

UNIVERSIDAD DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS DOCTORAL

La levadura de flor en la crianza de vinos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ignacio Saavedra García

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD DE MADRID FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5326696889

TI
577.1
SAA

LA LEVADURA DE FLOR EN LA CRIANZA DE
VINOS.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE - MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
BIBLIOTECA
Nº Registro33682.....

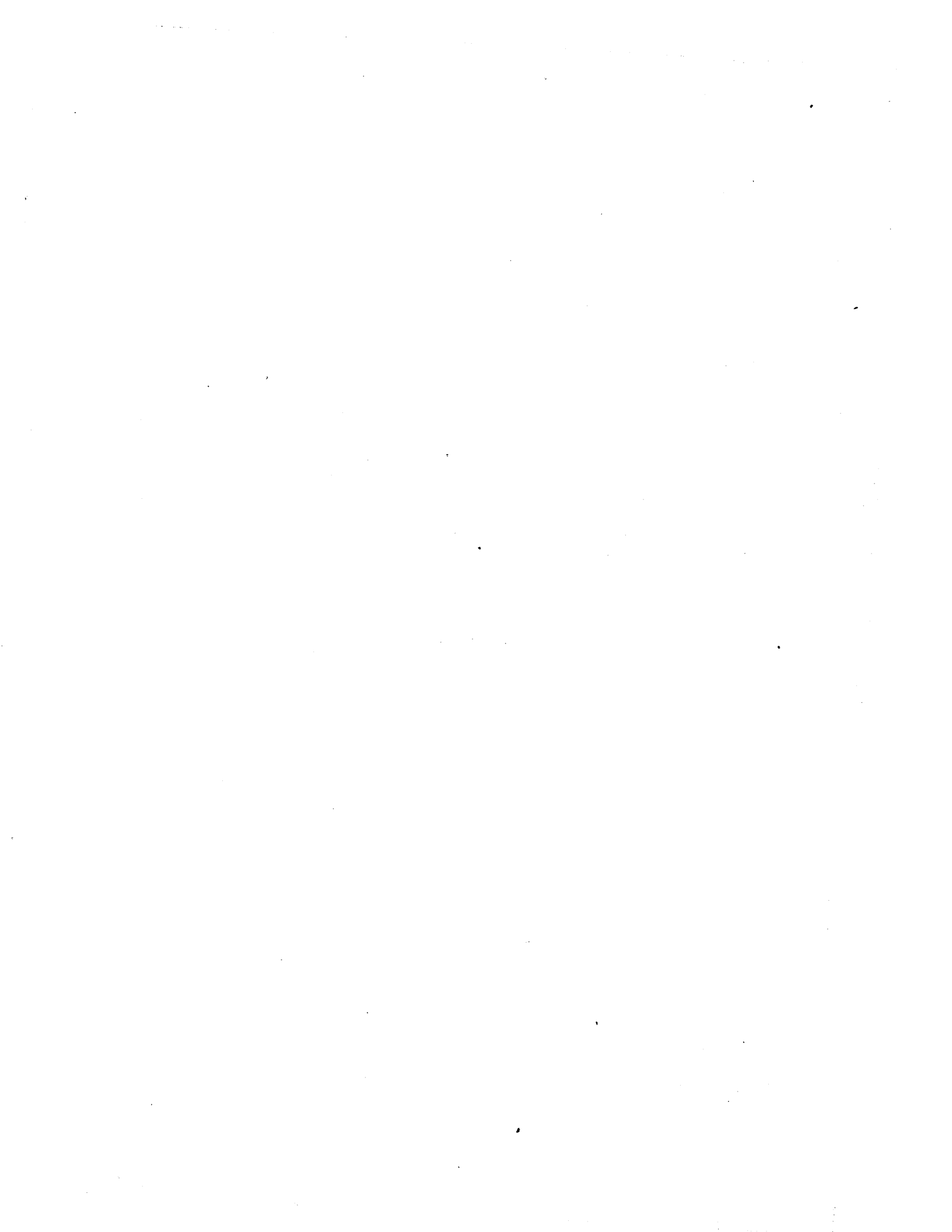
Tesis doctoral que presenta Ignacio
SAAVEDRA GARCIA del Departamento de
Fermentaciones Industriales del Pa-
tronato Juan de la Cierva.

