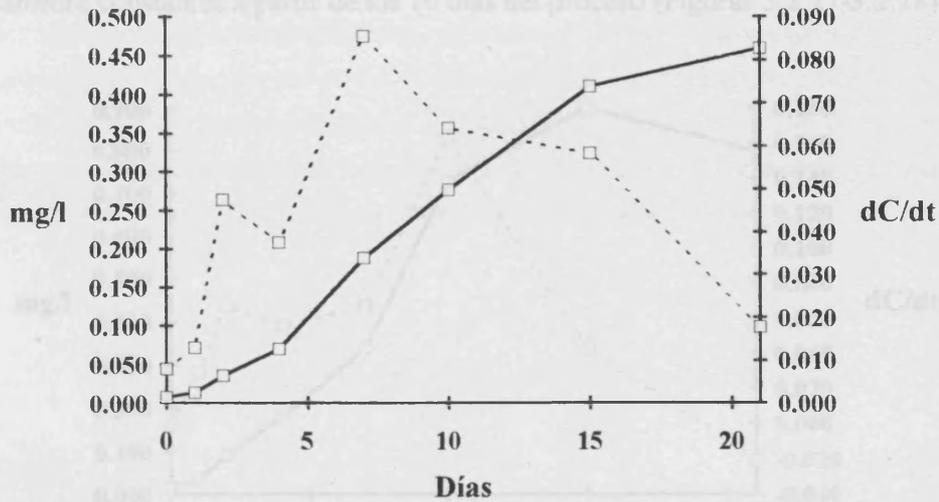


Figura 3.2.25.- Variación de la concentración y tasa de formación de 3-hidroxi-butirato de etilo durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

Por su parte, la formación de 9-decenoato de etilo no presenta grandes diferencias a lo largo del proceso, aunque es mayor en el tramo medio de la fermentación para descender ligera, pero progresivamente hacia el final (Figura 3.2.26).

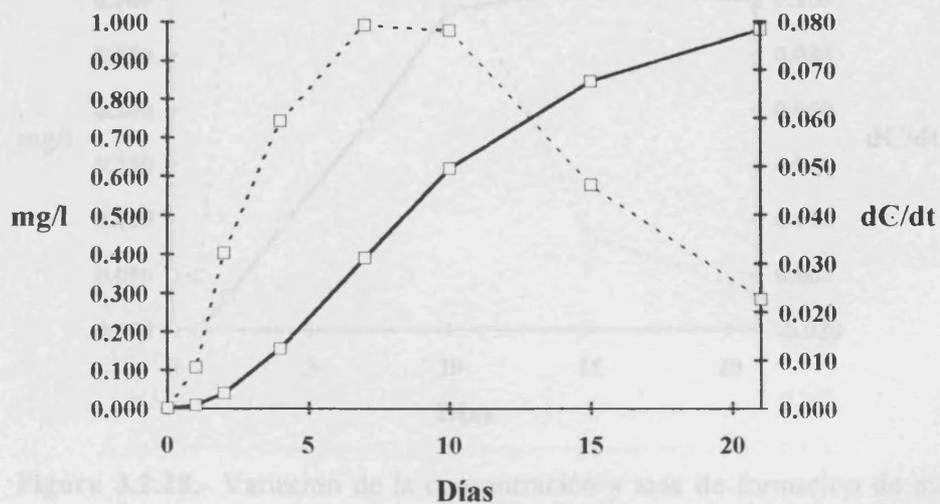


Figura 3.2.26.- Variación de la concentración y tasa de formación de 9-decenoato de etilo durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

Por último, en cuanto a los ésteres dietílicos se observa que su formación tiene lugar en las zonas medias de la fermentación, mostrando concentraciones prácticamente constantes a partir de los 10 días del proceso (Figuras 3.2.27-3.2.28)

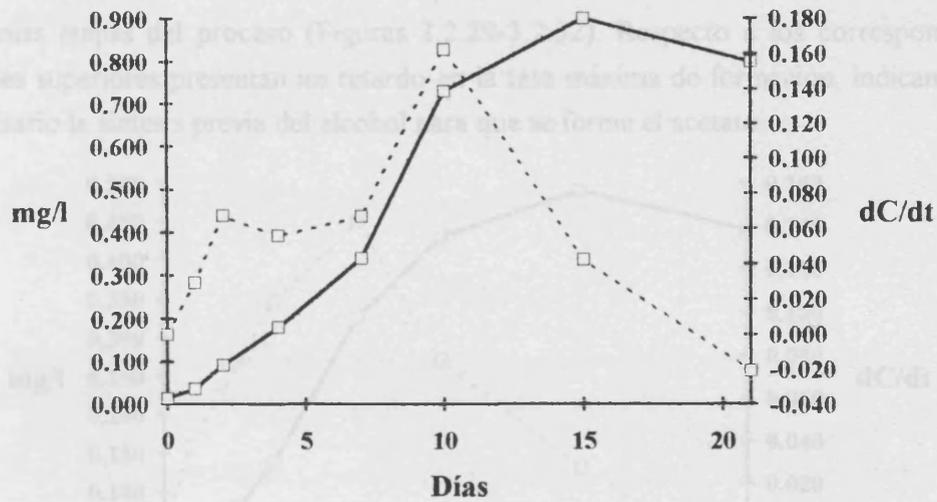


Figura 3.2.27.- Variación de la concentración y tasa de formación de succinato de dietilo durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

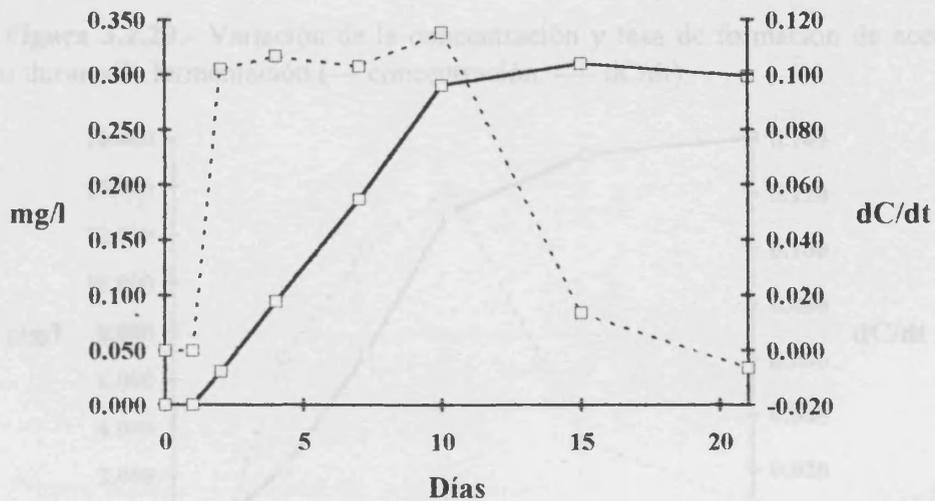


Figura 3.2.28.- Variación de la concentración y tasa de formación de malato de dietilo durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

3.2.3.2.3.3.- Acetatos.

El comportamiento de los acetatos estudiados, al igual que el de los alcoholes superiores de los que proceden, es bastante similar en todos los casos; presentan la tasa máxima de formación en los 7 ó 10 primeros días con concentraciones constantes en las últimas etapas del proceso (Figuras 3.2.29-3.2.32). Respecto a los correspondientes alcoholes superiores presentan un retardo en la tasa máxima de formación, indicando que es necesario la síntesis previa del alcohol para que se forme el acetato.

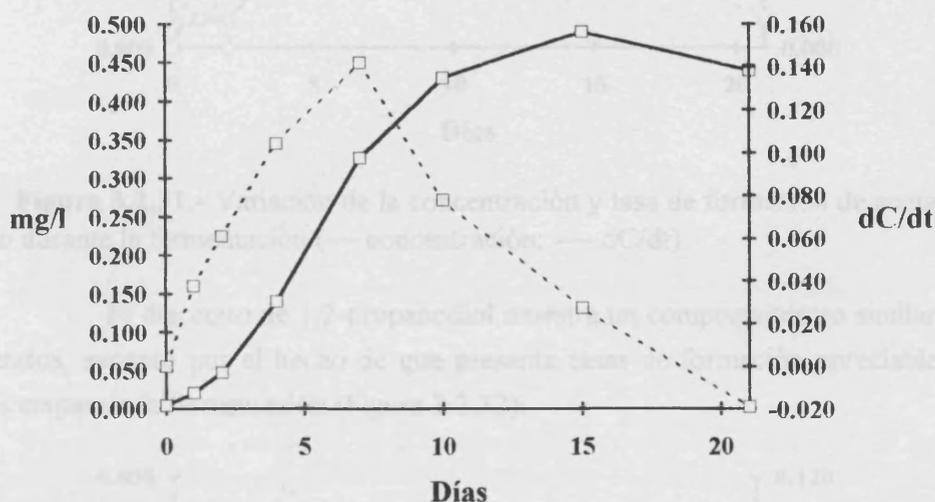


Figura 3.2.29.- Variación de la concentración y tasa de formación de acetato de isobutilo durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

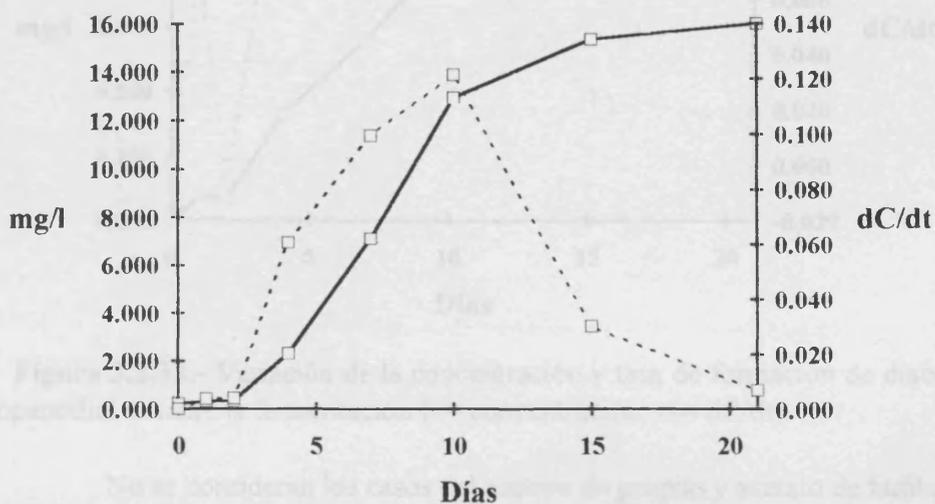


Figura 3.2.30.- Variación de la concentración y tasa de formación de acetato de isoamilo durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

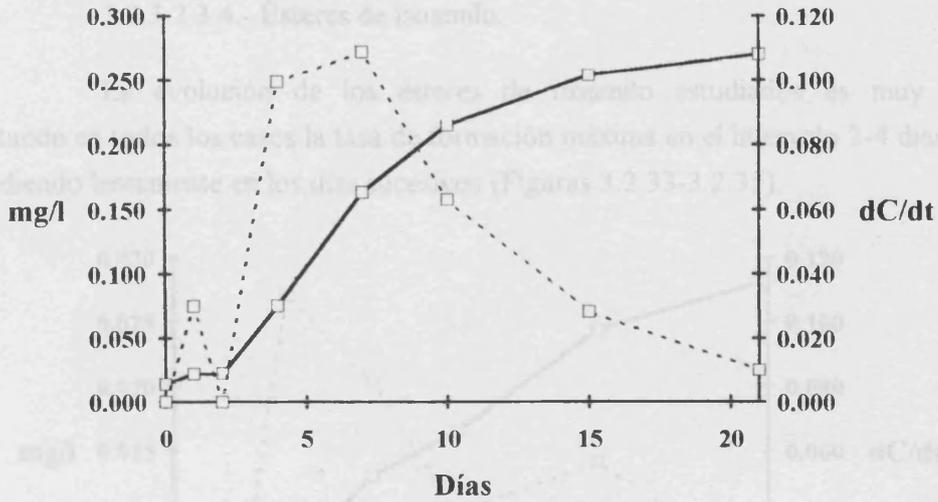


Figura 3.2.31.- Variación de la concentración y tasa de formación de acetato de 2-fenetilo durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

El diacetato de 1,2-propanodiol muestra un comportamiento similar al resto de acetatos, excepto por el hecho de que presenta tasas de formación apreciables en las últimas etapas de la fermentación (Figura 3.2.32).

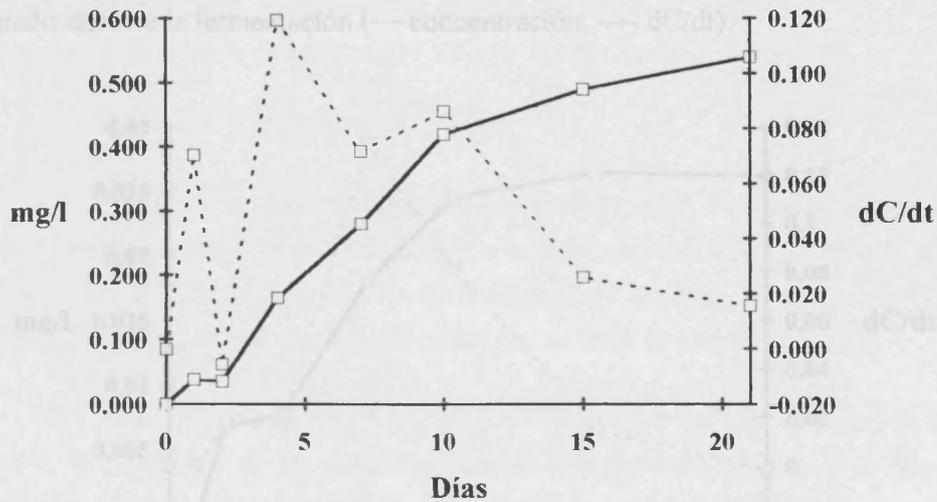


Figura 3.2.32.- Variación de la concentración y tasa de formación de diacetato de 1,2-propanodiol durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

No se consideran los casos del acetato de propilo y acetato de butilo porque sus concentraciones son muy bajas, de modo que el error cometido en su determinación hace que sean escasamente fiables los resultados obtenidos.

3.2.3.2.3.4.- Ésteres de isoamilo.

La evolución de los ésteres de isoamilo estudiados es muy similar, presentando en todos los casos la tasa de formación máxima en el intervalo 2-4 días para ir descendiendo lentamente en los días sucesivos (Figuras 3.2.33-3.2.35).

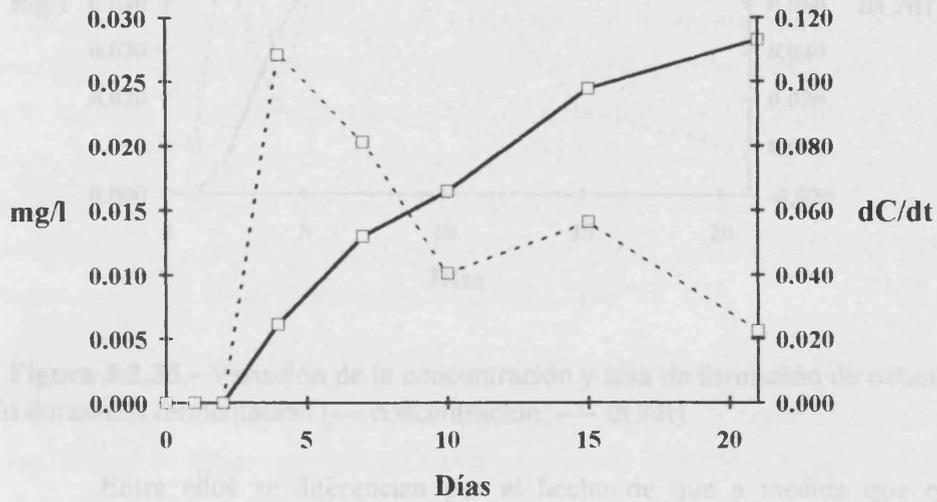


Figura 3.2.33.- Variación de la concentración y tasa de formación de isobutirato de isoamilo durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

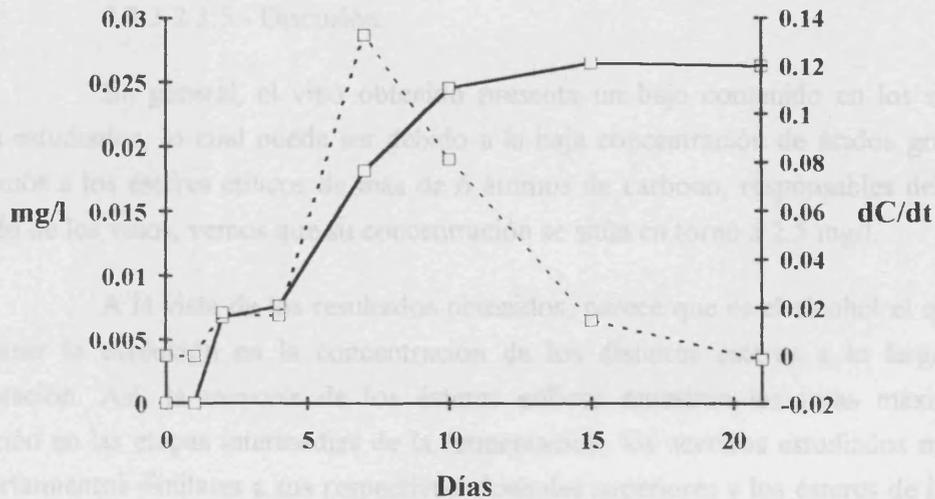


Figura 3.2.34.- Variación de la concentración y tasa de formación de hexanoato de isoamilo durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

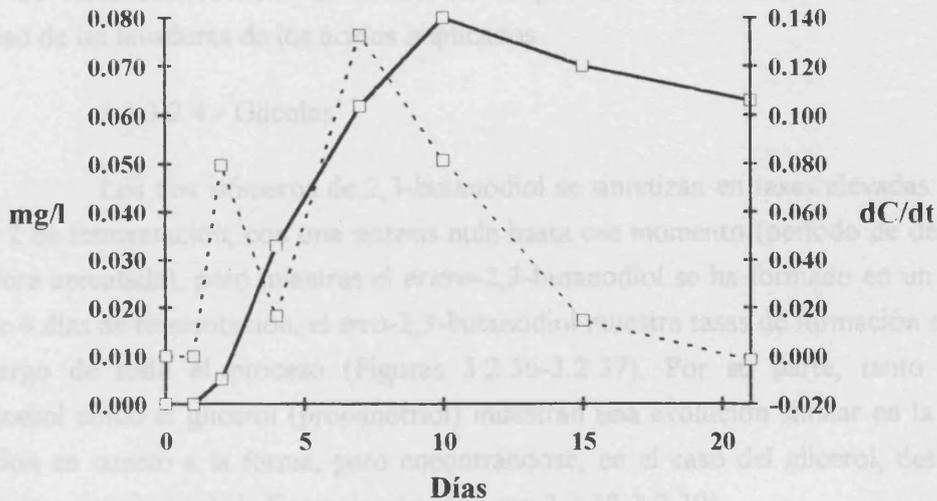


Figura 3.2.35.- Variación de la concentración y tasa de formación de octanoato de isoamilo durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

Entre ellos se diferencian por el hecho de que a medida que el ácido implicado posee un mayor número de átomos de carbono, la formación del éster correspondiente es menor en las últimas etapas del proceso, mostrando el octanoato de isoamilo un descenso en la concentración a partir del día 10 de fermentación.

3.2.3.2.3.5.- Discusión.

En general, el vino obtenido presenta un bajo contenido en los distintos ésteres estudiados, lo cual puede ser debido a la baja concentración de ácidos grasos. Si atendemos a los ésteres etílicos de más de 6 átomos de carbono, responsables del aroma afrutado de los vinos, vemos que su concentración se sitúa en torno a 2.5 mg/l.

A la vista de los resultados obtenidos, parece que es el alcohol el que va a determinar la evolución en la concentración de los distintos ésteres a lo largo de la fermentación. Así, la mayoría de los ésteres etílicos muestran las tasas máximas de formación en las etapas intermedias de la fermentación; los acetatos estudiados muestran comportamientos similares a sus respectivos alcoholes superiores y los ésteres de isoamilo evolucionan de forma parecida a lo largo de la fermentación. De igual forma, se observa que, tanto para los ésteres etílicos como para los de isoamilo, la concentración de los componentes que implican la participación de ácidos grasos de cadena lineal es tanto mayor cuanto más elevado es el número de átomos de carbono, pudiendo pensarse que la

síntesis de estos ésteres tiene un cierto efecto protector frente a la acción contra la viabilidad de las levaduras de los ácidos implicados.

3.2.3.2.4.- Glicoles.

Los dos isómeros de 2,3-butanodiol se sintetizan en tasas elevadas a partir del día 2 de fermentación, con una síntesis nula hasta ese momento (periodo de desarrollo de la flora apiculada), pero mientras el *eritro*-2,3-butanodiol se ha formado en un 75% al cabo de 4 días de fermentación, el *treo*-2,3-butanodiol muestra tasas de formación elevadas a lo largo de todo el proceso (Figuras 3.2.36-3.2.37). Por su parte, tanto el 1,2-propanodiol como el glicerol (propanotriol) muestran una evolución similar en la tasa de formación en cuanto a la forma, pero encontrándose, en el caso del glicerol, desplazado hacia etapas anteriores de la fermentación (Figuras 3.2.38-3.2.39).

La concentración de los glicoles estudiados se sitúa en los límites superiores de las concentraciones descritas por otros autores al igual que sucedió con los alcoholes superiores, lo cual es lógico teniendo en cuenta el elevado contenido en azúcar del mosto. A ello, y a la elevada cantidad de azúcares residuales presentes en el medio al final del proceso, es debido el marcado carácter dulce que presentan los vinos obtenidos.

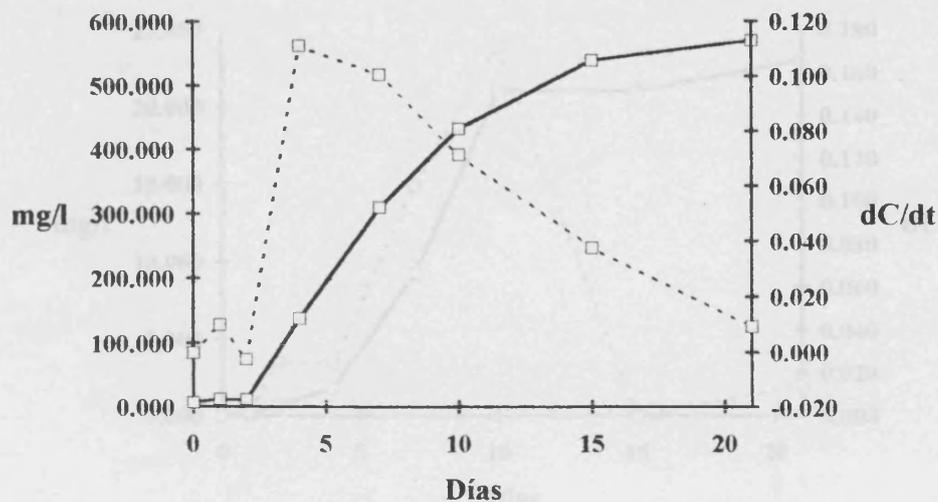


Figura 3.2.36.- Variación de la concentración y tasa de formación de *treo*-2,3-butanodiol durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

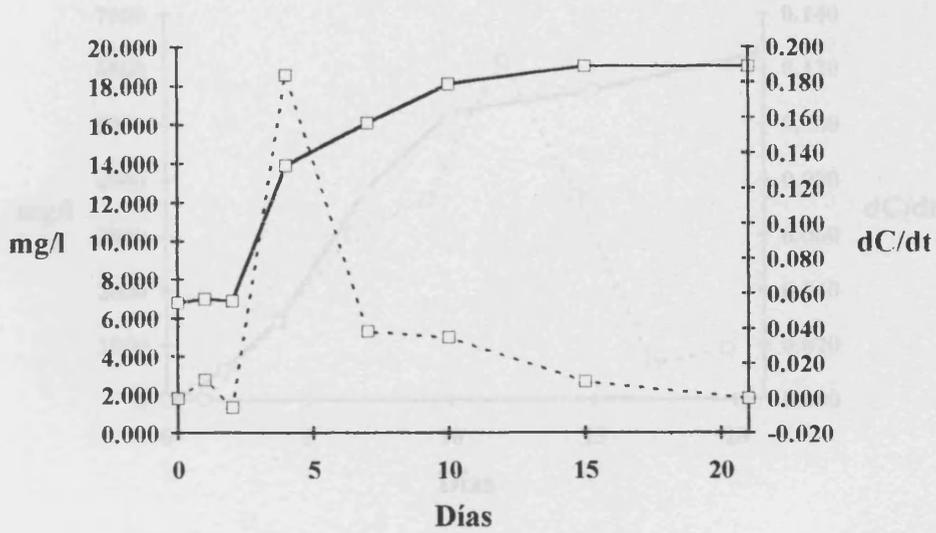


Figura 3.2.37.- Variación de la concentración y tasa de formación de *eritro*-2,3-butanodiol durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

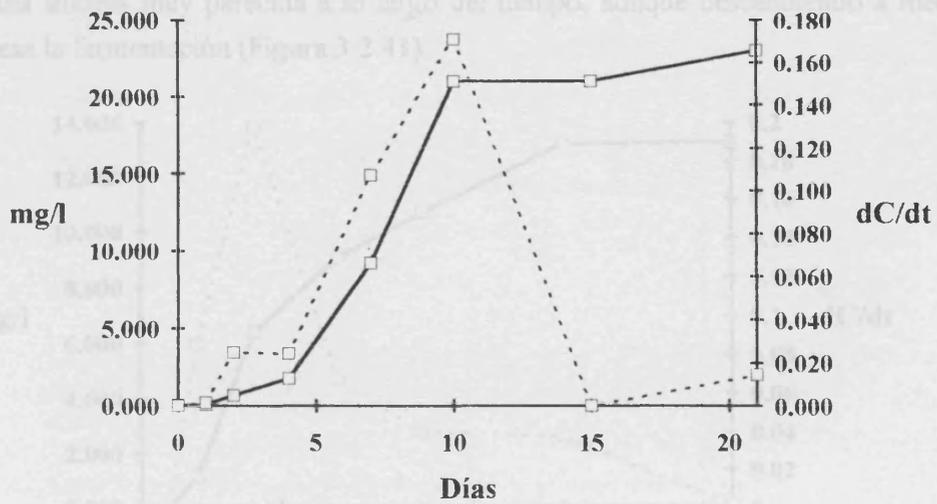


Figura 3.2.38.- Variación de la concentración y tasa de formación de 1,2-propanodiol durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

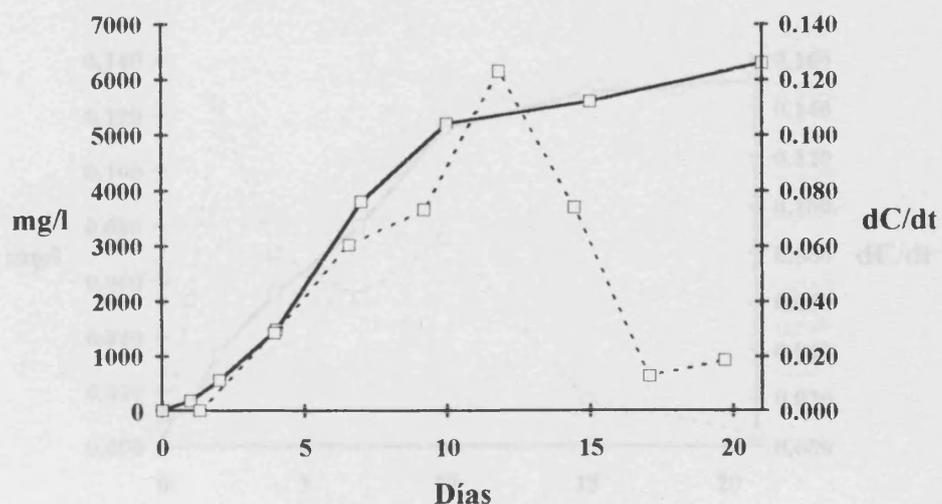


Figura 3.2.39.- Variación de la concentración y tasa de formación de glicerol durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

3.2.3.2.5.- Otros componentes.

Del resto de componentes estudiados, cabe destacar que la acetona muestra una elevada síntesis al inicio del proceso (50% al cabo de 4 días), aunque se sigue formando a lo largo de toda la fermentación (Figura 3.2.40), mientras que la β -ionona presenta una síntesis muy parecida a lo largo del tiempo, aunque descendiendo a medida que progresa la fermentación (Figura 3.2.41).

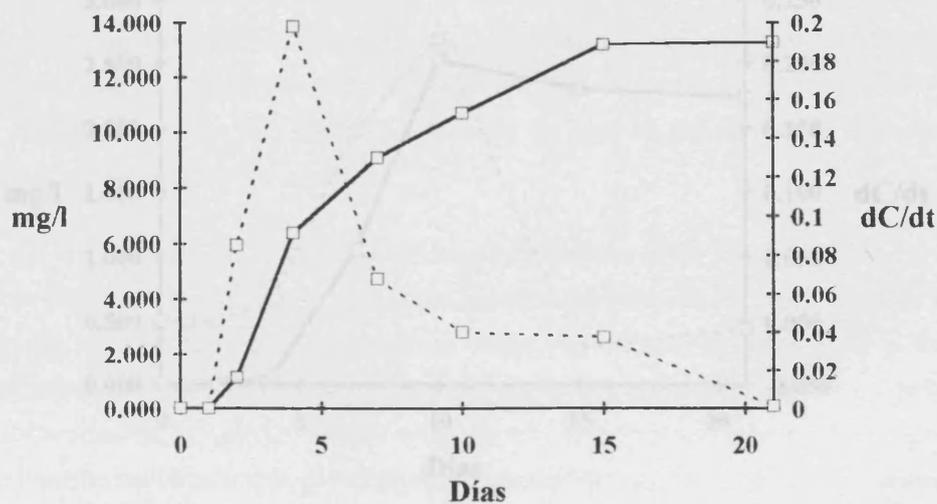


Figura 3.3.38.- Variación de la concentración y tasa de formación de acetona durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

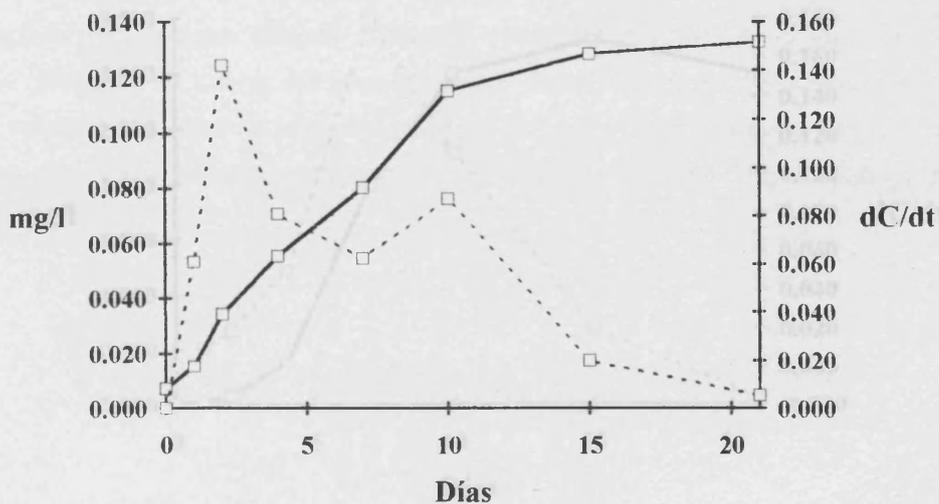


Figura 3.2.41.- Variación de la concentración y tasa de formación de β -ionona durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

La γ -butirolactona muestra tasas de formación cada vez mayores hasta el día 10 de fermentación, momento en que se alcanza la concentración máxima para decrecer hasta el final de la fermentación (Figura 3.2.42). Una situación similar se presenta con el 2,4-dimetil-1,3-dioxolano, pero en este caso se presentan tasas positivas de formación en el intervalo 10-15 días de fermentación (Figura 3.2.43).

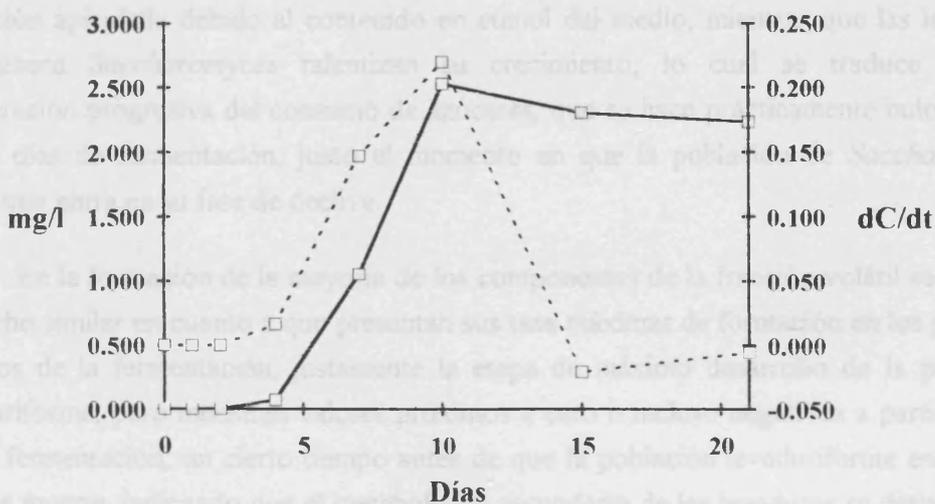


Figura 3.2.42.- Variación de la concentración y tasa de formación de γ -butirolactona durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

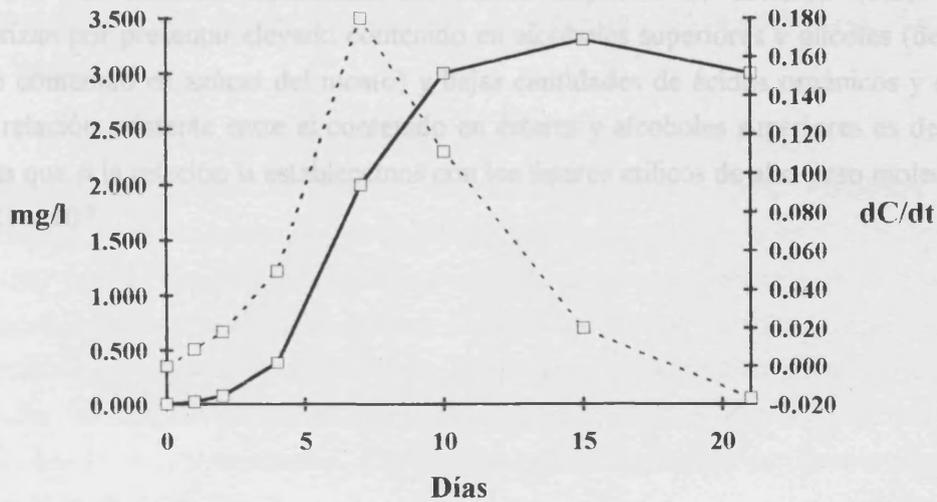


Figura 3.2.43.- Variación de la concentración y tasa de formación de 2,4-dimetil-1,3-dioxolano durante la fermentación (— concentración; ---- dC/dt).

3.2.4.- Discusión.

El consumo de los azúcares del mosto se inicia de una forma muy rápida, de modo que al cabo de 2 días se han transformado 120 g/l. Esta etapa coincide con la de máximo desarrollo de la población levaduriforme, de modo que la población total llega a unos valores máximos. Pasado este tiempo se llega a una fase de declive (muerte) de la población apiculada debido al contenido en etanol del medio, mientras que las levaduras del género *Saccharomyces* ralentizan su crecimiento, lo cual se traduce en una deceleración progresiva del consumo de azúcares, que se hace prácticamente nulo al cabo de 15 días de fermentación, justo el momento en que la población de *Saccharomyces cerevisiae* entra en su fase de declive.

En la formación de la mayoría de los componentes de la fracción volátil se observa un hecho similar en cuanto a que presentan sus tasa máximas de formación en los primeros estadios de la fermentación, justamente la etapa de máximo desarrollo de la población levaduriforme, pero muestran valores próximos a cero o incluso negativos a partir del día 10 de fermentación, un cierto tiempo antes de que la población levaduriforme entre en la fase de muerte, indicando que el metabolismo secundario de las levaduras se detiene antes que la actividad vital de los microorganismos, en un intento de ahorrar energía para prolongar su etapa activa.

Por fermentación espontánea del mosto empleado se obtienen vinos que se caracterizan por presentar elevado contenido en alcoholes superiores y glicoles (debido al elevado contenido en azúcar del mosto) y bajas cantidades de ácidos orgánicos y ésteres. Así, la relación existente entre el contenido en ésteres y alcoholes superiores es de 0.058, mientras que si la relación la establecemos con los ésteres etílicos de alto peso molecular es de 5.021×10^{-3} .

3.3.- Inoculación de mosto natural de la variedad Monastrell con levaduras seleccionadas.

A la vista de los resultados obtenidos por fermentación espontánea del mosto, nos planteamos la posibilidad de emplear inoculaciones con distintas levaduras vínicas seleccionadas, usando como control negativo la inoculación con cepa C.G.L. que cabe pensar que proporcionará los resultados menos favorables por tratarse de una levadura seleccionada para desarrollarse en un medio totalmente distinto. Las levaduras seleccionadas se añaden al mosto para llevar a cabo la fermentación de un modo controlado. El empleo de estas levaduras puede evitar las alteraciones químicas y microbiológicas en la fermentación, a la vez que pueden mejorar la composición química e influir en la calidad del vino.

A la hora de planificar las experiencias hemos creído conveniente considerar la influencia de la concentración del inóculo, ensayando aportaciones de 10^5 , 10^6 y 10^7 células/ml en cada caso. Hemos reducido la toma de muestras a los días 2, 7 y 21 de fermentación ya que, a la vista de los resultados obtenidos en la fermentación espontánea, son suficientes para determinar la evolución del proceso. En ningún caso hemos procedido a estudiar como varía la población levaduriforme, aunque existen metodologías puestas a punto para realizarlo (Querol *et al.*, 1992), el principal objeto de estas experiencias es observar la influencia que la adición de las levaduras va a ejercer sobre los parámetros estudiados, independientemente de si estas levaduras van a ser las que se impongan en la fermentación o no, ya que puede darse el caso de que aunque no sea una de ellas la que realice el proceso, sí que su presencia puede alterar el desarrollo de las restantes.

3.3.1.- Inoculación con la cepa T73 de *Saccharomyces bayanus*.

Las características fisiológicas de esta levadura, según la empresa que la comercializa. son:

- Fenotipo "killer" (K^+R^+).
 - Velocidad de fermentación elevada para temperaturas entre 22 y 35°C.
 - Buena capacidad de degradación de azúcares.
 - Tolerancia a elevadas concentraciones de etanol.
 - No forma espuma a velocidades normales de fermentación.
 - Produce ésteres, especialmente acetato de isoamilo y acetato de 2-fenetilo.
-

- Degrada hasta un 30% de ácido málico.
- Producción moderada de glicerol.

3.3.1.1.-Cinética de la fermentación.

Excepto en el caso de efectuar el inóculo más bajo (10^5 células/ml) se observa una fase de latencia del inicio de la fermentación, con consumo de 20 g/l de azúcar en los dos primeros días. Al cabo de 7 días de fermentación, en todos los casos, el medio presenta contenidos similares de azúcar, finalizando el proceso con unos 12 g/l de azúcares residuales (Figura 3.3.1), cantidad similar a la que se obtiene por fermentación de mosto estéril inducida con inóculo de un cultivo puro de la cepa T73 de *Saccharomyces bayanus*.

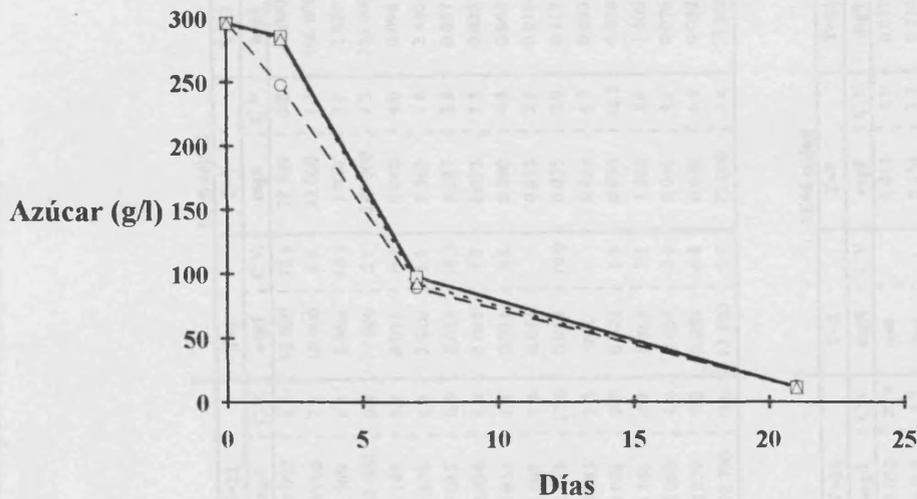


Figura 3.1.11.- Cinética de fermentación de los mostos inoculados con la cepa T73 de *Saccharomyces bayanus* (O 10^5 células/ml; □ 10^6 células/ml, Δ 10^7 células/ml).

3.3.1.2.- Formación de la fracción volátil.

En la Tabla 3.3.1 se muestra la evolución de los compuestos volátiles estudiados a lo largo de la fermentación para las tres concentraciones de inóculo ensayadas de la cepa T73. En la Tabla 3.3.2 se puede observar la evolución de los distintos grupos de componentes a lo largo de la fermentación en las muestras inoculadas con la cepa T73.

Tabla 3.3.1.- Concentración de los distintos componentes en las días 2, 7 y 21 de fermentación en las muestras inoculadas con la cepa T73 (*Saccharomyces bayanus*).