b16839961
i37466070

Mayo, 1959

Debo hacer constar mi agradecimiento
Al Director del Instituto de Química Dr. -
D. Manuel LORA TAMAYO, que con tanto inter-
és ha seguido los trabajos efectuados.
Al Dr. D. José GARRIDO MARQUEZ, cuya con-
stante y acertada guía ha hecho posible la
realización de esta tesis, en el Departamen-
to de Fermentaciones Industriales, del Pa-
tornato Juan de la Cierva, que él dirige.
A mis compañeros, especialmente a Jesús AR-
NEDO RODRIGUEZ, Víctor ARROYO VARELA y Bal-
domero INIGO LEAL, por la gran ayuda presta-
da.
A las bodegas de Montilla y Jerez que me
han enviado muestras, singularmente a aque-
llas que, de modo tan decisivo han contri-
buido a las experiencias con su aportación
económica.

Ignacio J. Saavedra



I N D I C E

	Página
INTRODUCCION (Plan general).....	1
1ª PARTE (Teórica).....	5
LA ELABORACION DEL VINO EN JEREZ.....	6
Enyesado.....	8
Sulfitado.....	11
Fermentación y clasificación.....	12
El sistema de soleras.....	13
Clarificación y estabilización.....	16
Alteraciones microbianas.....	17
LA CRIANZA CON FLOR EN OTROS PAISES.....	20
CRIANZA DE VINOS TINTOS CON FLOR.....	25
ESTADO ACTUAL DE LAS INVESTIGACIONES SOBRE EL PROCESO DE CRIANZA CON FLOR.	
Naturaleza del microorganismo.....	26
Factores que afectan a la formación del velo en fase anaerobia.....	29
Cambios metabólicos producidos en el vino bajo flor.....	35
Ensayos de aceleración del proceso de crianza..	45

2ª PARTE

ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA CRIANZA.

SECCION I

ESTUDIO DE LA CRIANZA EN LA BODEGA.

Variación de algunos componentes del vino durante la crianza.....	47
Procedimientos analíticos.....	48

SECCION II

ESTUDIO DE LA CRIANZA EN EL LABORATORIO

Introducción.....	71
-------------------	----

Capítulo 1º

ELECCION DE LEVADURAS

Aislamiento y selección.....	72
Resistencia al ácido sulfuroso.....	73
Formación de productos típicos.....	74

Capítulo 2º

CRIANZA EN MATRACES.....	79
--------------------------	----

Capítulo 3º

CRIANZA Y RELACION DE SUPERFICIE A VOLUMEN.....	98
---	----

Capítulo 4º

PLANTEAMIENTO DE UNA BODEGA PARA CRIANZA RAPIDA DE VINOS.....	108
---	-----

Capítulo 5º

CRIANZA CON FLOR DE VINOS TINTOS....	115
Selección de cepas.....	115
Crianza en cubetas.....	119

<u>Capítulo 6º</u>	CRIANZA CON FLOR DE VINOS DE DIFERENTES ORIGENES.....	126
--------------------	---	-----

SECCION III

ESTUDIO ESPECIAL DE ALGUNOS ASPECTOS DEL METABOLISMO DE LA LEVADURA EN VINOS Y EN MEDIOS SINTETICOS.