ALCOHOLES		1E+5 cel/ml						1E+6 cel/ml						1E+7 cel/ml					
		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
n°	COMPONENTE																		
7	1-Propanol	8 300	2.2	24 500	2.9	50 000	2.8	10 000	12.1	28 700	0.8	57 000	7.0	10 430	2.5	27 800	2.4	55 000	10.8
10	Isobutanol	16 300	1.1	73 800	0.6	73 000	2.3	10 000	8.8	83 000	1.1	106 000	1.4	11 280	0.8	82 000	2.7	95 000	1.7
13	1-Butanol	1 301	0.2	1 700	7.8	2 200	8.8	0 960	10.1	1 920	3.1	2 820	0.7	0 640	4.3	2 680	2.8	3 600	6.2
14	Alcohol isoamilico	39 000	1.4	240 000	1.0	252 000	0.8	22 800	2.1	245 000	1.5	253 000	1.0	38 800	0.3	320 000	3.5	340 000	0.5
16	Alcohol amilico	0 019	3.8	0 038	1.8	0 140	5.7	0 011	0.1	0 040	4.0	0 098	7.2	0 014	0.7	0 042	3.8	0 111	6.1
21	1-Hexanol	2 460	0.5	2 450	0.5	2 470	1.3	2 510	1.1	2 360	1.8	2 440	1.9	2 460	0.7	2 450	1.3	2 470	1.5
22	trans-3-Hexen-1-ol	0 037	3.4	0 037	2.3	0 035	0.6	0 033	11.3	0 037	2.9	0 037	0.7	0 034	0.3	0 037	0.5	0 036	4.2
23	cis-3-Hexen-1-ol	0 032	2.0	0 033	8.7	0 034	1.4	0 035	7.7	0 033	5.5	0 033	5.5	0 038	1.9	0 035	1.3	0 033	1.8
26	1-Heptanol	0 019	2.5	0 040	7.0	0 051	1.4	0 011	0.8	0 060	4.6	0 063	5.8	0 023	11.1	0 047	4.0	0 057	4.9
32	Linalool	0 005	7.8	0 009	7.8	0 008	1.4	0 012		0 012	2.9	0 010	4.9	0 013	0.9	0 008	3.4	0 008	2.3
33	1-Octanol	0 012	0.5	0 055	0.5	0 117	17.0	0 014	10.0	0 075	2.0	0 117	4.5	0 014	0.6	0 052	2.9	0 124	2.6
40	1-Metoxi-2-butanol	traz		0 024	4.3	0 183	5.3	traz		0 034	6.7	0 093	4.3	traz		0 023	3.9	0 102	6.1
44	alfa-Terpineol	0 016	4.6	0 024	3.9	0 036	2.7	0 022	5.5	0 030	16.2	0 026	6.1	0 029	5.9	0 029	19.1	0 023	6.8
46	3-Metilatio-1-propanol	0 600	5.9	1 190	1.0	1 160	4.4	0 860	3.5	1 600	8.6	1 600	5.8	0 587	0.8	1 300	1.1	1 340	3.2
48	1-Decanol	traz		0 038	5.0	0 060	1.4	0 007	7.3	0 041	4.1	0 076	2.9	traz		0 045	3.1	0 103	7.4
52	Alcohol bencilico	0 034	3.9	0 026	2.8	0 029	9.2	0 039	6.8	0 030	6.5	0 032	0.9	0 030	6.5	0 025	4.6	0 030	2.6
55	2-Feniletanol	7 900	2.8	76 700	1.1	102 700	0.6	12 100	5.7	72 000	2.4	75 000	2.1	17 200	3.0	76 000	1.4	79 000	1.6

ÁCIDOS GRASOS		1E+5 cel/ml						1E+6 cel/ml						1E+7 cel/ml					
		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
n°	COMPONENTE																		
35	Ácido isobutirico	traz		0 012	11.9	0 052	20.9	traz		0 012	5.9	0 072	1.8	traz		0 014	6.9	0 060	8.3
42	Ácido isovalerianico	traz		0 146	3.3	0 262	1.7	traz		0 154	3.7	0 256	2.8	traz		0 128	0.2	0 245	0.2
50	Ácido hexanoico	0 150	3.4	0 221	2.0	0 310	7.2	0 145	6.7	0 170	8.5	0 204	11.0	0 150	7.1	0 160	9.8	0 220	13.1
57	Ácido octanoico	0 007	1.0	0 027	7.3	0 055	13.7	0 008	8.9	0 025	6.3	0 055	0.2	0 007	3.0	0 013	4.4	0 054	7.2
59	Ácido decanoico	traz	4.1	0 032	2.3	0 064	8.4	ND		0 026	6.9	0 056	10.2	0 008	9.8	0 016	6.6	0 066	1.5

Tabla 3.3.1 (cont.)- Concentración de los distintos componentes en las días 2, 7 y 21 de fermentación en las muestras inoculadas con la cepa T73 (*Saccharomyces bayanus*).

ÉSTERES		1E+5 cel/ml						1E+6 cel/ml						1E+7 cel/ml					
		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
2	Acetato de etilo	0.332	1.2	3.300	11.7	12.200	5.1	0.140	8.2	7.000	5.1	22.600	1.1	0.400	4.9	6.800	7.8	21.300	1.9
4	Isobutirato de etilo	traz.		0.022	7.3	0.090	3.1	traz.		0.035	1.5	0.083	1.7	traz.		0.045	6.3	0.076	0.6
8	Butirato de etilo	traz.		0.011	0.7	0.009	2.1	0.005	5.0	0.004	1.9	0.015	3.7	traz.		0.005	2.2	0.009	2.0
9	Isovalerato de etilo	traz.		0.005	7.8	0.006	0.4	traz.		0.005	7.0	0.008	2.9	traz.		0.005	0.4	0.006	5.7
15	Hexanoato de etilo	0.065	0.7	0.176	4.5	0.166	1.2	0.041	10.9	0.140	2.1	0.136	0.4	0.075	0.6	0.116	5.9	0.110	8.0
20	Lactato de etilo	0.318	1.3	2.500	6.2	4.100	6.7	0.223	3.1	2.020	3.2	4.090	2.1	0.255	1.0	3.200	3.3	3.900	3.0
25	Octanoato de etilo	0.032	2.2	0.221	2.2	0.317	2.0	0.051	11.1	0.247	0.8	0.323	0.8	0.032	4.8	0.255	1.3	0.315	1.6
31	3-Hidroxiobutirato de etilo	0.021	7.2	0.316	2.4	0.490	6.6	0.015	8.3	0.314	1.5	0.460	6.6	0.015	8.3	0.263	0.9	0.428	0.4
41	Decanoato de etilo	0.049	11.4	0.300	16.2	0.540	8.9	0.042	9.9	0.334	0.3	0.470	2.9	0.033	0.7	0.222	1.6	0.448	1.7
43	Succinato de dietilo	0.022	1.7	0.162	6.3	0.320	2.9	0.014	4.3	0.230	8.3	0.340	15.8	0.014	2.1	0.220	2.7	0.370	3.4
45	9-Decenoato de etilo	0.025	5.3	0.179	2.5	0.560	3.4	traz.		0.210	12.1	0.650	6.3	0.028	6.9	0.217	3.7	0.730	1.2
51	Dodecanoato de etilo	0.032	6.2	0.167	12.9	0.372	1.6	0.021	4.9	0.230	0.9	0.338	0.5	0.033	7.1	0.176	4.1	0.372	2.3
58	Malato de dietilo	N D		0.150	9.4	0.340	14.0	N D		0.196	2.5	0.360	7.1	N D		0.180	11.0	0.350	6.3
5	Acetato de propilo	traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.	
6	Acetato de isobutilo	0.051	5.5	0.260	2.9	0.270	11.6	0.031	9.8	0.191	8.2	0.276	1.5	0.071	7.8	0.210	3.3	0.284	0.6
11	Acetato de butilo	traz.		0.005	10.8	0.016	6.4	traz.		0.006	4.0	0.023	15.9	traz.		traz.		0.019	6.3
12	Acetato de isoamilo	0.590	4.4	10.630	0.9	17.100	3.3	0.340	9.0	6.590	0.9	15.600	0.7	0.646	0.7	13.100	2.7	20.900	2.9
18	Acetato de hexilo	0.541	1.1	0.480	2.5	0.470	2.5	0.486	1.3	0.450	2.7	0.429	1.0	0.480	0.6	0.500	8.2	0.460	3.0
47	Diacetato de 1,2-propanodiol	0.042	6.3	0.430	8.8	0.508	1.5	0.054	6.4	0.400	16.8	0.520	2.9	0.056	3.8	0.428	2.2	0.520	3.8
49	Acetato de 2-fenetilo	0.041	2.7	0.246	1.0	0.270	10.3	0.040	8.4	0.103	1.3	0.151	1.8	0.033	3.8	0.198	7.3	0.195	5.0
17	Isobutirato de isoamilo	traz.	4.6	0.009	14.9	0.022	9.1	0.005	4.6	0.012	1.3	0.031	3.0	traz.		0.010	7.5	0.033	5.7
19	Isovalerato de isoamilo	traz.		traz.		0.005	4.0	traz.		0.005	2.2	0.006	0.8	traz.		0.007	0.5	0.008	1.4
27	Hexanoato de isoamilo	traz.		0.011	3.9	0.016	19.3	0.009	1.8	0.022	4.4	0.031	2.2	traz.		0.010	2.7	0.020	8.9
29	Octanoato de isoamilo	0.015	2.4	0.046	0.4	0.066	0.9	0.007	6.9	0.056	4.6	0.073	2.2	0.011	1.4	0.050	5.4	0.067	3.5
53	Isobutirato de 2-fenetilo	traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		N D		N D		traz.	
54	Decanoato de isoamilo	traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		N D		N D		traz.	
62	Benzoato de 2-fenetilo	N D		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		N D		traz.		0.008	3.8

Tabla 3.3.1 (cont.).- Concentración de los distintos componentes en las días 2, 7 y 21 de fermentación en las muestras inoculadas con la cepa T73 (*Saccharomyces bayanus*).

POLIOLES		1E+5 cel/ml						1E+6 cel/ml						1E+7 cel/ml					
		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
34	2,3-Butanodiol (treo)	12.400	2.6	234.000	1.3	520.000	2.9	12.300	3.6	191.000	3.2	502.000	1.9	7.700	1.7	317.000	1.4	570.000	7.4
36	2,3-Butanodiol (eritro)	6.900	2.9	21.400	3.8	21.700	2.2	7.100	2.4	16.000	13.1	24.000	8.0	6.900	5.1	25.100	1.5	32.000	2.0
37	1,2-Propanodiol	0.450	7.3	27.443	0.8	32.000	3.4	7.100	5.7	26.000	4.4	33.000	5.9	0.347	0.3	26.600	1.6	32.400	3.1
61	Glicerol	N.D.		2620.000	3.8	4020.000	1.4	284.000	5.4	3140.000	1.8	6000.000	4.2	N.D.		3760.000	5.2	6400.000	9.4

OTROS		1E+5 cel/ml						1E+6 cel/ml						1E+7 cel/ml					
		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
1	Acetona	0.094	5.4	5.200	2.6	7.800		0.580	6.7	5.500	7.1	6.300	5.1	N.D.		4.100	8.2	4.390	2.2
3	2,4-dimetil-1,3-dioxolano	0.142	4.3	2.500	6.2	3.600	3.1	traz.		1.600	8.2	4.100	5.1	0.101	5.7	2.220	0.9	4.100	4.0
24	4,5-dimetil-2-pentadecil- -1,3-dioxolano	0.094	1.8	0.098	6.2	0.110	17.3	0.092	1.7	0.090	0.2	0.105	7.9	0.080	0.9	0.087	0.3	0.102	5.8
28	2,4-Dimetil-3-pentanona	traz.		0.012	2.4	0.011	8.9	traz.		0.015	2.4	0.015	5.9	N.D.		0.009	1.6	0.013	4.7
30	Benzaldehido	0.092	6.3	0.094	3.7	0.130	4.3	0.103	6.2	0.130	4.3	0.120	10.0	0.096	6.2	0.105	3.2	0.124	2.9
38	gamma-Butirolactona	traz.		1.250	3.9	2.840	0.6	traz.		1.210	2.0	2.110	0.8	0.015	0.9	1.250	2.0	2.610	1.5
39	N-Etilacetamida	traz.		0.025	4.7	0.052	0.7	traz.		0.028	7.4	0.042	17.4	traz.		0.026	1.9	0.065	4.0
56	beta-Ionona	0.016	2.8	0.092	13.2	0.109	2.2	0.055	10.3	0.061	0.9	0.099	6.9	0.039	3.5	0.104	1.2	0.116	2.3
60	Anilbenzaldehido	N.D.		0.079	3.7	0.118	7.3	N.D.		0.045	2.3	0.139	2.5	N.D.		0.116	0.6	0.280	6.1

C.V. = Coeficiente de variación.

N.D. = No detectado.

traz. = Trazas.

Tabla 3.3.2.- Evolución en la concentración de los principales grupos de compuestos en las muestras inoculadas con la cepa T73 (*Saccharomyces bayanus*). A) 10⁵ células/ml; B) 10⁶ células/ml; C) 10⁷ células/ml.

A)

		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Fracción volátil		98.559		732.844		1111.571	
Componentes constantes		3.219	3.27	3.153	0.43	3.213	0.29
Alcoholes superiores	Mayoritarios	71.500	72.55	415.000	56.63	477.700	42.98
	Minoritarios	0.050	0.05	0.172	0.02	0.367	0.03
	Total	73.452	74.53	418.085	57.05	481.610	43.33
Ácidos orgánicos		0.158	0.16	0.439	0.06	0.743	0.07
Ésteres	Acetato de etilo	0.332	0.34	3.300	0.45	12.200	1.10
	Etilicos*	0.563	0.57	4.211	0.57	7.310	0.66
	Acetatos*	0.724	0.73	11.570	1.58	18.164	1.63
	Isoamílicos	0.015	0.02	0.067	0.01	0.109	0.01
	Totales*	1.303	1.32	15.848	2.16	25.583	2.30
Dioles		19.750	20.04	282.843	38.60	573.700	51.61

B)

		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Fracción volátil		88.424		695.793		1117.990	
Componentes constantes		3.240	3.66	3.083	0.44	3.128	0.28
Alcoholes superiores	Mayoritarios	54.900	62.09	428.700	61.61	491.000	43.92
	Minoritarios	0.043	0.05	0.215	0.03	0.354	0.03
	Total	56.763	64.19	432.469	62.15	495.867	44.35
Ácidos orgánicos		0.153	0.17	0.387	0.06	0.643	0.06
Ésteres	Acetato de etilo	0.140	0.16	7.000	1.01	22.600	2.02
	Etilicos*	0.412	0.47	3.965	0.57	7.272	0.65
	Acetatos*	0.466	0.53	7.291	1.05	16.569	1.48
	Isoamílicos	0.021	0.02	0.096	0.01	0.141	0.01
	Totales*	0.899	1.02	11.351	1.63	23.982	2.15
Dioles		26.500	29.97	233.000	33.49	559.000	50.00

C)

		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Fracción volátil		99.215		915.722		1274.521	
Componentes constantes		3.179	3.20	3.190	0.35	3.184	0.25
Alcoholes superiores	Mayoritarios	77.710	78.32	505.800	55.24	569.000	44.64
	Minoritarios	0.051	0.05	0.186	0.02	0.395	0.03
	Total	78.989	79.61	509.989	55.69	574.437	45.07
Ácidos orgánicos		0.166	0.17	0.332	0.04	0.645	0.05
Ésteres	Acetato de etilo	0.400	0.40	6.800	0.74	21.300	1.67
	Etilicos*	0.484	0.49	4.904	0.54	7.113	0.56
	Acetatos*	0.806	0.81	13.936	1.52	21.918	1.72
	Isoamílicos	0.011	0.01	0.076	0.01	0.128	0.01
	Totales*	1.301	1.31	18.916	2.07	29.159	2.29
Dioles		14.947	15.07	368.700	40.26	634.400	49.78

* = menos acetato de etilo.

3.3.1.2.1.- Alcoholes superiores.

Para los alcoholes superiores mayoritarios se observa que tanto el 1-propanol como el isobutanol muestran concentraciones más elevadas, tanto en la parte intermedia de la fermentación como en el producto final, a medida que se incrementa la concentración del inóculo. Cabe destacar que la concentración de 1-propanol es mucho mayor, en todos los casos, que la obtenida por fermentación espontánea del mosto.

Para el alcohol isoamílico se observa que la inoculación con gran cantidad de células de T73 provoca un incremento del 35% en la concentración, tanto en la mitad de la fermentación como en el producto final.

Por el contrario, el 2-feniletanol presenta concentraciones finales mayores cuando se efectúa el inóculo con 10^5 células/ml, aunque en la parte intermedia de la fermentación las concentraciones son similares en todos los casos; cabe concluir la importancia que tiene el desarrollo de la flora autóctona, menos inhibida en su desarrollo al efectuar inóculos bajos, en la síntesis de este alcohol.

Para el resto de los alcoholes estudiados se observa que, excepto para el alcohol amílico en el que la concentración final es mayor cuanto menor es el inóculo realizado, la cantidad final es directamente proporcional a la cantidad de levadura seleccionada añadida.

Por su parte, el 3-metil-1-propanol muestra un comportamiento diferente, alcanzando su concentración máxima al cabo de 7 días de fermentación, pero con una síntesis muy elevada en los dos primeros días del proceso, sin que parezca clara la influencia de la concentración del inóculo sobre la concentración del alcohol.

Globalmente se observa que la cantidad de alcoholes superiores en el producto final es tanto mayor cuanto más elevado es el inóculo efectuado. Así, cuando se inocula el mosto con 10^5 y 10^6 células/ml se obtienen cantidades globales de alcoholes superiores muy similares a las encontradas para la fermentación espontánea, mientras que las muestras obtenidas con inóculos de 10^7 células/ml muestran cantidades unos 100 mg/l superiores.

3.3.1.2.2.- Ácidos grasos.

La evolución en la concentración de los ácidos grasos es, excepto para el ácido hexanoico, muy similar en todos los casos, mostrando, bien concentraciones relativamente independientes de la cantidad de inóculo realizado, bien cantidades mayores a medida que el aporte de la levadura seleccionada es mayor.

Para el ácido hexanoico (C_6), además de ser el único presente en el mosto en cantidades apreciables y mostrar una síntesis reducida a lo largo de la fermentación, muestra concentraciones significativamente mayores (un 50% superiores) en las muestras a las que se añade la menor cantidad de la cepa T73, añadiendo este componente al grupo de los que su síntesis se ve favorecida por el desarrollo de la flora autóctona del mosto, al menos, se ve dificultada por el desarrollo de la cepa T73 de *Saccharomyces bayanus*.

Globalmente, aunque la concentración de ácidos grasos es menor al inicio del proceso que la presente en los muestras obtenidas por fermentación espontánea, la situación se invierte en las etapas posteriores, sobre todo en las muestras a las que se añade el inóculo menor, debido fundamentalmente al aporte de ácido hexanoico; de igual modo, la importancia relativa de los ácidos grasos en la fracción volátil es tanto mayor cuanto menor es el inóculo realizado.

3.3.1.2.3.- Ésteres.

3.3.1.2.3.1.- Acetato de etilo.

Aunque en todos los casos se obtienen concentraciones de acetato de etilo más bajas cuando se inocula con T73 que en la fermentación espontánea, hecho que ya se observa desde el día 7 de fermentación. En el inicio del proceso se obtienen concentraciones superiores al inocular el mosto con 10^5 células/ml, lo que puede ser explicado porque la baja presencia de la levadura seleccionada va a permitir el desarrollo de la flora apiculada en el inicio de la fermentación, levaduras que produce cantidades elevadas de acetato de etilo (Amerine *et al.*, 1972; Lafon Lafourcade, 1983).

3.3.1.2.3.2.- Ésteres etílicos.

En todos los ésteres etílicos estudiados, excepto el 9-decenoato de etilo y los ésteres dietílicos, en los que la situación es la contraria, la concentración de cada componente es tanto mayor cuanto menor en el inóculo de la cepa T73 realizado. No

obstante, en ningún momento el conjunto de ésteres etílicos llega a ser equivalente al que se obtiene por fermentación espontánea del mosto, representando el 35-37% menos, aunque la cantidad formada al cabo de dos días de fermentación es similar en las muestras no inoculadas y en aquella a la que se añade 10^5 células/ml. Todas estas observaciones guardan cierto paralelismo con las cinéticas de fermentación; así, las muestras con inóculos mayores de T73 muestran un retraso en el inicio de la fermentación, lo cual se traduce en un menor contenido inicial de etanol, y por tanto de ésteres etílicos, al inicio del proceso frente a las muestras con el inóculo menor. El hecho de que las muestras inoculadas con T73 presentan una menor degradación de azúcares al cabo de 21 días de fermentación provoca que las cantidades de ésteres etílicos sean menores que en las muestras obtenidas por fermentación espontánea.

3.3.1.2.3.3.- Acetatos.

En todos los casos, los diferentes acetatos estudiados muestran un comportamiento similar al descrito para sus alcoholes superiores correspondientes. Así, tanto el acetato de isobutilo como el acetato de isoamilo se producen en cantidades mayores a medida que es superior el inóculo realizado, mientras que con el acetato de 2-fenetilo la situación es la contraria; la concentración de diacetato de 1,2-propanodiol es independiente del inóculo efectuado, al igual que sucede con el glicol correspondiente.

En conjunto, la concentración global de acetatos en las muestras inoculadas con la menor cantidad de la cepa T73 son similares a las que se obtienen en aquellas obtenidas por fermentación espontánea; en cambio, al igual que ocurría para los alcoholes superiores, las muestras inoculadas con 10^7 células/ml muestran concentraciones superiores. Parece claro el papel de factor limitante que ejerce la concentración del alcohol correspondiente en la síntesis de los respectivos acetatos.

3.3.1.2.3.4.- Ésteres de isoamilo.

La concentración de los distintos ésteres de isoamilo estudiados, al igual que sucedía para el alcohol isoamílico, es mayor cuando se hacen inóculos elevados, presentándose siempre la menor concentración en las muestras inoculadas con 10^5 células/ml de la cepa de *Saccharomyces bayanus*.

3.3.1.2.3.5.- Discusión.

En el conjunto de los ésteres, sin considerar el acetato de etilo, se observa que las concentraciones más elevadas las presentan las muestras inoculadas con 10^7 células/ml, centrado sobre todo en una mayor producción de acetatos. Las muestras con el menor inóculo de la cepa T73 son las que, como cabría esperar, más se aproximan a lo observado en la fermentación espontánea del mosto, aunque muestran concentraciones algo superiores. Por su parte, las muestras inoculadas con 10^6 células/ml presentan, en todos los casos, concentraciones menores de ésteres que las muestras que se obtienen por fermentación espontánea del mosto.

Las cantidades de ésteres etílicos de alto peso molecular se sitúan entre 1.917 y 1.975 mg/l, inferiores en un 20% a las que se obtienen por fermentación espontánea del mosto.

Por otra parte, a la vista de los resultados obtenidos, parece claro que es la evolución en la concentración de los distintos alcoholes implicados la que va a determinar como varían a lo largo de la fermentación las cantidades de los diferentes ésteres estudiados.

3.3.1.2.4.- Glicoles.

Entre los glicoles estudiados, destaca el caso del 1,2-propanodiol ya que, como indicamos al estudiar la evolución de su diacetato correspondiente, la concentración parece, en todo momento, independiente de la cantidad de inóculo realizado. La concentración del resto de glicoles muestra una clara dependencia respecto al inóculo realizado correspondiendo las concentraciones mayores, en todos los casos, a las muestras inoculadas con 10^7 células/ml. Este hecho hace que sean estas muestras las únicas que presentan una concentración de glicoles superior a las que se obtienen por fermentación espontánea del mosto, mientras que el resto muestra cantidades menores.

3.3.1.2.5.- Otros compuestos.

Se observa que tanto el 2,4-dimetil-1,3-dioxolano como la β -ionona muestran ligeras variaciones en su concentración en función de la cantidad de inóculo, correspondiendo las mayores a las muestras en las que se añade la cantidad más elevada de la levadura seleccionada. Por otra parte, mientras que la acetona se produce en cantidades mayores cuanto menor es el inóculo, la situación de la γ -butirolactona es menos atribuible

a la concentración del inóculo, mostrando ligeras variaciones entre las diferentes muestras obtenidas.

3.3.1.3.- Discusión.

En primer lugar cabe destacar el acusado periodo de latencia que se presenta en el consumo de azúcares al inicio del proceso, excepto cuando se realiza el menor inóculo, aunque las cantidades presentes en el medio en la etapa intermedia del proceso son similares a la fermentación espontánea, indicando que ocurre una aceleración del proceso entre los días 2 y 7 de fermentación.

En cuanto a la formación de los compuestos volátiles, se observa que las muestras inoculadas con 10^5 y 10^6 células/ml presentan cantidades similares y parecidas a las que se obtienen por fermentación espontánea del mosto, y claramente inferiores a las que presentan las muestras inoculadas con 10^7 células/ml. En la Tabla 3.3.3 se muestra la relación existente entre las cantidades de ésteres (A) y ésteres etílicos de alto peso molecular (B) respecto a los alcoholes superiores.

	10^5 células/ml	10^6 células/ml	10^7 células/ml
A/C	0.053	0.048	0.051
B/C	4.06E-33	3.87E-33	3.44E-33

Tabla 3.3.3.- Relación existente entre las cantidades de ésteres (A) y ésteres etílicos de alto peso molecular (B) respecto a los alcoholes superiores (C) en las muestras inoculadas con la cepa T73 de *Saccharomyces bayanus*.

Como puede observarse, aunque considerando el conjunto de los ésteres las diferencias no son muy elevadas, para el conjunto de los ésteres etílicos de alto peso molecular se obtienen valores menores a medida que la concentración del inóculo es mayor, pero siempre inferiores a los que se obtienen por fermentación espontánea del mosto. Considerando también la concentración global de alcoholes superiores y los resultados de la cinética de fermentación puede concluirse que es más apropiada la inoculación con 10^5 células/ml.

3.3.2.- Inoculación con la cepa L2226 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Entre las propiedades de la cepa L2226 de *Saccharomyces cerevisiae* están:

- Rápido inicio de la fermentación.
- Cepa K⁺R⁺.
- Tolerante al SO₂.
- Permite recomenzar la fermentación con tasas elevadas de alcohol (16%).

3.3.2.1.- Cinética de la fermentación.

Se observa un inicio relativamente rápido de la fermentación, aunque ésta es más veloz cuanto menor es el inóculo empleado. Sin embargo, esta situación tiende a invertirse en las etapas intermedias del proceso, quizá debido al efecto inhibitorio del etanol; al final de la fermentación, la concentración de azúcar en todos los casos es similar o algo inferior a la que se obtiene de la fermentación espontánea del mosto (Figura 3.2.2).

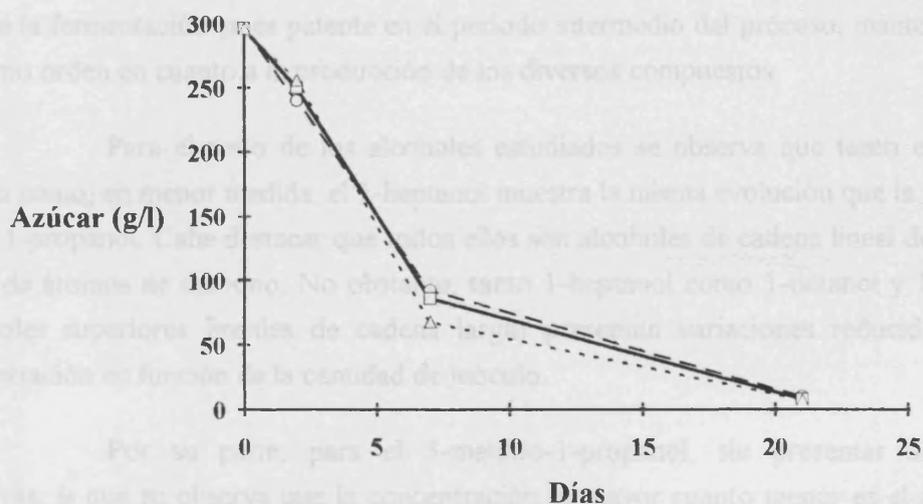


Figura 3.3.2.- Cinética de fermentación de los mostos inoculados con la cepa L2226 de *Saccharomyces cerevisiae* (O 10⁵ células/ml; □ 10⁶ células/ml, Δ 10⁷ células/ml).

3.3.2.2.- Formación de la fracción volátil

En la Tabla 3.3.4 se muestra la evolución de cada uno de los componentes estudiados para los tres inóculos ensayados a lo largo de la fermentación, así como el coeficiente de variación entre las distintas experiencias realizadas. En la Tabla 3.3.5 se presenta la evolución de la concentración global de cada uno de los grupos químicos más importantes de la fracción volátil del vino en las muestras inoculadas con la cepa L2226.

3.3.2.2.1.- Alcoholes superiores.

Dentro de los alcoholes superiores mayoritarios cabe destacar que tanto el isobutanol como el alcohol isoamílico y el 2-feniletanol muestran incrementos en sus concentraciones finales a medida que se inocula mayor cantidad de la levadura seleccionada, aunque en el caso del alcohol isoamílico las muestras inoculadas con 10^5 y 10^6 células/ml presentan concentraciones similares. De ellos, los dos últimos muestran concentraciones superiores, en todos los casos, a las muestras no inoculadas, mientras que el isobutanol presenta cantidades menores. Sin embargo, para el 1-propanol se obtienen concentraciones algo menores cuando se efectúa el inóculo de 10^6 células/ml, aunque en todos los casos se obtienen cantidades muy superiores a las que presentan las muestras obtenidas por fermentación espontánea. En todos los casos, la tendencia que se observa al final de la fermentación ya es patente en el periodo intermedio del proceso, manteniéndose el mismo orden en cuanto a la producción de los diversos compuestos.

Para el resto de los alcoholes estudiados se observa que tanto el alcohol amílico como, en menor medida, el 1-heptanol muestra la misma evolución que la mostrada por el 1-propanol. Cabe destacar que todos ellos son alcoholes de cadena lineal de número impar de átomos de carbono. No obstante, tanto 1-heptanol como 1-octanol y 1-decanol (alcoholes superiores lineales de cadena larga) presentan variaciones reducidas en su concentración en función de la cantidad de inóculo.

Por su parte, para el 3-metiltio-1-propanol, sin presentar diferencias excesivas, sí que se observa que la concentración es mayor cuanto menor es el aporte de levadura seleccionada. La síntesis de este alcohol es muy elevada en los dos primeros días de la fermentación, alcanzándose la cantidad máxima al cabo de 7 días.

Globalmente, se observa que la cantidad de alcoholes superiores que aparece en el producto final es tanto mayor cuanto más elevado es el inóculo realizado,

Tabla 3.3.4.- Concentración de los distintos componentes en las días 2, 7 y 21 de fermentación en las muestras inoculadas con la cepa L2226 (*Saccharomyces cerevisiae*).

ALCOHOLES		1E+5 cel/ml						1E+6 cel/ml						1E+7 cel/ml					
		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
7	1-Propanol	13.000	13.9	21.000	4.0	39.000	4.0	10.400	4.9	17.700	4.0	30.000	5.7	15.500	2.0	22.540	0.1	43.000	7.4
10	Isobutanol	15.300	1.5	54.000	4.9	106.300	0.7	10.800	2.2	71.000	2.0	116.000	1.4	12.800	0.4	80.400	3.9	144.000	1.2
13	1-Butanol	0.729	0.8	1.200	12.2	3.400	5.5	0.760	8.7	1.360	4.2	4.000	10.8	0.710	1.7	1.290	2.5	4.670	0.5
14	Alcohol isoamílico	39.400	0.5	199.000	5.0	250.000	0.4	30.570	0.2	181.000	2.3	246.000	1.1	32.400	0.8	248.000	2.2	280.000	0.5
16	Alcohol amílico	0.049	1.0	0.135	9.0	0.154	2.1	0.047	3.0	0.103	5.6	0.125	3.5	0.042	1.3	0.153	11.3	0.200	5.3
21	1-Hexanol	2.450	1.8	2.500	6.8	2.340	0.6	2.520	3.3	2.530	1.3	2.470	1.8	2.380	0.5	2.400	3.0	2.470	3.3
22	trans-3-Hexen-1-ol	0.034	0.4	0.036	2.0	0.038	1.8	0.032	5.3	0.035	7.5	0.035	1.8	0.035	2.6	0.035	8.8	0.036	6.4
23	cis-3-Hexen-1-ol	0.035	4.6	0.033	5.4	0.033	1.1	0.036	2.8	0.033	1.8	0.034	6.7	0.035	1.3	0.035	4.6	0.033	1.7
26	1-Heptanol	0.020	13.6	0.030	2.0	0.047	6.7	0.015	6.5	0.032	7.8	0.046	3.8	0.013	3.2	0.037	7.2	0.048	15.5
32	Linalool	0.008	1.8	0.006	8.3	0.004	8.8	0.006	6.3	0.007	3.0	0.005	2.7	0.008	2.8	0.008	2.9	0.005	3.7
33	1-Octanol	0.013	2.3	0.081	5.4	0.092	7.1	0.014	5.2	0.079	0.2	0.096	2.9	0.015	2.4	0.081	3.6	0.092	4.2
40	1-Metoxi-2-butanol	N.D.		0.050	5.9	0.115	7.1	N.D.		0.032	5.9	0.166	5.1	0.017	6.9	0.040	7.9	0.154	3.1
44	alfa-Terpineol	0.025	6.9	0.024	7.1	0.021	8.2	0.027	6.0	0.021	7.7	0.019	6.1	0.027	8.8	0.020	9.0	0.023	10.6
46	3-Metilito-1-propanol	0.561	1.1	0.900	10.1	0.970	6.8	0.520	5.9	0.800	13.9	0.900	6.5	0.486	2.0	0.700	1.3	0.800	12.9
48	1-Decanol	traz.		0.074	14.6	0.080	0.2	traz.		0.077	6.3	0.074	20.3	traz.		0.072	1.3	0.076	2.9
52	Alcohol bencilico	0.027	12.3	0.024	9.6	0.024	9.7	0.037	0.7	0.021	7.9	0.022	6.9	0.031	0.8	0.038	10.0	0.033	2.9
55	2-Feniletanol	0.980	1.3	69.000	4.5	97.600	1.0	14.400	4.8	88.000	3.6	108.000	3.9	5.100	2.3	103.000	1.9	115.400	0.6

ÁCIDOS GRASOS		1E+5 cel/ml						1E+6 cel/ml						1E+7 cel/ml					
		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
35	Acido isobutírico	traz.		0.039	6.9	0.078	12.6	traz.		0.035	3.6	0.065	6.2	traz.		0.041	5.1	0.077	5.6
42	Acido isovalerianico	0.014	8.3	0.128	5.4	0.243	1.0	traz.		0.121	8.3	0.260	5.0	traz.		0.161	0.4	0.261	3.0
50	Acido hexanoico	0.150	7.8	0.270	6.1	0.263	2.6	0.148	0.2	0.239	0.4	0.233	1.2	0.142	6.5	0.231	5.0	0.193	2.2
57	Acido octanoico	0.013	6.1	0.048	1.9	0.070	6.9	0.010	7.1	0.053	4.5	0.069	16.0	traz.		0.049	6.9	0.067	11.5
59	Acido decanoico	traz.		0.018	7.9	0.044	5.3	traz.		0.025	4.1	0.054	0.2	traz.		0.025	8.9	0.067	11.1

Tabla 3.3.4 (cont.)- Concentración de los distintos componentes en las días 2, 7 y 21 de fermentación en las muestras inoculadas con la cepa L2226 (*Saccharomyces cerevisiae*).

n° COMPONENTE		1E+5 cel/ml						1E+6 cel/ml						1E+7 cel/ml					
		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
2	Acetato de etilo	0.596	4.2	0.910	3.9	17.800	3.2	0.470	8.3	0.916	0.2	20.800	0.7	0.210	5.4	1.500	7.0	23.600	2.6
4	Isobutirato de etilo	traz.		0.050	1.3	0.059	7.3	0.010	8.9	0.055	4.5	0.063	16.7	0.007	9.3	0.055	6.1	0.061	4.2
8	Butirato de etilo	traz.		0.008	9.1	0.009	7.1	traz.		0.007	6.9	0.010	8.1	0.008	9.3	0.009	3.9	0.016	5.3
9	Isovalerato de etilo	traz.		0.008	3.8	0.005	3.8	traz.		0.007	1.9	0.007	2.3	traz.		traz.		0.011	12.2
15	Hexanoato de etilo	0.058	3.8	0.213	3.0	0.250	6.6	0.053	3.0	0.260	7.9	0.290	5.8	0.044	0.8	0.230	3.4	0.310	3.4
20	Lactato de etilo	0.330	5.8	2.443	0.3	3.600	8.7	0.121	6.9	2.390	0.7	3.400	5.8	0.214	2.3	2.379	0.4	3.360	2.4
25	Octanoato de etilo	0.022	13.6	0.191	4.9	0.341	2.6	0.035	2.1	0.210	5.8	0.340	5.4	0.015	1.6	0.220	6.1	0.350	5.7
31	3-Hidroxiobutirato de etilo	0.011	3.8	0.330	6.1	0.480	8.6	traz.		0.310	5.0	0.450	4.6	0.009	0.1	0.305	2.9	0.440	5.3
41	Decanoato de etilo	0.029	3.6	0.420	3.1	0.670	7.6	0.048	6.9	0.340	3.8	0.650	2.0	0.052	3.5	0.430	5.0	0.730	11.0
43	Succinato de dietilo	0.075	10.0	0.360	8.3	0.443	8.6	0.080	3.2	0.388	3.8	0.416	3.0	0.050	6.9	0.311	2.7	0.480	1.3
45	9-Decenoato de etilo	0.005	7.1	0.350	7.1	0.990	6.4	traz.		0.147	4.2	0.680	2.4	0.005	9.2	0.168	8.6	0.690	1.3
51	Dodecanoato de etilo	0.019	6.0	0.250	6.9	0.360	9.2	0.062	1.7	0.290	7.7	0.352	2.3	0.038	0.6	0.278	0.6	0.370	11.8
58	Malato de dietilo	0.045	18.4	0.150	5.3	0.230	4.9	N.D.		0.250	6.0	0.290	3.9	traz.		0.160	5.2	0.250	4.1
5	Acetato de propilo	traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.	
6	Acetato de isobutilo	0.023	7.2	0.380	3.4	0.405	0.3	0.071	0.6	0.450	6.1	0.480	1.0	0.058	4.1	0.380	11.3	0.666	0.9
11	Acetato de butilo	0.005	6.4	0.013	9.8	0.016	6.2	0.010	7.1	0.010	6.9	0.013	7.3	traz.		0.013	3.6	0.016	6.2
12	Acetato de isoamilo	0.516	0.3	3.700	3.3	26.200	1.2	0.512	0.8	3.540	0.4	21.500	1.5	0.425	1.9	3.600	4.0	25.700	1.2
18	Acetato de hexilo	0.510	4.0	0.450	9.0	0.510	6.2	0.430	8.6	0.450	10.1	0.430	9.1	0.450	0.5	0.500	2.3	0.490	12.9
47	Diacetato de 1,2-propanodiol	0.044	7.1	0.320	8.5	0.520	3.9	0.064	6.3	0.280	4.1	0.450	16.0	0.015	8.9	0.307	2.6	0.500	0.2
49	Acetato de 2-fenetilo	0.029	0.3	0.200	2.1	0.200	12.2	0.026	8.9	0.191	6.9	0.220	5.6	0.020	5.6	0.190	6.3	0.240	5.9
17	Isobutirato de isoamilo	traz.		0.025	11.6	0.024	0.8	traz.		0.014	8.1	0.016	7.1	traz.		0.018	3.5	0.017	9.7
19	Isovalerato de isoamilo	traz.		traz.		0.008	1.7	traz.		0.005	0.5	0.006	4.7	traz.		0.008	7.5	0.009	7.7
27	Hexanoato de isoamilo	traz.		0.023	6.7	0.036	5.6	0.007	1.8	0.028	3.8	0.037	6.3	traz.		0.027	13.2	0.035	0.5
29	Octanoato de isoamilo	0.012	2.2	0.054	9.0	0.085	2.8	0.005	9.1	0.057	5.3	0.080	3.0	0.010	3.2	0.062	20.6	0.084	11.0
53	Isobutirato de 2-fenetilo	traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.	
54	Decanoato de isoamilo	traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.	
62	Benzoato de 2-fenetilo	traz.		traz.		traz.		traz.		0.008	6.9	0.008	2.4	traz.		traz.		0.013	0.2

Tabla 3.3.4 (cont.)- Concentración de los distintos componentes en las días 2, 7 y 21 de fermentación en las muestras inoculadas con la cepa L2226 (*Saccharomyces cerevisiae*).

n° COMPONENTE		1E+5 cel/ml						1E+6 cel/ml						1E+7 cel/ml					
		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
34	2,3-Butanodiol (treo)	10.000	11.3	290.000	4.8	690.000	2.2	15.400	3.6	353.300	0.4	700.000	0.7	6.900	6.9	370.000	7.2	730.000	1.8
36	2,3-Butanodiol (eritro)	6.800	3.1	10.500	8.8	17.320	0.1	6.800	2.1	12.400	5.5	15.000	1.2	6.800	3.2	14.400	2.9	13.000	10.7
37	1,2-Propanodiol	0.080	6.2	52.000	2.9	62.000	3.1	0.079	6.5	45.800	2.3	52.600	1.5	0.075	7.2	51.400	5.3	48.000	5.1
61	Glicerol	N.D.		380.000	8.5	4400.000	4.1	N.D.		292.000	0.8	4700.000	3.5	N.D.		288.000	2.3	4400.000	8.1

n° COMPONENTE		1E+5 cel/ml						1E+6 cel/ml						1E+7 cel/ml					
		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
1	Acetona	N.D.		6.000	3.9	7.300	12.3	1.140	4.3	5.100	10.8	6.800	3.2	0.930	5.3	8.900	4.9	10.000	13.2
3	2,4-dimetil-1,3-dioxolano	0.095	1.7	1.430	3.1	2.210	2.9	0.069	6.9	1.390	4.9	2.000	3.1	0.032	8.2	1.550	4.1	2.550	3.2
24	4,5-dimetil-2-pentadecil-1,3-dioxolano	0.101	0.7	0.105	4.8	0.093	3.1	0.070	0.4	0.095	2.0	0.139	0.8	0.081	0.3	0.131	0.9	0.148	2.6
28	2,4-Dimetil-3-pentanona	N.D.		0.012	5.0	0.009	6.6	traz.		0.015	4.7	0.013	5.3	traz.		traz.		0.014	13.2
30	Benzaldehido	0.088	7.3	0.130	14.4	0.149	10.7	0.090	8.3	0.111	3.0	0.135	5.8	0.090	7.1	0.096	8.2	0.118	14.4
38	gamma-Butirolactona	0.009	1.9	2.100	6.6	4.240	1.3	0.046	14.9	2.040	2.9	4.083	0.1	0.009	5.9	1.630	3.9	3.920	2.5
39	N-Etilacetamida	traz.		0.106	13.3	0.097	1.4	traz.		0.099	2.8	0.084	4.9	traz.		0.068	8.3	0.121	1.8
56	beta-Ionona	0.015	9.8	0.161	14.0	0.230	5.1	0.030	9.0	0.190	10.2	0.270	7.2	0.013	9.7	0.200	3.8	0.260	8.6
60	Amilbenzaldehido	traz.		0.089	17.4	0.202	6.0	N.D.		0.051	9.6	0.222	0.5	N.D.		0.020	7.1	0.219	1.9

C.V. = coeficiente
de variación
N.D. = No detectado
traz. = trazas

Tabla 3.3.5.- Evolución en la concentración de los principales grupos de compuestos en las muestras inoculadas con la cepa L2226 (*Saccharomyces cerevisiae*).
 A) 10^5 células/ml; B) 10^6 células/ml; C) 10^7 células/ml.

A)

		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Fracción volátil		92.323		721.989		1337.804	
Componentes constantes		3.177	3.44	3.203	0.44	3.119	0.23
Alcoholes superiores	Mayoritarios	68.680	74.39	343.000	47.51	492.900	36.84
	Minoritarios	0.082	0.09	0.321	0.04	0.373	0.03
	Totales	70.052	75.88	345.470	47.85	497.758	37.21
Ácidos orgánicos		0.177	0.19	0.504	0.07	0.697	0.05
Ésteres	Acetato de etilo	0.596	0.65	0.910	0.13	17.800	1.33
	Etilicos*	0.592	0.64	4.774	0.66	7.437	0.56
	Acetatos*	0.617	0.67	4.613	0.64	27.340	2.04
	Isoamilicos	0.012	0.01	0.102	0.01	0.153	0.01
	Totales*	1.221	1.32	9.489	1.31	34.930	2.61
Dioles		16.880	18.28	352.500	48.82	769.320	57.51

B)

		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Fracción volátil		96.070		794.438		1340.585	
Componentes constantes		3.179	3.31	3.208	0.40	3.150	0.23
Alcoholes superiores	Mayoritarios	66.170	68.88	357.700	45.03	500.000	37.30
	Minoritarios	0.076	0.08	0.291	0.04	0.341	0.03
	Totales	67.526	70.29	360.183	45.34	505.407	37.70
Ácidos orgánicos		0.158	0.16	0.473	0.06	0.681	0.05
Ésteres	Acetato de etilo	0.470	0.49	0.916	0.12	20.800	1.55
	Etilicos*	0.409	0.43	4.654	0.59	6.948	0.52
	Acetatos*	0.683	0.71	4.471	0.56	22.663	1.69
	Isoamilicos	0.011	0.01	0.104	0.01	0.139	0.01
	Totales*	1.103	1.15	9.228	1.16	29.750	2.22
Dioles		22.279	23.19	411.500	51.80	767.600	57.26

C)

		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Fracción volátil		86.300		918.676		1458.264	
Componentes constantes		3.055	3.54	3.132	0.34	3.209	0.22
Alcoholes superiores	Mayoritarios	65.800	76.25	453.940	49.41	582.400	39.94
	Minoritarios	0.071	0.08	0.344	0.04	0.416	0.03
	Totales	67.083	77.73	456.314	49.67	588.440	40.35
Ácidos orgánicos		0.142	0.16	0.507	0.06	0.666	0.05
Ésteres	Acetato de etilo	0.210	0.24	1.500	0.16	23.600	1.62
	Etilicos*	0.441	0.51	4.545	0.49	7.069	0.48
	Acetatos*	0.518	0.60	4.491	0.49	27.122	1.86
	Isoamilicos	0.010	0.01	0.114	0.01	0.146	0.01
	Totales*	0.970	1.12	9.150	1.00	34.336	2.35
Dioles		13.775	15.96	435.800	47.44	791.000	54.24

* = menos acetato de etilo.

siendo más acusado cuando se añade al mosto 10^7 células/ml de la levadura L2226; cuando se efectúa el inóculo más bajo, la cantidad de alcoholes superiores es muy similar a la que se obtiene en la fermentación espontánea del mosto. Sin embargo, a día 7 de fermentación, sólo es parecida a la fermentación espontánea la muestra en la que se realiza el inóculo más alto, mientras que en el resto de los casos las cantidades sintetizadas son significativamente menores.

3.3.2.2.2.- Ácidos grasos.

A excepción del ácido hexanoico, el resto de ácidos grasos estudiados muestra concentraciones ligeramente superiores cuanto más elevado es el inóculo realizado, aunque las diferencias son mínimas.

El ácido hexanoico (C_6) muestra incrementos poco acusados de su concentración a lo largo de la fermentación (apenas si duplica su concentración) pero además presenta cantidades más elevadas cuanto menor es el inóculo realizado (entre 15-35%), de modo que parece que el desarrollo de la levadura seleccionada va a dificultar la síntesis de este ácido.

Globalmente, la cantidad de ácidos grasos que se sintetiza es mayor cuanto más reducido es el inóculo efectuado, fundamentalmente debido al aporte del ácido hexanoico, aunque las diferencias son inferiores al 5%. Lo que si se observa es que en todos los casos, las cantidades que se obtiene son un 25-30% superiores a las que se observan en las muestras obtenidas por fermentación espontánea del mosto.

3.3.2.2.3.- Ésteres.

3.3.2.2.3.1.-Acetato de etilo.

Lo que en principio llama la atención sobre la producción de acetato de etilo en los mostos inoculados con la cepa L2226 es la escasa síntesis que se observa en los 7 primeros días de la fermentación, mientras que la mayor parte de este producto se forma en la etapa final del proceso. Por otra parte, se observa que se produce un incremento en la concentración de acetato de etilo a medida que se incrementa el aporte de la levadura seleccionada, aunque en ningún caso llegan a alcanzarse las concentraciones obtenidas en la fermentación espontánea del mosto.

3.3.2.2.3.2.- Ésteres etílicos.

La mayoría de los ésteres etílicos considerados muestran un incremento en la concentración final cuanto mayor es el inóculo realizado; sin embargo, las diferencias no son en ningún caso muy acusadas, destacando, quizá, la diferencia del 25% que se presenta en el hexanoato de etilo, mientras que en el resto de los casos es siempre inferior al 15%.

Sin embargo, los hidroxí-ésteres etílicos y el 9-decenoato de etilo muestran concentraciones mayores en todos los estadios de la fermentación cuando se emplean concentraciones bajas de inóculo; no obstante, en el caso de los hidroxí-ésteres, las diferencias nunca son muy acusadas (7-9%), mientras que en el 9-decenoato de etilo se observan diferencias del 45%.

Considerando el conjunto de los ésteres etílicos, se observa que las cantidades más elevadas se obtienen cuando se efectúa el inóculo menor. Sin embargo, en todos los casos, las concentraciones son mucho menores que las obtenidas por fermentación espontánea del mosto, oscilando entre 21-28% al cabo de 7 días de fermentación y entre 51-62% al final del periodo fermentativo, aunque las concentraciones de los ésteres etílicos de alto peso molecular son similares a las que se obtienen por fermentación espontánea del mosto. Este hecho no se puede justificar únicamente en función de la concentración de etanol (ya que es similar en todos los casos), por lo que debemos pensar en la intervención de otros factores añadidos que van a determinar la síntesis de los ésteres etílicos.

3.3.2.2.3.3.- Acetatos.

Para todos los acetatos considerados se observa el mismo comportamiento que el visto para sus respectivos alcoholes superiores; así, tanto el acetato de 2-fenetilo como el acetato de isoamilo muestran concentraciones mayores cuanto más elevado es el aporte de levadura seleccionada. Por el contrario, tanto el acetato de isobutilo como el diacetato de 1,2-propanodiol presentan cantidades más elevadas con el inóculo de 10^5 células/ml de la cepa L2226. Sin embargo, el acetato de isoamilo muestra un comportamiento diferencial; así, mientras el resto de acetatos se sintetiza mayoritariamente en los 7 primeros días de la fermentación, el de isoamilo se forma fundamentalmente a partir de ese momento del periodo fermentativo.

En conjunto se observa que las inoculaciones mayor y menor presentan concentraciones similares, mientras que cuando se efectúa el inóculo de 10^6 células/ml la cantidad obtenida es menor. Sin embargo, las concentraciones que se obtienen son 30-57% superiores a las que se presentan en la fermentación espontánea, de forma paralela a lo que ocurre con los alcoholes superiores.

3.3.2.2.3.4.- Ésteres de isoamilo..

Los ésteres de isoamilo muestra comportamientos similares con ligeras diferencias en función de la concentración del inóculo, aunque mantienen la evolución mostrada por el alcohol isoamílico. Sin embargo, en ningún caso se presenta el efecto mencionado para el acetato de isoamilo.

3.3.2.2.3.5.- Discusión.

Dado que los acetatos son los compuestos mayoritarios dentro de los ésteres, es la variación de éstos la que va a determinar su comportamiento. Así, se observa que la mayor concentración se presenta en las muestras inoculadas con 10^5 y 10^7 células/ml. No obstante, las concentraciones finales son mayores, en todos los casos, que las que se obtienen por fermentación espontánea, aunque a día 7 de fermentación la situación es la contraria, siendo la muestra inoculada con la menor cantidad de la cepa L2226 la más próxima a la muestra no inoculada.

3.3.2.2.4.- Glicoles.

Por un lado, se observa que la formación de glicerol no depende del inóculo realizado, destacando el hecho de que se sintetiza fundamentalmente a partir del día 7 de fermentación. Tanto el 1,2-propanodiol como el *eritro*-2,3-butanodiol muestran concentraciones máximas cuando se inocula el mosto con 10^5 células/ml y la mínima cuando se realiza el inóculo con 10^6 células/ml. Por último, el *treo*-2,3-butanodiol muestra concentraciones finales tanto mayores cuanto más elevado es el inóculo.

Globalmente, la muestra que presenta un mayor contenido en dioles es la inoculada con 10^5 células/ml de la cepa L2226 y siempre superior al que se obtiene por fermentación espontánea; igual sucede, pero en menor medida, con la muestra inoculada con 10^7 células/ml. Por el contrario, la muestra inoculada con 10^6 células/ml muestra concentraciones más bajas que las muestras obtenidas por fermentación espontánea.

3.3.2.2.5.- Otros compuestos.

Del resto de compuestos estudiados, tanto acetona como β -ionona y 2,4-dimetil-1,3-dioxolano presentan concentraciones mayores a medida que el inóculo es más elevado. Por su parte, la γ -butirolactona, aunque con diferencias mínimas, muestra concentraciones mayores cuanto menor es el aporte de la levadura seleccionada L2226.

3.3.2.3.- Discusión.

Si nos fijamos en la cinética de la fermentación observamos que no existen grandes diferencias en función del inóculo empleado, aunque es ligeramente más rápido el inicio cuando se realiza el aporte más bajo de levadura seleccionada.

Atendiendo a la fracción volátil, se observa que las cantidades menores se obtienen con los inóculos de 10^5 y 10^6 células/ml, aunque en todos los casos son superiores a las que se obtienen por fermentación espontánea del mosto, fundamentalmente por la concentración de dioles.

Las cantidades de alcoholes superiores que se obtienen muestra la misma dependencia del inóculo que la vista para el conjunto de la fracción volátil; no obstante, las concentraciones presentes en las muestras a las que se añade menor cantidad de la cepa L2226 son muy parecidas a las que se obtienen por fermentación espontánea del mosto. En cuanto a las relaciones existentes entre la cantidad total de ésteres (A) o ésteres etílicos de alto peso molecular (B) respecto al contenido en alcoholes superiores (C) (Tabla 3.3.6).

	10 ⁵ células/ml	10 ⁶ células/ml	10 ⁷ células/ml
A/C	0.070	0.059	0.058
B/C	5.24E-3	4.58E-3	4.16E-3

Tabla 3.3.6.- Relación existente entre las cantidades de ésteres (A) y ésteres etílicos de alto peso molecular (B) respecto a los alcoholes superiores (C) en las muestras inoculadas con la cepa L2226 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Para ambas relaciones los valores más elevados se obtienen al realizar el inóculo con 10^5 células/ml, siendo incluso superiores a los que se obtienen en la fermentación espontánea del mosto, mientras que las cantidades son menores a medida que

la concentración del inóculo es más elevada. De este modo, cabe concluir que los resultados más satisfactorios se obtienen, para la cepa L2226 de *Saccharomyces cerevisiae*, al inocular el mosto con 10^5 células/ml, obteniéndose, para todos los parámetros estudiados, valores similares a los que proporciona la fermentación espontánea del mosto.

3.3.3.- Inoculación con la cepa V de *Saccharomyces cerevisiae*.

Las características enológicas de la cepa V de *Saccharomyces cerevisiae* son:

- Rápido inicio de la fermentación.
- Cepa K⁺R⁺.
- Resistencia a altas concentraciones de etanol.

3.3.3.1.- Cinética de la fermentación.

El mosto inoculado con esta levadura muestra un rápido inicio de la fermentación, aunque en ningún momento se iguala a la fermentación espontánea (50-70 g/l en los dos primeros días), siendo más rápido cuanto mayor es el inóculo realizado. Sin embargo, al cabo de 7 días de fermentación, excepto en la muestra en la que se hace el inóculo más bajo, la cantidad de azúcares es la menor de todas las muestras, presentando un elevado consumo en etapas intermedias de la fermentación.

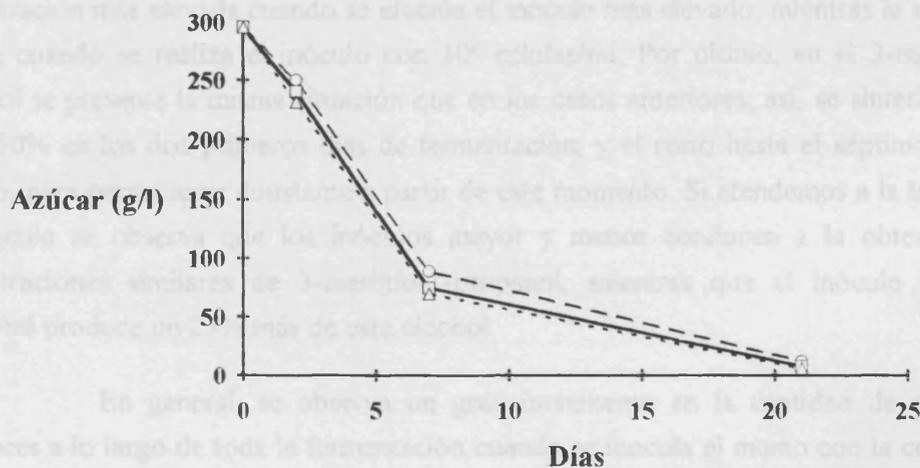


Figura 3.3.3.- Cinética de fermentación de los mostos inoculados con la cepa V de *Saccharomyces cerevisiae* (O 10^5 células/ml; □ 10^6 células/ml, Δ 10^7 células/ml).

Al cabo de 21 días, se obtiene un vino con el mismo contenido en azúcares que la muestra obtenida por fermentación espontánea del mosto y aquella en la que se inocula la cepa L2226 (Figura 3.3.3).

3.3.3.2.- Formación de la fracción volátil.

En la Tabla 3.3.7 se muestra la evolución de cada uno de los componentes estudiados para los tres inóculos ensayados a lo largo de la fermentación, así como el coeficiente de variación entre las distintas experiencias realizadas. En la Tabla 3.3.8 se presenta la evolución de la concentración global de cada uno de los grupos químicos más importantes de la fracción volátil del vino en las muestras inoculadas con la cepa V.

3.3.3.2.1.-Alcoholes superiores.

Atendiendo a los alcoholes superiores mayoritarios cabe destacar, en primer lugar, que la influencia de la concentración del inóculo es más bien reducida. No obstante, parece que existe una mayor concentración de cada componente cuanto mayor es el inóculo efectuado.

Para el 1-butanol la situación es un tanto más confusa ya que aunque la menor concentración corresponde al inóculo menor, la mayor lo hace al inóculo de 10^6 células/ml. En el resto de alcoholes superiores se observa que tanto para el 1-heptanol como para el 1-octanol la síntesis es mayor cuanto menor es el inóculo realizado. En cambio, para el 1-pentanol la situación es la inversa. Por su parte, el 1-decanol presenta la concentración más elevada cuando se efectúa el inóculo más elevado, mientras la menor se obtiene cuando se realiza el inóculo con 10^6 células/ml. Por último, en el 3-metil-1-propanol se presenta la misma situación que en los casos anteriores; así, se sintetiza cerca de un 50% en los dos primeros días de fermentación, y el resto hasta el séptimo día del proceso, para permanecer constante a partir de este momento. Si atendemos a la influencia del inóculo se observa que los inóculos mayor y menor conducen a la obtención de concentraciones similares de 3-metil-1-propanol, mientras que el inóculo con 10^6 células/ml produce un 25% más de este alcohol.

En general, se observa un gran incremento en la cantidad de alcoholes superiores a lo largo de toda la fermentación cuando se inocula el mosto con la cepa V de *Saccharomyces cerevisiae*. Este incremento es del 86-220% a los dos días de la fermentación, del 34-49% al cabo de siete días de iniciada la fermentación y del 6-19% en

Tabla 3.3.7.- Concentración de los distintos componentes en las días 2, 7 y 21 de fermentación en las muestras inoculadas con la cepa V (*Saccharomyces cerevisiae*).

ALCOHOLES		1E+5 cel/ml						1E+6 cel/ml						1E+7 cel/ml					
		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
7	1-Propanol	7.600	4.4	39.000	15.1	45.000	6.1	9.300	3.1	46.000	3.1	49.000	6.6	9.470	0.2	46.000	4.7	46.000	3.5
10	Isobutanol	16.400	2.4	130.000	0.7	125.000	1.1	19.920	0.2	131.000	2.8	128.000	6.3	16.900	1.7	118.000	1.4	119.800	0.6
13	1-Butanol	0.740	9.5	2.100	1.1	3.120	3.1	0.910	6.7	2.640	0.7	3.800	12.6	0.790	9.5	2.540	1.0	3.400	6.5
14	Alcohol isoamílico	49.600	1.6	324.000	1.0	273.000	1.9	69.100	0.8	350.000	3.1	320.000	5.3	98.600	0.9	382.000	1.3	336.000	0.9
16	Alcohol amílico	0.049	1.4	0.060	4.4	0.091	15.2	0.064	2.1	0.105	3.9	0.149	3.1	0.075	0.3	0.174	4.9	0.207	9.4
21	1-Hexanol	2.420	1.0	2.460	1.8	2.440	0.8	2.500	1.1	2.480	3.2	2.460	3.7	2.470	3.1	2.480	1.4	2.480	1.1
22	trans-3-Hexen-1-ol	0.035	4.4	0.033	5.2	0.033	8.6	0.035	4.0	0.033	16.0	0.034	6.4	0.036	4.6	0.034	9.0	0.035	4.8
23	cis-3-Hexen-1-ol	0.034	3.0	0.034	4.1	0.034	4.1	0.033	13.0	0.035	11.2	0.033	5.7	0.032	8.6	0.034	11.5	0.034	3.2
26	1-Heptanol	0.017	11.5	0.049	0.4	0.086	5.8	0.020	3.6	0.048	1.1	0.086	1.5	0.023	1.6	0.046	10.9	0.075	1.3
32	Linalool	0.007	1.8	0.008	4.3	0.007	2.3	0.005	2.7	0.006	2.7	0.009	1.8	0.007	4.0	0.007	0.4	0.010	2.0
33	1-Octanol	0.014	2.3	0.080	6.4	0.108	3.1	0.010	4.5	0.073	7.0	0.108	6.2	0.017	3.9	0.095	1.7	0.104	1.6
40	1-Metoxi-2-butanol	0.006	8.1	0.025	2.2	0.120	18.0	0.010	7.1	0.018	6.2	0.108	3.1	N.D.		6.000		0.120	12.4
44	alfa-Terpineol	0.020	7.1	0.028	6.2	0.024	4.1	0.024	3.7	0.029	9.1	0.022	4.8	0.027	6.0	0.029	5.7	0.025	10.2
46	3-Metilitio-1-propanol	0.463	1.1	1.080	2.2	1.100	11.7	0.720	7.5	1.410	3.1	1.400	9.4	0.570	9.8	1.100	6.1	1.150	3.4
48	1-Decanol	0.009	7.1	0.048	8.7	0.082	17.4	traz		0.041	4.8	0.066	3.0	0.005	9.1	0.065	3.9	0.098	13.0
52	Alcohol bencílico	0.033	12.3	0.034	6.9	0.036	10.6	0.044	5.6	0.043	4.8	0.046	7.2	0.037	3.6	0.036	7.9	0.039	5.6
55	2-Feniletanol	18.400	1.3	75.000	2.0	74.000	3.4	23.000	5.9	75.000	3.3	76.000	6.3	35.000	4.9	77.600	0.8	77.200	1.4

ÁCIDOS ORGÁNICOS		1E+5 cel/ml						1E+6 cel/ml						1E+7 cel/ml					
		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
35	Ácido isobutírico	traz		0.035	1.7	0.135	6.1	traz		0.017	3.0	0.103	7.1	traz		0.012	6.9	0.099	7.6
42	Ácido isovaleriano	0.006	9.2	0.207	5.3	0.409	3.9	traz		0.183	3.8	0.410	2.6	0.012	3.2	0.199	8.2	0.413	3.6
50	Ácido hexanoico	0.189	3.7	0.308	3.0	0.320	6.8	0.150	0.1	0.299	7.8	0.304	9.9	0.162	13.5	0.238	1.8	0.287	6.7
57	Ácido octanoico	0.011	4.7	0.077	13.0	0.088	5.7	0.012	9.1	0.073	7.6	0.082	2.2	0.019	7.1	0.075	6.8	0.118	5.5
59	Ácido decanoico	traz		0.029	2.3	0.077	6.5	traz		0.037	2.2	0.056	4.2	traz		0.051	11.5	0.055	7.7

Tabla 3.3.7 (cont.).- Concentración de los distintos componentes en las días 2, 7 y 21 de fermentación en las muestras inoculadas con la cepa V (*Saccharomyces cerevisiae*).

ÉSTERES

n°	COMPONENTE	1E+5 cel/ml						1E+6 cel/ml						1E+7 cel/ml					
		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
2	Acetato de etilo	0.440	11.6	2.800	7.3	27.300	2.9	0.880	3.6	1.500	8.0	35.000	7.3	0.680	7.5	3.250	2.0	48.900	2.0
4	Isobutirato de etilo	traz.		0.045	1.1	0.051	6.3	0.010	7.1	0.032	19.1	0.033	7.0	0.012	6.8	0.035	0.5	0.041	4.4
8	Butirato de etilo	0.006	2.5	0.015	5.8	0.017	3.5	0.005	9.8	0.008	7.1	0.007	9.7	traz.		0.011	6.4	0.007	7.2
9	Isovalerato de etilo	traz.		traz.		0.012	0.7	traz.		0.004	9.0	0.008	5.8	traz.		0.005	9.6	0.009	4.4
15	Hexanoato de etilo	0.074	3.1	0.264	2.3	0.340	3.8	0.103	0.6	0.248	4.5	0.290	8.0	0.135	2.1	0.256	3.4	0.269	2.9
20	Lactato de etilo	0.114	3.1	1.900	10.8	8.300	7.2	0.150	12.0	2.230	2.2	7.780	0.7	0.360	11.8	2.600	7.2	8.300	1.6
25	Octanoato de etilo	0.027	3.1	0.250	4.8	0.570	4.1	0.033	2.2	0.247	1.8	0.580	12.2	0.043	12.6	0.240	0.2	0.570	4.3
31	3-Hidroxibutirato de etilo	0.086	3.8	0.600	6.1	0.590	8.4	0.134	1.0	0.590	3.3	0.585	0.4	0.199	2.3	0.590	2.3	0.620	7.8
41	Decanoato de etilo	0.046	3.6	0.270	7.7	0.500	1.1	0.047	5.9	0.210	9.8	0.487	1.2	0.061	1.3	0.241	8.5	0.500	4.3
43	Succinato de dietilo	0.018	10.0	0.325	1.0	0.910	6.5	0.024	4.9	0.335	3.0	0.900	7.2	0.051	4.0	0.520	10.6	1.000	5.6
45	9-Decenoato de etilo	0.032	4.7	0.230	3.9	0.440	14.3	0.053	5.7	0.600	2.7	0.570	3.2	0.029	14.6	0.520	3.6	0.510	1.4
51	Dodecanoato de etilo	0.033	6.0	0.250	18.0	0.310	10.0	0.043	5.9	0.210	4.5	0.330	9.5	0.072	3.1	0.180	4.9	0.360	5.0
58	Malato de dietilo	N.D.		0.230	7.6	0.350	6.4	0.092	6.6	0.242	1.9	0.400	10.4	N.D.		0.213	1.9	0.360	2.8
5	Acetato de propilo	traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.	
6	Acetato de isobutilo	0.020	14.4	0.560	0.3	1.060	1.4	0.016	10.5	0.530	5.9	1.100	2.1	0.011	8.9	0.634	0.8	0.986	0.5
11	Acetato de butilo	0.005	10.1	0.031	6.8	0.044	5.7	0.013	18.4	0.042	4.5	0.052	6.2	0.010	5.4	0.033	3.7	0.040	9.2
12	Acetato de isoamilo	0.764	1.0	11.900	1.4	24.200	1.2	0.980	7.7	9.800	0.5	28.000	4.0	1.490	1.7	13.600	1.1	29.400	0.6
18	Acetato de hexilo	0.497	0.8	0.480	4.6	0.440	9.2	0.440	5.3	0.430	2.2	0.490	3.6	0.430	1.3	0.490	5.2	0.490	12.0
47	Diacetato de 1,2-propanodiol	0.025	4.9	0.199	0.2	0.600	1.7	0.068	4.0	0.261	1.7	0.750	2.6	0.049	11.2	0.450	9.7	0.900	0.7
49	Acetato de 2-fenitilo	0.030	0.3	0.094	9.7	0.120	0.2	0.030	4.7	0.119	2.9	0.120	19.2	0.030	5.6	0.134	6.5	0.123	2.2
17	Isobutirato de isoamilo	traz.		0.012	10.3	0.023	4.2	traz.		0.016	1.9	0.030	9.6	traz.		0.017	6.0	0.031	10.2
19	Isovalerato de isoamilo	traz.		traz.		0.005	10.0	traz.		traz.		0.005	5.7	traz.		traz.		0.006	1.6
27	Hexanoato de isoamilo	traz.		0.023	5.2	0.035	6.2	traz.		0.032	3.1	0.037	5.7	traz.		0.028	2.8	0.038	1.2
29	Octanoato de isoamilo	0.005	2.2	0.048	11.6	0.080	10.4	0.006	9.3	0.049	4.3	0.099	8.3	0.015	4.6	0.059	6.5	0.125	1.3
53	Isobutirato de 2-fenitilo	traz.		0.009	4.9	0.013	19.5	traz.		0.006	8.4	traz.		traz.		0.015	8.7	0.012	4.2
54	Decanoato de isoamilo	traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		traz.	
62	Benzoato de 2-fenitilo	traz.		traz.		traz.		traz.		traz.		0.008	4.9	traz.		0.007	4.7	0.007	4.5

Tabla 3.3.7 (cont.)- Concentración de los distintos componentes en las días 2, 7 y 21 de fermentación en las muestras inoculadas con la cepa V (*Saccharomyces cerevisiae*).

POLIOLES		1E+5 cel/ml						1E+6 cel/ml						1E+7 cel/ml					
		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
34	2,3-Butanodiol (treo)	14.000	11.3	410.000	6.3	890.000	2.5	7.600	4.5	338.000	2.7	820.000	2.6	13.200	2.9	445.000	0.9	720.000	3.0
36	2,3-Butanodiol (eritro)	7.200	6.9	18.500	4.4	26.000	8.6	6.900	7.0	18.300	2.5	21.000	14.3	6.800	6.1	16.200	2.9	28.600	2.0
37	1,2-Propanodiol	0.081	4.3	37.400	1.4	74.000	1.4	0.082	3.0	36.000	3.9	73.600	0.6	0.075	3.4	39.500	0.6	78.000	2.6
61	Glicerol	N.D.		2920.000	2.6	3600.000	1.6	400.000	6.7	2600.000	10.7	3600.000	5.8	N.D.		3500.000	2.1	4060.000	1.7

OTROS		1E+5 cel/ml						1E+6 cel/ml						1E+7 cel/ml					
		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
1	Acetona	N.D.		6.800	6.6	10.000	12.2	N.D.		5.800	6.1	11.000	12.6	N.D.		7.600	2.7	10.100	7.9
3	2,4-dimetil-1,3-dioxolano	0.400	6.9	3.300	7.1	7.070	1.2	0.400	3.4	3.840	0.7	6.300	3.2	0.139	4.3	4.000	4.6	6.200	4.1
24	4,5-dimetil-2-pentadecil- -1,3-dioxolano	0.086	2.6	0.129	4.2	0.088	1.2	0.098	4.7	0.134	3.9	0.080	19.5	0.082	2.5	0.111	5.1	0.108	2.8
28	2,4-Dimetil-3-pentanona	traz.		0.012	4.8	0.018	4.3	traz.		0.007	7.9	0.010	5.3	traz.		0.011	4.3	0.023	4.6
30	Benzaldehido	0.109	6.9	0.096	3.7	0.092	10.8	0.088	7.2	0.117	7.2	0.117	8.3	0.088	6.9	0.104	5.1	0.121	4.2
38	gamma-Butirolactona	0.025	1.9	1.680	1.2	2.700	4.3	0.025	1.2	0.780	4.5	2.400	9.5	0.019	3.0	0.730	5.1	2.170	2.4
39	N-Etilacetamida	0.008	7.3	0.021	1.5	0.072	2.9	0.006	6.9	0.033	3.5	0.050	0.6	0.026	5.9	0.018	1.3	0.099	2.1
56	beta-Ionona	0.025	3.7	0.288	2.1	0.250	4.9	0.055	12.4	0.230	13.5	0.261	6.4	0.114	9.9	0.300	13.2	0.240	3.0
60	Amilbenzalchido	N.D.		0.094	0.6	0.202	3.4	N.D.		0.084	5.7	0.280	5.8	N.D.		0.095	2.4	0.175	1.9

C.V. = Coeficiente de variación.

N.D. = No detectado.

traz. = Trazas.

Tabla 3.3.8.- Evolución en la concentración de los principales grupos de compuestos en las muestras inoculadas con la cepa V (*Saccharomyces cerevisiae*).
 A) 10⁵ células/ml; B) 10⁶ células/ml; C) 10⁷ células/ml.

A)

	T=2		T=7		T=21		
	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	
Fracción volátil	120.208		1073.626		1601.896		
Componentes constantes	3.156	2.63	3.172	0.30	3.106	0.19	
Alcoholes superiores	Mayoritarios	92.000	76.53	568.000	52.90	517.000	32.27
	Minoritarios	0.089	0.07	0.237	0.02	0.367	0.02
	Totales	93.298	77.61	571.442	53.23	521.707	32.57
Ácidos orgánicos	0.206	0.17	0.635	0.06	1.028	0.06	
Ésteres	Acetato de etilo	0.440	0.37	2.800	0.26	27.300	1.70
	Eúlicos*	0.435	0.36	4.580	0.43	12.390	0.77
	Acetatos*	0.844	0.70	12.784	1.19	26.024	1.62
	Isoamílicos	0.005	0.00	0.083	0.01	0.143	0.01
Totales*	1.284	1.07	17.447	1.63	38.557	2.41	
Dioles	21.281	17.70	465.900	43.39	990.000	61.80	

B)

	T=2		T=7		T=21		
	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	
Fracción volátil	144.240		1030.549		1594.746		
Componentes constantes	3.170	2.20	3.173	0.31	3.211	0.20	
Alcoholes superiores	Mayoritarios	121.320	84.11	602.000	58.42	573.000	35.93
	Minoritarios	0.095	0.07	0.267	0.03	0.409	0.03
	Totales	123.055	85.31	606.335	58.84	578.717	36.29
Ácidos orgánicos	0.162	0.11	0.608	0.06	0.955	0.06	
Ésteres	Acetato de etilo	0.880	0.61	1.500	0.15	35.000	2.19
	Eúlicos*	0.694	0.48	4.957	0.48	11.969	0.75
	Acetatos*	1.107	0.77	10.752	1.04	30.022	1.88
	Isoamílicos	0.006	0.00	0.098	0.01	0.172	0.01
Totales*	1.806	1.25	15.806	1.53	42.163	2.64	
Dioles	14.582	10.11	392.300	38.07	914.600	57.35	

C)

	T=2		T=7		T=21		
	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	
Fracción volátil	188.471		1174.496		1528.487		
Componentes constantes	3.128	1.66	3.214	0.27	3.234	0.21	
Alcoholes superiores	Mayoritarios	159.970	84.88	623.600	53.10	578.200	37.83
	Minoritarios	0.120	0.06	0.380	0.03	0.484	0.03
	Totales	161.450	85.66	633.620	53.95	583.354	38.17
Ácidos orgánicos	0.193	0.10	0.575	0.05	0.972	0.06	
Ésteres	Acetato de etilo	0.680	0.36	3.250	0.28	48.900	3.20
	Eúlicos*	0.960	0.51	5.411	0.46	12.547	0.82
	Acetatos*	1.589	0.84	14.850	1.26	31.450	2.06
	Isoamílicos	0.015	0.01	0.105	0.01	0.200	0.01
Totales*	2.565	1.36	20.366	1.73	44.196	2.89	
Dioles	20.075	10.65	500.700	42.63	826.600	54.08	

* = menos acetato de etilo.

el producto final respecto a la fermentación espontánea. La concentración de los alcoholes superiores es mayor a medida que se hacen inóculos mayores del mosto inicial, siendo de destacar que, en todos los casos, la concentración de alcoholes superiores es mayor al séptimo día que al final de la fermentación.

3.3.3.2.2.- Ácidos grasos.

Para el conjunto de los ácidos grasos considerados se observa que la concentración es prácticamente independiente del inóculo realizado, excepto, quizás, el ácido isobutírico, para el que la realización de un inóculo de 10^5 células/ml supone un incremento del 34% en la concentración.

Como en el resto de los casos estudiados, vamos a considerar aparte el caso del ácido hexanoico (C_6). En el caso del inóculo de la cepa V se observa que el incremento en la concentración es, como sucede con otras levaduras, poco acusado, presentándose la cantidad más alta cuando se efectúan inóculos más bajos.

Globalmente se observa que la cantidad de ácidos grasos es, en todo momento, cerca del doble de la que se obtiene en la fermentación espontánea del mosto. Las variaciones entre las distintas concentraciones de inóculos son siempre pequeñas (como máximo del 10%), aunque en todo momento se presentan mayores concentraciones cuando se realizan los inóculos más reducidos.

3.3.3.2.3.- Ésteres.

3.3.3.2.3.1.- Acetato de etilo.

La concentración de acetato de etilo presente en el producto final es tanto mayor cuanto más elevado es el inóculo realizado; no obstante, las concentraciones que se alcanzan en el inóculo de 10^5 células/ml son menores que las que se obtienen por fermentación espontánea, mientras que al inocular 10^6 células/ml se obtienen concentraciones similares. Solamente en el caso de efectuar un inóculo de 10^7 células/ml se obtienen concentraciones de acetato de etilo superiores a las obtenidas en la fermentación espontánea de mosto.

Es de destacar el hecho de que, en todos los casos, el incremento en la concentración que se produce en los siete primeros días de fermentación es prácticamente

despreciable respecto al que se produce desde este momento hasta el final de la fermentación.

3.3.3.2.3.2.- Ésteres etílicos.

Los ésteres etílicos de cadena lineal muestran una clara dependencia de la concentración de inóculo en el sentido de incrementar su concentración a medida que se aporta un menor número de levadura seleccionada. A esta regla se escapa el dodecanoato de etilo, aunque al séptimo día de fermentación la situación es similar a la ya expuesta. Por su parte, el octanoato de etilo muestra una evolución en su concentración prácticamente independiente de la concentración de inóculo. De igual modo, las concentraciones de los hidroxí-ésteres etílicos presentan una evolución similar a lo largo de la fermentación, sin que parezca estar influida por la cantidad de inóculo realizada.

Por último, tanto los ésteres dietílicos como el 9-decanoato de etilo presentan las concentraciones finales menores en los casos en los que se hacen los inóculos más bajos, mientras que, con la excepción del succinato de dietilo, la concentración más elevada se presenta cuando se efectúan inóculos de 10^6 células/ml.

Globalmente se observa que, en todo momento, las concentraciones obtenidas de ésteres etílicos son similares o algo superiores a las obtenidas en la fermentación espontánea del mosto, especialmente cuando se inoculan 10^7 células/ml de levadura V, ya que, aunque con ligeras variaciones respecto al resto, con este inóculo es con el que se obtienen concentraciones más elevadas de ésteres etílicos. Por su parte, los ésteres etílicos de más de 6 átomos de carbono están presentes en cantidades un 10% inferiores a las obtenidas en las muestras sin inocular.

3.3.3.2.3.3.- Acetatos.

Los acetatos de los alcoholes superiores mayoritarios muestran la misma gradación en cuanto a la concentración final que la mostrada por sus alcoholes correspondientes; en todos los casos, la menor concentración corresponde a la muestra inoculada con la menor cantidad de levadura seleccionada. De igual modo sucede con el diacetato de 1,2 propanodiol, pero las diferencias que se observan en la concentración del éster son mucho más elevadas que las que se observan para el diol.

Globalmente se observa, igual que para los alcoholes superiores, que la concentración de acetatos es tanto mayor cuanto más elevado es el inóculo efectuado. De

igual modo, siempre es superior a la concentración global de acetatos obtenidos a la fermentación espontánea; así, el segundo día de fermentación es un 55-150% superior, un 39-87% mayor en el séptimo día y un 50-80% más elevado al final del periodo fermentativo.

3.3.3.2.3.4.- Otros ésteres.

Como en el caso anterior, la gradación en la concentración de estos ésteres de isoamilo al final del proceso va a ser similar al visto para el alcohol isoamílico, de modo que se obtienen concentraciones menores cuanto más bajo sea el inóculo efectuado con la cepa V de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.3.3.2.3.5.- Conclusión.

Para el conjunto de los ésteres se obtiene que la cantidad que se obtiene de la inoculación de la cepa V va a ser en todos los casos, tanto en términos absolutos como relativos, superior a la obtenida por fermentación espontánea del mosto, efecto que va a ser debido tanto al aporte de los ésteres etílicos como al de los distintos acetatos, representando un 37-53% más al final del periodo fermentativo.

Por otra parte, se observa que la cantidad de ésteres sintetizados va a ser mayor cuanto más elevado sea el inóculo realizado.

3.3.3.2.4.- Glicoles.

De los polioles estudiados se observa que para el glicerol, el *eritro-2,3-butanodiol* y *1,2-propanodiol*, se obtienen concentraciones más elevadas cuanto mayor es el inóculo realizado, aunque para el último compuesto se observa que la concentración es prácticamente independiente del inóculo realizado.

Por su parte, el *treo-2,3-butanodiol* presenta concentraciones mayores cuanto más bajo es el inóculo. Este hecho hace que, dado que este compuesto es el de mayor concentración, el conjunto de los dioles presenta concentraciones más elevadas cuanto mayor es el inóculo, aunque al séptimo día de fermentación, la mayor producción de dioles la presente la muestra inoculada con 10^7 células/ml, mientras que la menor concentración se encuentra en la inoculada con 10^6 células/ml.

Comparando los valores obtenidos con las presentes fermentaciones espontáneas del mosto se observa que, independientemente del inóculo realizado, la adición de la cepa V de *Saccharomyces cerevisiae* va a provocar un incremento apreciable en la concentración de glicoles en el producto final de la fermentación.

3.3.3.2.5.- Otros compuestos.

Se observa que tanto la acetona como la β -ionona presentan concentraciones mayores con inóculo de 10^6 células/ml, aunque las diferencias no son en ningún caso excesivas. Por su parte, las concentraciones de 2.4-dimetil-1,3-dioxolano y γ -butirolactona son mayores cuando se realiza el inóculo bajo de la levadura seleccionada.

3.3.3.3.-Discusión.

La inoculación de mostos con la cepa V de *Saccharomyces cerevisiae* apenas va a provocar cambios en la cinética de fermentación, aunque ésta es algo más lenta cuando se inocula el mosto con 10^5 células/ml.

En cuanto a la fracción volátil se observa que en todos los casos la concentración total es muy superior a la que se obtienen por fermentación espontánea del mosto, siendo tanto más pequeña cuanto mayor sea la concentración del inóculo realizado. Para los alcoholes superiores se obtienen en todos los casos cantidades muy superiores a las presentes en las muestras no inoculadas, siendo más elevadas cuanto mayor es el aporte de la levadura seleccionada. Las relaciones entre la cantidad de ésteres (A) o ésteres etílicos de alto peso molecular (B) respecto al contenido en alcoholes superiores (C) se muestran en la Tabla 3.3.9.

	10 ⁵ células/ml	10 ⁶ células/ml	10 ⁷ células/ml
A/C	0.074	0.073	0.076
B/C	4.14E-3	3.90E-3	3.79E-3

Tabla 3.3.9.- Relación existente entre las cantidades de ésteres (A) y ésteres etílicos de alto peso molecular (B) respecto a los alcoholes superiores (C) en las muestras inoculadas con la cepa V de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se observa que aunque la relación A/C es similar en todas las muestras y claramente superior a la que se obtiene en las muestras no inoculadas, los valores B/C son siempre menores, siendo el más próximo el que se obtiene en las muestras inoculadas con 10^5 células/ml.