Introducción.....	130
-------------------	-----

<u>Capítulo 1º</u>	EVOLUCION DEL NITROGENO.....	131
--------------------	------------------------------	-----

<u>Capítulo 2º</u>	PUESTA A PUNTO DE UN MEDIO DE CULTIVO DONDE LA LEVADURA PUEDA DESARROLLAR EN FASE DE VELO.....	
Requerimientos en sustancias carbonadas ternarias.....	138	
Formación de velo sobre un vino con cantidades crecientes de alcohol.....	142	
Necesidades de algunos factores de crecimiento para el desarrollo en fase de velo.....	146	
Desarrollo en fase de velo sobre medios conteniendo ácidos orgánicos.....	148	

<u>Capítulo 3º</u>	EL ORIGEN DEL AUMENTO DE ACIDEZ DEL MEDIO DURANTE EL DESARROLLO EN FASE DE VELO.....	151
Caracterización de los ácidos.....	153	

	Página
<u>Capítulo 4º</u>	
EL ORIGEN DEL ACIDO LACTICO QUE SE FORMA DURANTE LA CRIANZA CON FLOR...	160
Evolución de ácido málico y láctico.....	160
Evolución de glicerina y ácido láctico.....	162
Acido láctico en la autolisis.....	165
<u>Capítulo 5º</u>	
EL ALCOHOL EN EL METABOLISMO EN FASE DE VELO.....	167
El etanal y otros productos de transformación en del etanol en medios sintéticos.....	173
CONCLUSIONES.....	177
BIBLIOGRAFIA.....	187

INTRODUCCION

(Plan general)

Los vinos de "flor", de las zonas de Jerez y Montilla, a causa del original sistema de añejamiento, de naturaleza principalmente bioquímica, a que son sometidos, poseen características especiales que los hacen sumamente apreciados en los mercados internacionales, constituyendo su exportación una de las cuatro más importantes fuentes de divisas para la economía nacional.

Pero el vino de flor tropieza, en su salida a los mercados, con dificultades crecientes debidas en parte a la fuerte competencia de otros países y en parte también a la carestía del producto. Pues el sistema de elaboración, tal como se lleva en las bodegas de tipo tradicional, si bien permite obtener productos de una calidad y uniformidad extraordinarias, presenta graves inconvenientes, sobre todo por su lentitud y elevado coste y por la imposibilidad de que el bodeguero pueda mantener un control sobre muchos de los fenómenos que afectan al vino antes de que estos se produzcan. A este respecto González Gordón (33, pag. 297) dice: "El vino de Jerez nace y no se hace, pues durante la mayor parte de la vida del vino, exceptuando el período inicial, el bodeguero jerezano es un mero espectador".

El mosto evoluciona libremente y, una vez convertido en un vino determinado, se destina a la elaboración de un tipo diferente según el carácter del vino que se haya producido, lo que se traduce en una multiplicación de los tipos que puede desorientar al consumidor. "La enorme variedad de tipos de vinos que se producen en Jerez hace más difícil su comercio pues la propaganda genérica se dificulta en extremo y la particular no da el rendimiento que podía esperarse de ella si los vinos fueran todos de un tipo uniforme, como ocurre en la mayor parte de las regiones vinícolas" (González Gordón - (33) pag. 302).

De los párrafos anteriores tomados de una de las más altas autoridades en cuestiones relacionadas con la crianza de flor, se deduce claramente la necesidad de realizar estudios que puedan llevarnos un día al conocimiento, lo más profundo posible, de los complejos fenómenos que aquella implica, lo que permitirá llevar a cabo elaboraciones más racionales y con menor coste que las que son posibles actualmente, estudios que ya han sido emprendidos en todos los países donde hay bodegas de crianza con flor, entre ellos el nuestro, como podrá verse en la parte bibliográfica de esta tesis.

Siguiendo la idea de conocer los procesos de crianza y la posibilidad de llegar a acortar su duración y mejorar las condiciones en que se lleva, el presente -

trabajo consta de una parte previa, teórica, de revisión de los conocimientos actuales sobre el tema y de una parte experimental dividida en tres secciones.

La sección I se dedica al estudio analítico de la evolución del vino en la bodega, hecho sobre muestras - que fueron remitidas por varias casas productoras.

Después, con el fin de seguir la crianza en condiciones que permitieran el control de los procesos que - durante ella ocurren, se realizaron experiencias de evolución del vino blanco bajo flor, en escala de laboratorio, para conocer las modificaciones que sufre en función del tiempo y de la relación de superficie con flor a volumen de vino, ensayos que se exponen en la sección II. Estos comprendieron: aislamiento y selección de levaduras, evolución del vino y aplicación de los resultados obtenidos a la puesta a punto de una bodega para la crianza rápida y controlada del vino. Por último se incluye un estudio de la crianza de vinos tintos, que toca los mismos puntos que la de blancos aunque con menos extensión.

En la sección III se profundiza en algunos aspectos del metabolismo de la levadura de flor. Las experiencias, si bien en ciertos casos pudieron llevarse a cabo sobre vino, estéril o no, en general requirieron la previa - puesta a punto de un medio sintético de desarrollo don-

de se pudiera seguir la evolución de los componentes de interés únicamente evitando en lo posible interferencias de otras sustancias presentes en los medios naturales . En esta sección se incluyen además: la evolución de algunas fracciones nitrogenadas del vino bajo la acción de la flor, la evolución de la acidez fija y la formación de ácido láctico durante la crianza, algunas transformaciones metabólicas del alcohol y su utilización por la levadura para la formación de sustancia celular.

1ª PARTE
(Teórica)

La crianza con flor, o con levaduras que forman velo, es una técnica de envejecimiento de los vinos que se practica, desde hace alrededor de un siglo, en Andalucía occidental y, más recientemente, en otras regiones de España y de diversos países.

La mayor parte del vino criado con flor procede de dos áreas muy limitadas que tienen por centros, respectivamente, Jerez de la Frontera (Cádiz) y Montilla (Córdoba). En estas regiones existen especies de levaduras del género *Saccharomyces*, capaces, una vez terminada la fermentación alcohólica de los azúcares de los mostos, de ascender a la superficie del vino en contacto con el aire y desarrollar sobre ella formando una película o velo en una etapa esencialmente aerobia. Durante ella realizan transformaciones metabólicas de distintos componentes del vino, causa de la aparición de características especiales de color, aroma, y sabor que distinguen estos vinos de cualesquiera otros envejecidos por otros medios. Considerable asimilación de alcohol, disminución de la acidéz volátil, consumo de glicerina y gran producción de etanal son algunos de los caracteres analíticos más destacados que señalan la actividad de la levadura.

LA ELABORACION DEL VINO EN JEREZ

Los datos utilizados en la siguiente descripción proceden de: González Gordon (33), Marcilla (44), Fornachon (27) y de información directa.

La crianza con flor tuvo su inicio, según hemos indicado, a mediados del pasado siglo. Ya entonces se sabía que en los envases no totalmente llenos de vino podía producirse una infección a la que se llamó "flor" por el aspecto que presenta en las primeras fases de su desarrollo. Por esta época se observaron los efectos beneficiosos que la flor producía sobre los caracteres del vino afectado. Durante algún tiempo tales vinos no fueron apreciados pero gradualmente, al irse mejorando los procedimientos de crianza, empezaron a gozar del favor de los consumidores.

Es notable la gran variedad existente de tipos de vinos que han recibido crianza con flor durante alguna etapa de su evolución; secos, abodados o dulces, con colores que van desde el topacio muy pálido al caramelo oscuro y contenidos en alcohol de 15 a 24 grados. Pero limitándonos al vino sólomente añejado durante el tiempo de acción de la levadura, sin envejecimiento posterior ni mezcla con otros vinos no criados, y que ha sido el objeto de nuestro estudio, el tipo fundamental es

el llamado "fino": González Gordon lo describe como un vino pálido, muy seco aunque no ácido. En general es de color pajizo, parecido al topacio; su graduación alcohólica oscila entre los 15 y 17 grados; su aroma es delicado y punzante.

Como sucede con todos los vinos, la calidad del de Jerez depende de diversos factores, siendo los más importantes entre ellos, la variedad y estado de madurez de la uva, el clima y el terreno, las sistemas de poda y cultivo de la viña y la elaboración de la materia prima.