A la vista de los resultados obtenidos no parece que sea conveniente la inoculación de este tipo de mostos con la cepa V de *Saccharomyces cerevisiae*, aunque en el caso de efectuarlo parece aconsejable emplear inóculos poco concentrados, ya que a nivel de fracción volátil es cuando se obtienen unos resultados más satisfactorios y, aunque la fermentación es algo más lenta, las diferencias encontradas no son tan importantes como para llevarnos a pensar en desechar este tipo de inóculos.

3.3.4- Inoculación con la cepa C.G.L. de *Saccharomyces cerevisiae*.

En este caso no vamos a ofrecer las características fisiológicas de la levadura, ya que está seleccionada para realizar un proceso totalmente distinto a la elaboración del vino.

3.3.4.1.- Cinética de la fermentación

Aunque se produce un rápido inicio de la fermentación (60-80 g/l en los dos primeros días), el proceso se ralentiza a medida que se incrementa el contenido en etanol del medio debido a que esta levadura no está adaptada a la realización de la fermentación alcohólica, por lo que la acción inhibitoria del etanol será más acusada sobre esta levadura que sobre el resto; por ello, al final del proceso, las muestras inoculadas con la cepa C.G.L. son las que presentan un mayor contenido en azúcares residuales (40 g/l) (Figura 3.3.4).

3.3.4.2.- Formación de la fracción volátil.

En la Tabla 3.3.9 se muestra la evolución de cada uno de los componentes estudiados para los tres inóculos ensayados a lo largo de la fermentación, así como el coeficiente de variación entre las distintas experiencias realizadas. En la Tabla 3.3.10 se presenta la evolución de la concentración global de cada uno de los grupos químicos más importantes de la fracción volátil del vino en las muestras inoculadas con la cepa C.G.L.

Tabla 3.3.10.- Concentración de los distintos componentes en los días 2, 7 y 21 de fermentación en las muestras inoculadas con la cepa C.G.L. (*Saccharomyces cerevisiae*).

ALCOHOLES		1E+5 cel/ml						1E+6 cel/ml						1E+7 cel/ml					
		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
n°	COMPONENTE																		
7	1-Propanol	6.000	3.7	10.160	0.2	36.000	6.9	7.800	11.4	11.700	2.9	36.360	0.2	6.500	6.9	13.200	2.5	36.300	2.3
10	Isobutanol	13.000	1.6	93.700	0.3	96.400	0.3	12.800	3.7	91.900	0.3	98.200	0.7	9.500	1.7	84.300	0.5	102.000	1.0
13	1-Butanol	0.710	8.3	2.440	1.7	3.850	1.8	0.610	5.1	2.963	0.3	5.230	1.1	0.840	5.2	3.200	2.5	6.100	9.8
14	Alcohol isoamílico	37.000	1.1	280.000	0.5	343.000	0.7	41.900	2.3	328.000	0.5	377.000	0.5	36.000	0.6	345.800	0.1	361.000	1.3
16	Alcohol amílico	0.038	0.8	0.050	1.5	0.150	12.2	0.047	3.6	0.048	16.6	0.126	4.4	0.028	10.6	0.053	3.3	0.111	4.7
21	1-Hexanol	2.480	0.9	2.500	4.2	2.490	1.3	2.480	3.3	2.450	0.7	2.440	3.2	2.490	3.2	2.430	1.2	2.500	1.0
22	trans-3-Hexen-1-ol	0.032	1.8	0.034	3.5	0.034	8.4	0.037	2.0	0.033	4.7	0.034	9.6	0.034	4.7	0.031	1.9	0.033	4.2
23	cis-3-Hexen-1-ol	0.040	1.7	0.035	1.0	0.034	0.5	0.035	7.4	0.033	0.4	0.031	8.2	0.035	0.1	0.035	3.2	0.035	2.0
26	1-Heptanol	0.013	3.8	0.022	1.9	0.047	0.8	0.010	4.1	0.020	9.3	0.050	9.4	0.011	1.9	0.026	8.6	0.063	2.1
32	Linalool	0.008	2.9	0.004	7.0	0.004	4.1	0.009	2.6	0.005	2.1	0.012	3.6	0.009	3.0	0.011	6.2	0.007	1.8
33	1-Octanol	0.016	0.4	0.067	3.2	0.104	0.5	0.019	5.4	0.063	2.6	0.098	3.6	0.010	5.6	0.057	6.3	0.081	5.2
40	1-Metoxi-2-butanol	traz		0.069	2.5	0.075	6.8	traz		0.066	7.7	0.077	5.6	traz		0.103	5.0	0.130	6.8
44	alfa-Terpineol	0.022	9.3	0.019	8.1	0.017	6.9	0.028	7.2	0.024	6.2	0.025	5.1	0.027	4.3	0.026	6.9	0.023	7.0
46	3-Metiltio-1-propanol	0.640	3.2	0.960	2.6	0.980	4.0	0.940	1.6	1.400	13.8	1.390	3.6	0.780	3.4	1.070	4.3	1.100	1.8
48	1-Decanol	0.012	10.4	0.029	16.0	0.090	14.0	0.013	3.2	0.034	14.9	0.107	6.9	0.009	6.9	0.039	7.2	0.115	5.1
52	Alcohol bencílico	0.041	4.6	0.041	6.8	0.038	0.6	0.036	8.5	0.039	3.3	0.037	7.9	0.035	2.5	0.037	15.6	0.040	8.4
55	2-Feniletanol	11.200	1.7	77.000	2.4	88.200	0.5	11.700	1.0	100.400	0.9	132.000	1.7	10.300	2.0	131.000	2.8	159.000	2.0

ÁCIDOS ORGÁNICOS		1E+5 cel/ml						1E+6 cel/ml						1E+7 cel/ml					
		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
n°	COMPONENTE																		
35	Ácido isobutírico	traz		0.018	1.0	0.046	0.9	traz		0.021	1.8	0.050	12.2	traz		0.019	5.1	0.056	1.9
42	Ácido isovaleriano	0.060	10.5	0.126	7.9	0.190	9.2	0.095	3.8	0.158	1.5	0.190	5.4	0.049	7.2	0.149	1.6	0.224	1.9
50	Ácido hexanoico	0.155	7.1	0.180	6.2	0.230	10.5	0.146	3.2	0.150	11.3	0.200	6.9	0.130	5.2	0.178	4.4	0.196	2.4
57	Ácido octanoico	0.026	9.1	0.086	3.2	0.180	15.1	0.025	6.1	0.093	4.5	0.200	7.1	0.015	6.8	0.129	5.2	0.184	4.0
59	Ácido decanoico	traz		traz		0.028	6.1	traz		0.010	9.8	0.030	6.8	traz		0.005	11.7	0.043	10.0

Tabla 3.3.10 (cont.)- Concentración de los distintos componentes en los días 2, 7 y 21 de fermentación en las muestras inoculadas con la cepa C.G.L. (*Saccharomyces cerevisiae*).

ÉSTERES		1E+5 cel/ml						1E+6 cel/ml						1E+7 cel/ml					
		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21	
n°	COMPONENTE	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
2	Acetato de etilo	0.290	3.5	3.800	7.0	16.000	15.2	0.357	1.5	3.800	4.2	18.400	2.9	0.900	19.5	4.000	3.3	20.500	2.2
4	Isobutirato de etilo	0.015	7.0	0.032	10.2	0.038	6.4	0.015	9.7	0.029	4.9	0.085	7.1	traz		0.048	6.2	0.151	6.4
8	Butirato de etilo	traz		0.012	16.6	0.016	7.2	traz		0.005	5.7	0.006	4.4	traz		0.011	10.0	0.019	8.9
9	Isovalerato de etilo	traz		0.006	7.6	0.005	3.1	traz		traz		traz		traz		traz		0.008	13.5
15	Hexanoato de etilo	0.093	0.6	0.149	1.2	0.260	8.8	0.083	2.5	0.240	6.0	0.330	10.4	0.072	2.1	0.330	11.7	0.346	1.3
20	Lactato de etilo	0.300	3.0	1.460	1.9	5.600	13.9	0.280	12.6	1.900	5.6	5.300	18.1	0.180	5.8	1.180	6.4	5.900	2.2
25	Octanoato de etilo	0.018	7.5	0.044	3.0	0.290	7.6	0.022	5.9	0.056	2.3	0.250	6.5	0.057	3.2	0.066	12.1	0.231	2.2
31	3-Hidroxiobutirato de etilo	0.018	5.3	0.540	2.8	0.530	1.0	0.012	6.5	0.560	8.5	0.580	12.4	0.006	5.4	0.530	5.5	0.557	5.1
41	Decanoato de etilo	0.040	1.5	0.313	0.2	0.680	10.6	0.040	10.0	0.350	4.6	0.640	13.0	0.036	6.4	0.350	6.3	0.620	2.7
43	Succinato de dietilo	0.310	4.6	0.890	5.3	1.900	14.1	0.340	14.6	0.970	1.4	2.700	2.1	0.310	7.6	1.170	4.0	2.710	2.6
45	9-Decenoato de etilo	0.039	4.0	0.081	0.6	1.400	14.4	0.028	9.3	0.080	18.4	1.090	2.9	traz		0.100	18.1	1.000	13.3
51	Dodecanoato de etilo	0.031	4.2	0.210	5.3	0.260	14.8	0.037	12.4	0.210	5.6	0.330	7.3	0.022	7.3	0.200	14.4	0.310	7.6
58	Malato de dietilo	N.D		0.250	6.1	0.242	3.9	N.D		0.280	6.3	0.280	3.9	N.D		0.210	7.8	0.204	6.8
5	Acetato de propilo	traz		traz		traz		traz		traz		0.005	10.7	traz		traz		traz	
6	Acetato de isobutilo	0.055	2.1	0.183	0.2	0.450	1.2	0.065	8.0	0.211	3.3	0.480	1.0	0.043	9.2	0.173	2.7	0.450	4.0
11	Acetato de butilo	0.006	7.6	0.011	5.9	0.018	9.4	0.006	6.1	0.009	5.0	0.007	6.4	traz		0.008	9.6	0.013	6.8
12	Acetato de isoamilo	0.640	1.9	5.140	1.6	10.400	0.9	0.690	2.5	4.810	0.6	11.220	0.4	0.790	4.7	4.530	1.8	11.400	2.4
18	Acetato de hexilo	0.498	0.4	0.452	0.6	0.470	2.0	0.466	0.5	0.520	8.0	0.490	6.8	0.470	9.3	0.498	0.4	0.450	1.8
47	Diacetato de 1,2-propanodiol	0.019	9.7	0.310	15.8	0.370	4.1	0.021	5.3	0.304	2.8	0.330	5.0	0.025	2.1	0.320	3.8	0.330	7.7
49	Acetato de 2-fenetilo	0.025	8.2	0.051	14.1	0.180	16.3	0.017	18.5	0.067	5.5	0.228	1.3	0.016	5.8	0.080	4.0	0.250	7.4
17	Isobutirato de isoamilo	0.008	0.1	0.017	9.5	0.023	4.0	traz		0.013	7.8	0.024	0.1	traz		0.028	1.3	0.032	2.8
19	Isovalerato de isoamilo	traz		0.009	2.7	0.009	2.7	traz		0.008	2.4	0.012	4.9	traz		0.010	0.9	0.013	9.8
27	Hexanoato de isoamilo	traz		0.031	0.7	0.044	7.3	traz		0.033	10.7	0.053	3.2	traz		0.033	15.0	0.048	1.9
29	Octanoato de isoamilo	0.007	3.8	0.046	2.8	0.121	1.7	0.008	0.8	0.044	4.6	0.115	8.0	0.005	9.6	0.043	0.8	0.118	6.4
53	Isobutirato de 2-fenetilo	traz		traz		traz		traz		traz		traz		traz		traz		traz	
54	Decanoato de isoamilo	traz		traz		traz		traz		traz		traz		traz		traz		traz	
62	Benzoato de 2-fenetilo	traz		0.007	6.4	0.006	2.5	traz		0.011	5.6	0.013	7.6	traz		0.012	3.4	0.010	15.9

Tabla 3.3.10 (cont.)- Concentración de los distintos componentes en los días 2, 7 y 21 de fermentación en las muestras inoculadas con la cepa C.G.L. (*Saccharomyces cerevisiae*).

n° COMPONENTE		1E+5 cel/ml						1E+6 cel/ml						1E+7 cel/ml					
		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
34	2,3-Butanodiol (treo)	16.770	0.2	281.000	0.9	520.000	3.2	12.530	0.6	227.000	1.5	500.000	0.2	14.000	7.9	260.000	8.2	450.000	4.0
36	2,3-Butanodiol (eritro)	6.800	5.4	13.100	7.1	20.000	8.0	6.900	6.1	15.700	5.1	25.000	4.9	6.800	8.4	13.000	4.3	25.000	4.2
37	1,2-Propanodiol	0.084	4.9	30.700	1.7	70.000	2.7	0.082	7.6	30.600	2.7	78.000	2.2	0.097	6.8	31.000	4.3	72.000	4.2
61	Glicerol	N.D.		4400.000	15.6	6800.000	10.7	N.D.		7240.000		8600.000	13.1	N.D.		7000.000	2.9	8800.000	5.5

n° COMPONENTE		1E+5 cel/ml						1E+6 cel/ml						1E+7 cel/ml					
		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
1	Acetona	N.D.		2.900	4.6	9.500	1.7	N.D.		5.000	4.9	14.200	6.2	2.500	7.1	6.000	5.7	18.000	6.9
3	2,4-dimetil-1,3-dioxolano	0.760	3.1	1.870	3.7	2.500	4.7	0.690	11.0	1.080	6.1	4.000	7.2	0.200	6.9	2.600	5.7	5.200	3.9
24	4,5-dimetil-2-pentadecil- -1,3-dioxolano	0.095	0.2	0.085	4.4	0.119	6.3	0.105	1.0	0.101	0.8	0.107	0.8	0.089	4.1	0.135	6.8	0.107	1.4
28	2,4-Dimetil-3-pentanona	N.D.		0.007	2.6	0.006	3.4	traz.		0.003	5.9	0.008	9.7	traz.		0.012	10.8	0.017	4.0
30	Benzaldehido	0.094	7.2	0.140	12.4	0.102	7.1	0.088	5.6	0.093	6.8	0.130	12.9	0.098	8.3	0.088	6.9	0.150	12.8
18	gamma-Butirolactona	0.034	7.5	1.280	1.2	3.880	0.4	0.025	5.8	1.690	3.1	4.630	0.7	0.031	11.2	2.440	2.7	6.100	4.8
19	N-Etilacetamida	0.007	5.2	0.042	6.8	0.051	4.6	traz.		0.055	13.3	0.099	4.8	0.005	10.3	0.056	4.9	0.074	8.5
56	beta-Ionona	0.030	8.9	0.240	7.7	0.273	2.2	0.016	3.8	0.256	1.7	0.310	6.4	0.024	7.9	0.210	6.2	0.290	5.7
60	Amilbenzaldehido	N.D.		0.039	8.4	0.062	6.7	N.D.		0.055	7.2	0.087	1.5	N.D.		0.035	6.1	0.107	0.7

C.V. = Coeficiente de variación.

N.D. = No detectado.

traz. = Trazas.

Tabla 3.3.11.- Evolución en la concentración de los principales grupos de compuestos en las muestras inoculadas con la cepa C.G.L. (*Saccharomyces cerevisiae*).

A) 10⁵ células/ml; B) 10⁶ células/ml; C) 10⁷ células/ml.

A)

		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Fracción volátil		98.578		812.942		1237.927	
Componentes constantes		3.214	3.26	3.226	0.40	3.190	0.26
Alcoholes superiores	Mayoritarios	67.200	68.17	460.860	56.69	563.600	45.53
	Minoritarios	0.079	0.08	0.168	0.02	0.391	0.03
	Totales	68.629	69.62	464.497	57.14	568.896	45.96
Ácidos orgánicos		0.241	0.24	0.409	0.05	0.674	0.05
	Acetato de etilo	0.290	0.29	3.800	0.47	16.000	1.29
	Etilicos*	0.863	0.88	3.987	0.49	11.221	0.91
	Acetatos*	0.745	0.76	5.694	0.70	11.418	0.92
	Isoamílicos	0.015	0.02	0.103	0.01	0.197	0.02
	Totales*	1.622	1.65	9.785	1.20	22.836	1.84
Dioles		23.654	24.00	324.800	39.95	610.000	49.28

B)

		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Fracción volátil		101.654		835.687		1323.323	
Componentes constantes		3.177	3.13	3.197	0.38	3.199	0.24
Alcoholes superiores	Mayoritarios	74.200	72.99	532.000	63.66	643.560	48.63
	Minoritarios	0.090	0.09	0.165	0.02	0.381	0.03
	Totales	75.840	74.61	536.594	64.21	650.638	49.17
Ácidos orgánicos		0.267	0.26	0.432	0.05	0.670	0.05
	Acetato de etilo	0.357	0.35	3.800	0.45	18.400	1.39
	Etilicos*	0.858	0.84	4.680	0.56	11.591	0.88
	Acetatos*	0.799	0.79	5.402	0.65	12.266	0.93
	Isoamílicos	0.008	0.01	0.097	0.01	0.204	0.02
	Totales*	1.664	1.64	10.179	1.22	24.061	1.82
Dioles		19.512	19.19	273.300	32.70	603.000	45.57

C)

		T=2		T=7		T=21	
		mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Fracción volátil		93.547		911.317		1291.939	
Componentes constantes		3.197	3.42	3.156	0.35	3.238	0.25
Alcoholes superiores	Mayoritarios	62.300	66.60	574.300	63.02	658.300	50.99
	Minoritarios	0.059	0.06	0.175	0.02	0.370	0.03
	Totales	63.979	68.39	578.848	63.52	666.000	51.59
Ácidos orgánicos		0.163	0.17	0.440	0.05	0.703	0.05
	Acetato de etilo	0.900	0.96	4.000	0.44	20.500	1.59
	Etilicos*	0.683	0.73	4.195	0.46	12.056	0.93
	Acetatos*	0.873	0.93	5.111	0.56	12.443	0.96
	Isoamílicos	0.005	0.01	0.115	0.01	0.211	0.02
	Totales*	1.562	1.66	9.420	1.03	24.709	1.91
Dioles		20.897	22.34	304.000	33.36	547.000	42.37

* = menos acetato de etilo.

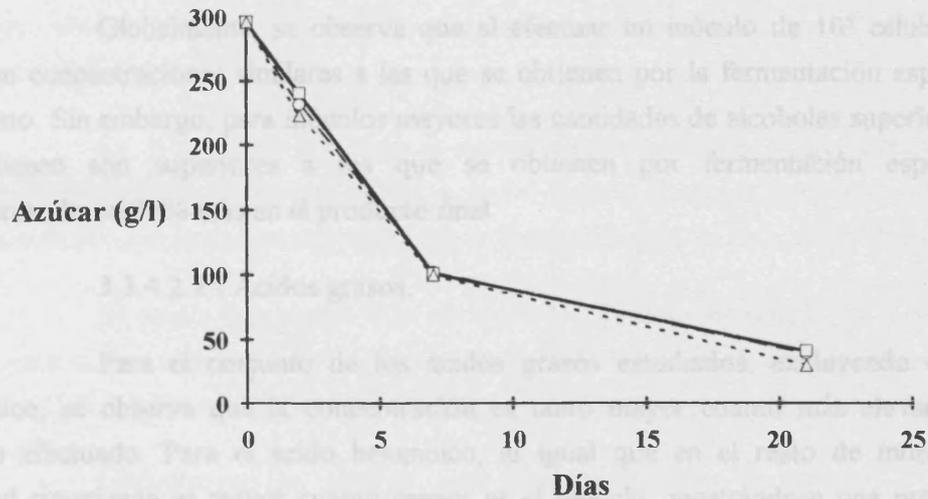


Figura 3.1.14.- Cinética de fermentación de los mostos inoculados con la cepa C.G.L. (O 10^5 células/ml; □ 10^6 células/ml, Δ 10^7 células/ml).

3.3.4.2.1.- Alcoholes superiores.

En el caso de los alcoholes superiores mayoritarios se observa, en todos los casos, que la concentración de los distintos compuestos depende directamente de la cantidad del inóculo realizado, de modo que las concentraciones menores están presente en aquellas muestras inoculadas con 10^5 células/ml. No obstante, tanto 1-propanol como isobutanol muestran evoluciones de sus concentraciones prácticamente independientes del inóculo realizado.

En el resto de los alcoholes superiores, tanto 1-butanol como 1-heptanol y 1-decanol muestran la misma dependencia en la concentración respecto al inóculo que la vista para los alcoholes superiores mayoritarios, mientras que para 1-pentanol y 1-octanol la situación es la contraria, mostrándose concentraciones superiores cuando se efectúan inóculos más bajos.

Por último, para el 3-metil-1-propanol se observa, al igual que en todos los demás casos, se sintetiza entre un 65 y un 70% de la cantidad final en los dos primeros días de fermentación, alcanzándose la concentración máxima a partir del día siete de fermentación. La concentración mayor se obtiene al efectuar un inóculo de 10^6 células/ml, mientras que se sintetiza la menor cantidad al hacer el inóculo más bajo de la cepa C.G.L.

Globalmente, se observa que al efectuar un inóculo de 10^5 células/ml se obtienen concentraciones similares a las que se obtienen por la fermentación espontánea del mosto. Sin embargo, para inóculos mayores las cantidades de alcoholes superiores que se obtienen son superiores a los que se obtienen por fermentación espontánea, representando un 35% más en el producto final.

3.3.4.2.2.- Ácidos grasos.

Para el conjunto de los ácidos grasos estudiados, excluyendo el ácido hexanoico, se observa que la concentración es tanto mayor cuanto más elevado es el inóculo efectuado. Para el ácido hexanoico, al igual que en el resto de muestras, la cantidad sintetizada es mayor cuanto menor es el inóculo, mostrándose una producción reducida a lo largo de la fermentación.

La cantidad de ácidos grasos que se obtiene al efectuar el inóculo de 10^5 células/ml es, aunque ligeramente superior, la que más se asemeja a lo que se obtiene por fermentación espontánea del mosto. A medida que incrementamos la cantidad de inóculo se incrementa la cantidad de ácidos grasos, alcanzando el máximo cuando se inoculan 10^7 células/ml de la cepa C.G.L.

3.3.4.2.3.- Ésteres.

3.3.4.2.3.1.- Acetato de etilo.

La síntesis de acetato de etilo es prácticamente similar para todas las concentraciones de inóculo ensayadas hasta el séptimo día de fermentación, para diversificarse a partir de este momento de modo que la mayor concentración en el producto final se obtiene para la mayor cantidad de inóculo. No obstante en todo momento las concentraciones obtenidas son menores que las que se obtienen en la fermentación espontánea del mosto.

3.3.4.2.3.2.- Ésteres etílicos.

De todos los ésteres etílicos considerados, solamente en los casos del octanoato, decanoato y 9-decenoato de etilo se obtienen concentraciones más elevadas cuando de efectúan los inóculos más bajos. En el 9-decenoato de etilo se observa que la síntesis es baja hasta el día siete de fermentación y prácticamente independiente del inóculo

efectuado, observándose un incremento más acusado en la concentración en el último periodo de la fermentación.

En el resto de los casos la concentración aumenta proporcionalmente al inóculo realizado; únicamente en los casos de los hidroxí-ésteres etílicos se muestra una evolución de las concentraciones prácticamente independientes de la cantidad de inóculo.

El único compuesto que no sigue las pautas expuestas es el malato de dietilo, para el que se alcanza la concentración máxima cuando se inoculan 10^6 células/ml de la cepa C.G.L., y la mínima cuando se efectúa el aporte mayor de este tipo de levadura.

Globalmente se observa que la concentración de ésteres etílicos es ligeramente superior cuanto más elevado es el aporte de cepa C.G.L.; no obstante, las cantidades alcanzadas no son mucho mayores a las que se obtienen en la fermentación espontánea del mosto, aunque para los ésteres etílicos de alto peso molecular son 1-17% superiores.

3.3.4.2.3.3.- Acetatos.

Como en el resto de los casos, todos los acetatos estudiados muestran un comportamiento similar al que presentan sus alcoholes respectivos; en todos ellos se obtiene las concentraciones menores cuando se efectúan los inóculos más bajos, aunque la diferencia entre las distintas muestras no son elevadas.

En el conjunto de acetatos se observa que las concentraciones mayores a día 2 y 21 de fermentación se obtienen cuando se hace el mayor aporte de la cepa C.G.L. al mosto, mientras que a día 7 de fermentación la situación es justamente la contraria. No obstante, excepto los valores obtenidos para el día 2 de fermentación, el resto de los puntos muestran valores inferiores a los que se obtienen para la fermentación espontánea del mosto.

3.3.4.2.3.4.- Ésteres de isoamilo.

Como en el caso anterior, la concentración de ésteres de isoamilo sigue la misma evolución frente a la concentración de inóculo que la vista para el alcohol isoamílico, aunque para el octanoato de isoamilo la concentración es independiente del inóculo realizado.

3.3.4.2.3.5.- Discusión.

Para el conjunto de los ésteres, sin considerar el acetato de etilo, se obtiene que la concentración es casi independiente de la cantidad de inóculo, mostrándose un ligero incremento al final de la fermentación en las muestras inoculadas con 10^7 células/ml de levadura de panadería. Sin embargo, a excepción del segundo día de fermentación, los valores obtenidos son menores que los que presentan las muestras obtenidas por fermentación espontánea del mosto.

3.3.4.2.4.- Glicoles.

A excepción del *treo*-2,3-butanodiol, en el que la mayor concentración se obtiene con el menor inóculo de la cepa C.G.L., en el resto de casos las concentraciones mayores se obtienen cuando se efectúa un inóculo de 10^6 células/ml, mientras que las menores se presentan en las muestras inoculadas con 10^5 células/ml.

Considerando el conjunto de dioles, se observa que para los dos inóculos más bajos se obtienen concentraciones similares, y algo superiores a las que presenta la muestra inoculada con 10^7 células/ml de la cepa C.G.L..

3.3.4.2.5.- Otros compuestos.

Para el resto de compuestos se observa que se obtienen concentraciones más elevadas cuando se efectúan inóculos elevados de levadura de panadería, a excepción de la β -ionona, en la que la mayor concentración está presente en las muestras inoculadas con 10^6 células/ml.

3.3.4.3.- Discusión.

Los datos obtenidos en la fermentación de las muestras a las que se añade la cepa C.G.L. son suficientes para desechar el empleo de esta levadura en la fermentación de mostos como el empleado, ya que, aunque presentan un inicio más o menos rápido del proceso, la cantidad de azúcar residual al cabo de 21 días es muy elevada (40 g/l).

De igual modo son las muestras que presentan un contenido más elevado de alcoholes superiores, hecho más evidente cuanto mayor es el inóculo empleado, representando cerca del 50% de la fracción volátil del vino. En cuanto a las relaciones entre el contenido en ésteres (A) o ésteres de más de 6 átomos de carbono (B) respecto al

de alcoholes superiores (C) (Tabla 3.3.12) se observa que el valor A/C es similar en todos los casos e inferior en un 20% al que se obtiene por fermentación espontánea del mosto; en cambio el valor de B/C para el inóculo de 10^5 células/ml es similar al que se obtiene en la muestra no inoculada, mientras que para el resto de concentraciones de inóculo son inferiores.

	10 ⁵ células/ml	10 ⁶ células/ml	10 ⁷ células/ml
A/C	0.040	0.037	0.037
B/C	5.08E-3	4.05E-3	3.76E-3

Tabla 3.3.12.- Relación existente entre las cantidades de ésteres (A) y ésteres etílicos de alto peso molecular (B) respecto a los alcoholes superiores (C) en las muestras inoculadas con la cepa C.G.L.

En conjunto, no parece muy apropiado el empleo de la cepa C.G.L. para inducir la fermentación de este tipo de mostos, sobre todo teniendo en cuenta los datos de la cinética de fermentación y el contenido en alcoholes superiores, aunque los resultados más "satisfactorios" se obtienen con inóculos de 10^5 células/ml.

3.3.5.- Discusión.

3.3.5.1.- Cinética de la fermentación.

En todos los casos, el inicio más rápido de la fermentación se obtiene con la fermentación espontánea del mosto, con una degradación de 40-60 g/l día más de azúcar en este periodo. Teniendo en cuenta la similitud del resto de condiciones, esta diferencia sólo puede ser atribuible al hecho de la inoculación masiva con levaduras del género *Saccharomyces*, cuyo efecto sobre la flora levaduriforme autóctona, seleccionada naturalmente para realizar la fermentación de mostos con elevado contenido inicial de azúcares reductores, puede ir en el sentido de inhibir su desarrollo por razones de competencia ecológica; la flora inoculada necesita un periodo de adaptación de su maquinaria enzimática a las nuevas condiciones que encuentra. Con concentraciones bajas de inóculo este periodo es independiente de la levadura inoculada, existiendo una mayor contribución de las levaduras presentes en el mosto; la fermentación, excepto para la cepa

C.G.L. no adaptada a este medio en el que se alcanzan elevadas concentraciones de etanol, se hace similar en todos los casos y acaba el proceso con cantidades similares de azúcares residuales.

Con concentraciones mayores de inóculo, los datos indican que la adaptación de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* es mejor que la que presenta la cepa de *Saccharomyces bayanus*, ya que éste presenta un periodo de latencia muy acusado con bajo consumo de azúcares, posibilitando el desarrollo de microorganismos desfavorables, sin que pueda pensarse en desarrollo de la flora autóctona debido al diferente perfil de fermentación que se obtiene si lo comparamos con el de la fermentación espontánea.

La etapa media de la fermentación presenta un consumo de azúcar más elevado en los mostos inoculados con levaduras seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, llegando incluso a superar a la fermentación espontánea cuando se emplean inóculos altos; la cepa de *Saccharomyces bayanus* también muestra esta aceleración del proceso, pero en ningún caso puede superar el periodo de latencia inicial, presentando siempre el medio un contenido en azúcares superior al que presentan las muestras obtenidas por fermentación espontánea del mosto.

Lo expuesto anteriormente también es válido para el final de la fermentación. Tanto la muestra obtenida por fermentación espontánea, como aquellas en las que se inoculan las cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* acaban con cantidades similares de azúcares residuales, mientras que el producto obtenido por inoculación de la levadura T73 muestra un contenido ligeramente mayor.

3.3.5.2.- Formación de la fracción volátil.

3.3.5.2.1.- Alcoholes superiores.

En conjunto, cabe destacar el hecho de que las muestras inoculadas con la cepa C.G.L. y la cepa V, ambas pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, presentan una cantidad de alcoholes superiores mayor que el resto de las muestras; en la parte opuesta se sitúan las muestras obtenidas por fermentación espontánea. También se observa que el hecho de realizar la inoculación va a conducir a un incremento en la concentración de alcoholes superiores, que será tanto mayor cuanto más elevado sea el inóculo. Sin embargo, hay alcoholes que escapan a esta observación, como el isobutanol o el 3-metiltio-1-propanol, que se encuentran en mayor concentración en las muestras

obtenidas por fermentación espontánea, aunque las muestras inoculadas con las cepas T73 de *Saccharomyces bayanus* y L2226 de *Saccharomyces cerevisiae* no muestran grandes diferencias respecto a ella. Respecto a este componente, cabe destacar que su síntesis se produce fundamentalmente en los primeros estadios de la fermentación, de modo que al cabo de 7 días ya se encuentran presentes en el medio cantidades muy cercanas a la máxima. En las Figuras 3.3.5-3.3.7 se muestra la producción comparativa de los distintos alcoholes superiores en las muestras inoculadas respecto a la fermentación espontánea para cada una de las concentraciones de inóculo ensayadas. Como puede observarse, independientemente de la concentración del inóculo, el perfil de todas ellas es bastante similar, por lo que parece que el emplear una cepa u otra incidirá en la concentración final de cada componente, pero los compuestos que presentan cantidades superiores e inferiores serán prácticamente los mismos. Para el 1-propanol y alcohol amílico, y en menor medida alcohol isoamílico, 1-butanol, 2-feniletanol (excepto en las muestras inoculadas con T73), 1-octanol y 1-decanol muestran concentraciones superiores. De igual modo, a medida que el inóculo es mayor se incrementa la diferencia respecto a la línea correspondiente a la fermentación espontánea, indicando que concentraciones mayores de inóculo conducen a cantidades mayores de alcoholes superiores.

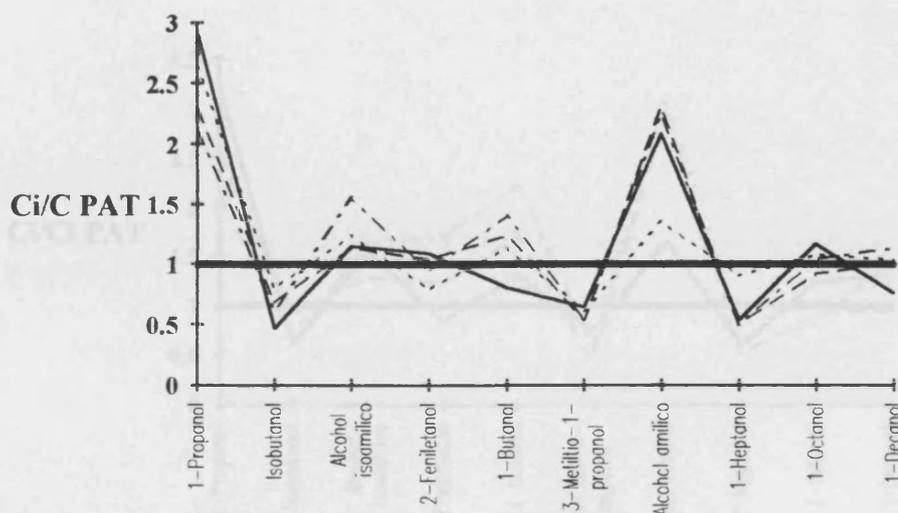


Figura 3.3.5.- Formación relativa de los alcoholes superiores en las muestras inoculadas con 10^5 células/ml respecto a la fermentación espontánea (— fermentación espontánea; --- T73, · · · L2226; - · - · C.G.L.).

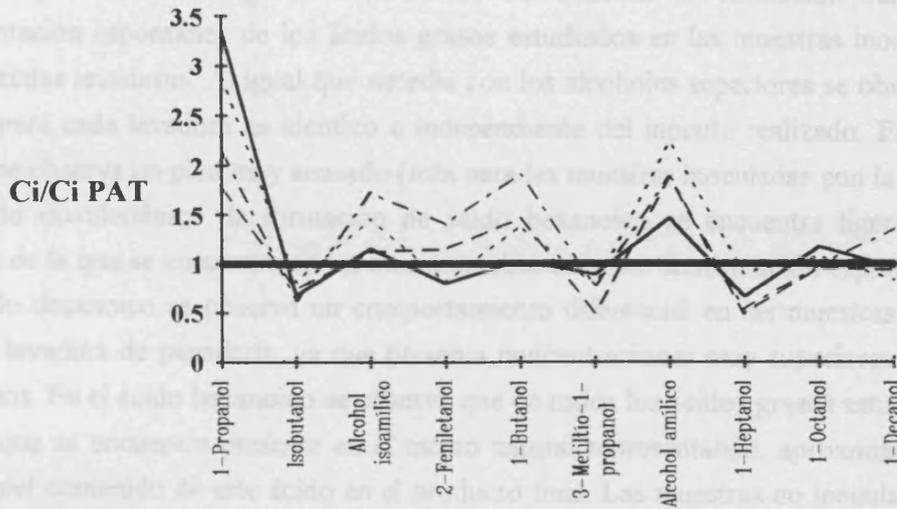


Figura 3.3.6.- Formación relativa de los alcoholes superiores en las muestras inoculadas con 10^6 células/ml respecto a la fermentación espontánea (— fermentación espontánea; — T73, --- L2226; · · · V; - · - · C.G.L.).

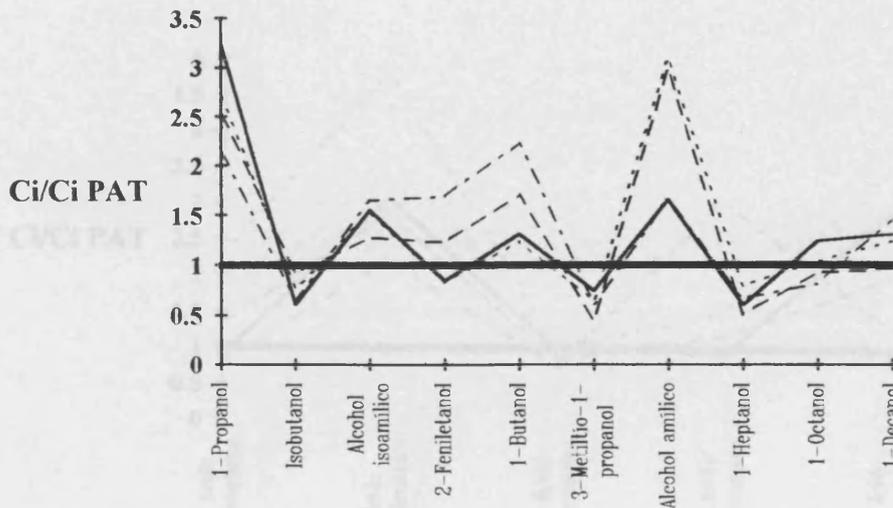


Figura 3.3.7.- Formación relativa de los alcoholes superiores en las muestras inoculadas con 10^7 células/ml respecto a la fermentación espontánea (— fermentación espontánea; — T73, --- L2226; · · · V; - · - · C.G.L.).

3.3.5.2.2.- Ácidos grasos.

En las Figuras 3.3.8-3.3.10 se observa la formación relativa a la fermentación espontánea de los ácidos grasos estudiados en las muestras inoculadas con las distintas levaduras. Al igual que sucedía con los alcoholes superiores se observa que el perfil para cada levadura es idéntico e independiente del inóculo realizado. En todos los casos se observa un pico muy acusado (más para las muestras inoculadas con la cepa V) en el ácido isovaleriano; la formación de ácido hexanoico se encuentra ligeramente por debajo de la que se encuentra en las muestras obtenidas por fermentación espontánea. Para el ácido decanoico se observa un comportamiento diferencial en las muestras inoculadas con la levadura de panadería, ya que presenta concentraciones muy superiores al resto de los casos. En el ácido hexanoico se observa que de todos los ácidos grasos estudiados es el único que se encuentra presente en el mosto natural representando, aproximadamente, la mitad del contenido de este ácido en el producto final. Las muestras no inoculadas son las que presentan mayores concentraciones de este ácido, mientras que para el resto la cantidad es inversamente proporcional a la cantidad de inóculo, de modo que se puede concluir que es en la flora autóctona del mosto donde se van a dar las condiciones adecuadas para la síntesis de este ácido; la alteración de la población propia del mosto conduce irremediablemente a un descenso en la concentración de ácido hexanoico.

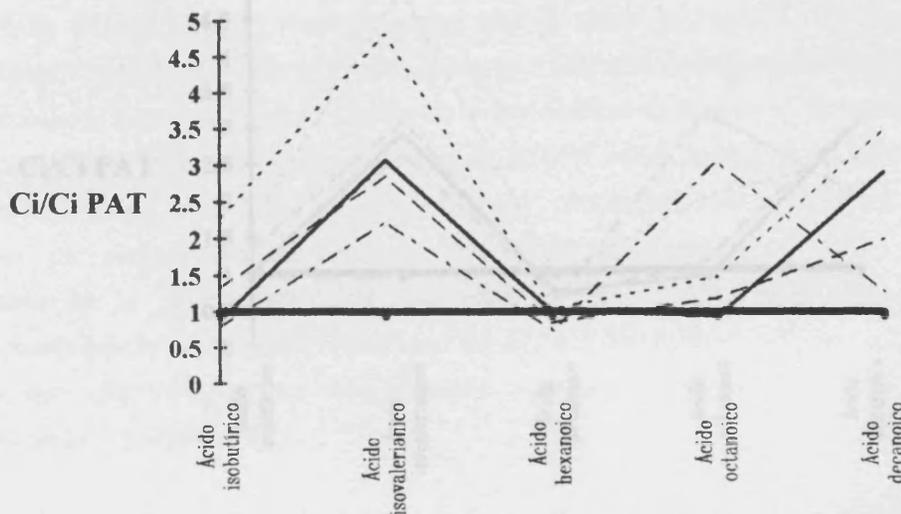


Figura 3.3.8.- Formación relativa de los ácidos grasos en las muestras inoculadas con 10^5 células/ml respecto a la fermentación espontánea (— fermentación espontánea; --- T73, --- L2226; ···· V; -.-.- C.G.L.).

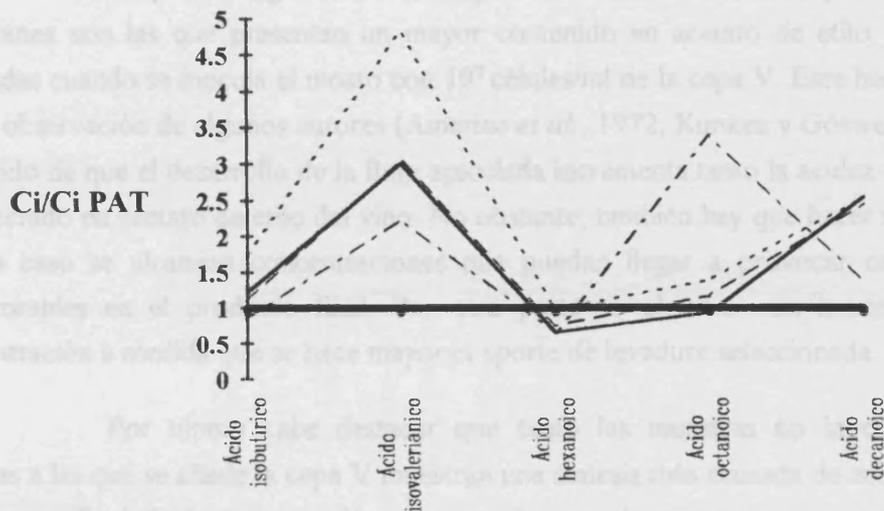


Figura 3.3.9.- Formación relativa de los ácidos grasos en las muestras inoculadas con 10⁶ células/ml respecto a la fermentación espontánea (— fermentación espontánea; — T73, - - - L2226; · · · V; - - - C.G.L.).

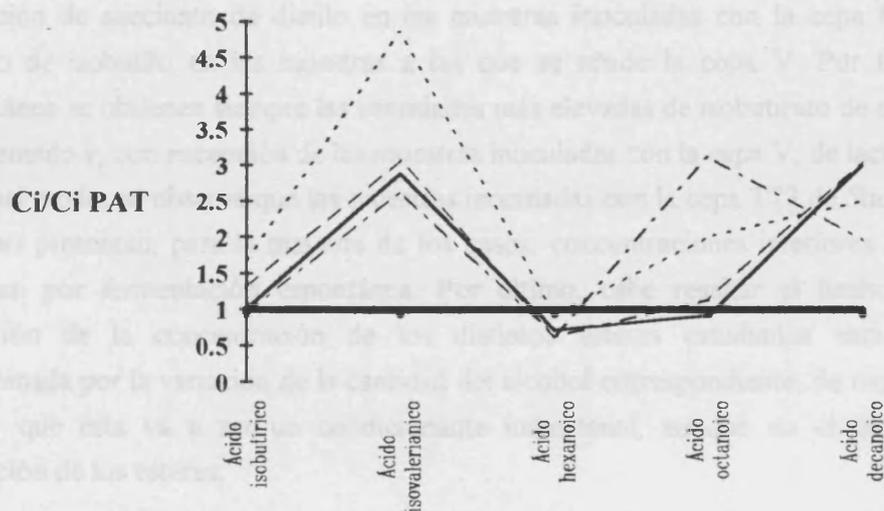


Figura 3.3.10.- Formación relativa de los ácidos grasos en las muestras inoculadas con 10⁷ células/ml respecto a la fermentación espontánea (— fermentación espontánea; — T73, - - - L2226; · · · V; - - - C.G.L.).

3.3.5.2.3.- Ésteres.

En primer lugar se observa que las muestras obtenidas por fermentación espontánea son las que presentan un mayor contenido en acetato de etilo, sólo siendo superadas cuando se inocula el mosto con 10^7 células/ml de la cepa V. Este hecho coincide con la observación de algunos autores (Amerine *et al.*, 1972; Kunkee y Goswell, 1977) en el sentido de que el desarrollo de la flora apiculada incrementa tanto la acidez volátil como el contenido en acetato de etilo del vino. No obstante, también hay que hacer notar que en ningún caso se alcanzan concentraciones que puedan llegar a provocar características desfavorables en el producto final. Por otra parte se observa un incremento en la concentración a medida que se hace mayor el aporte de levadura seleccionada.

Por último cabe destacar que tanto las muestras no inoculadas como aquellas a las que se añade la cepa V muestran una síntesis más acusada de acetato de etilo en la parte final de la fermentación, aunque el resto de muestras se aproximan a esta tendencia a medida que se incrementa la concentración del inóculo.

En las Figuras 3.3.11-3.3.13 se muestra la concentración final de los ésteres más importantes estudiados respecto a la que se obtiene por fermentación espontánea del mosto. Como se puede observar, no existen grandes diferencias en cuanto a la formación de los distintos componentes respecto a la fermentación espontánea, excepto en la formación de succinato de dietilo en las muestras inoculadas con la cepa C.G.L. y de acetato de isobutilo en las muestras a las que se añade la cepa V. Por fermentación espontánea se obtienen siempre las cantidades más elevadas de isobutirato de etilo, acetato de 2-fenetilo y, con excepción de las muestras inoculadas con la cepa V, de lactato de etilo. De igual modo, se observa que las muestras inoculadas con la cepa T73 de *Saccharomyces bayanus* presentan, para la mayoría de los casos, concentraciones inferiores a las que se obtienen por fermentación espontánea. Por último, cabe resaltar el hecho de que la evolución de la concentración de los distintos ésteres estudiados está claramente determinada por la variación de la cantidad del alcohol correspondiente, de modo que cabe pensar que ésta va a ser un condicionante importante, aunque no el único, para la formación de los ésteres.

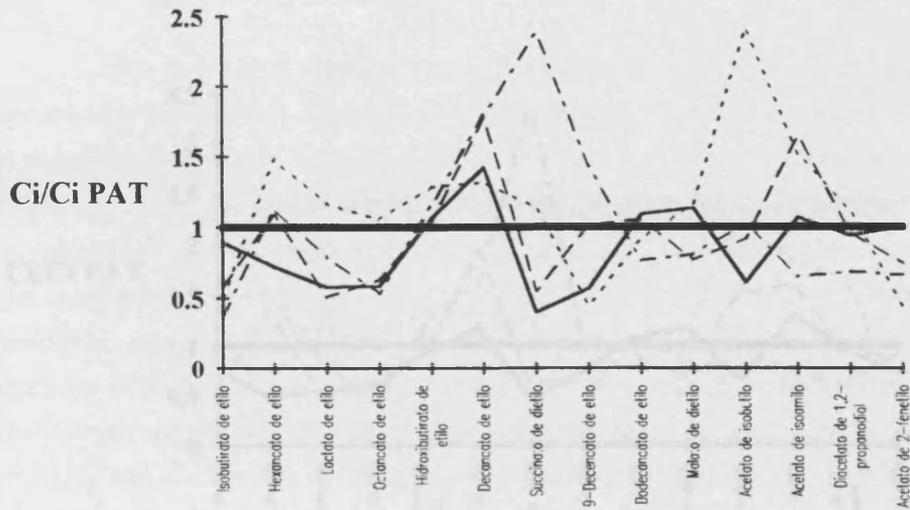


Figura 3.3.11.- Formación relativa de los ésteres principales en las muestras inoculadas con 10^5 células/ml respecto a la fermentación espontánea (— fermentación espontánea; — T73, — — L2226; - - - V; — — — C.G.L.).

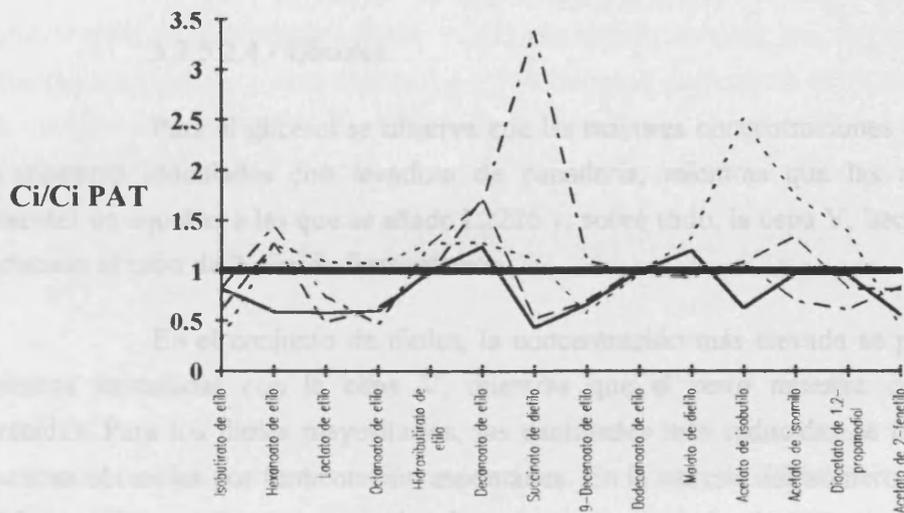


Figura 3.3.12.- Formación relativa de los ésteres principales en las muestras inoculadas con 10^6 células/ml respecto a la fermentación espontánea (— fermentación espontánea; — T73, — — L2226; - - - V; — — — C.G.L.).

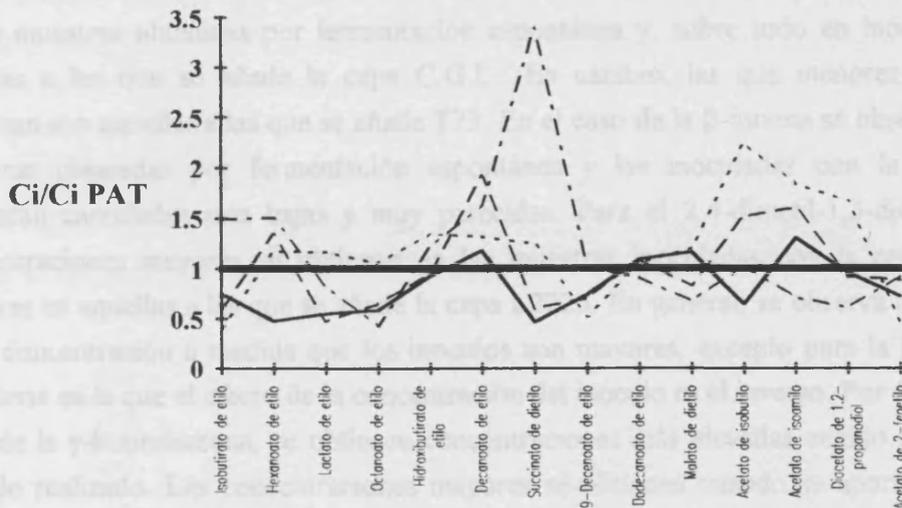


Figura 3.3.13.- Formación relativa de los ésteres principales en las muestras inoculadas con 10^7 células/ml respecto a la fermentación espontánea (— fermentación espontánea; --- T73, -.- L2226; · · · V; — — — C.G.L.).

3.3.5.2.4.- Glicoles.

Para el glicerol se observa que las mayores concentraciones se obtienen en las muestras inoculadas con levadura de panadería, mientras que las menores están presentes en aquellas a las que se añade L2226 y, sobre todo, la cepa V, hecho que es más destacado al cabo de 7 días de fermentación.

En el conjunto de dioles, la concentración más elevada se presenta en las muestras inoculadas con la cepa V, mientras que el resto muestra concentraciones parecidas. Para los dioles mayoritarios, las cantidades más reducidas se obtienen en las muestras obtenidas por fermentación espontánea. En la síntesis del isómero minoritario de 2,3-butanodiol se observa, en todos los casos, un periodo de latencia de 2 días, las muestras que presentan concentraciones menores son aquellas obtenidas por fermentación espontánea y a las que se añade la cepa L2226, añadiéndose, a concentraciones elevadas de inóculo, aquellas a las que se agrega la cepa V.

3.5.2.5.- Otros compuestos.

Para la acetona se observa que las concentraciones superiores se obtienen en las muestras obtenidas por fermentación espontánea y, sobre todo en inóculos altos, aquellas a las que se añade la cepa C.G.L.. En cambio, las que menores cantidades muestran son aquellas a las que se añade T73. En el caso de la β -ionona se observa que las muestras obtenidas por fermentación espontánea y las inoculadas con la cepa T73 presentan cantidades más bajas y muy parecidas. Para el 2,4-dimetil-1,3-dioxolano las concentraciones mayores se obtienen en las muestras inoculadas con la cepa V y las menores en aquellas a las que se añade la cepa L2226. En general, se observa un descenso en la concentración a medida que los inóculos son mayores, excepto para la levadura de panadería en la que el efecto de la concentración del inóculo es el inverso. Por último, en el caso de la γ -butirolactona, se obtienen concentraciones más elevadas cuanto mayor es el inóculo realizado. Las concentraciones mayores se obtienen cuando se aporta al vino la cepa C.G.L. y L2226 y las menores en las muestras obtenidas por fermentación espontánea y a las que se añade la cepa V.

3.3.6.- Conclusión.

En general se observa que, aunque presenta un ligero incremento en la concentración de productos volátiles con la cantidad de inóculo, las muestras que más se asemejan a los valores que se obtienen por fermentación espontánea del mosto son aquellas inoculadas con la cepa T73 de *Saccharomyces bayanus*. La misma respuesta frente a la concentración de inóculo se presenta en las muestras a las que se añade la cepa L2226 de *Saccharomyces cerevisiae*, aunque presentan cantidades ligeramente superiores a las obtenidas por fermentación espontánea.

Las muestras que presentan una mayor concentración de compuestos volátiles son aquellas inoculadas con la cepa V de *Saccharomyces cerevisiae*, aunque en éstas el efecto de la cantidad de inóculo es el contrario al visto en los casos anteriores; así, se obtienen cantidades finales menores a medida que añadimos cantidades superiores de la levadura seleccionada, aunque en el resto de periodos considerados la gradación es la inversa. Por último, para la levadura de panadería se obtienen cantidades intermedias de compuestos volátiles, aunque presenta concentraciones elevadas al inicio de la fermentación; también se observa que las cantidades obtenidas son mayores a medida que la concentración del inóculo es superior.

Ahora bien, si no consideramos el aporte de los glicoles (Figura 3.3.14) la situación es más clara. Así, se observa que la concentración total de componentes volátiles es tanto mayor cuanto más elevado es el inóculo realizado. Para las muestras inoculadas con las cepas T73 y L2226 se observa que las concentraciones que se obtienen al realizar inóculos de 10^5 y 10^6 células/ml son semejantes, aunque algo inferiores (más en el caso de la cepa T73) a los valores que se obtienen por fermentación espontánea del mosto. En cambio, al efectuar inóculos con la cepa V y, sobre todo, con la cepa C.G.L., se obtienen siempre cantidades mucho mayores que en la muestras no inoculadas, siendo muy parecidas las que se obtienen al inocular 10^6 y 10^7 células/ml.

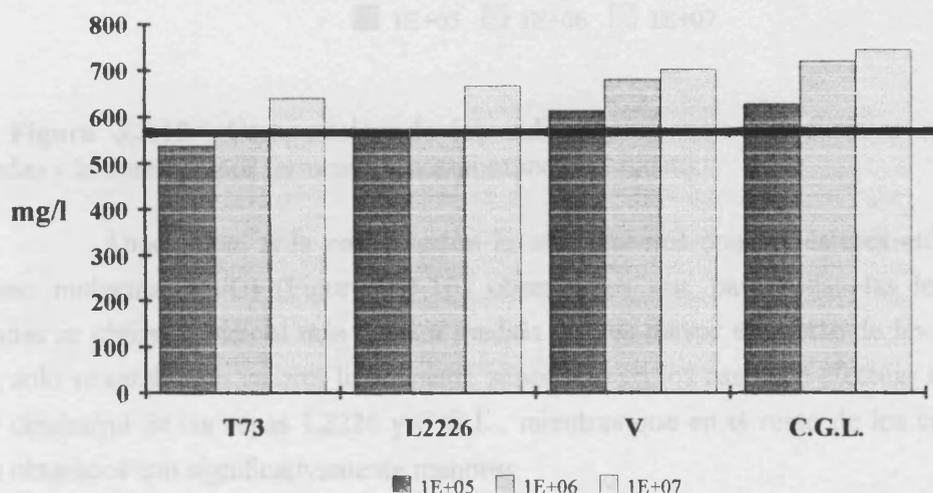


Figura 3.3.14.- Comparación de la concentración de productos volátiles excepto glicoles entre las distintas muestras inoculadas y la obtenida por fermentación espontánea del mosto.

En la Figura 3.3.15 se muestra el estudio comparativo del índice A/C de las distintas muestras inoculadas respecto a la obtenida por fermentación espontánea. Así, excepto para la muestra inoculada con 10^5 células/ml de la cepa L2226 se observa que se obtienen valores muy parecidos en las muestras inoculadas con la misma levadura, independientemente del inóculo. Con la excepción ya indicada, las muestras más próximas a la fermentación espontánea son las inoculadas con la cepa L2226, mientras que a las que se añade la cepa V muestran valores más elevados (mayor formación relativa de ésteres) y las inoculadas con la cepa T73 y, sobre todo, la cepa C.G.L., valores más reducidos.

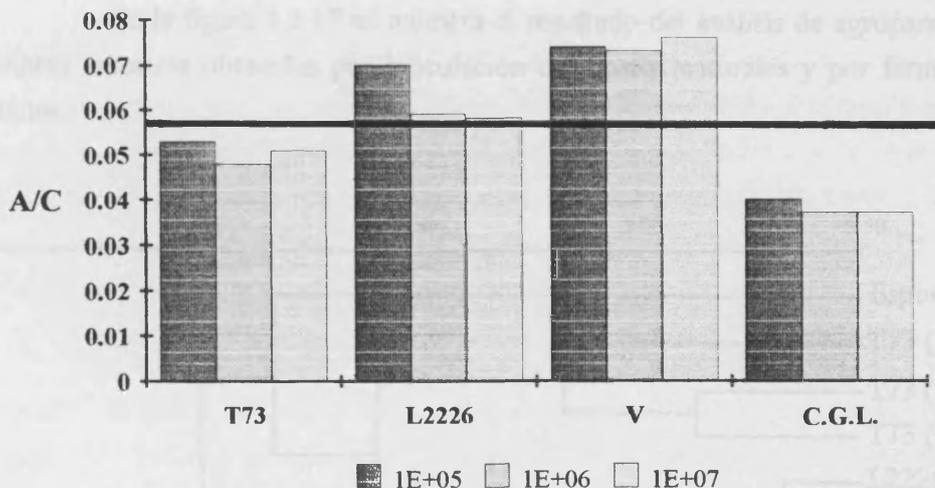


Figura 3.3.15.- Comparación de los índices A/C entre las distintas muestras inoculadas y la obtenida por fermentación espontánea del mosto.

Ahora bien, si la comparación la establecemos con los ésteres etílicos de alto peso molecular (B/C) (Figura 3.3.16) observamos que para todas las levaduras empleadas se obtienen índices más bajos a medida que es mayor el aporte de levadura al mosto; solo se establecen valores ligeramente superiores en los casos de efectuar inóculos de 10^5 células/ml de las cepas L2226 y C.G.L., mientras que en el resto de los casos los índices obtenidos son significativamente menores.

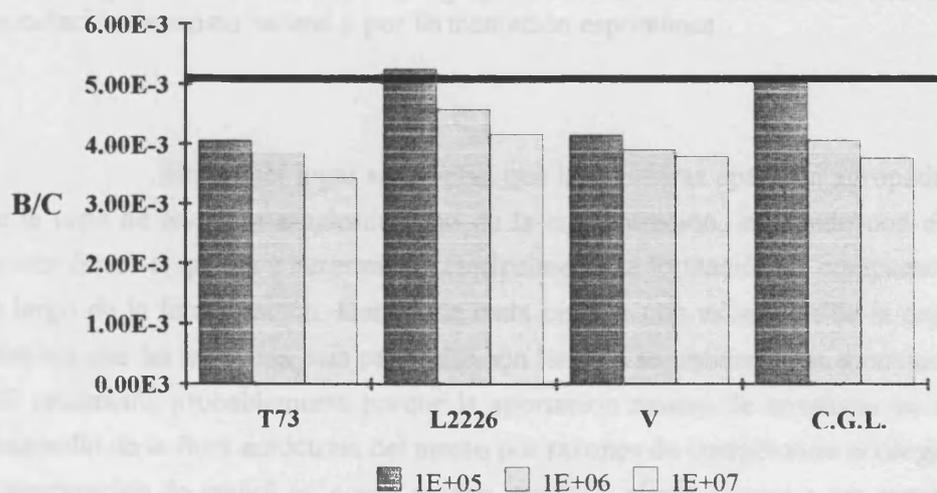


Figura 3.3.16.- Comparación de los índices B/C entre las distintas muestras inoculadas y la obtenida por fermentación espontánea del mosto.

En la figura 3.3.17 se muestra el resultado del análisis de agrupamiento de las distintas muestras obtenidas por inoculación de mostos naturales y por fermentación espontánea.

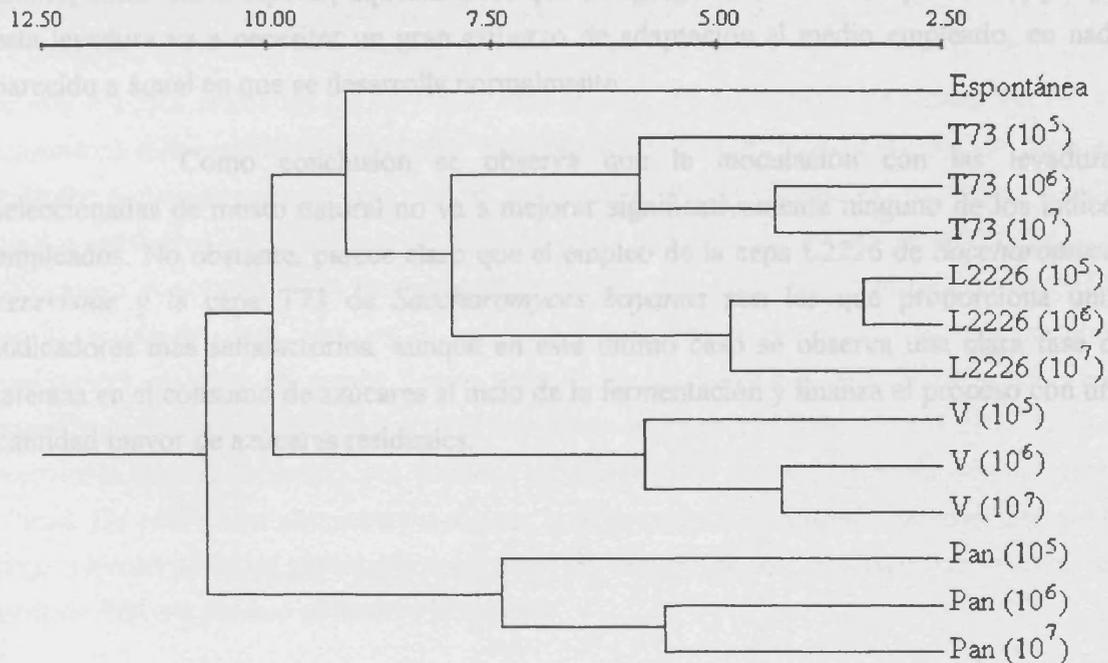


Figura 3.3.17.- Análisis de agrupamiento de las distintas muestras obtenidas por inoculación de mosto natural y por fermentación espontánea.

En primer lugar se observa que las muestras aparecen agrupadas en función de la cepa de levadura empleada y no de la concentración, indicando con ello que es el primer factor el que va a determinar principalmente la formación de compuestos volátiles a lo largo de la fermentación. Dentro de cada cepa, y con excepción de la cepa L2226, se observa que las muestras más parecidas son las que se obtienen por inoculación de 10^6 y 10^7 células/ml, probablemente porque la aportación masiva de levaduras va a interferir el desarrollo de la flora autóctona del mosto por razones de competencia ecológica (ya que la concentración de etanol es, como mucho, similar), efecto que va a ser menor al inocular 10^5 células/ml.

Considerando las distintas levaduras se observa que las muestras inoculadas con L2226 y T73 son las más cercanas entre sí y las más próximas a la fermentación espontánea del mosto, pero no se pueden considerar similares debido a la gran distancia de agrupamiento. A continuación se encuentran las muestras inoculadas con la cepa V, y por último, como cabía esperar, aquellas a las que se agrega la levadura de panadería, ya que esta levadura va a necesitar un gran esfuerzo de adaptación al medio empleado, en nada parecido a aquel en que se desarrolla normalmente.

Como conclusión se observa que la inoculación con las levaduras seleccionadas de mosto natural no va a mejorar significativamente ninguno de los índices empleados. No obstante, parece claro que el empleo de la cepa L2226 de *Saccharomyces cerevisiae* y la cepa T73 de *Saccharomyces bayanus* son las que proporciona unos indicadores más satisfactorios, aunque en este último caso se observa una clara fase de latencia en el consumo de azúcares al inicio de la fermentación y finaliza el proceso con una cantidad mayor de azúcares residuales.

3.4.- Fermentaciones inducidas de mosto estéril de la variedad Monastrell.

Según numerosos autores (Amerine *et al.*, 1973; Lafon Lafourcade, 1983; Suárez e Iñigo, 1990), el empleo eficaz de las levaduras seleccionadas implica una reducción o eliminación previa de las levaduras autóctonas del mosto, bien por procedimientos físicos (desfangado, filtración), bien por vía química (adición de SO₂). Ahora bien, la realización de esta práctica puede no parecer muy conveniente, ya que implica la sustitución de un mecanismo fermentativo que conlleva una sucesión de microorganismos por un proceso realizado en pureza por una sola especie de levadura. Planteada esta problemática, y dado que los resultados obtenidos por inoculación de mostos frescos no son satisfactorios, nos planteamos el estudio de la fermentación en mosto esterilizado por filtración. Para ello hemos empleado, por una parte, cultivos puros de las levaduras autóctonas más importantes aisladas de mosto fresco además de las levaduras seleccionadas que han proporcionado mejores resultados en la fermentación de mosto fresco, y por otra, cultivos iniciadores mixtos formados por distintas combinaciones de las levaduras anteriormente citadas. De esta forma podemos determinar la importancia de realizar una reducción de la carga microbiana inicial previa a la realización del inóculo, y, por otro lado, la idoneidad de emplear cultivos puros o mixtos de levaduras.

En este tipo de estudios no hemos efectuado un seguimiento de la formación de los compuestos volátiles a lo largo de la fermentación, considerando suficiente la obtención de los resultados del producto final. En cambio, sí hemos hecho un seguimiento de las poblaciones levaduriformes a lo largo del proceso con vistas a determinar cómo esta evolución puede afectar al resto de parámetros considerados.

3.4.1.- Fermentaciones de mosto estéril inducidas con cultivos puros de levaduras.

3.4.1.1.- Fenotipo killer de las levaduras empleadas.

Las experiencias realizadas para conocer el carácter killer de las cinco cepas levaduriformes utilizadas dieron como resultado que las tres levaduras del género *Saccharomyces* (cepa salvaje, cepa T73 y cepa L2226) presentaban fenotipo killer y las dos levaduras apiculadas resultaron ser sensibles a la toxina. Estos fenotipos se detallan en la Tabla 3.4.1.

Levadura	Fenotipo
<i>S. cerevisiae</i> cepa salvaje	K ⁺ R ⁺
<i>S. cerevisiae</i> cepa L2226	K ⁺ R ⁺
<i>S. bayanus</i> cepa T73	K ⁺ R ⁺
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	K ⁻ R ⁻
<i>Kloeckera apiculata</i>	K ⁻ R ⁻

Tabla 3.4.1.-Fenotipo killer de las levaduras empleadas.

Estos resultados no aseguran la expresión del carácter killer en las experiencias de fermentación realizadas, ya que las condiciones del medio, tanto fisicoquímicas como ecológicas son distintas a las de las experiencias realizadas para conocer los fenotipos killer. No obstante, de producirse la expresión del genotipo killer por las cepas K⁺R⁺, tan solo cabe esperar un efecto inhibitorio sobre la flora apiculada, que es la sensible, aunque este efecto es siempre difícil de determinar puesto que dicho tipo de flora también se inhibe cuando aumenta la concentración de etanol.

3.4.1.2.- Evolución de la población levaduriforme.

El número de células viables al final de las fermentaciones inducidas con levaduras apiculadas y con levaduras del género *Saccharomyces* resultó distinto (Figura 3.4.1). Dentro de las levaduras apiculadas, la población de *Kloeckera apiculata* al final de la fermentación fue dos órdenes de magnitud inferiores a los de *Hanseniaspora uvarum*, a pesar de que la primera alcanzó un número máximo (alrededor del séptimo día de fermentación) un orden de magnitud superior al de *Hanseniaspora uvarum*. Respecto al resto de levaduras, se observó que la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* L2226 fue la que alcanzó una población más elevada durante el proceso fermentativo, aunque las dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* presentan la fase de declive en el día 28 de fermentación. Por su parte, la población de la cepa de *Saccharomyces bayanus* presenta la fase estacionaria a partir del día 4 de fermentación. Está descrito una mayor tolerancia a las concentraciones elevadas de etanol por parte de esta especie, por lo que suele aparecer sobre todo en los últimos estadios de la fermentación (Lafon Lafourcade, 1983).

A excepción de la cepa T73 de *Saccharomyces bayanus*, que mantiene una población estable hasta el final del proceso una vez alcanzado su máximo, el resto de levaduras muestra una evolución poblacional análoga, alcanzando el máximo entre los días 4 y 7 de fermentación para decaer hasta el final del proceso.

des crept y al séptimo era superior al de estas. Al final dejó una cantidad de azúcares residuales intermedias.

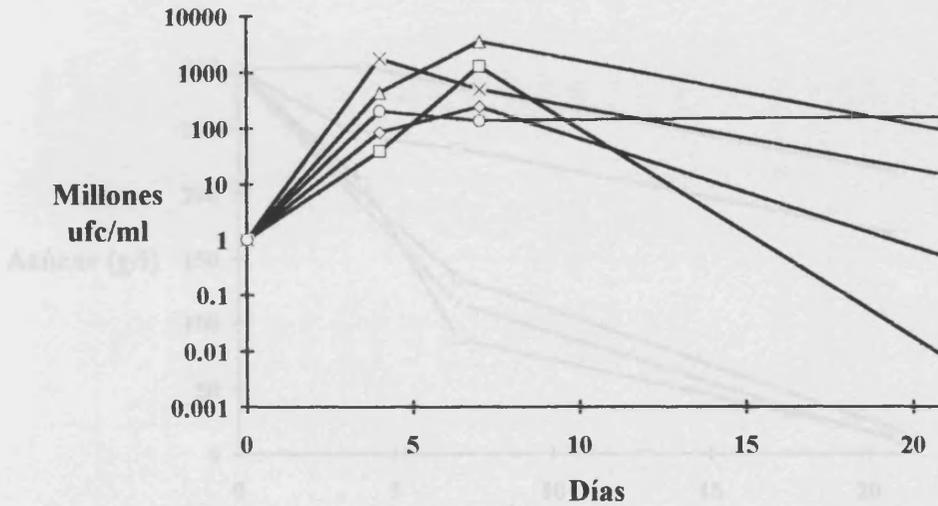


Figura 3.4.1.- Evolución de la población levaduriforme en las fermentaciones de mosto estéril inducidas con cultivos puros de levaduras (□ *Kloeckera apiculata*, ◇ *Hanseniaspora uvarum*, △ *S. cerevisiae* cepa salvaje, X *S. cerevisiae* cepa L2226, O *S. bayanus* cepa T73).

3.4.1.3.- Cinética de fermentación.

Observando las dinámicas de consumo de azúcares (Figura 3.4.2) se ponen de manifiesto las diferencias entre las levaduras de alto y bajo poder fermentativo. *Hanseniaspora uvarum* y *Kloeckera apiculata* dejaron 216 y 168 g/L de azúcares residuales al final de la fermentación respectivamente. Las cepas salvaje y L2226 de *Saccharomyces cerevisiae* y la T73 de *Saccharomyces bayanus* dejaron 18 g/L, 9 g/L y 13 g/L de azúcares residuales respectivamente. Estos valores representan cantidades de etanol entre 16-17 % v/v, superiores a los obtenidos por las levaduras apiculadas.

Las dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* presentaron una dinámica de consumo de azúcares similar. Empezaron con la velocidad de consumo más alta y la fueron disminuyendo progresivamente hasta el final de la fermentación. Sin embargo, la cepa T73 de *Saccharomyces bayanus* aumentó su velocidad de consumo de azúcares entre los días cuarto y séptimo, ya que en el cuarto día, su consumo de azúcar era inferior al de las otras

dos cepas y al séptimo era superior al de éstas. Al final dejó una cantidad de azúcares residuales intermedia.

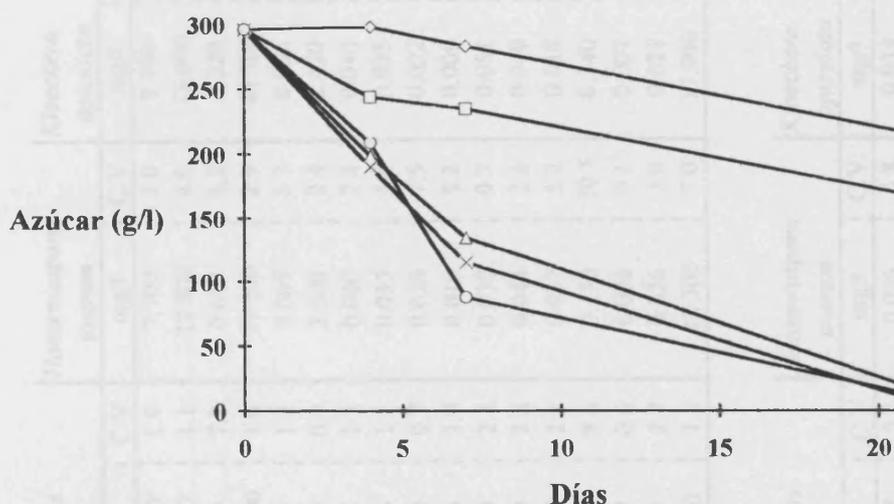


Figura 3.4.2.- Cinética de fermentación en las fermentaciones de mosto estéril inducidas con cultivos puros de levaduras (□ *Kloeckera apiculata*, ◇ *Hanseniaspora uvarum*, Δ *S. cerevisiae* cepa salvaje, X *S. cerevisiae* cepa L2226, O *S. bayanus* cepa T73)

3.4.1.4.- Formación de la fracción volátil.

Las concentraciones de los compuestos volátiles formados en cada una de las fermentaciones inducidas con cultivos puros de levaduras se muestran en la Tablas 3.4.2, así como sus coeficientes de variación. En la Tabla 3.4.3 se puede observar la evolución de los distintos grupos de componentes a lo largo de la fermentación.

3.4.1.4.1.- Alcoholes superiores.

La concentración global de alcoholes superiores oscila entre 331 y 359 mg/l para las levaduras del género *Saccharomyces* y entre 55 y 80 mg/l para las levaduras apiculadas. En el primer caso, la levadura más productora es la cepa T73 de *Saccharomyces bayanus*, mientras que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* forman cantidades similares, aunque algo inferiores para la cepa autóctona. Entre las levaduras apiculadas la mayor productora es la especie *Kloeckera apiculata* que, como ya vimos, es la que consume una mayor cantidad de azúcares durante la fermentación.

Tabla 3.4.2.- Concentración de los distintos componentes de la fracción volátil en el producto obtenido por fermentación de mosto estéril inducida con cultivos puros de levaduras.

ALCOHOLES

n°	COMPONENTE	<i>S.cerevisiae</i> autóctona		<i>S.cerevisiae</i> L2226		<i>S.bayanus</i> T73		<i>Hanseniaspora uvarum</i>		<i>Kloeckera apiculata</i>	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
7	1-Propanol	10.100	1.1	12.100	1.2	10.000	1.9	7.700	3.0	9.700	10.7
10	Isobutanol	72.000	2.3	74.700	0.9	75.500	1.1	19.800	4.6	18.000	11.3
13	1-Butanol	2.200	8.6	2.100	1.6	1.520	7.3	0.610	4.2	1.220	9.3
14	Alcohol isoamílico	166.000	2.1	182.000	3.8	202.000	1.0	39.500	2.9	44.700	6.0
16	Alcohol amílico	0.049	10.7	0.049	6.7	0.037	1.2	0.005	6.3	0.005	3.2
21	1-Hexanol	2.230	1.2	2.340	3.4	2.400	0.9	2.500	2.4	2.420	4.8
22	trans 3-Hexen-1-ol	0.035	0.9	0.040	3.9	0.035	1.2	0.040	2.4	0.040	3.2
23	cis 3-Hexen-1-ol	0.040	0.8	0.039	5.1	0.036	1.1	0.035	3.4	0.035	4.6
26	1-Heptanol	0.033	11.9	0.050	3.8	0.060	0.7	0.020	7.5	0.022	12.6
32	Linalool	0.004	3.4	0.009	4.3	0.005	3.9	0.010	5.2	0.009	11.6
33	1-Octanol	0.090	5.5	0.090	4.0	0.100	2.4	0.030	9.7	0.051	2.7
40	1-Metoxi-2-butanol	0.087	6.5	0.083	5.8	0.090	2.8	0.044	2.6	0.040	11.8
44	alfa-Terpineol	0.018	2.8	0.017	3.6	0.017	2.2	0.017	5.2	0.018	7.6
46	3-Metilúo-1-propanol	1.600	7.2	1.180	5.4	1.590	8.6	0.130	30.5	0.140	11.5
48	1-Decanol	0.040	9.3	0.013	3.4	0.017	0.6	0.006	0.1	0.007	1.5
52	Alcohol bencilico	0.027	4.1	0.028	5.4	0.027	2.7	0.026	3.0	0.027	6.1
55	2-Feniletanol	79.200	0.9	76.000	3.4	68.000	1.5	12.300	7.0	17.000	7.2

ÁCIDOS GRASOS

n°	COMPONENTE	<i>S.cerevisiae</i> autóctona		<i>S.cerevisiae</i> L2226		<i>S.bayanus</i> T73		<i>Hanseniaspora uvarum</i>		<i>Kloeckera apiculata</i>	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
35	Acido isobutírico	0.036	8.3	0.030	3.4	0.032	2.2	0.026	5.8	0.011	5.7
42	Acido isovaleriánico	0.095	9.2	0.090	15.9	0.050	0.6	0.060	3.2	0.065	6.7
50	Acido hexanoico	0.280	5.2	0.200	7.1	0.190	1.7	0.140	3.9	0.135	5.6
57	Acido octanoico	0.040	6.2	0.047	6.6	0.059	3.4	0.026	11.9	0.027	9.0
59	Acido decanoico	0.013	6.2	traz.		0.010	4.6	0.020	0.1	0.010	1.5

Tabla 3.4.2 (cont.).- Concentración de los distintos componentes de la fracción volátil en el producto obtenido por fermentación de mosto estéril inducida con cultivos puros de levaduras.

ÉSTERES		<i>S.cerevisiae</i> autóctona		<i>S.cerevisiae</i> L2226		<i>S.bayanus</i> T73		<i>Hanseniaspora</i> <i>uvarum</i>		<i>Kloeckera</i> <i>apiculata</i>	
nº	COMPONENTE	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
4	Isobutirato de etilo	0.080	1.5	0.080	8.6	0.068	1.7	traz.		0.005	9.4
8	Butirato de etilo	0.017	9.2	traz.		0.008	4.9	0.012	9.6	0.011	5.9
9	Isovalerato de etilo	traz.		traz.		0.006	4.7	0.005	2.4	0.010	5.2
15	Hexanoato de etilo	0.100	1.1	0.130	7.3	0.120	10.9	0.047	8.6	0.044	4.3
20	Lactato de etilo	2.500	1.8	1.900	3.4	2.500	1.1	1.660	2.4	2.000	4.6
25	Octanoato de etilo	0.400	2.1	0.500	3.6	0.440	1.0	0.024	9.3	0.050	7.6
31	3-Hidroxibutirato de etilo	0.150	7.3	0.200	4.8	0.280	1.2	0.030	12.3	0.045	3.6
41	Decanoato de etilo	0.300	0.8	0.230	7.4	0.310	1.0	0.060	3.2	0.050	5.6
43	Succinato de dietilo	0.980	11.4	1.080	3.6	0.900	2.2	0.150	6.3	0.170	6.7
45	9-Decenoato de etilo	1.150	12.2	1.000	4.6	1.050	11.5	0.201	5.2	0.223	7.6
51	Dodecanoato de etilo	0.190	5.7	0.160	3.7	0.160	1.7	0.240	6.8	0.200	4.0
5	Acetato de propilo	0.010	1.7	0.010	2.5	0.011	0.9	0.010	14.5	0.025	6.0
6	Acetato de isobutilo	0.280	5.7	0.270	5.7	0.320	3.9	0.070	10.2	0.098	8.3
11	Acetato de butilo	0.012	5.1	0.009	6.3	0.015	0.8	0.014	28.0	0.015	6.6
12	Acetato de isoamilo	10.300	6.9	10.500	0.7	11.400	1.6	0.600	6.9	0.600	9.2
18	Acetato de hexilo	0.470	5.3	0.480	16.5	0.480	1.7	0.480	3.0	0.490	5.4
49	Acetato de 2-fenilo	0.300	6.8	0.220	5.4	0.240	1.7	0.040	8.7	0.080	6.0
17	Isobutirato de isoamilo	traz.		traz.		traz.		traz.		traz.	
19	Isovalerato de isoamilo	traz.		traz.		traz.		traz.		traz.	
27	Hexanoato de isoamilo	0.008	7.5	0.008		0.006		0.013	6.6	0.010	5.4
29	Octanoato de isoamilo	0.026	7.1	0.036	3.1	0.050	3.4	0.040	3.0	0.034	5.9
54	Decanoato de isoamilo	0.010	1.1	0.009	4.2	0.010	11.7	traz.		traz.	
53	Isobutirato de 2-fenilo	traz.			6.2	traz.		traz.		traz.	

Tabla 3.4.2 (cont.)- Concentración de los distintos componentes de la fracción volátil en el producto obtenido por fermentación de mosto estéril inducida con cultivos puros de levaduras.

DIOLES

n°	COMPONENTE	<i>S.cerevisiae</i> autóctona		<i>S.cerevisiae</i> L2226		<i>S.bayanus</i> T73		<i>Hanseniaspora</i> <i>uvarum</i>		<i>Kloeckera</i> <i>apiculata</i>	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
34	2,3-Butanodiol (treco)	374.000	1.0	449.000	3.1	510.000	1.8	47.000	5.5	51.600	5.5
37	1,2-Propanodiol	21.200	0.9	20.800	3.3	21.200	1.2	0.230	9.1	0.230	7.3

OTROS

n°	COMPONENTE	<i>S.cerevisiae</i> autóctona		<i>S.cerevisiae</i> L2226		<i>S.bayanus</i> T73		<i>Hanseniaspora</i> <i>uvarum</i>		<i>Kloeckera</i> <i>apiculata</i>	
		mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.	mg/l	C.V.
28	2,4-Dimetil-3-pentanona	traz.		traz.		0.005	0.6	traz.		traz.	
30	Benzaldehido	0.094	4.0	0.092	7.9	0.098	11.2	0.096	5.9	0.096	8.7
38	gamma-Butirolactona	1.630	6.5	1.200	3.4	2.020	7.5	0.380	3.7	0.290	10.3
56	beta-Ionona	0.120	11.1	0.110	5.9	0.070	8.0	0.032	2.4	0.040	6.1

C.V. = Coeficiente de variación

traz. = trazas

Tabla 3.4.3.- Concentración de los principales grupos de componentes de la fracción volátil en el producto obtenido por fermentación de mosto estéril inducida con cultivos puros de levaduras.