Las mejores calidades del vino se obtienen de los viñedos plantados sobre terrenos conocidos localmente como "Albarizas". Estos suelos, del período miocénico, son margas de un contenido excepcionalmente alto en caliza con proporciones variables de arcilla y arena. Su coloración es blanco-grisácea a lo que deben su nombre.

La cepa Palomino es la más extensamente plantada en los viñedos jerezanos pues de ella resultan mostos del mayor grado de finura. La vendimia se inicia durante la segunda quincena de septiembre y se hace en varias veces para recoger sólo el fruto maduro.

Los racimos se asolean durante un día o dos y se llevan al lagar para la extracción del mosto que, en su forma típica, se hace por pisada a pié de hombre y en dos vueltas. A continuación se da una prensada ligera

con una prensa de husillo accionada a brazo y el mosto obtenido, llamada de primer pié, se agrega al procedente de la pisada, constituyendo el conjunto el mosto de yema, que se destina a la elaboración de vinos finos. Los orujos se agotan con prensadas más enérgicas pero de los mostos recogidos se obtienen vinos de calidad inferior y para destilar. Este primitivo procedimiento, lento y trabajoso, se considera el más adecuado porque mediante él se extrae poco tanino y sustancias que puedan comunicar sabor basto a los mostos. Sin embargo está siendo sustituido, cada vez en mayor escala, por sistemas más mecanizados, con prensas hidráulicas.

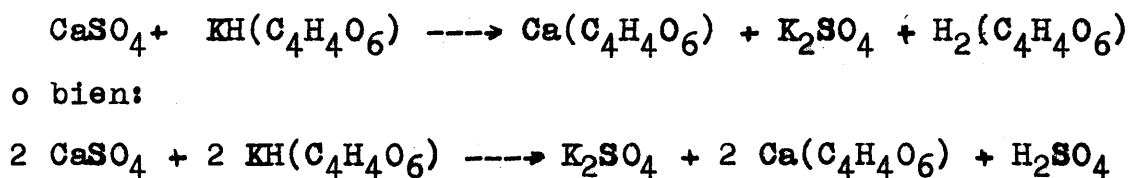
Enyesado

Es práctica general en la vendimia. Se hace espolvoreando con yeso la uva estrujada antes del primer pié. La cantidad empleada varía bastante según los distritos y los sistemas de prensada. Por término medio se añade 1,5 gramos de yeso por cada 1Kg. de vendimia estrujada.

Quizá sea el enyesado la operación más discutida entre todas las que se realizan a lo largo de la elaboración de un vino. Reparos de todo orden, incluso sanitario, se han formulado a una práctica que, muy común en otros tiempos en toda clase de vinos, ha ido perdiendo difusión - siendo hoy empleadas sistemáticamente sólo para los vinos de flor. La legislación actual ha contribuido a restringir el uso del yeso al señalar como límite máximo de sul-

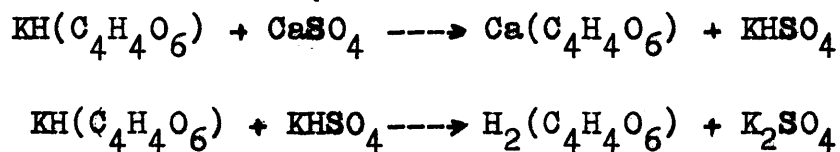
fatos el de 2 g/l, expresado como sulfato potásico. Los vinos de Jerez gozan de una protección especial y no se marca ningún tope a su contenido en yeso.

Generalmente se destaca como efecto principal del enyesado el aumento de la acidez actual del mosto. El sulfato cálcico reacciona con el bitartrato de potasio dando tartrato cálcico y dejando ácido tartárico libre. El mecanismo de la reacción es, según Joslyn y Amerine (37):



según la relación yeso/tartratos.