		<i>S. cerevisiae</i> autóctona		<i>S. cerevisiae</i> L2226		<i>S. bayanus</i> T73		<i>Hanseniaspora</i> <i>uvarum</i>		<i>Kloeckera</i> <i>apiculata</i>	
		mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Fracción volátil		748.545		839.230		913.542		134.479		150.098	
Componentes constantes		2.918	0.39	3.045	0.36	3.098	0.34	3.204	2.39	3.135	2.09
Alcoholes superiores	Mayoritarios	327.300	43.72	344.800	41.09	355.500	38.91	79.300	58.97	89.400	59.56
	Minoritarios	0.299	0.04	0.285	0.03	0.304	0.03	0.105	0.08	0.125	0.08
	Totales	331.399	44.27	348.365	41.51	358.914	39.29	80.145	59.60	90.885	60.55
Ácidos orgánicos		0.464	0.06	0.367	0.04	0.341	0.04	0.272	0.20	0.248	0.17
Ésteres	Etilicos	5.867	0.78	5.280	0.63	5.842	0.64	2.429	1.81	2.808	1.87
	Acetatos*	0.602	0.08	0.509	0.06	0.586	0.06	0.134	0.10	0.218	0.15
	Acetato de isoamilo	10.300	1.38	10.500	1.25	11.400	1.25	0.600	0.45	0.600	0.40
	Ésteres de isoamilo*	0.044	0.01	0.054	0.01	0.066	0.01	0.053	0.04	0.044	0.03
	Totales	16.814	2.25	16.343	1.95	17.895	1.96	3.216	2.39	3.670	2.44

* = menos acetato de isoamilo

3.4.1.4.1.1.- Alcoholes superiores mayoritarios.

Para los alcoholes superiores mayoritarios se observa la misma situación en cuanto a las cepas productoras que la vista para el conjunto de alcoholes superiores, aunque la cepa T73 es la mayor productora entre las levaduras de alto poder fermentativo debido a la cantidad aportada de alcohol isoamílico, ya que forma cantidades similares de 1-propanol e isobutanol y claramente inferiores de 2-feniletanol.

En cuanto a las levaduras de bajo poder fermentativo, *Kloeckera apiculata* es la mayor productora para todos los compuestos, llegando incluso a igualar el nivel de 1-propanol formado por las levaduras de alto poder fermentativo.

3.4.1.4.1.2.- Alcoholes superiores minoritarios.

En este caso, las diferencias entre las levaduras de alto poder fermentativo son escasas, existiendo una menor diferencia entre éstas y las levaduras apiculadas. Entre las levaduras del género *Saccharomyces* se observa que las cantidades de 1-octanol y 2-metoxi-1-butanol son muy similares. Para el alcohol amílico, las dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* presentan cantidades similares y superiores a la obtenida en la muestra inoculada con T73. La cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae* es la mayor productora de 1-decanol, mientras que la cepa T73 es la que más 1-heptanol sintetiza.

Las levaduras de bajo poder fermentativo producen cantidades similares de todos los alcoholes superiores minoritarios estudiados, excepto para el 1-octanol para el que *Kloeckera apiculata* produce cantidades mayores.

3.4.1.4.1.3.- Otros alcoholes superiores.

Para el 1-butanol se observa que las levaduras más productoras son las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que la cepa T73 forma cantidades similares a las sintetizadas por *Kloeckera apiculata*; por su parte, *Hanseniaspora uvarum* es la levadura que menos cantidad de este compuesto sintetiza.

En el caso del 3-metil-1-propanol, las levaduras de bajo poder fermentativo forman cantidades mucho menores que el resto de levaduras, de las cuales las mayores productoras son las cepas salvaje y T73, aunque en ningún caso llegan a formar las cantidades que se obtienen por fermentación espontánea del mosto. No obstante, en las levaduras de alto poder fermentativo se observa la misma tendencia que en la fermentación

espontánea, de modo que al cabo de 4 días de fermentación se ha sintetizado ya la práctica totalidad de 3-metil-1-propanol.

3.4.1.4.1.4.- Discusión.

En general, las cantidades totales de alcoholes superiores son bastante inferiores a las obtenidas por fermentación espontánea del mosto, destacando, aparte de las levaduras de bajo poder fermentativo, la cantidad aportada por la cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae*. En la figura 3.4.3 se observa la comparación de las cantidades de alcoholes superiores obtenidas por la fermentación inducida de mosto estéril con cultivos puros de levaduras y las que presenta la fermentación espontánea del mosto.

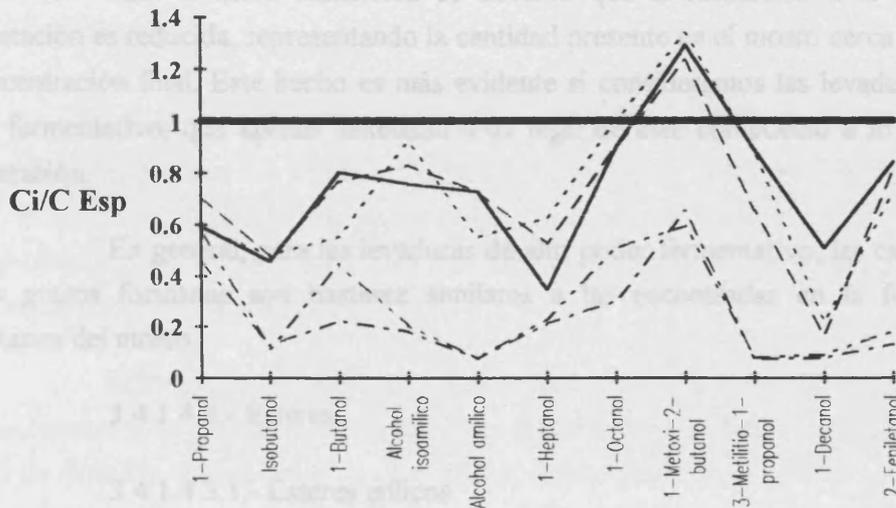


Figura 3.4.3.- Concentraciones relativas de los alcoholes superiores producidas en la fermentación de mosto estéril inducidas por cultivos puros de levaduras respecto a la fermentación espontánea (— fermentación espontánea; — — cepa salvaje de *S.cerevisiae*, - - - cepa L2226 de *S.cerevisiae*; - · - · cepa T73 de *S.bayanus*; · · · · *Hanseniaspora uvarum*; · · · · · *Kloeckera apiculata*).

Se observa que en la mayoría de los casos se obtienen cantidades inferiores a la fermentación espontánea del mosto; no obstante, la cantidad de alcohol isoamílico producida por la cepa T73 es sólo un 10% inferior y se forman cantidades similares, para las cepas más productoras, de 1-octanol y 1-butanol, mientras que las cantidades de 1-metoxi-2-butanol son superiores en todas las muestras inoculadas con levaduras de alto poder fermentativo. Las levaduras apiculadas producen cantidades más reducidas de todos

los alcoholes superiores, a excepción de la formación de 1-propanol por parte de *Kloeckera apiculata*.

3.4.1.4.2.- Ácidos grasos.

En general se observa que la concentración total de ácidos grasos es mayor en las muestras inoculadas con levaduras del género *Saccharomyces* que en aquellas a las que se añade levaduras de bajo poder fermentativo, aunque en este caso son similares entre sí. En el primer caso, la levadura más productora es la cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae* (debido a la concentración de ácido hexanoico), mientras que las otras levaduras producen cantidades similares.

Para el ácido hexanoico se observa que la formación a lo largo de la fermentación es reducida, representando la cantidad presente en el mosto cerca del 50% de la concentración final. Este hecho es más evidente si consideramos las levaduras de bajo poder fermentativo, que apenas sintetizan 0.02 mg/l de este compuesto a lo largo de la fermentación.

En general, para las levaduras de alto poder fermentativo, las cantidades de ácidos grasos formadas son bastante similares a las encontradas en la fermentación espontánea del mosto.

3.4.1.4.3.- Ésteres.

3.4.1.4.3.1.- Ésteres etílicos.

La formación global de ésteres etílicos es mucho mayor en las levaduras de alto poder fermentativo debido a su mayor capacidad de producir etanol; sin embargo, entre ellas la levadura más productora es la cepa T73 que, sin embargo, no es la que más etanol produce, indicando que intervienen otros factores en las vías de síntesis de los ésteres etílicos. Entre las levaduras de bajo poder fermentativo, la cepa más productora es la que más etanol produce (*Kloeckera apiculata*), observándose este hecho sobre todo en las concentraciones finales de octanoato y 3-hidroxibutirato de etilo.

Aunque las concentraciones finales de butirato e isovalerato de etilo son muy bajas, la flora apiculada produjo niveles similares o superiores a los obtenidos por las levaduras del género *Saccharomyces*; la cantidad de dodecanoato de etilo formada por las levaduras de bajo poder fermentativo es significativamente superior a la que se encuentra

presente en las muestras inoculadas con las cepas de alta capacidad fermentativa. Para el resto de ésteres etílicos, la flora apiculada produjo cantidades significativamente menores, destacando sobre todo el caso del hexanoato de etilo, para el que apenas se produjo incremento en su concentración a lo largo del periodo considerado.

La cepa T73 es la mayor productora de octanoato, decanoato y 9-decenoato de etilo, mientras que es la levadura que menor cantidad de dodecanoato de etilo sintetizó a lo largo de la fermentación. Para el resto de ésteres etílicos estudiados, los niveles producidos por las distintas levaduras del género *Saccharomyces* son similares, aunque destaca, quizá, el bajo nivel de lactato de etilo formado en las muestras inoculadas con la cepa L2226 y las cantidades muy superiores de octanoato de etilo formadas por la cepa T73 respecto a las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.4.1.4.3.2.- Acetatos.

En la formación de los acetatos existe una gran diferencia entre las cantidades formadas por las levaduras de alto y bajo poder fermentativo. En todos los casos, existe una clara correlación entre la cantidad de acetato y la del alcohol correspondiente, por lo que parece claro que la síntesis de los primeros está condicionada por la concentración de los últimos.

Entre las levaduras de alto poder fermentativo, la cepa más productora es la T73; así, presenta las concentraciones máximas de acetato de isobutilo, acetato de butilo y acetato de isoamilo. Por su parte, la cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae* es la mayor productora de acetato de 2-fenetilo.

En cuanto a las levaduras de bajo poder fermentativo, *Kloeckera apiculata* es la mayor productora de todos los acetatos estudiados, pero en ningún caso llega a formar las cantidades presentes en las muestras inoculadas con las levaduras del género *Saccharomyces*.

3.4.1.4.3.3.- Ésteres de isoamilo.

Entre los ésteres de isoamilo, el isovalerato de isoamilo se obtuvo en una concentración muy baja (0.008 mg/l). Los cuatro ésteres de isoamilo restantes se encontraron al final de la fermentación en concentraciones comprendidas entre 0.025-0.1 mg/l.

3.4.1.4.3.4.- Discusión.

En la Figura 3.4.4 se muestra la producción comparativa de los distintos ésteres en las fermentaciones de mosto estéril inducidas con cultivos puros de levaduras respecto a la fermentación espontánea. No se consideran los compuestos que presentan concentraciones muy bajas, ya que el error cometido en su determinación puede ser muy elevado. Se observa que para la mayoría de ésteres, las cantidades obtenidas son inferiores a las que se presentan por fermentación espontánea del mosto. No obstante, gran parte de los ésteres etílicos, sobre todo los de cadena más larga, muestran concentraciones similares o incluso superiores, poniendo de manifiesto la relación existente entre las cantidades formadas y el contenido en etanol del medio. Sin embargo, destaca el hecho de que para los dos hidroxi-ésteres de etilo estudiados, las concentraciones obtenidas por fermentación de mosto estéril inducida por cultivos mixtos de levaduras son muy inferiores a las que se obtienen por fermentación espontánea del mosto. Del mismo modo, resalta el hecho de que la cepa autóctona de *Saccharomyces cerevisiae* es la única capaz de formar niveles similares de acetato de 2-feniletano a la fermentación espontánea, aunque en todos los casos aparece una clara correlación entre la cantidad de acetatos y ésteres de isoamilo formados y la cantidad del alcohol correspondiente presente en el medio. De esta forma, puede concluirse que la concentración de los ésteres va a depender en gran medida de la cantidad del alcohol correspondiente que se va a formar en el medio a lo largo de la fermentación.

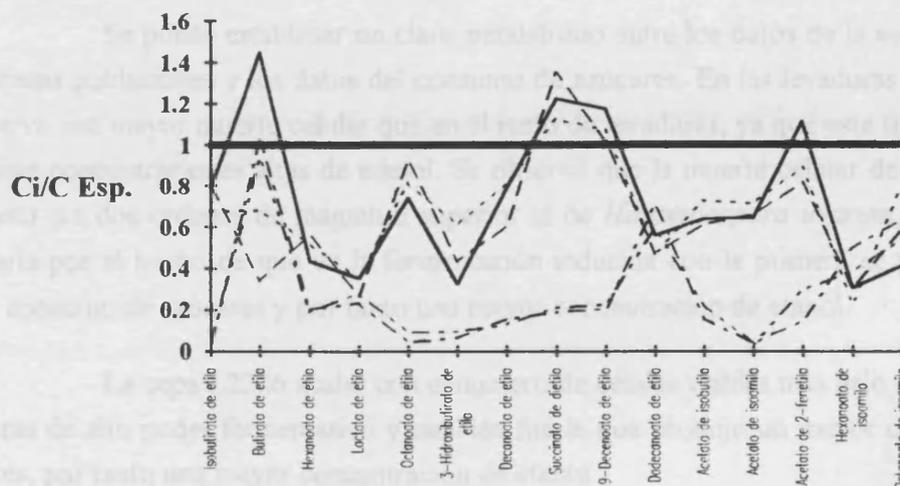


Figura 3.4.4.- Concentraciones relativas de los ésteres producidas en la fermentación de mosto estéril inducidas por cultivos puros de levaduras respecto a la fermentación espontánea (— fermentación espontánea; — cepa salvaje de *S. cerevisiae*, — cepa L2226 de *S. cerevisiae*; - - - cepa T73 de *S. bayanus*; — — — *Hanseniaspora uvarum*; — — — — *Kloeckera apiculata*).

3.4.1.4.4.- Glicoles.

Se estudiaron dos dioles, el *treo*-2,3-butanodiol y el 1,2-propanodiol. El primero fue uno de los compuestos volátiles más abundantes de los estudiados en el vino (589 mg/L). Las levaduras apiculadas producen cantidades muy pequeñas de estos componentes, por lo que parece que su síntesis va estrechamente ligada a la formación de etanol. Las levaduras de alto poder fermentativo sintetizan cantidades comparables a las que se obtienen por fermentación espontánea del mosto, aunque ligeramente inferiores.

3.4.1.4.5.- Otros componentes.

Del resto de componentes, no incluidos en ninguna de las familias químicas, la γ -butirolactona se observa que las levaduras de bajo poder fermentativo producen cantidades significativamente menores que las cepas del género *Saccharomyces*, aunque éstas, a excepción de la cepa T73 de *Saccharomyces bayanus*, aportan al medio cantidades más pequeñas que las que se obtienen por fermentación espontánea. Con la β -ionona, se presenta la misma diferencia entre las levaduras de alto y bajo poder fermentativo, pero son en este caso las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* las que forman cantidades similares a las que se obtienen en las muestras no inoculadas.

3.4.1.5.- Discusión.

Se puede establecer un claro paralelismo entre los datos de la evolución de las distintas poblaciones y los datos del consumo de azúcares. En las levaduras apiculadas se observa una mayor muerte celular que en el resto de levaduras, ya que este tipo de flora no resiste concentraciones altas de etanol. Se observó que la muerte celular de *Kloeckera apiculata* era dos ordenes de magnitud superior al de *Hanseniaspora uvarum*, lo cual se explicaría por el hecho de que en la fermentación inducida con la primera se produjo un mayor consumo de azúcares y por tanto una mayor concentración de etanol.

La cepa L2226 acabó con el número de células viables más bajo de entre las levaduras de alto poder fermentativo y también fue la que produjo un mayor consumo de azúcares, por tanto una mayor concentración de etanol.

Comparando las dinámicas de consumo de azúcares de las fermentaciones llevadas a cabo con cultivos puros de levaduras con la fermentación espontánea, se observa que la fermentación espontánea tiene la mayor pendiente inicial, es decir, es la que más rápido comienza. Sin embargo, la cepa L2226 es capaz de mantener una capacidad

fermentativa mayor a partir de este momento, acabando con una cantidad de azúcares residuales del mismo orden. La cepa T73, a pesar de mostrar una clara aceleración de la fermentación en el tramo medio del proceso, se ralentiza hacia el final, mostrando una cantidad de azúcares superior al final del intervalo de tiempo considerado.

En cuanto a la fracción volátil destaca la gran diferencia existente entre los componentes volátiles formados por las levaduras de alto y bajo poder fermentativo, pero mientras el consumo de azúcar es un 55-70% menor, la cantidad de compuestos volátiles representa un 15-18%, siempre con resultados mejores para las muestras inoculadas con *Kloeckera apiculata*. En cuanto a las levaduras de alto poder fermentativo destaca el hecho de que las muestras obtenidas con la cepa T73 poseen los valores más altos para todos los grupos de compuestos excepto para los ácidos grasos y ésteres etílicos, que se obtienen en las muestras inoculadas con la cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae*.

En la Tabla 3.4.4 se muestra las relaciones existentes entre las concentraciones de ésteres (A) y ésteres etílicos de alto peso molecular (B) respecto al contenido total de alcoholes superiores (C) para cada muestra.

	Spontánea	<i>S. cerevisiae</i> autóctona	<i>S. cerevisiae</i> L2226	<i>S. bayanus</i> T73	<i>Hanseniaspora</i> <i>uvarum</i>	<i>Kloeckera</i> <i>apiculata</i>
A/C	0.058	0.051	0.047	0.052	0.040	0.040
B/C	5.02×10^{-3}	6.46×10^{-3}	5.80×10^{-3}	6.28×10^{-3}	7.14×10^{-3}	6.24×10^{-3}

Tabla 3.4.4.- Índices A/C y B/C de las distintas fermentaciones de mosto estéril inducidos con cultivos puros de levaduras y la fermentación espontánea.

En los índices A/C se observa que en ningún caso llega a superarse el valor obtenido en la fermentación espontánea, situándose muy por debajo los valores obtenidos para las levaduras de bajo poder fermentativo. Sin embargo para el índice B/C obtenemos valores más elevados que los que proporciona la fermentación espontánea, destacando los presentes para las levaduras apiculadas. Entre las levaduras del género *Saccharomyces* no

se observan grandes diferencias, obteniéndose los valores más altos para la cepa autóctona y los menores para la cepa L2226.

Como conclusión se puede afirmar que los resultados más satisfactorios obtenidos por fermentación inducida de mosto estéril con cultivos puros de levaduras se obtienen cuando se emplea la cepa autóctona de *Saccharomyces cerevisiae*, aunque hay que destacar la importancia que pueden tener las levaduras apiculadas en la obtención de bebidas de bajo contenido alcohólico y marcado carácter afrutado.

3.4.2.- Fermentaciones de mosto estéril inducidas con cultivos mixtos de levaduras.

3.4.2.1.- Evolución de la población levaduriforme.

Los resultados de la evolución de los cinco cultivos mixtos a lo largo de las cinco fermentaciones ensayadas se muestra en las gráficas 3.4.5 a 3.4.9.

En las muestras obtenidas por inoculación de cultivos mixtos con elevado contenido de levaduras apiculadas se observan algunas diferencias significativas. En primer lugar, la muestra M2 presenta un mayor desarrollo temporal y poblacional, de las levaduras de bajo poder fermentativo; así, éstas se detectan hasta el día 7 de fermentación, mientras que en la muestra M1 dejan de observarse a partir del cuarto día del proceso. De igual modo, la población máxima de estas levaduras es un orden de magnitud mayor en el primer caso frente al segundo. Por otra parte, en lo que se refiere a las levaduras de alto poder fermentativo, se observa que en la muestra M1 la levadura mayoritaria es la cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que en M2 la cepa L2226 permite que sea la cepa T73 de *Saccharomyces bayanus* la que domine numéricamente desde que desaparece la flora apiculada y hasta el final de la fermentación. Estos datos ponen de manifiesto la importancia de emplear inóculos en los que intervenga la flora autóctona; así, la cepa salvaje no tiene ningún problema en el mosto empleado mientras que la cepa L2226, aislada de una región vitivinícola de características muy diferentes, muestra problemas de adaptación, inconveniente que no presenta la cepa T73 de *Saccharomyces bayanus*, aislada de una zona próxima a la D.O. Jumilla.

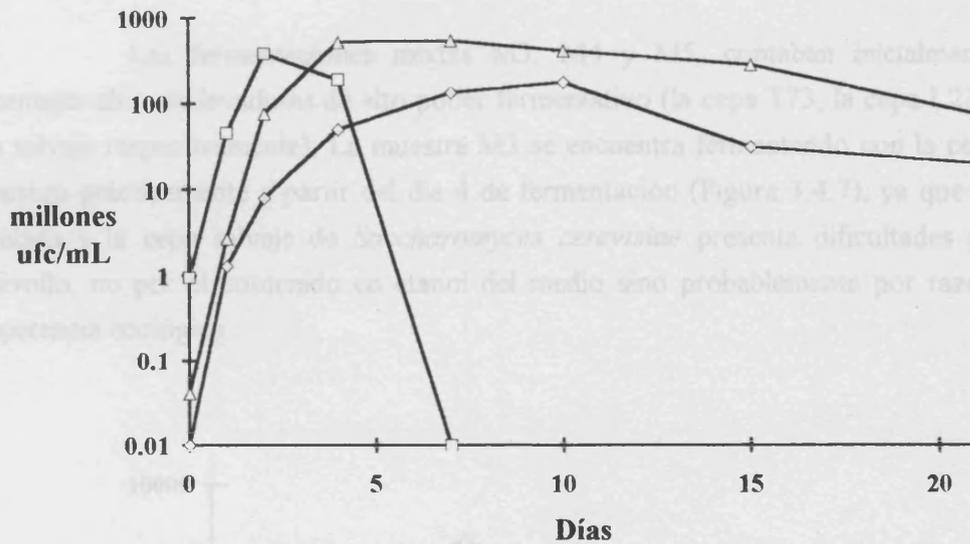


Figura 3.4.5.- Evolución de la población levaduriforme a la largo de la fermentación en la muestra M1 (□ Levaduras apiculadas, Δ *Saccharomyces cerevisiae* cepa salvaje, ◇ *Saccharomyces bayanus* cepa T73).

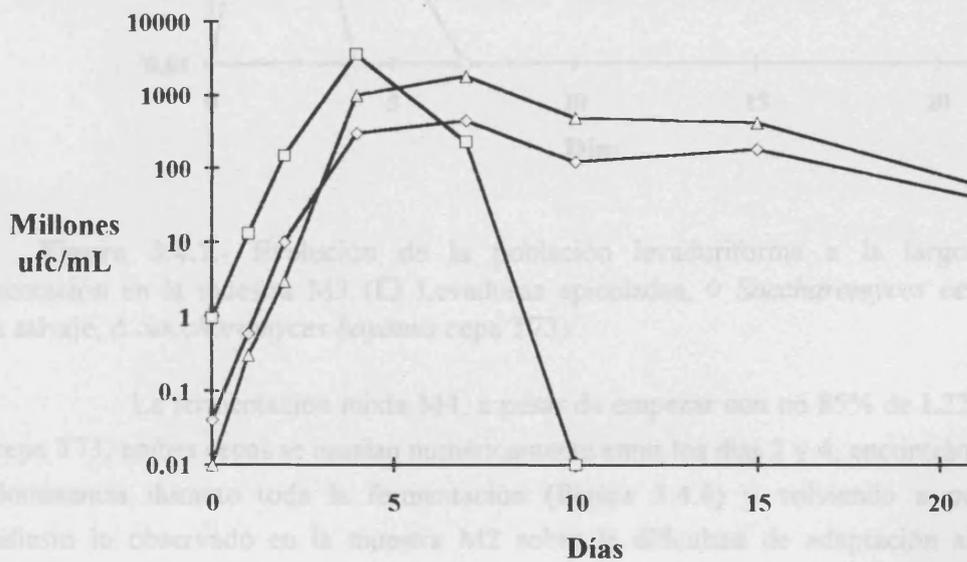


Figura 3.4.6.- Evolución de la población levaduriforme a la largo de la fermentación en la muestra M2 (□ Levaduras apiculadas, ◇ *Saccharomyces cerevisiae* cepa L2226, Δ *Saccharomyces bayanus* cepa T73).

Las fermentaciones mixtas M3, M4 y M5, contaban inicialmente con porcentajes altos de levaduras de alto poder fermentativo (la cepa T73, la cepa L2226 y la cepa salvaje respectivamente). La muestra M3 se encuentra fermentando con la cepa T73 en pureza prácticamente a partir del día 4 de fermentación (Figura 3.4.7), ya que la flora apiculada y la cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae* presenta dificultades para su desarrollo, no por el contenido en etanol del medio sino probablemente por razones de competencia ecológica.

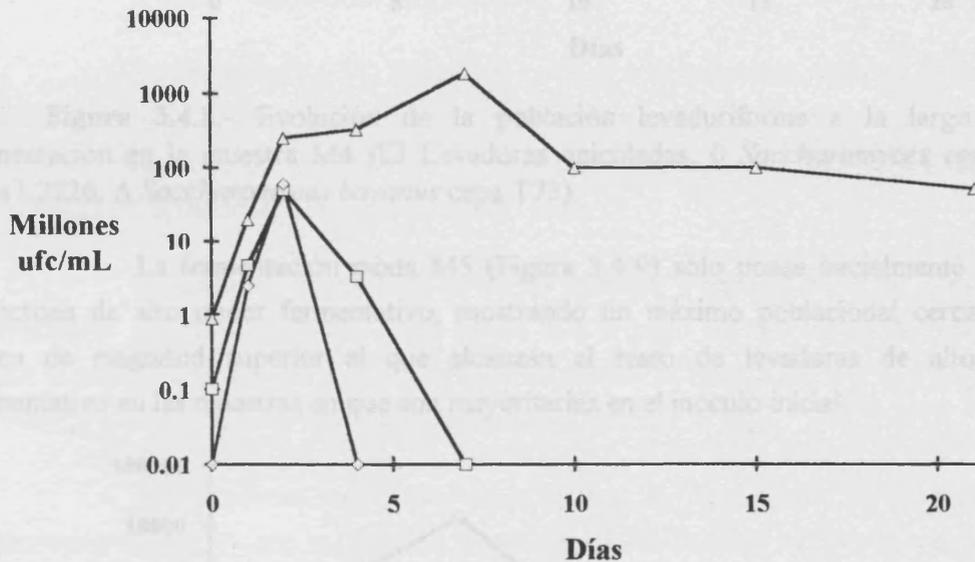


Figura 3.4.7.- Evolución de la población levaduriforme a la largo de la fermentación en la muestra M3 (\square Levaduras apiculadas, \diamond *Saccharomyces cerevisiae* cepa salvaje, Δ *Saccharomyces bayanus* cepa T73)

La fermentación mixta M4, a pesar de empezar con un 85% de L2226 y un 5% cepa T73, ambas cepas se igualan numéricamente entre los días 2 y 4, encontrándose en co-dominancia durante toda la fermentación (Figura 3.4.8) y volviendo a poner de manifiesto lo observado en la muestra M2 sobre la dificultad de adaptación al mosto empleado.

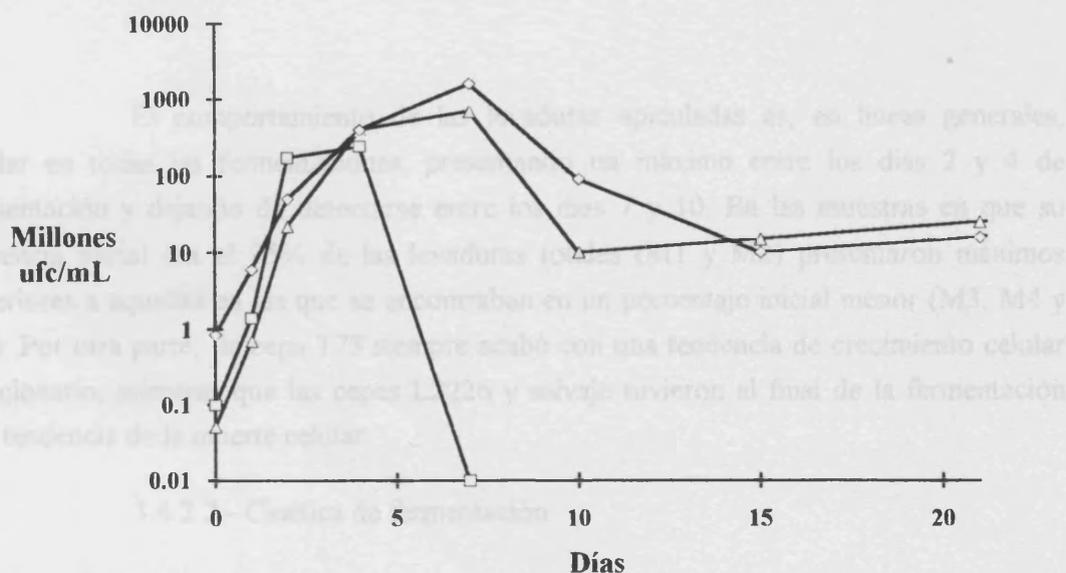


Figura 3.4.8.- Evolución de la población levaduriforme a la largo de la fermentación en la muestra M4 (□ Levaduras apiculadas, ◇ *Saccharomyces cerevisiae* cepa L2226, △ *Saccharomyces bayanus* cepa T73).

La fermentación mixta M5 (Figura 3.4.9) sólo posee inicialmente la cepa autóctona de alto poder fermentativo, mostrando un máximo poblacional cerca de un orden de magnitud superior al que alcanzan el resto de levaduras de alto poder fermentativo en las muestras en que son mayoritarias en el inóculo inicial.

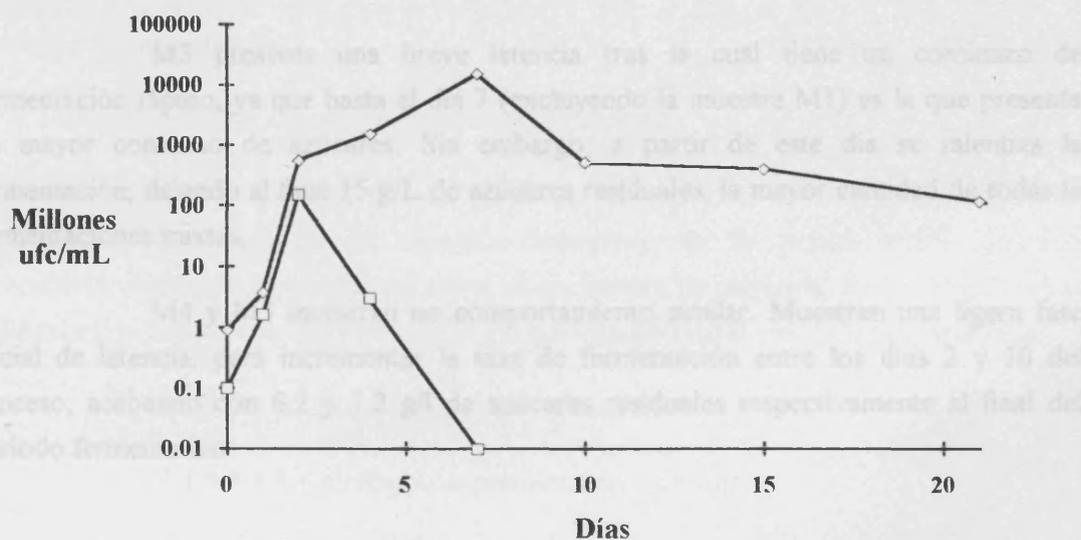


Figura 3.4.9.- Evolución de la población levaduriforme a la largo de la fermentación en la muestra M5 (□ Levaduras apiculadas, ◇ *Saccharomyces cerevisiae* cepa autóctona).

El comportamiento de las levaduras apiculadas es, en líneas generales, similar en todas las fermentaciones, presentando un máximo entre los días 2 y 4 de fermentación y dejando de detectarse entre los días 7 y 10. En las muestras en que su presencia inicial era el 95% de las levaduras totales (M1 y M2) presentaron máximos superiores a aquellas en las que se encontraban en un porcentaje inicial menor (M3, M4 y M5). Por otra parte, la cepa T73 siempre acabó con una tendencia de crecimiento celular estacionario, mientras que las cepas L2226 y salvaje tuvieron al final de la fermentación una tendencia de la muerte celular.

3.4.2.2.- Cinética de fermentación.

La fermentación M1 fue la que tuvo un comienzo más rápido y la que antes acabó con 6.5 g/L de azúcares residuales. En la gráfica 3.4.10 se puede observar como su evolución es notablemente distinta a las otras cuatro fermentaciones mixtas y semejante a la observada en la fermentación espontánea del mosto.

M2 presentó un periodo inicial de latencia, y hasta el día 2 no comienza la fermentación. Sin embargo a día 10 se iguala con el resto de fermentaciones mixtas en cuanto al azúcar consumido, y acaba aproximadamente al mismo tiempo que M3, M4 y M5 con 6.5 g/L de azúcares residuales, igual que la muestra M1.

M3 presenta una breve latencia tras la cual tiene un comienzo de fermentación rápido, ya que hasta el día 7 (excluyendo la muestra M1) es la que presenta un mayor consumo de azúcares. Sin embargo, a partir de este día se ralentiza la fermentación, dejando al final 15 g/L de azúcares residuales, la mayor cantidad de todas la fermentaciones mixtas.

M4 y M5 muestran un comportamiento similar. Muestran una ligera fase inicial de latencia, para incrementar la tasa de fermentación entre los días 2 y 10 del proceso, acabando con 6.2 y 7.2 g/l de azúcares residuales respectivamente al final del periodo fermentativo.

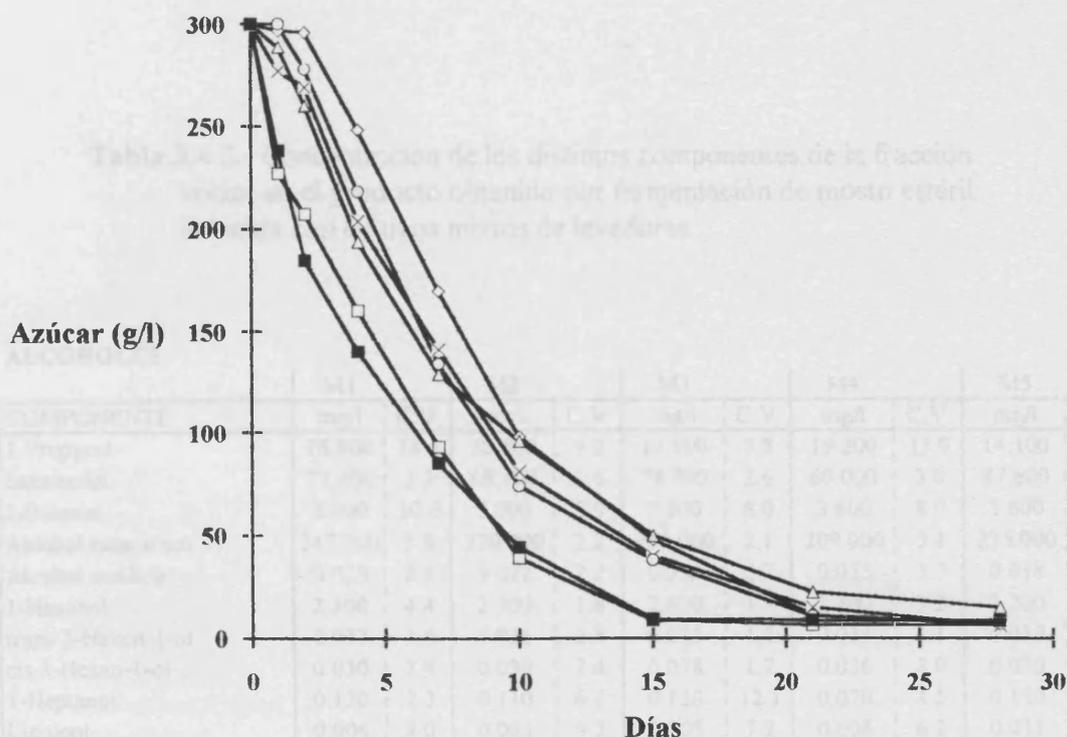


Figura 3.4.10.- Cinética de fermentación en las fermentaciones de mosto estéril inducidas con cultivos mixtos de levaduras (□ M1, ◇ M2, △ M3, X M4, O M5, ■ fermentación espontánea).

3.4.2.3.- Formación de la fracción volátil.

En la Tabla 3.4.5 se muestran las concentraciones de los distintos componentes obtenidos en las distintas fermentaciones de mosto estéril inducidas con cultivos mixtos de levaduras, así como su coeficiente de variación. En la Tabla 3.4.6 se muestran las concentraciones de cada familia química para cada una de las experiencias.

3.4.2.3.1.- Alcoholes superiores.

3.4.2.3.1.1.- Alcoholes superiores mayoritarios.

En la Figura 3.4.11 se muestra la concentración total de los alcoholes superiores mayoritarios obtenidos en las distintas fermentaciones mixtas, oscilando entre 363 y 420 mg/l. Las cantidades halladas en M1 y M5 por una parte, y en M2 y M4 por

Tabla 3.4.5.- Concentración de los distintos componentes de la fracción volátil en el producto obtenido por fermentación de mosto estéril inducida con cultivos mixtos de levaduras.

ALCOHOLES											
nº	COMPONENTE	M1		M2		M3		M4		M5	
		mg/l	C.V.								
7	1-Propanol	16.800	14.4	10.500	9.2	14.500	5.8	19.200	13.9	14.100	12.8
10	Isobutanol	72.400	3.3	68.900	2.6	78.700	2.6	60.000	3.0	87.600	6.0
13	1-Butanol	2.400	10.6	3.000	5.0	2.600	8.0	3.600	8.9	3.600	3.9
14	Alcohol isoamílico	247.000	3.6	220.000	2.2	253.000	2.1	209.000	5.4	235.000	3.4
16	Alcohol amílico	0.025	5.3	0.032	2.2	0.036	2.7	0.035	3.7	0.018	4.3
21	1-Hexanol	2.300	4.4	2.300	1.8	2.400	1.7	2.400	3.2	2.200	3.8
22	trans 3-Hexen-1-ol	0.032	3.6	0.036	2.8	0.035	1.3	0.034	3.1	0.039	3.8
23	cis 3-Hexen-1-ol	0.030	2.9	0.030	2.4	0.038	1.7	0.036	3.9	0.030	3.2
26	1-Heptanol	0.120	2.3	0.110	6.1	0.110	12.1	0.070	4.5	0.110	3.9
32	Linalool	0.006	8.0	0.005	9.2	0.005	7.2	0.008	6.2	0.011	6.6
33	1-Octanol	0.094	7.4	0.100	2.2	0.060	11.8	0.080	3.2	0.120	7.8
40	1-Metoxi-2-butanol	0.086	7.3	0.092	7.7	0.080	22.4	0.090	2.6	0.070	9.2
44	alfa-Terpineol	0.023	6.5	0.025	3.0	0.019	3.1	0.020	2.6	0.022	5.6
46	3-Metil-1-propanol	1.500	7.7	1.400	11.0	2.000	4.4	1.530	3.1	1.800	6.2
48	1-Decanol	0.040	7.1	0.050	5.1	0.055	18.5	0.060	3.0	0.070	6.6
52	Alcohol bencílico	0.030	8.1	0.028	5.6	0.027	1.2	0.029	4.3	0.026	5.0
55	2-Feniletanol	79.500	5.8	73.800	2.3	74.000	1.7	74.600	2.5	78.100	4.1

ÁCIDOS GRASOS											
nº	COMPONENTE	M1		M2		M3		M4		M5	
		mg/l	C.V.								
35	Acido isobutírico	0.061	9.2	0.067	1.9	0.052	4.1	0.058	4.0	0.040	3.1
42	Acido isovaleriánico	0.080	2.9	0.090	9.0	0.060	3.6	0.050	3.4	0.080	5.4
50	Acido hexanoico	0.270	6.1	0.270	4.5	0.240	2.4	0.270	2.6	0.240	3.9
57	Acido octanoico	0.070	9.4	0.066	1.9	0.077	8.8	0.057	4.7	0.071	3.4
59	Acido decanoico	0.024	6.4	0.028	7.2	0.031	10.9	0.023	21.6	0.027	14.7

Tabla 3.4.5 (cont.).- Concentración de los distintos componentes de la fracción volátil en el producto obtenido por fermentación de mosto estéril inducida con cultivos mixtos de levaduras.