Cruess (21) supone que la reacción se verifica en dos etapas, formándose primero tartrato cálcico y bisulfato potásico que reacciona con otra molécula de bitartrato para dar ácido tartárico:



Realmente sólo los iones Ca^{++} y $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6^{--}$ participan en la reacción mientras que K^+ , H^+ , SO_4^{--} y $\text{H}(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)^-$ permanecen sin actuar.

A consecuencia de estas reacciones el hidrógeno poco ionizado de una sal ácida se sustituye por el ion H^+ del ácido tartárico con la conseguinte disminución de pH lo que induce a creer a Cruess que la adición de ácido tartá-

rico o cítrico pueden producir los mismos efectos que el enyesado. De la misma opinión es Fornachon (27) para el cual el efecto de disminución de pH por el yeso varía de un mosto a otro y tiene la máxima eficacia con mostos de pH alrededor de 3,6.

Las principales hipótesis sobre la acción del yeso se basan, como puede verse, en un único aspecto de ella. Pero según otros investigadores el sulfato cálcico actúa más ampliamente. Erdelyi, citado por Carpentiere (11) encuentra aumento de extracto, cenizas y sulfatos en los mostos enyesados y el mismo Carpentiere nota un descenso de la alcalinidad de las cenizas y del porcentaje de carbonatos de éstas, y un aumento de calcio y sulfatos. Más recientemente Bobadilla, Quirós y Serrano (6) observan aumento de cenizas, calcio y sulfatos y disminución de magnesio, potasio, sodio y fosfatos.

Como principales efectos beneficiosos del enyesado cabe señalar, según García-Angulo (31) que el aumento de acidez se traduce en una fermentación más limpia y que la disminución del contenido en bitartrato potásico reduce el riesgo de enturbiamientos posteriores en el vino por precipitaciones.

Organolépticamente los mostos tratados con yeso presentan más intensidad y brillantez de color que los no tratados, lo que se comunica a los vinos resultantes. En opinión de Amerine y Winkler (2) ello se debe a que la extracción de materia colorante, y posiblemente también la de los

constituyentes del aroma es más completa a pH más bajos. Para Marcilla (44) la causa está en la acción conjunta de los iones Ca^{++} y de la disminución de pH sobre los coloides del mosto, produciendo una coagulación más rápida y eficaz de estos.

Desde el punto de vista microbiológico, el yeso protege a los vinos contra las infecciones bacterianas, debido al aumento de acidez al decir de Cruess, e incrementa la velocidad de fermentación hasta un máximo, cuando la cantidad de sulfato cálcico es de 3 g/l, disminuyendo para concentraciones más altas, según trabajos de Bobadilla, Quirós y Serrano (6). No parece que el yeso sea necesario para el desarrollo satisfactorio del velo de flor sobre el vino.

Sulfitado

El empleo del ácido sulfuroso, tan general en la vinificación, no ha empezado a extenderse en Jerez hasta hace pocos años. La acción antimicrobiana de este ácido y el hecho de que las levaduras pueden actuar bajo concentraciones que inhiben la actividad bacteriana lo convierten en una gran ayuda para la elaboración de vinos sanos. A lo que ha de añadirse el que sea el único antiséptico permitido por las legislaciones vinícolas de todos los países.

La adición de ácido sulfuroso protege al vino de contaminaciones bacterianas, siempre posibles sobre todo en

años de vendimias en malas condiciones (uvas pedriscadas, atacadas de mohos, etc.) y reúne tantas ventajas en el orden enológico que se haría muy larga su exposición aún cuando fuera superficial. Solo se requiere cierta prudencia en las dosis, usualmente de 100-150 mg/l, para no impedir o retrasar la formación del velo de levaduras.

Fermentación y clasificación

La fermentación se hace en botas de 30 arrobas, barricas de roble americano de unos 500 litros de capacidad, interviniendo levaduras presentes espontáneamente en el mosto, y es completa, quedando sólo restos de azúcares que favorecen el posterior desarrollo de la flor.