ÉSTERES											
n°	COMPONENTE	M1		M2		M3		M4		M5	
		mg/l	C.V	mg/l	C.V	mg/l	C.V	mg/l	C.V	mg/l	C.V
4	Isobutirato de etilo	0.077	8.8	0.087	3.4	0.066	7.2	0.079	1.8	0.084	4.1
8	Butirato de etilo	0.013	9.8	0.008	2.6	0.005	3.5	0.005	1.2	0.005	9.8
9	Isovaleriato de etilo	0.010	7.6	0.010	3.3	0.009	4.2	0.010	1.8	0.012	3.6
15	Hexanoato de etilo	0.120	2.1	0.120	2.4	0.140	3.9	0.110	10.9	0.130	3.5
20	Lactato de etilo	2.500	4.9	2.000	2.3	2.500	3.9	2.100	3.1	2.400	4.3
25	Octanoato de etilo	0.500	8.0	0.460	5.6	0.500	3.4	0.490	4.9	0.480	4.9
31	3-Hidroxibutirato de etilo	0.400	5.7	0.300	4.5	0.200	4.9	0.300	4.0	0.470	3.1
41	Decanoato de etilo	0.450	6.2	0.400	2.7	0.430	5.9	0.440	3.7	0.450	4.9
43	Succinato de dietilo	0.850	9.4	0.810	4.0	0.900	1.5	0.840	2.6	0.810	4.2
45	9-Decenoato de etilo	1.200	4.5	1.200	6.4	1.250	6.9	1.100	11.9	1.300	3.6
51	Dodecanoato de etilo	0.190	2.0	0.160	3.1	0.210	1.8	0.170	3.2	0.180	8.5
5	Acetato de propilo	0.009	8.2	0.007	3.4	0.007	13.9	0.005	7.8	0.008	5.6
6	Acetato de isobutilo	0.450	3.8	0.400	13.0	0.340	7.3	0.400	7.2	0.460	4.1
11	Acetato de butilo	0.019	16.4	0.016	6.2	0.012	6.1	0.016	5.8	0.017	8.0
12	Acetato de isoamilo	19.000	3.7	16.400	6.8	21.800	2.7	14.000	3.1	18.800	3.6
18	Acetato de hexilo	0.490	4.3	0.480	6.9	0.490	10.0	0.480	5.7	0.490	6.2
49	Acetato de 2-fenetilo	0.253	12.8	0.151	2.6	0.150	10.7	0.170	6.9	0.270	4.5
17	Isobutirato de isoamilo	0.011	3.6	0.008	8.7	0.010	10.3	0.010	6.9	0.009	7.3
19	Isovaleriato de isoamilo	traz.		traz.		traz.		traz.		traz.	
27	Hexanoato de isoamilo	0.021	5.4	0.013	6.2	0.018	1.8	0.016	8.1	0.015	3.2
29	Octanoato de isoamilo	0.050	4.1	0.040	2.4	0.045	3.1	0.045	6.8	0.055	8.3
54	Decanoato de isoamilo	0.017	4.7	0.007	8.9	0.019	3.9	traz.		0.018	7.4
53	Isobutirato de 2-fenetilo	0.007	2.1	traz.		0.007	3.3	traz.		traz.	

Tabla 3.4.5 (cont.)- Concentración de los distintos componentes de la fracción volátil en el producto obtenido por fermentación de mosto estéril inducida con cultivos mixtos de levaduras.

DIOLES

n°	COMPONENTE	M1		M2		M3		M4		M5	
		mg/l	C.V.								
34	2,3-Butanodiol(treo)	407.000	7.4	420.000	1.8	426.000	2.0	445.000	2.9	500.000	3.1
37	1.2-Propanodiol	28.500	7.0	27.000	27.1	17.100	1.9	21.600	2.9	25.000	5.7

OTROS

n°	COMPONENTE	M1		M2		M3		M4		M5	
		mg/l	C.V.								
28	2,4-Dimetil-3-pentanona	0.008	2.7	traz.		0.007	4.8	traz.		traz.	
30	Benzaldehido	0.090	10.1	0.095	5.4	0.100	9.4	0.097	2.7	0.098	11.3
38	gamma-Butirolactona	2.300	4.7	1.950	5.7	3.200	2.4	1.700	3.4	2.900	6.0
56	beta-Ionona	0.120	6.9	0.110	6.9	0.101	3.4	0.103	2.4	0.113	7.5

C.V. = Coeficiente de variación

traz. = trazas

Tabla 3.4.6.- Concentración de los principales grupos de componentes de la fracción volátil en el producto obtenido por fermentación de mosto estéril inducida con cultivos mixtos de levaduras.

		M1		M2		M3		M4		M5	
		mg/l	%								
Fracción volátil		887.546		853.331		900.627		857.536		977.948	
Componentes constantes		3.001	0.34	2.999	0.35	3.214	0.36	3.104	0.36	2.916	0.30
Alcoholes superiores	Mayoritarios	415.700	46.84	373.320	43.75	420.200	46.66	362.800	42.31	414.800	42.42
	Minoritarios	0.365	0.04	0.384	0.05	0.341	0.04	0.335	0.04	0.388	0.04
	Totales	419.965	47.32	377.104	44.19	425.141	47.21	368.265	42.95	420.588	43.01
Ácidos orgánicos		0.505	0.06	0.521	0.06	0.460	0.05	0.458	0.05	0.458	0.05
Ésteres	Etilicos	6.310	0.71	6.605	0.77	6.210	0.61	5.644	0.66	6.321	0.65
	Acetatos*	0.731	0.08	0.574	0.07	0.509	0.06	0.591	0.07	0.755	0.08
	Acetato de isoamilo	19.000	2.14	16.400	1.92	21.800	2.42	14.000	1.63	18.800	1.92
	Ésteres de isoamilo*	0.099	0.01	0.068	0.01	0.092	0.01	0.071	0.01	0.097	0.01
	Totales	26.147	2.95	23.647	2.77	28.619	3.18	17.306	2.02	25.973	2.66

* = menos acetato de isoamilo

otra, son muy similares entre sí, debido a que ambos pares de muestras poseen el mismo tipo de *Saccharomyces cerevisiae* mayoritario.

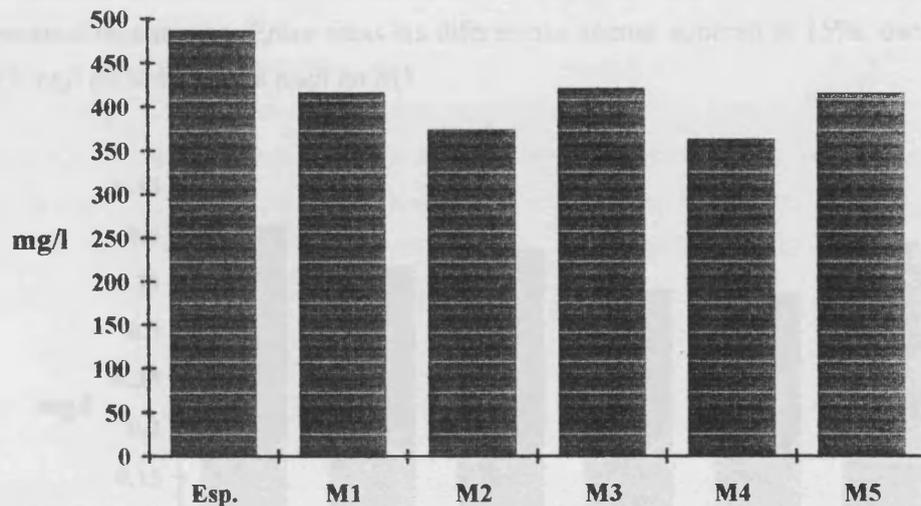


Figura 3.4.11.- Concentraciones totales de los alcoholes superiores mayoritarios en la fermentación espontánea y en las fermentaciones con cultivos mixtos de levaduras.

Para el 1-propanol las cantidades mayores se obtienen en la muestra M4, aunque las diferencias que presenta con M1 no son significativas. En M3 y M5 se produjeron cantidades similares, mientras que la muestra M2 fue la menor cantidad de este alcohol produjo. El isobutanol se obtiene en sus concentraciones más elevadas en la muestra M5 mientras que la menor productora fue M4; en el resto de las muestras se obtienen cantidades similares. Para el alcohol isoamílico las concentraciones mayores se obtienen en la muestra en la que el inóculo presenta cantidades mayores de la cepa T73 de *Saccharomyces bayanus*, mientras que aquellas en que incluye la cepa L2226 son las que menores concentraciones presentan, aunque, al igual que ocurre en las muestras en las que el inóculo incluye a la cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae*, es mayor en las muestras en las que la población inicial presenta mayoría de levaduras de bajo poder fermentativo. Por último, las diferencias en la producción de 2-feniletanol no son tan acusadas como en el resto de los alcoholes superiores mayoritarios, pero las muestras que presentan mayores cantidades son aquellas en las que la levadura de alto poder fermentativo mayoritaria es la cepa autóctona de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.4.2.3.1.2.- Alcoholes superiores minoritarios.

En la Figura 3.4.12 se muestran las concentraciones totales de los alcoholes superiores minoritarios obtenidos en la fermentación espontánea del mosto y en cada una de las fermentaciones mixtas. Entre éstas las diferencias apenas superan el 15%, oscilando entre 0.335 mg/l en M4 y 0.388 mg/l en M5.

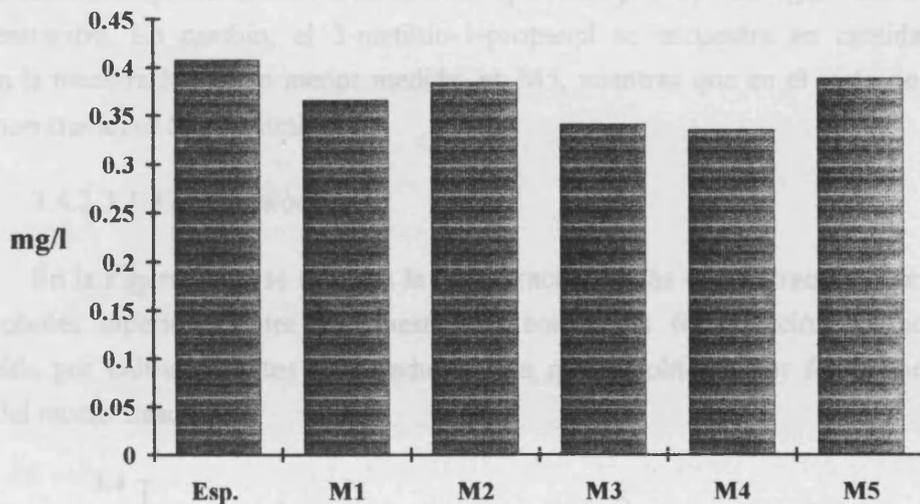


Figura 3.4.12.- Concentraciones totales de los alcoholes superiores minoritarios en la fermentación espontánea y en las fermentaciones con cultivos mixtos de levaduras.

Así, el alcohol amílico muestra concentraciones más elevadas en las muestras M2, M3 y M4, aquellas en las que los inóculos no poseen la cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae*. Para el 1-heptanol se obtienen cantidades similares en todas las muestras, excepto en M4. En el caso del 1-octanol la situación es más compleja: las cantidades mayor y menor se obtienen en M5 y M3 respectivamente, siendo la primera el doble de la segunda. En M1 y M2 se obtienen cantidades similares y algo superiores a la presente en M4. La similitud de resultados en M1 y M2 puede ser debida a la presencia de la flora apiculada en porcentajes elevados al inicio del proceso, mientras que las cantidades mayores se obtienen en las muestras con elevados porcentajes iniciales de *Saccharomyces cerevisiae*. Para el 1-metoxi-2-butanol las diferencias no son muy acusadas, aunque las cantidades mayores se obtienen en M5. Por último, el 1-decanol se obtuvo en cantidades

más elevadas en las muestras en las que añadieron porcentajes iniciales elevados de levaduras del género *Saccharomyces*.

3.4.2.3.1.3.- Otros alcoholes superiores.

El 1-butanol se produce en mayores cantidades en las muestras inoculadas con porcentajes elevados de *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que la presencia de la cepa T73 de *Saccharomyces bayanus* o de la flora apiculada provoca un ligero descenso en su concentración. En cambio, el 3-metil-1-propanol se encuentra en cantidades superiores en la muestra M3 y, en menor medida, en M5, mientras que en el resto de los casos las concentraciones fueron similares.

3.4.2.3.1.4.- Discusión.

En la Figura 3.4.5 se muestra la comparación de las concentraciones de los distintos alcoholes superiores entre las muestras obtenidas por fermentación de mosto estéril inducida por cultivos mixtos de levaduras y la que se obtiene por fermentación espontánea del mosto fresco.

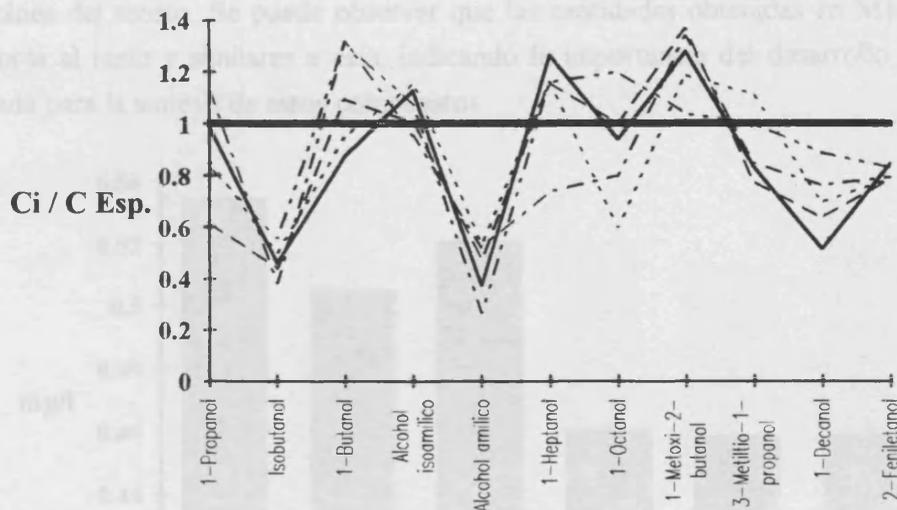


Figura 3.4.5.- Concentraciones relativas de los alcoholes superiores producidas en la fermentación de mosto estéril inducidas por cultivos mixtos de levaduras respecto a la fermentación espontánea (— fermentación espontánea; --- M1, --- M2; M3; -.-.- M4; -.-.- M5).

En conjunto las cantidades totales de los alcoholes superiores mayoritarios y minoritarios son inferiores a las que se obtienen por fermentación espontánea del mosto,

pero este hecho es debido a las cantidades de isobutanol, 2-feniletanol, alcohol amílico y 1-decanol, ya que para el resto de alcoholes superiores estudiados las cantidades obtenidas mediante los cultivos mixtos de levaduras son similares o incluso superiores, destacando los casos del 1-butanol, 1-metoxi-2-butanol y 1-heptanol.

Cabe destacar que en todos los casos se obtienen cantidades elevadas de alcoholes superiores, aunque se ha conseguido rebajar 67-123 mg/l respecto a la fermentación espontánea. Ahora bien, en ningún caso el descenso puede ser achacado únicamente a los distintos cultivos mixtos empleados, ya que la filtración del mosto puede haber alterado en parte su composición inicial por adsorción o retención de componentes en las membranas. Sin embargo, sí que parece claro que los cultivos M2 y M4 producen una menor cantidad de alcoholes superiores, mientras que la M3 aporta al medio una cantidad superior de este tipo de componentes.

3.4.2.3.2.- Ácidos grasos.

En la Figura 3.4.13 se muestra la concentración total de ácidos grasos producidos en cada una de las fermentaciones ensayadas, así como en la fermentación espontánea del mosto. Se puede observar que las cantidades obtenidas en M1 y M2 son superiores al resto y similares a ésta, indicando la importancia del desarrollo de la flora apiculada para la síntesis de estos compuestos.

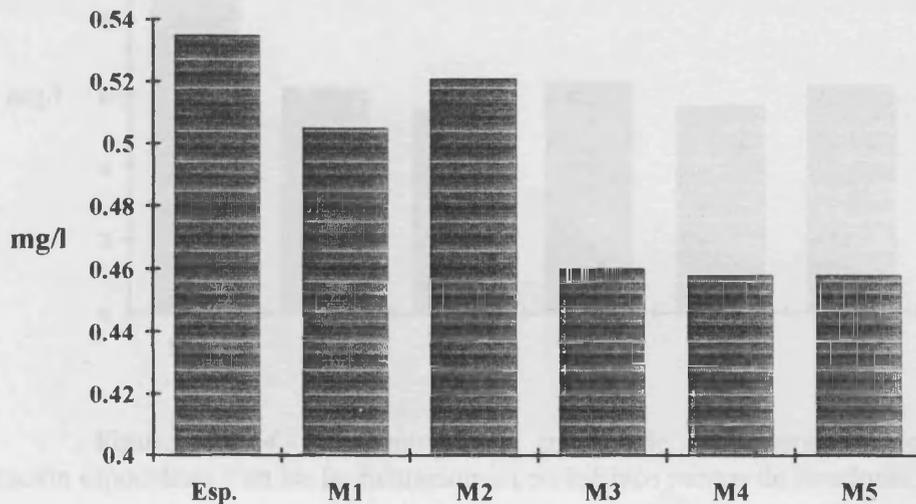


Figura 3.4.13.- Concentraciones totales de los ácidos grasos en la fermentación espontánea y en las fermentaciones con cultivos mixtos de levaduras.

Así en el ácido isobutírico ya se observa este hecho, aunque la cantidad obtenida en M1 es similar a la que se presenta en M4. El ácido isovaleriánico también muestra las concentraciones más elevadas en M1 y M2, aunque las concentraciones en M1 y M5, ambas inoculadas con la cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae*, son similares. Para el resto de los ácidos orgánicos estudiados no son significativas las diferencias entre las muestras.

3.4.2.3.3.-Ésteres.

3.4.2.3.3.1.- Ésteres etílicos.

La Figura 3.4.14 muestra la producción global de ésteres etílicos por parte de las distintas fermentaciones mixtas ensayadas y por la fermentación espontánea del mosto. Como se puede observar, aunque todas las muestras presentan cantidades inferiores a la última, las concentraciones mayores se obtienen en M3, mientras que M1 y M5 (inoculadas con la cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae*) muestran cantidades similares y las menores están presentes en las muestras M2 y M4 (inoculadas con la cepa L2226 de *Saccharomyces cerevisiae*).

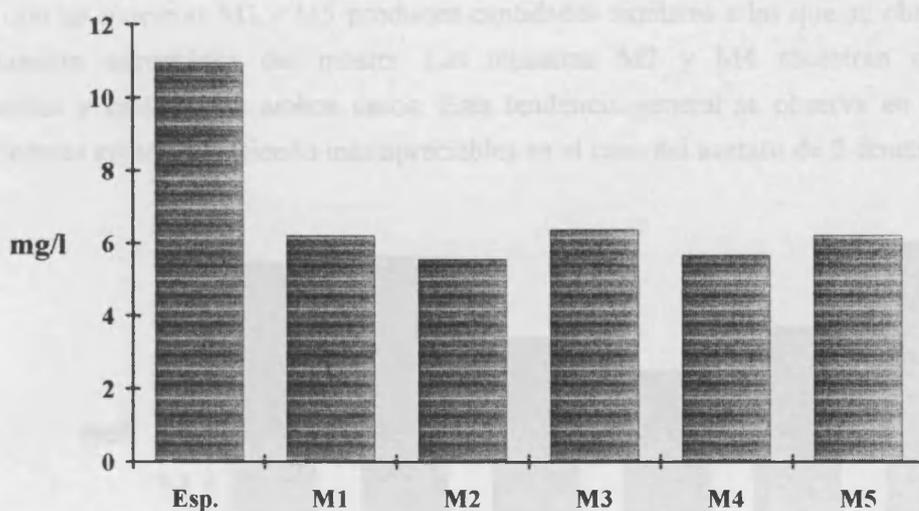


Figura 3.4.14.- Concentraciones totales de los ésteres etílicos en la fermentación espontánea y en las fermentaciones con cultivos mixtos de levaduras.

Del conjunto de los ésteres etílicos estudiados no se observan grandes diferencias en las concentraciones de isovalerato de etilo, hexanoato de etilo, lactato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, succinato de dietilo, 9-decenoato de etilo y

dodecanoato de etilo entre las distintas fermentaciones mixtas ensayadas. Como se observa, no va a haber grandes diferencias entre los cultivos mixtos empleados respecto a la formación de ésteres etílicos de alto peso molecular, siendo similar a la que se obtiene por fermentación espontánea de los vinos. El isobutirato de etilo se produjo en mayores cantidades en las muestras inoculadas con porcentajes elevados de levaduras apiculadas y en M5, mientras que el butirato de etilo, aunque en bajas concentraciones, presenta cantidades mayores en M1. Por su parte, el 3-hidroxibutirato de etilo se produce en cantidades superiores en las muestras en que está presente la cepa salvaje, mientras que la menor se obtiene en M3.

3.4.2.3.3.2.- Acetatos.

En la figura 3.4.15 se muestran las cantidades totales de acetatos sin tener en cuenta el acetato de isoamilo, ya que representa más del 99% de la cantidad total de acetatos. Así, mientras que la muestra M3 es la que mayor concentración de acetato de isoamilo presenta, es la que menor cantidad del resto de acetatos produce; para el resto de acetatos, las concentraciones mayores se obtienen en las muestras en las que la cepa de alto poder fermentativo mayoritaria es la cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae*, de modo que las muestras M1 y M5 producen cantidades similares a las que se obtienen por fermentación espontánea del mosto. Las muestras M2 y M4 muestran cantidades intermedias y similares en ambos casos. Esta tendencia general se observa en todos los componentes estudiados, siendo más apreciables en el caso del acetato de 2-fenetilo.

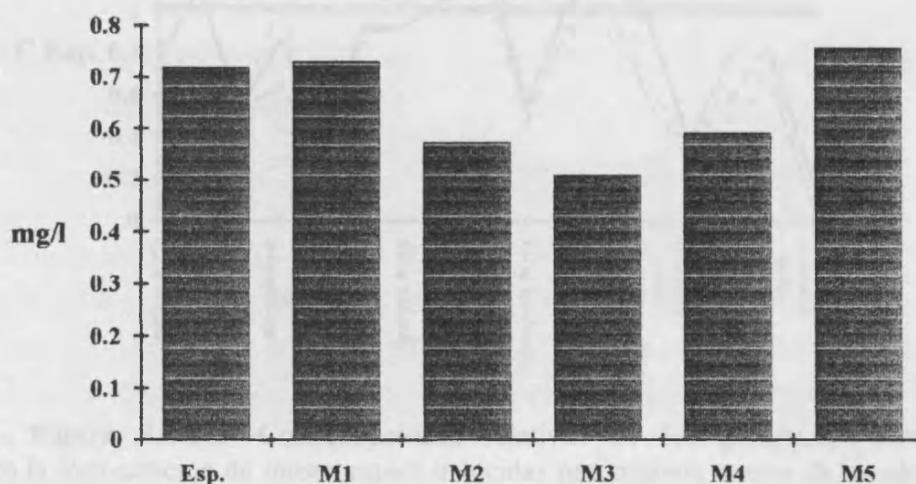


Figura 3.4.15.- Concentraciones totales de los acetatos (excepto acetato de isoamilo) en la fermentación espontánea y en las fermentaciones con cultivos mixtos de levaduras.

3.4.2.3.3.3.- Ésteres de isoamilo.

Del resto de ésteres, sólo se obtuvieron concentraciones significativas de hexanoato, octanoato y decaonato de isoamilo. La concentración de hexanoato de isoamilo osciló entre los 0.013 y 0.021 mg/l producidos en M2 y M1 respectivamente. Las concentraciones producidas en M3, M4 y M5 fueron bastante similares entre sí. El octanoato de isoamilo se obtuvo en concentraciones siempre superiores a las del éster anterior. M3 y M5 lo produjeron en concentraciones significativamente iguales (0.09-0.10 mg/l) y M1, M2 y M4 entre 0.045 y 0.06 mg/l, lo que supone un estrecho margen de concentraciones. Las cantidades halladas de decaonato de isoamilo fueron del mismo orden en M1, M3 y M5 (0.017-0.019 mg/l) y bastante más bajas en M2 y M4, siendo estas las fermentaciones con presencia de la cepa L2226 como levadura de alto poder fermentativo mayoritaria.

3.4.2.3.3.4.- Discusión.

En la Figura 3.4.16 se muestra la producción comparada de los ésteres más importantes de las distintas fermentaciones mixtas respecto a la fermentación espontánea del mosto.

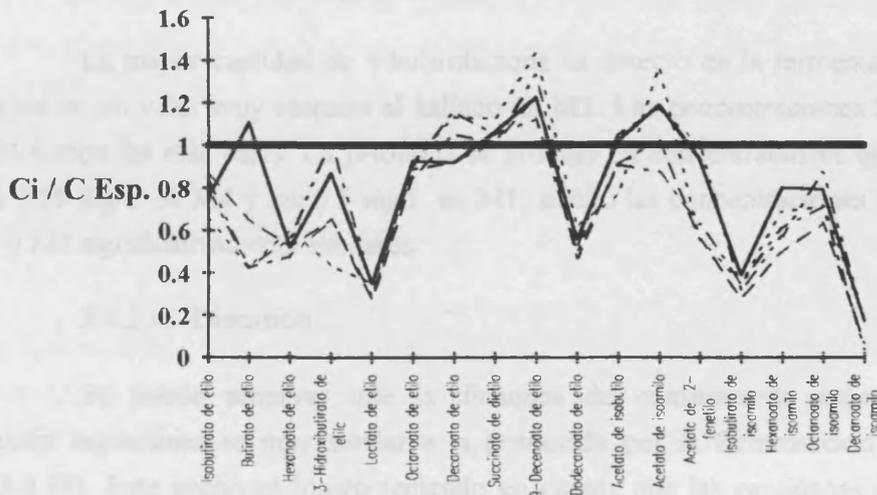


Figura 3.4.16.- Concentraciones relativas de los principales ésteres producidas en la fermentación de mosto estéril inducidas por cultivos mixtos de levaduras respecto a la fermentación espontánea (— fermentación espontánea; — M1, - - M2; - - - M3; - - - - M4; - - - - - M5).

Del conjunto de los ésteres etílicos considerados, sólo el 3-hidroxibutirato de etilo, decanoato de etilo, succinato de dietilo, 9-decenoato de etilo muestran niveles similares o superiores a los obtenidos en la fermentación espontánea. Entre ellos destaca el caso del lactato de etilo, para el que la cantidad obtenida por fermentación espontánea es tres veces superior a la presente en cualquiera de las fermentaciones mixtas ensayadas. En el caso de los acetatos se observa que el tipo de flora de alto poder fermentativo que se desarrolle va a ser de importancia crucial para la síntesis de estos compuestos. Así, las mezclas M1 y M5 presentan concentraciones similares o superiores a las presentes en las muestras obtenidas por fermentación espontánea; la muestra M3 produce cantidades superiores de acetato de isoamilo y las muestras M2 y M4 cantidades inferiores para todos los compuestos estudiados.

3.4.2.3.4.- Glicoles.

Tanto para el 2,3-butanodiol como para el 1,2-propanodiol se obtienen cantidades similares en todas las muestras ensayadas, siendo en el primer caso inferiores a las que se obtienen por fermentación espontánea del mosto, mientras que en el segundo son similares.

3.4.2.3.5.- Otros compuestos.

La mayor cantidad de γ -butirolactona se detectó en la fermentación mixta M3, aunque en un valor muy cercano al hallado en M5. Las concentraciones halladas en M2 y M4 fueron las más bajas. La β -ionona se produjo en concentraciones que variaron entre los 0.36 mg/L en M4 y los 0.5 mg/l en M1, siendo las concentraciones halladas en M2, M3 y M5 significativamente similares.

3.4.2.4.- Discusión.

Se puede observar que la dinámica de consumo de azúcares de la fermentación espontánea es muy similar a la producida por la fermentación mixta M1 (Figura 3.4.10). Este hecho es lógico teniendo en cuenta que las cantidades iniciales de levaduras de M1 son las que habitualmente se encuentran en los mostos naturales. En M2 las cantidades son las mismas, pero no se produjo una dinámica de fermentación similar a la espontánea debido a que contaba con una cepa foránea, la L2226, presentando la problemática de adaptación previamente descrita.

La diferencia fundamental que separa a la fermentación espontánea y M1 del resto de fermentaciones es la rapidez de comienzo. M1 es la única que no presenta periodo de latencia y tiene un rápido comienzo, el resto de fermentaciones mixtas presentaron un periodo de latencia más o menos acusado. Si observamos las dinámicas poblacionales de todas ellas vemos como en M1 el crecimiento de todas las especies levaduriformes es más rápido que en el resto.

La similitud de los resultados obtenidos en la fermentación espontánea del mosto y los que proporcionan los mostos inoculados con la muestra M1, así como la más o menos amplia divergencia mostrada por el resto de cultivos mixtos ensayados nos lleva a proponer la conveniencia de, en los casos en que sea necesario y para mostos como el empleado en el presente trabajo, efectuar inoculaciones con cultivos mixtos de levaduras autóctonas y no, como viene siendo habitual, añadir indiscriminadamente levaduras secas activas seleccionadas, ya que, además de presentar una fase de latencia al inicio de la fermentación, justamente cuando las condiciones del mosto no impiden el crecimiento de flora microbiana no deseable, muestran un menor desarrollo de la flora levaduriforme y, consecuentemente, un consumo más lento de los azúcares del mosto.

En cuanto a la fracción volátil se observa que, aunque siempre inferiores a la fermentación espontánea, los valores superiores se obtienen en las muestras M1, M3 y M5, es decir, aquellas en las que no interviene la cepa L2226, probablemente debido a su dificultad de adaptación a este tipo de mostos. De igual modo, esta puede ser la explicación de la similitud de los distintos indicadores que se obtenían entre la fermentación espontánea del mosto y las fermentaciones de mosto fresco inoculado con la cepa L2226 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Un comportamiento semejante se observa en cuanto al contenido en ésteres totales y ésteres etílicos de más de 6 átomos de carbono. En la Tabla 3.4.7 se muestran las relaciones A/C y B/C para cada cultivo mixto y para la fermentación espontánea. Para la relación A/C se obtiene los índices mayores para M3 y los menores para M4, básicamente influido por el contenido en acetato de isoamilo; para el resto de muestras se obtienen cantidades similares. En cambio, para la relación B/C las cantidades mayores se obtienen en las muestras que contienen la cepa L2226, pero hay que tener en cuenta que estas muestras son las que presentan un menor contenido en productos volátiles lo cual, unido a las dificultades de adaptación que presenta, no la hace muy apropiada para emplear como inóculo para este tipo de mostos. Para el resto de muestras se obtienen valores similares y superiores a los que se presentan por fermentación espontánea, lo cual, unido a las

cinéticas de fermentación y producción de alcoholes superiores, hace que sean más apropiados los cultivos mixtos M1 (muy similar a las condiciones microbiológicas iniciales del mosto) y M5 (formado únicamente por levaduras aisladas a partir del mosto objeto de estudio), aunque con el M3 se consigue una mejora apreciable para la mayoría de los indicadores empleados.

	Espontánea	M1	M2	M3	M4	M5
A/C	0.058	0.062	0.063	0.067	0.048	0.062
B/C	5.02E-3	5.86E-3	6.21E-3	5.95E-3	6.27E-3	6.04E-3

Tabla 3.4.7.- Relación entre el contenido en ésteres totales (A) y ésteres etílicos de alto peso molecular (B) respecto al de alcoholes superiores (C) para las fermentaciones de mosto estéril inducidas con cultivos mixtos de levaduras y la fermentación espontánea.

3.4.3.- Discusión.

Las fermentaciones inducidas con cultivos puros de las levaduras dejaron en general una mayor cantidad de azúcares residuales que las fermentaciones inducidas con cultivos mixtos. Únicamente la fermentación mixta M3 dejó una cantidad de azúcares residuales del orden del dejado en las fermentaciones en pureza. Este hecho se puede explicar si tenemos en cuenta que en dicha fermentación la cepa T73 se encuentra fermentando en pureza desde el cuarto día, por tanto puede darse un comportamiento similar al de la muestra fermentada exclusivamente por la citada cepa.

Esta mayor capacidad de consumo de azúcares por las fermentaciones inducidas con cultivos mixtos de levaduras de alto y bajo poder fermentativo puede deberse al desarrollo inicial de la flora apiculada que se produce en todos los casos, aunque se encuentren en minoría inicial. Esta flora comenzaría la fermentación y facilitarían un más rápido desarrollo de la flora de alto poder fermentativo.

En cuanto a la fracción volátil, en primer lugar, hay que hacer notar que en las experiencias realizadas con mosto estéril se han detectado un menor número de componentes que en las experiencias con mosto fresco; esto puede ser debido a que para la mayoría de los compuestos se obtiene concentraciones inferiores, lo que puede originar

que algunos componentes se encuentren presentes en cantidades muy pequeñas y no den lugar a una señal diferenciable del ruido de fondo del detector.

El hecho de tener concentraciones inferiores en las experiencias con mosto estéril nos indica que en el proceso de filtración realizado para eliminar la población microbiana del mosto hemos perdido parte de los componentes del mosto, probablemente retenidos por los filtros, hecho que afecta, más que al transcurso en sí de la fermentación, a la producción de metabolitos secundarios, dentro de los cuales se incluyen los componentes de la fracción volátil del vino.

No obstante, comparando todas las muestras obtenidas por fermentación inducida de mosto estéril, se observa que para casi todos los componentes (excepto para el alcohol amílico) se encuentran concentraciones superiores en las muestras inoculadas con cultivos mixtos de levaduras, indicando que la presencia de la flora apiculada al inicio de la fermentación favorece, de alguna manera, la síntesis de estas sustancias aunque estas levaduras, por sí solas, forman cantidades mucho menores que las levaduras de alto poder fermentativo.

En la Figura 3.4.17 se muestra el resultado del análisis de agrupamiento de los datos obtenidos con la fermentación inducida de mosto estéril, tanto con cultivos puros como con cultivos mixtos, y de los obtenidos por fermentación espontánea del mosto. Como se puede observar, destaca el hecho de que las muestras obtenidas por inoculación de levaduras de bajo poder fermentativo se agrupan muy cerca entre sí y a gran distancia del resto de las muestras. Para el resto de muestras se pueden hacer tres grupos; en uno de ellos se incluirían las muestras obtenidas por inoculación de mosto estéril con cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, en otro aquellas a las que se añaden cultivos mixtos que incluyen como cepa de alto poder fermentativo mayoritaria a la cepa autóctona de *Saccharomyces cerevisiae*, y en el último estarían agrupadas las muestras M2, M3 y M4, junto con el inóculo que contiene solo la cepa T73 de *Saccharomyces bayanus*. Estos resultados nos indican la importancia, más que de la cepa empleada, de la especie con que se realice la fermentación, indicando, además, que van a ser las levaduras de alto poder fermentativo las que formen mayoritariamente los compuestos volátiles que van a estar presentes en el producto final.

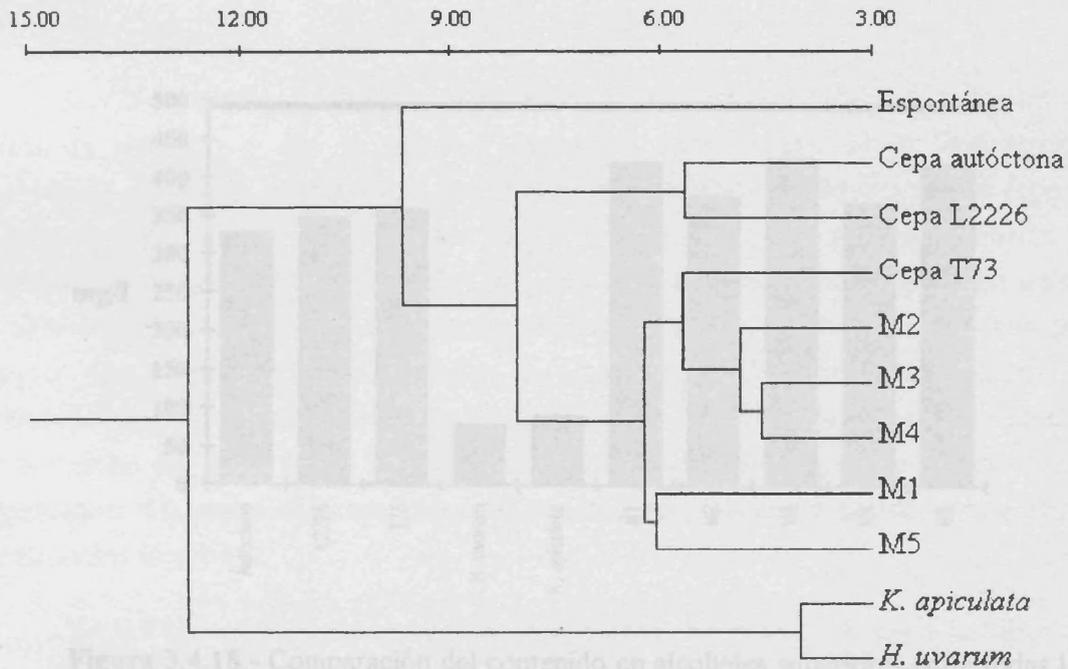


Figura 3.4.15.- Comparación del contenido en alcoholes superiores en las experiencias realizadas con mosto estéril y la fermentación espontánea.

Figura 3.4.17.- Análisis de agrupamiento de las muestras obtenidas por fermentación inducida de mosto estéril y por fermentación espontánea del mosto.

No obstante, cabe destacar que el agrupamiento con la muestra obtenida por fermentación espontánea del mosto no es en ningún caso próxima, aunque sí que se encuentra a más distancia de las muestras obtenidas por inoculación de las levaduras de bajo poder fermentativo. Ahora bien, esta amplia divergencia no puede ser atribuible en su totalidad a las levaduras empleadas ya que, como hemos visto, la esterilización del mosto por filtración parece haber alterado la composición del mosto.

Si observamos la formación total de alcoholes superiores (Figura 3.4.18). Se observa que la formación de alcoholes superiores en las muestras obtenidas con el empleo de cultivos mixtos es superior, correspondiendo, aproximadamente a la suma de las contribuciones de cada una de las levaduras que se van a desarrollar, y siempre inferiores a las que se obtienen por fermentación espontánea del mosto, con lo cual parece que hemos encontrado una forma de minimizar la problemática que en este sentido planteaba la fermentación tradicional de los mostos empleados.

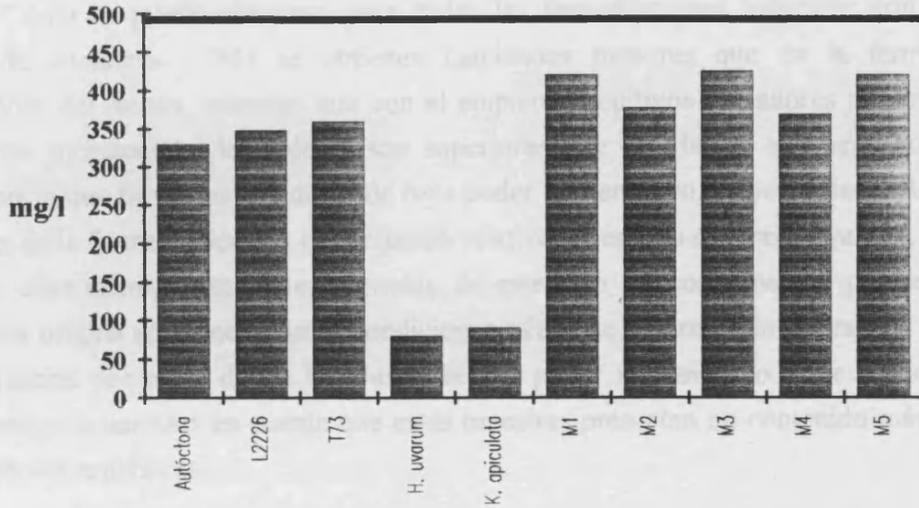


Figura 3.4.18.- Comparación del contenido en alcoholes superiores entre todas las experiencias realizadas con mosto estéril y la fermentación espontánea.

En la Figura 3.4.19 se observa la comparación del índice A/C entre todas las experiencias realizadas con mosto estéril y la fermentación espontánea.

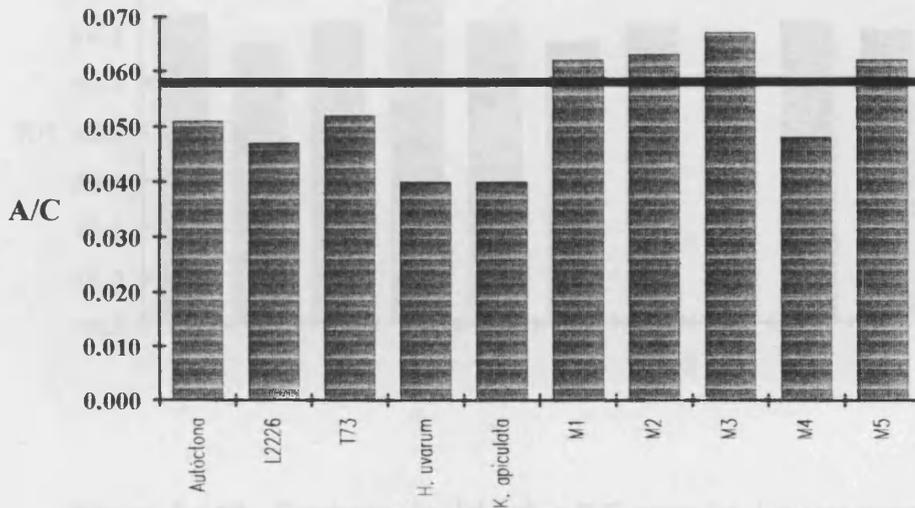


Tabla 3.4.19.- Comparación del índice A/C entre todas las experiencias realizadas con mosto estéril (barra) y la fermentación espontánea (línea).

Como se puede observar, para todas las fermentaciones inducidas con cultivos puros de levaduras y M4 se obtienen cantidades menores que en la fermentación espontánea del mosto, mientras que con el empleo de cultivos iniciadores mixtos (con la excepción mencionada) los valores son superiores. De este hecho se puede concluir la importancia que tienen las levaduras de bajo poder fermentativo, mayoritarias en las etapas iniciales de la fermentación, en el contenido relativo de ésteres del mosto ya que, más que aportar ellas mismas cantidades elevadas de este tipo de componentes, parece que su presencia origina en el medio unas condiciones tales que favorecen la síntesis de este tipo de sustancias por parte de las levaduras de alto poder fermentativo. Este hecho es más significativo si tenemos en cuenta que estas muestras presentan un contenido más elevado de alcoholes superiores.

En la Figura 3.4.20 observamos la comparación del índice B/C entre las distintas muestras obtenidas por fermentación de mosto estéril y por fermentación espontánea.

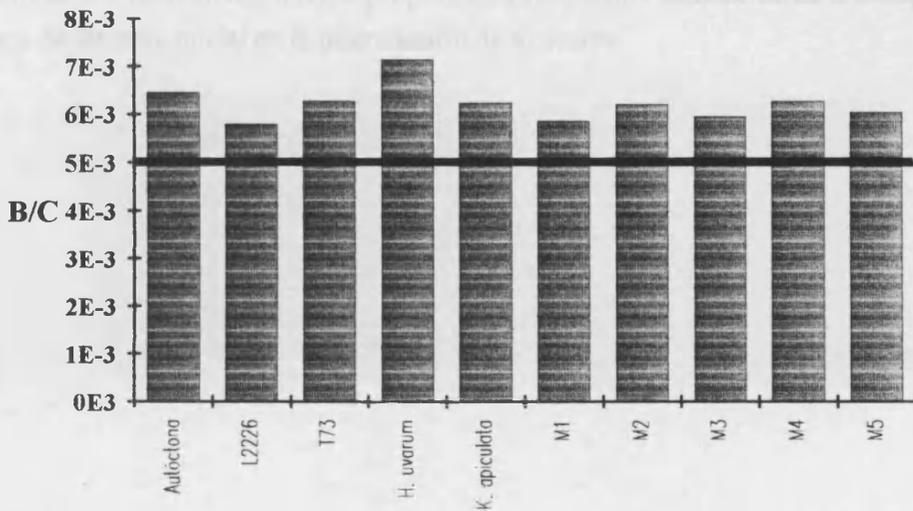


Figura 3.4.20.- Comparación del índice B/C entre las distintas muestras obtenidas por fermentación de mosto estéril y por fermentación espontánea.

Como se ve, no existen grandes diferencias entre las distintas muestras obtenidas, aunque destaca aquella inoculada con un cultivo puro de *Hanseniaspora uvarum*. No obstante, en todos los casos se obtienen valores superiores a los que presentan las muestras obtenidas por fermentación espontánea, por lo que cabe concluir que por fermentación inducida de mosto estéril se van a obtener vinos que presentarán unos rasgos afrutados superiores a aquellos que se obtienen de un modo tradicional.

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que por fermentación inducida de mosto estéril se van a obtener vinos con un menor contenido en alcoholes superiores y un carácter afrutado más marcado que por fermentación espontánea de mostos de la variedad Monastrell de la D.O Jumilla. Aunque con un aporte de los diversos componentes muy reducido, las levaduras de bajo poder fermentativo juegan un importante papel a la hora de potenciar la síntesis de ésteres, por lo que el empleo de cultivos mixtos es más apropiado que la fermentación en pureza con una sola especie de levadura. De entre las levaduras empleadas, los resultados más satisfactorios se obtienen con el empleo de cultivos mixtos formados con levaduras autóctonas que, por selección natural, serán las más adaptadas a las condiciones que presenta el mosto. No obstante, el empleo de la levadura seleccionada T73 (*Saccharomyces bayanus*), aislada de una región próxima, en la composición de cultivos mixtos proporciona resultados satisfactorios a excepción de una etapa de latencia inicial en la degradación de azúcares.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- La adición de levaduras foráneas seleccionadas al mosto, bien por inoculación del mosto fresco, bien por formar parte mayoritaria del inóculo empleado en mostos estériles, provoca una fase de latencia inicial en la degradación de los azúcares del medio. En todos los casos, la cantidad de azúcares residuales al final de la fermentación es muy elevada, como corresponde a mostos con un contenido tan elevado de estas sustancias al inicio del proceso, destacando el caso de mostos frescos inoculados con levadura de panadería.

2.- Los alcoholes C₆, acetato de hexilo, terpenos, alcohol bencílico y benzaldehído se encuentran presentes en el mosto fresco y muestran concentraciones prácticamente constantes a lo largo del tiempo durante la fermentación; 4,5-dimetil-2-pentadecil-1,3-dioxolano y ácido hexanoico, aunque sufren significativos incrementos de su concentración a lo largo de la fermentación, ya se encuentran presentes en cantidades apreciables en el mosto, por lo que también pueden ser considerados como integrantes de la fracción volátil de mostos de la cv Monastrell.

3.- El estudio del contenido final de azúcares reductores, el contenido en alcoholes superiores y la importancia, frente a éstos, de los ésteres totales y ésteres etílicos de alto peso molecular se pueden emplear como índices que nos permitan discriminar entre las diferentes muestras.

4.- Por fermentación espontánea del mosto se obtienen productos que muestran un contenido más elevado de acetato de etilo, lactato de etilo y acetato de 2-fenetilo. En cambio, las cantidades de ácido hexanoico y las de ácido octanoico, excepto para las muestras inoculadas con la levadura de panadería, son independientes del hecho de realizar el aporte de levaduras seleccionadas.

4.- La inoculación de mostos frescos con levaduras seleccionadas provoca un incremento en la concentración global de alcoholes superiores del producto final respecto a la fermentación espontánea, siendo muy acusado para el 1-propanol y el alcohol amílico. Este aumento es tanto mayor cuanto más elevado es el inóculo efectuado y más acusado cuando se emplean las cepas V y de panadería de *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, alcoholes como isobutanol y 3-metil-1-propanol escapan a esta observación, obteniéndose las cantidades mayores por fermentación espontánea del mosto.

5.- Por la inoculación de mostos frescos se obtienen productos con una menor carga de ésteres etílicos de elevado peso molecular, hechos tanto más evidentes cuanto más elevado es el inóculo empleado.

6.- La similitud de resultados obtenidos entre la fermentación espontánea del mosto y las muestras de mosto fresco inoculadas con la cepa L2226 de *Saccharomyces cerevisiae* es debida a la dificultad que ésta presenta para desarrollarse en este tipo de mostos. De igual modo, parece aconsejable el empleo de la cepa V de *Saccharomyces cerevisiae* dado el elevado contenido en alcoholes superiores que presenta el producto final. Este hecho, además del elevado contenido final de azúcar son las características desfavorables que presentan las muestras de mosto fresco inoculadas con la levadura de panadería.

7.- Las experiencias realizadas con mosto estéril conducen a la obtención de productos con un contenido más bajo de alcoholes superiores y mayor importancia relativa de los ésteres etílicos de alto peso molecular. El proceso de filtración provoca cambios en la composición inicial del mosto, pudiendo justificar este hecho las diferencias encontradas.

8.- La formación de la fracción volátil a lo largo de la fermentación va a estar determinada principalmente por la naturaleza de los integrantes de la población levaduriforme que se va a desarrollar en el mosto y no por la concentración en que se hallan presente cada uno de sus integrantes.

9.- El empleo de cultivos iniciadores mixtos proporciona resultados más favorables que las fermentaciones realizadas en pureza por una sola especie de levadura. Así, el desarrollo de la flora apiculada, además de significar un menor contenido final en azúcares, provoca una mayor carga relativa de ésteres en el vino; como estas levaduras son incapaces de justificar por sí mismas este incremento, cabe pensar que su proliferación en las etapas iniciales de la fermentación va a crear las condiciones adecuadas para la síntesis de estos componentes

10.- El empleo de cultivos iniciadores mixtos formados por levaduras autóctonas conduce a la obtención de productos en los que se obtienen los índices más favorables; no obstante, el empleo de la cepa T73 de *Saccharomyces bayanus* (aisladas de una región próxima a la D.O.Jumilla) también conduce a la obtención de resultados satisfactorios. Este hecho nos lleva a concluir que parece conveniente fomentar el estudio de las microflora autóctonas de cada región vitivinícola con vistas a obtener inóculos que permitan al enólogo superar con éxito los problemas que se presentan en las diferentes

campañas sin que ello conlleve una alteración drástica de las características propias de los vinos de cada región.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

ALBAGNAC, G. (1975) La decarboxilation des acides cinnamiques substitues par les levures. Ann.Technol.Agric. 24, 133-137.

ALVAREZ, M.A.; GARCÍA, E (1984) Componentes aromáticos de la fermentación alcohólica del Jerez. Microbiol.Españ. 37, 39-45.

AMERINE, M.A.; BERG, H.W.; CRUSSES, W.V. (1972) The technology of winemaking. AVI Publishing, Westport, Conn.

ÄYRÄPÄÄ, T. (1971) On the formation of higher alcohols by yeasts and its dependence on nitrogenous nutrients. Kem.Tidskr. 83, 79-90.

ÄYRÄPÄÄ, T. (1973) In "Proceedings of the third international spacialized symposium on yeast" (H. Suomalainen and Ch. Waller, Eds.), part II. Otaniemi/Helsinki.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W., YARROW, D. (1983) Yeasts: characteristics and identification. Cambridge University Press, New York

BARWALD, G.; KLEIM, D. (1971) Ein beitrage zum methioninstoffwechsel der hefe (*Saccharomyces cerevisiae*). Chem.Mikrobiol.Technol.Lebensm. 1, 27-33.

BAUMES, R.; CORDONNIER, R.; NITZ, S.; DRAWERT, F. (1986) Identification and determination of volatile constituents in wines from different vine cultivar. J.Sci.Food Agric. 37, 927-943.

BELIN, J.M. (1982) Recherches sur la repartition des levures à la surface de la grappe du raisin. Vitis 11, 135-145.

BELY, M.; SABLAYROLLES, G.; BARRE, P. (1990) Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. Am.J.Enol.Vitic. 41, 319-324.

BENDA, I. (1982) Wine and brandy. In Prescott and Dunn's Industrial Microbiology. G. Reed (Ed.). AVI Publ. Company, Westport, Connecticut.

BERTRAND, A.; BOIDRON, J.N.; RIBEREAU-GAYON, P. (1967) Méthode d'extraction des constituants volatils des fruits et de leurs dérivés en vue d'une étude par chromatographie en phase gazeuse. Bull.Soc.Chim. 9, 3149-3151.

BERTRAND, A. (1968) Application of liquid gas chromatography to the determination of volatile constituents of wine. Conn.Vigne Vin 2, 179-270.

BERTRAND, A. (1971) Utilisation de la démixtion pour le dosage de quelques substances volatiles du vin par chromatographie gazeuse. Chim.Anal. 53, 577-583.

BERTRAND, A. (1975) Recherches sur l'analyse des vins par chromatographie en phase gazeuse. Thèse Doct. Sciences, Bordeaux

BERTRAND, A.; PISSARD, R.; SARRE, C.; SAPIS, J.C. (1976) Etude de l'influence de la pourriture grise des raisins (*Botrytis cinerea*) sur le comportement et la qualité des vins. Conn.Vigne Vin 10, 427-446.

BERTRAND, A.; MARLY-BRUGGEROLLE, C.; SARRE, C. (1978) Influence du débouillage des moûts et du sulfitage sur les teneurs en substances volatiles des vins et des eaux-de-vie. I. Etude des vins. Conn.Vigne Vin 12, 35-48.

BERTRAND, A.; SOUFLEROS, E. (1980) Incidence de l'action conjuguée de la température de fermentation et de l'acidité du milieu sur les teneurs en substances volatiles formées par les levures. Conn.Vigne Vin 14, 97-109.

BERTUCCIOLI, M.; MONTEDORO, G. (1974) Concentration of the headspace volatiles above wine for direct chromatography analysis. J.Sci.Food Agric. 25, 675-687.

BLANCH, G.P.; REGLERO, G.; HERRAIZ, M.; TABERA, J. (1991) A comparison of different extraction methods for the volatile components of grape juice. J.Chromatogr.Sci. 29, 11-15.

BLOOMFIELD, D.K.; BLOCH, K. (1960) Formation of Δ^9 -unsaturated fatty acids. J.Biol.Chem. 235, 337-341.

BOIDRON, J.N. (1978) Analytical identification of the aroma compounds of *Vitis vinifera* wine. 3rd Cycle Thesis 391. Fac. Sciences, univ. Bourdeaux.

-
- BOUIX, M.; LEVEAU, I.Y. (1983) Electrophoretic study of the macromolecular compounds excreted by yeasts: application to differentiation between strains of the same species. *Biotechnol. Bioeng.* 25, 1133-1142.
- BRAUS, H.; MILLER, D. (1958) Composition of whiskey: steam-volatile phenols of fusel oil. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 41, 141-145.
- BRENNER, W.M.; OWADES, J.L.; FAZIO, T. (1955) Determination of volatile sulfur compounds. IV. Further notes on mercaptans. *Am. Soc. Brew. Chem. Proc.* 1955, 125-129.
- BUREAU, G.; BRUN, O.; VIGUES, A.; MAUJIAN, A.; VESELLE, G.; FEUILLAT, A. (1982) Etude d'une microflore levurienne champenoise. *Conn. Vigne Vin* 16, 15-32.
- CABEZUDO, M.D.; HERRAIZ, M.; GOROSTIZA, E.F. (1983) On the main analytical characteristics for solving enological problems. *Proc. Biochem.* 18, 17-23.
- CABRERA, M.J.; MORENO, J.; ORTEGA, J.M.; MEDINA, M. (1988) Formation of ethanol, esters and terpenes by five yeast strains in musts from Pedro Ximenez grapes in various degrees of ripeness. *Am. J. Enol. Vitic.* 39, 283-287.
- CASTELLI, T. (1953) Les agents de la fermentation vinaire. *Arch. Mikrobiol.* 20, 323-342.
- CATASTRO VITÍCOLA Y VINÍCOLA (1978) Ministerio de Agricultura. Instituto de Denominaciones de Origen.
- COMELLAS, L.; GASSIOT, M.; QUINTANA, M.; SULLE, R. (1988) Comparación entre las técnicas de extracción con disolventes y concentración en polímeros porosos aplicadas al estudio de la fracción volátil de los vinos. *Afinidad* 45, 305-309.
- CORDONNIER, R. (1971) The aroma of wine and brandy. *Bull. OIV* 490, 1128-1148.
- CORDONNIER, R.; BAYONOVE, C. (1981) Etude de la phase prefermentaire de la vinification: extraction et formation de certains composés de l'arôme; cas des terpénols, des aldéhydes et des alcools en C₆. *Conn. Vigne Vin* 15, 269-286.
- CRAIG, J.T. (1988) A comparison of the headspace volatiles of kiwifruit wine with those of wine of *Vitis vinifera* variety Müller-Thurgau. *Am. J. Enol. Vitic.* 39, 321-324.
- CUINIER, P. (1976) La microflore des sols du vignoble. *Rev. Fr. Oenol.* 102, 42-49.
-

-
- CUINIER, P.; BOUIX, N.; LEVAN, J. (1981) Méthode d'étude de l'origine des levures en oenologie. Identification des espèces et différentiation des clones. *Vignes Vin* 302, 37.
- CUINIER, C. (1983) Reflexions sur le levurage en oenologie. *Vigne Vin*. 322, 12-18.
- DAUDT, C.E.; OUGH, C.S. (1973) Variations in some volatile acetic esters formed during grape juice fermentation. Effects of fermentation temperature, SO₂, yeast strain and grape variety. *Am.J.Enol.Vitic.* 24, 130-135.
- DI STEFANO, R.; CIOLFI, G.; DELFINI, C. (1981) Composti volatili prodotti dai lieviti. *Riv.Vitic.Enol.* 34, 342-355.
- DITTRICH, H.H.; SPONHOLZ, W.R. (1975) Decrease in amino acids in berries infected with *Botrytis* and the formation of higher alcohols in such musts during fermentation. *Wein Wiss* 30, 118-120.
- DOMERQ, S. (1957) Etude et classification des levures du vin de la Gironde. *Ann.Technol. Agric.* 7, 1-12.
- DRAWERT, F. (1965) Über inhaltsstoffe von mosten und weinen. V. Nachweis von biogenen im wein und deren bedeutung. *Vitis* 5, 127-132.
- DRAWERT, F.; RAPP, A. (1966) The compounds in must and wine. VII. Gas chromatographic investigation of aroma compounds in wine and their biogenesis. *Vitis* 5, 351-376.
- DRAWERT, F.; RAPP, A. (1968) Gaschromatographic analysis of plant aromas. I. Enrichment, separation and identification of volatile substances in grape musts and wines. *Chromatographia* 1, 446-457.
- DRAWERT, F.; SCHREIER, P.; SCHREIER, W. (1974) Gaschromatographisch-massenspektrometrische untersuchung flüchtiger inhaltsstoffe des weines. III. Säuren des weinaromas. *Z.Lebensm.Unters.Forsch.* 155, 342-346.
- DUBOURDIEU, D.; VILLETAZ, J.C.; DESPLANQUES, C.; RIBEREAU-GAYON, P. (1981) Dégradation enzymatique du glucane de *Botrytis cinerea*. Application à l'amélioration de la clarification des vins issus de raisin pourris *Conn.Vigne Vin* 15, 161-177.
-

EDWARDS, C.G.; BEELMAN, R.B.; BARTLEY, C.E.; MC CONNELL, C. (1990) Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeasts and malolactic bacteria during fermentation. *Am.J.Enol.Vitic.* 41, 48-56.

ENCICLOPEDIA DEL VINO (1988) *Enología, Viticultura y Cata*. Ed. Orbis, Barcelona.

ETIEVANT, P.X.; BAYONOVE, C.L. (1983) Aroma components of pomaces and wine from the variety Muscat of Fontignan. *J.Sci.Food Agric.* 34, 393-403.

ETIEVANT, P.X.; MAARSE, H.; VAN DER BERG, F. (1986) Wine analysis: study and comparison of techniques developed for the study of volatile constituents. *Chromatographia* 21, 379-386.

FARRIS, G.A.; FORTELEONI, M.; RUGGIU, M.; DEIANA, P. (1988) La microflora blastomicetica delle uve colpite da marciume acido. *Vine Italia* 3, 7-14.

FLEET, G.H.; LAFON-LAFOURCADE, S.; RIBEREAU-GAYON, P. (1984) Evolution of yeast and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1034-1038.

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

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

GUERZONI, M.E.; MARCHETTI, R.; GINCINI, P. (1985) Modifications des composants aromatiques des vins obtenus par fermentation avec des mutants de *Saccharomyces cerevisiae*. *Bull.OIV* 648-649, 228-258.

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

GUYMON, J.F.; INGRAHAM, J.L.; CROWELL, E.A. (1961) The influence of aeration on the formation of higher alcohols by yeasts. *Am.J.Enol.Vitic.* 12, 60-66.

GUYMON, J.F.; INGRAHAM, J.L.; CROWELL, E.A. (1964) The formation of n-propyl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch.Biochem.Biophys.* 95, 163-168.

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

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

HERRAIZ, T.; REGLERO, G.; HERRAIZ, M. (1988) Gas chromatographic analysis of free carboxylic acids in food using a micropacked column. *Food Chem.* 29, 177-188.

HERRAIZ, T.; MARTIN, P.J.; REGLERO, G.; CABEZUDO, M.D. (1989) Differences between wines fermented with and without sulphur dioxide using various selected yeasts. *J. Sci. Food Agric.* 49, 249-258.

HERRAIZ, T.; HERRAIZ, M.; REGLERO, G.; MARTIN, P.J.; CABEZUDO, M.D. (1990a) Changes in the composition of fatty acids during the alcoholic fermentation of grape musts. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 12, 185-188.

HERRAIZ, T.; MARTIN, P.J.; REGLERO, G.; HERRAIZ, M.; CABEZUDO, M.D. (1990b) Effects of the presence of skins during alcoholic fermentation on the composition of wine volatiles. *Vitis* 29, 239-249.

HERRAIZ, T.; MARTIN, P.J.; REGLERO, G.; HERRAIZ, M.; CABEZUDO, M.D. (1990c) The influence of the yeast and type of culture on the composition of wines fermented without sulfur dioxide. *Am. J. Enol. Vitic.* 41, 313-318.

HERRAIZ, T.; REGLERO, G.; MARTIN, P.J.; HERRAIZ, M.; CABEZUDO, M.D. (1991) Identification of aroma components of Spanish "Verdejo" wine. *J. Sci. Food Agric.* 55, 103-116.

HIEKE, E. (1972) Zur Kenntnis von flüchtigen Inhaltsstoffe (Aromastoffe) von Wein und anderen alkoholischen Getränken. I. Alkohole und andere flüchtige Inhaltsstoffe in Wein, Tresterwein, Hefewein. *Allg. Dtsch. Weinfachztg.* 108, 24-29.

HIEKE, E.; VOLLBRECHT, D. (1974) The formation of 2-butanol by lactic acid bacteria and yeasts. *Arch. Mikrobiol.* 99, 345-351.

HOCK, R.; BENDA, I.; SCHREIER, P. (1984) Formation of terpenes by yeasts during alcoholic fermentation. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 179, 450-452.

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

HOUTMAN, A.C.; DU PLESSIS, C.S. (1985) Influence du cépage et de la souche de levure sur la vitesse de fermentation et sur la concentration des composants volatils du vin. *Conn.Vigne Vin* 648-649, 235-346.

INOUE, T. (1974) Influence of temperature on formation of acetohydroxy acids by brewer's yeasts. *Rep.Res.Lab.Kirin Brewery* 17, 25-27.

IÑIGO, B.; ARROYO, V.; BRAVO, F.; LLAGUNO, C. (1961) Diferencias metabólicas de interés industrial entre especies de levaduras vínicas. *Rev.Agroquim.Tecnol.Alim.* 1, 11-17.

IÑIGO, B.; VAZQUEZ, D.; ARROYO, V. (1963) The agents of wine fermentation in the Jerez district. *Rev.Cienc.Apl.* 97, 196-305.

IÑIGO, B.; ARROYO, V. (1964) Metabolism of the film forming and non-film forming yeasts of the district of Montilla-Moriles. *Rev.Cienc.Apl.* 99, 305-314.

IÑIGO, B.; TOMELO, M.; HEGARDT, F.G. (1969) Los agentes de la fermentación de la zona de Aragón. *Rev.Agroquim.Tecnol.Alim.* 9, 437-422.

KATO, S.; KURATA, T.; FUJIMAKI, M. (1978) Volatile compounds produced by the reaction of L-cysteine or L-cystine with carbonyl compounds. *Agric.Biol.Chem.* 37, 539-543.

KEITH, E.S.; POWERS, J.J. (1968) Determination of flavor threshold levels and sub-threshold additive and concentration effects. *J.Food Sci.* 33, 213-219.

KILLIAM, E.; OUGH, C.S. (1979) Fermentation esters. Formation and retention as affected by fermentation temperature. *Am.J.Enol.Vitic.* 30, 301-305.

KREGER VAN RIJ, N.J.N. (1984) The yeasts: a taxonomic study. Elsevier Science Publisher, B.V. Amsterdam.

KUNKEE, R.E.; AMERINE, M.A. (1970) Yeasts in winemaking. In A.H. Rose and J.G. Harrison (Eds.) *The Yeasts. Vol 3.* Academic Press, New York.

-
- KUNKEE, R.E.; GOSWELL, R. (1977) Table wines. In Economic microbiology, vol. I. A.H. Rose (Ed.). Academic Press, Londers.
- LAFON-LAFOURCADE, S.; PEYNAUD, E. (1961) Composition azotée des vins en fonction des conditions de vinification. Ann.Technol.Agric. 10, 143-160.
- LAFON-LAFOURCADE, S.; PEYNAUD, E. (1965) Sur l'evolution des acides pyrivique et α -cetoglutamique au cours de la fermentation alcoolique. Compt.Rend. 261, 1778-1780.
- LAFON-LAFOURCADE, S.; RIBEREAU-GAYON, P. (1976) First observations on the use of dry yeasts in white wine fermentation. Conn. Vigne Vin 10, 277-292.
- LAFON-LAFOURCADE, S.; LARUE, F.; RIBEREAU-GAYON, P. (1979) Evidence for the existence of "survival factors" as an explanatiion for some peculiarities of yeast growth, specially in grape musts of high sugar concentration. Appl.Environ. Microbiol. 38, 1069-1073.
- LAFON-LAFOURCADE, S.; LUCMARET, V.; JOYEUX, A.; RIBEREAU-GAYON, P (1981) Utilisation des levains mixtes dans l'elaboration de vins de poirriture noble en vue de réduire l'acidité volatile CR Acad.Agric. 67, 616-622.
- LAFON-LAFOURCADE, S. (1983) Wine and brandy. In Biotechnology, Vol. 5. H.J. Rehm and G. Reed (Eds.) Verlag Chemie, Weinheim.
- LAFON-LAFOURCADE, S.; GENEIX, C.; RIBEREAU-GAYON, P. (1984) Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast gosht. Appl.Environ.Microbiol. 47, 1246-1249.
- LAMIKANRA, O. (1987) Aroma constituents of Muscadine wine. J.Food Qual. 10, 57-66.
- LEHTONEN, M.; SUOMALAINREN, L. (1977) Rum. In Economic Microbiology. Vol I. Alcoholic beverages. A.H. Rose (Ed.) Academic Press, New York.
- LODDER, J. (1970) The yeasts: a taxonomic study. Horth Holland Publishing Co., Amsterdam.
-

LONGO, E.; CANSADO, J.; AGRELO, D.; VILLA, T.G. (1991) Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from Northwest Spain. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 141-144.

LONGO, E.; VELÁZQUEZ, J.B.; SIEIRO, C.; CANSADO, J.; CALO, P.; VILLA, T.G. (1992) Production of higher alcohols, ethyl acetate, acetaldehyde and other compounds by 14 *Saccharomyces cerevisiae* wine strains isolated from the same region (Salnés, N.W. Spain). *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 8, 539-541.

LOYOLA, E.; MARTIN, P.J.; HERRAIZ, T.; REGLERO, G.; HERRAIZ, M. (1990) A contribution to the study of the volatile fraction in distillates of wines made from Muscat grapes (Pisco). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 190, 501-505.

LYNEN, F. (1973) In "Proceedings of the third international specialized symposium on yeast" (H. Suomalainen and Ch. Waller, Eds.), part II. Otaniemi/Helsinki.

MAGA, J.A. (1976) Lactones in food. *CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 8, 1-25.

MALAN, M. (1956) Taste properties of sterile (grape) musts fermented in pure culture. *Riv. Vitic. Enol.* 1, 11-22.

MARAIS, J.; HOUTMAN, A.C. (1979) Quantitative gas chromatography determination of specific esters and higher alcohols in wine using freon extraction. *Am. J. Enol. Vitic.* 30, 250-252.

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

MARQUARDT, P.; SCHMITH, H.; SPÄTH, M. (1963) Histamin in alkoholischen getränken. *Arznein. Forsch.* 13, 1100-1105.

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

MASUDA, M.; NISHIMURA, K. (1971) Branched nonalactones from some *Quercus* species. *Phytochemistry* 10, 1401-1405.

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

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

MAUGENET, M. (1980) *Rev.Fr.Oenol.* 80, 81-89.

MESIAS, J.L.; MAYNAR, J.I.; MARECA, I. (1981) Contribución al estudio de los componentes volátiles de uvas de Tierra de Barros (Badajoz). *Rev.Agroquim.Tecnol. Alim.* 21, 114-120.

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

MESTRE, C.; MESTRE, A. (1946) Fermentaciones comparativas con diferentes levaduras. *Min.Agric., Inst.Nal.Invest.Agron., Estación Vitic.Enol. villafranca del Penedés, Cuaderno 68*, 1-28.

MILLAN, C.; ORTEGA, J.M. (1988) Production of ethanol, acetaldehyde and acetic acid in wine by various yeast races. Role of alcohol and aldehyde dehydrogenase. *Am.J. Enol.Vitic.* 39, 107-112.

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

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

MOORE, K.J.; JOHNSON, M.G.; MORRIS, J.R. (1988) Indigenous yeast microflora on Arkansas White Riesling (*Vitis vinifera*) grapes and in model must systems. *J. Food Sci.* 53, 1725-1728.

MORA, J.J.; BARBAS, I.; RAMIS, B.; MULET, A. (1988) Yeast microflora associated with some Majorcan musts and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 39, 344-346.

-
- MORA J.J.; MULET, A. (1991) Effects of some treatments of grape juice on the population and growth of yeast species during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 133-136.
- MULLER, J.; KEPNER, R.E.; WEBB, A.D. (1971) Identification of 3-(methylthio)-propanol as an aroma constituent in Cabernet Sauvignon and Ruby Cabernet wines. *Am.J.Enol.Vitic.* 22, 156- 160.
- MULLER, C.J.; KEPNER, R.E.; WEBB. A.D. (1973) Lactones in wines: a review. *Am.J.Enol.Vitic.* 24, 5-9.
- NORDSTROM, K. (1964) Studies on the formation of volatile esters in the fermentation with brewer's yeasts. *Sven.Kem.Tidskr.* 76, 1-34.
- ORTEGA, J.; MARTIN, I.; MARTIN, A. (1987) Utilización de polímeros porosos en el análisis de compuestos volátiles de vinos. *Anal.Bromatol.* 34, 147-160.
- OUGH, C.S.; DAVENTPORT, M.; JOSEPH, K. (1989) Effects of certain vitamins on growth and fermentation rate of several commercial active dry wine yeast. *Am.J.Enol.Vitic.* 40, 208-217.
- PARFAIT, A.; JOURET, C. (1975) Formation of higher alcohols in rum. *Ann.Technol.Agric.* 24, 421-435.
- PARRISH, M.E.; CARROLL, D.E. (1985) Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 165-169.
- PASTEUR, L. (1866) *Etudes sur le vin.* 1^a Ed. Masson, Paris
- PASTEUR, L. (1876) *Etudes sul la bière.* Gauthier-Vallars, Paris.
- PEYNAUD, E.; DOMERQ, S. (1953) Etude des levures de la Gironde. *Ann.Technol. Agric.* 4, 265-300.
- PIETRUSCO, R.; FORDEN, L. (1961) γ -Aminobutyric acid metabolism in plants. I. Metabolism in yeasts. *Ann.Bot.* 25, 491-494.
- PORTNO, A.D. (1966) The influence of oxygen on the production of diacetyl during fermentation and conditioning. *J.Inst.Brew.* 72, 458-461.
-

-
- QUEROL, A.; JIMENEZ, M.; HUERTA, T. (1990) Microbiological and enological parameters during fermentation of musts from poor and normal grape-harvests in the region of Alicante (Spain). *J.Food Sci.* 55, 1603-1606.
- QUEROL, A.; BARRIO, E.; HUERTA, T.; RAMON, D. (1992) Molecular monitoring of wine fermentation conducted by active dry yeast strains. *Appl.Environ.Microbiol.* 58, 2948-2953.
- RANKINE, B.C.; LLOYD, B. (1963) Quantitative assessment of dominance of added yeast in wine fermentations. *J. Sci. Food Agric.* 14, 793-798.
- RANKINE, B.C.(1967) Formation of higher alcohols by wine yeasts and relationship to taste threshlod. *J.Sci.Food Agric.* 18, 583-589.
- RANKINE, B.C. (1968) The importance of yeasts in the determining the composition and quality of wines. *Vitis* 7, 22-49.
- RAPP, A.; HASTRICH, L.; ENGEL, I. (1976) Gaschromatographische untersuchungen uber die aromastoffe von weinbeeren. *Vitis* 15, 29-36.
- RAPP, A.; HASTRICH, H. (1976) Gaschromatographische untersuchungen über die aromastoffe von wienbeeren. II. Möglichkeiten der sortencharakterisierung. *Vitis* 15, 183-187.
- REAZIN, G.; SCALES, H.; ANDREASEN, A.A. (1973) *J.Agric.Food Chem.* 21, 50-65.
- REED, G.; NAGODAWITHANA, T.W. (1988) Technology of yeast usage in winemaking. *Am. J. Enol. Vitic.* 39, 83.
- REGLERO, G.; HERRAIZ, T.; HERRAIZ, M.; CABEZUDO, M.D. (1986) Mixed micropacked columns designed for selective separation of fermentation products. *Chromatographia* 22, 358-362.
- RENAUD, J. (1940) La microflore des levures du vin. Son role dans la vinification. *Ann.Ferment.* 5, 410-417.
- RIBERERAU-GAYON, P. (1971) Les arômes des vins et des eaux-de-vie. *Bull.OIV* 483, 428-466.
-

RIBEREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E.; SUDRAUD, P.; RIBEREAU-GAYON, P. (1972-1977) Sciences et techniques du vin. Vol 1-4. Ed. Dunod, Paris.

RIBEREAU-GAYON, P.; BOIDRON, J.G.; TERRIER, A. (1975) Aroma of Muscat grape varieties. *J.Agric.Food Chem.* 23, 1042-1047.

RIBEREAU-GAYON, P. (1985) New developments in wine microbiology. *Am.J.Enol.Vitic.* 36, 1-10.

RONKAINEN, P.; BRUMMER, S.; SUOMALAINEN, H. (1970) Diacetyl and formic acid as decomposition product of 2-acetolactic acid. *Acta Chem.Scand.* 24, 3404-3406.

ROSINI, G.; FEDERICHI, F.; MARTINI, A. (1982) Yeast flora of grape berries during ripening. *Microbiol. Ecol.* 8, 83-89.

SALLER, W. (1957) Die spontane-sprosspilzflora frisch gepresster traubensäfte und die Reinhefegärung. *Mitt.Rebe.Wein, Serie A (Klosterneuburg)* 7, 130-138.

SAPIS-DOMERQ, S. (1979) Nouvelles études de la microflore de vinification. *Connaiss. Vigne Vin.* 4, 45-61.

SCHNEYDER, J. (1973) Histamine et substances dans les vins. Cause de leur formation. Méthodes de leur élimination du vin. *Bull.OIV* 46, 821-823.

SCHREIER, P.; DRAWERT, F. (1974a) Gaschromatographisch-massenspektrometrische untersuchug flüchtiger inhaltsstoffe des weines. I. Unpolare verbindugen des weinaromas. *Z.Lebensm.Unters.Forsch.* 154, 273-287.

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

SCHREIER, P.; DRAWERT, F.; JUNKER, A. (1974c) Gaschromatographisch-massenspektrometrische untersuchug flüchtiger inhaltsstoffe des weines. II. Thioätherverbindungen des weinaromas. *Z.Lebensm.Unters.Forsch.* 155, 279-283.

SCHREIER, P.; DRAWERT, F.; JUNKER, A. (1975) Gaschromatographisch-massenspektrometrische untersuchug flüchtiger inhaltsstoffe des weines. IV. Nachweis sekundärer amide. *Z.Lebensm.Unters.Forsch.* 156, 34-37.

SCHREIER, P.; DRAWERT, F.; KERENYI, Z.; JUNKER, A. (1976a) Gaschromatographisch-massenspektrometrische untersuchug flüchtiger inhaltsstoffe des weines. VII. Aromastoffe in tokajer trockenbeerenauslesse (Aszu) weinen, a) Neutralstoffe. Z.Lebensm.Unters.Forsch. 162, 5-10.

SCHREIER, P.; DRAWERT, F.; KERENYI, Z.; JUNKER, A. (1976b) Gaschromatographisch-massenspektrometrische untersuchug flüchtiger inhaltsstoffe des weines. VII. Aromastoffe in tokajer trockenbeerenauslesse (Aszu) weinen, b) Organische säuren. Z.Lebensm.Unters.Forsch. 162, 11-16.

SCHREIER,P.; DRAWERT, F.; JUNKER, A. (1976c) Identification of volatile constituents from grape. J.Agric.Food Chem. 24, 331-336.

SCHREIER, P.; DRAWERT, F. (1977) Gaschromatographisch-massenspektrometrische identizierung flüchtigen säuren und phenole im traubenhund weinaroma. Appl.Aliment. (Symp.Intern.Comm.Int.Ind.Agric.Aliment. 15th) 150-151.

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

SCHREIER, P.; DRAWERT, F.; WINKLER, F. (1979) Composition of neutral volatileconstituents in grape brandies. J.Agric.Food Chem. 27, 365-372.

SCHREIER, P. (1980) Wine aroma composition: Identification of additional volatile constituents of red wine. J.Agric.Food Chem. 28, 926-928.

SCHUTTE, L. (1974) Precursors of sulfur-containig flavor compounds. CRC Crit.Rev.Food Technol. 4, 457-469.

SIEK, T.J.; ALBIN, J.A.; SATHER, L.A.; LINDSAY, R.C. (1971) Comparison of flavor threshold of aliphatic lactones with those of fatty acids, esters, aldehydes, alcohols and ketones. J.Dairy Sci. 54, 1-5.

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

SINGLETON, V.L.; OUGH, C.S.; AMERINE, M.A. (1975) Am.J.Enol.Vitic. 15, 134-141.

SOLES, R.M.; OUGH, C.S.; KUNKEE, R.E. (1982) Ester concentration differences in wine fermented by various species and strains of yeast. *Am.J.Enol.Vitic.* 33, 94-98.

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

STAHL, W.H. (Ed.) (1973) Compilation of odor and taste threshold values data. ASTM Data Series DS 48. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.

STEVIC, B. (1982) The importance of bees (*Apis* sp) and wasps (*Vespa* sp) as carriers of yeasts for the microflora of grapes and the quality of wines. *Archiv.Poljoprivredne Nanke*, Belgrado 15, 80-91.

STEINKE, R.D. (1964) The production of steam volatile phenols during the cooking and alcoholic fermentation of grain. *J.Agric.Food Chem.* 12, 381-383.

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

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

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

SUOMALAINEN, H. (1967a) The structure and function of the yeast cell. In "aspects of yeast metabolism". A.K. Mills and H. Krebs (Eds.) Blackwell Scientific Publications, Oxford.

SUOMALAINEN H.; KERÄNEN, A.J.A. (1967b) Keto acids from baker yeasts *J.Inst. Brew.* 73, 477-484.

SUOMALAINEN, H.; RONKAINEN, P. (1968) Mechanism of diacetyl formation in yeast fermentation. *Nature (London)* 220, 792-793.

SUOMALAINEN, H.; LEHTONEN, M. (1979) The production of aroma compounds by yeasts. *J.Inst.Brew.* 85, 149-156.

-
- TARANTOLA, C. (1945) New contribution to the study of apiculate yeasts. Ann.Acad.Agric. Torino 88, 115-133.
- TERANISHI, R.; BUTTERY, R.G.; STERN, D.J.; TAKEOKA, G. (1991) Use of odor threshold in aroma research. Lebensm.Wiss Technol. 24, 1-5.
- TERRIER, A.; BOIDRON, J.N.; RIBEREAU-GAYON, P. (1972) Teneurs en composés terpéniques des raisins de *V. vinifera*. CR Acad.Sci. 275, 941-950.
- TESNIERE, C.; BAUMES, R.; BAYONOVE, C.; FLANZY, C. (1989) Effect of simulated alcoholic fermentation on aroma components of grape berries during anaerobic metabolism. Am.J.Enol.Vitic. 40, 183-188.
- USSEGLIO-TOMASSET, L. (1967) The volatile acids (homologous of acetic acid) in fermentation with various yeast species. Atti.Acad.Ital.Vite Vino, Siena 19, 165-183.
- USSEGLIO TOMASSET, L. (1969) Il costituenti aromatici delle uve. Riv.Vitic.Enol. 22, 223-227
- USSEGLIO-TOMASSET, L. (1971) Ethyl acetate and the higher alcohols in wine. Riv. Vitic.Enol. 24, 236-276. 303.
- USSEGLIO TOMASSET, L.; DI STEFANO, R. (1980) Profilo aromatico del Moscato bianco del Piemonte. Riv.Vitic.Enol. 33, 3-13.
- VAN DER OUWELAND, G.A.M.; PEER, H.G. (1975) Components contributing to beef flavor. Volatile compounds produced by the reaction of 4-hydroxy-5-methyl-3(2H)-furanone and its analogs with hydrogen sulfide. J.Agric.Food Chem. 23, 501-505.
- VAN WYK, C.J.; WEBB, A.D.; KEPNER, R.E. (1967) Some volatile components in *Vitis vinifera* white Riesling. I. Grape juice. J.Food Sci. 32, 660-668.
- VOLLBRECHT, D.; RADLER, F (1973) Formation of higher alcohols by amino acid deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* . I. The decomposition of amino acids to higher alcohols. Arch.Mikrobiol. 94, 351-358.
- WAGENER, W.W.D.; WAGENER, G.W.W. (1968) The influence of ester and fusel alcohol content upon the quality of dry white wines. S.Afr.J.Agric.Sci. 11, 469-476.
-

-
- WALDRAT, J.P.; LINDASY, R.C. (1970) Popcorn flavor: identification of volatile compounds. *J.Agric.Food Chem.* 18, 926-931.
- WEBB, A.D.; KEPNER, R.E. (1961) Fusel oil analysis by means of gas liquid partition chromatography. *Am.J.Enol.Vitic.* 12, 51-59.
- WEBB, A.D.; KEPNER, R.E. (1962) The aroma of flor sherry. *Am.J.Enol.Vitic.* 13, 1-14.
- WEBB, A.D.; INGRAHAM, J.L. (1963) Fusel oil. *Adv.Appl.Microbiol.* 5, 317-353.
- WEBB, A.D. (1967a) Some aroma compounds produced by vinous fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 9, 305-319.
- WEBB, A.D.; KEPNER, R.E.; MAGGIORA, M. (1967a) Sherry aroma. VI. Some volatile components of flor sherry of Spanish origin. Neutral substances. *Am.J.Enol.Vitic.* 18, 190-199.
- WEBB, A.D. (1970) Anthocianin pigments in grapes and wines. *Suom.Kemistilehti A* 43, 67-74.
- WEBB, A.D.; MULLER, C.J. (1972) Volatile aroma components of wines and other fermented beverages. In *Advances in Applied Microbiology*, vol 14. Perlman, D. (Ed.), Academic Press, New York.
- WILLIAMS, A.A.; HOLLANDS, T.A.; TUCKNOTT, O.G. (1981) The gas chromatographic-mass spectrometric examination of the volatiles produced by the fermentation of a sucrose solution. *Z.Lebensm.Unters.Forsch.* 172, 377-381.
- WILLIAMS, A.A. (1982) Recent developments in the field of wine flavour research. *J.Inst.Brew.* 88, 43-53.
- WOLF, E.; BENDA, I. (1965) Differentiation of yeast strain by *Drosophila melanogaster* with regard to representatives of the genus *Saccharomyces*. *Weinberg Keller* 14, 163-166.
- WUCHERPFENNING, K.; SEMMLER, G. (1973) Über den SO₂ bedarf der weine aus den verschiedenen weinbaugebieten der welt und dessen abhängigkeit von der bildung von acetaldehyd im verlauf der Gärung. *Dtsch.Weinbau* 28, 846. 851-855.
-



UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de
D. Jose Juan Mateo Tolosa

la calificación de Apto "cum laude"

Valencia, a 23 de Noviembre de 1993

El Secretario,

El Presidente