En los meses de enero a marzo se realiza el primer trasiego para separar los vinos de las heces. Al mismo tiempo se hace una clasificación previa, casco por casco, agrupando los vinos en varias categorías o tipos según sus características. Durante esta operación es cuando los vinos destinados a finos se encabezan, es decir, se eleva su contenido en alcohol hasta 15-16 grados mediante una mezcla de vino y alcohol vínico. De esta concentración no conviene pasar para no inhibir o retardar la formación del velo. Tal práctica resulta necesaria para proteger al vino de la acetificación y también para impedir refermentaciones que puedan enturbiarlo o desvirtuar su tipo.

Después de alcoholizados los vinos se dejan unos me

ses en espera de ver si se confirma o se cambia su tipo inicial y los que conservan las cualidades requeridas pasan a ser sometidos a crianza.

El sistema de soleras

Hablando estrictamente, el término solera se refiere a la etapa final del sistema jerezano de añejamiento dándose el nombre de criaderas a todas las demás. Pero en general esta denominación se puede aplicar a todo el conjunto.

Fundamentalmente el sistema consiste en disponer una serie de escalas, cada una formada por un cierto número de botas que contienen vino del mismo tipo y en el mismo grado de crianza. En la primera escala o solera está el vino más viejo y de ella se extrae el vino terminado. Las botas rara vez se vacían totalmente, retirándose por lo general la cuarta parte de su contenido en sacas periódicas cada seis meses. Los envases de la solera se rellenan con la misma cantidad de vino procedente de la escala anterior, primera criadera; ésta a su vez con la anterior y así sucesivamente hasta la última criadera que se completa con vino nuevo, llamado localmente mosto. De esta forma el vino se mueva constantemente a lo largo de todo el sistema y cuando llega a la solera tiene, por lo menos, cinco años de edad variando ésta según el número de escalas y la frecuencia de las sacas. Por término medio el número de escalas es de cinco o seis aunque a veces

llega a ocho o nueve. Los rellenos se hacen de forma que el vino extraído de cada bota se reparte entre todas las de la escala siguiente con el resultado de lograr la mayor uniformidad en el tipo.

El fin primordial de las soleras es obtener, de un año para otro, un tipo invariable o, por lo menos, que varíe poco con relación al de la primera escala. Los trasiegos se hacen a mano, con jarras y sifones, con lo que se consigue una aireación que se estima muy beneficiosa para el vino y a la que González (33) atribuye una parte muy importante del éxito de las soleras.

La principal desventaja del sistema está en su escaso rendimiento económico, pues sólo puede disponerse anualmente de un 20% del vino almacenado en la bodega, lo que, unido al coste de la enorme cantidad de botas necesaria, al interés del capital inmovilizado y las pérdidas por evaporación, que pueden alcanzar hasta un 7% al año, determina la imposibilidad de producir tales vinos a bajo precio.

Las botas de las soleras no se llenan por completo, sino que se deja en vacío una sexta parte de su capacidad quedando a la vez suficiente superficie y una cámara de aire conveniente para el adecuado desarrollo del velo. Su boca se tapa flojamente con un trozo de corcho o madera para permitir un fácil acceso de aire al interior.

En estas condiciones, si la temperatura es favorable, se inicia el crecimiento del velo. En pocos días apa

recen los primeros islotes de levadura que se van extendiendo por la superficie del líquido hasta juntar sus bordes y cubrirla totalmente. Al cabo de unas semanas el velo se arruga y toma un color blanco cremoso. Con el tiempo se desprenden trozos de él, que caen al fondo de la bota y son sustituidos por nuevo desarrollo. El sedimento de levadura se autoliza en un proceso que Cruess (21) considera de importancia para el aroma y sabor del vino.

Una vez que la flor se ha establecido en las botas, se deja que desarrolle en todas las escalas de la solera sin que el bodeguero intervenga apenas más que para hacer trasiegos y rociár los vinos con alcohol en reposición de pérdidas.

Las temperaturas más convenientes a la flor son de 15-18°C. Por encima de 25° y a menos de 13° la levadura paraliza su acción y el velo va desprendiéndose en fragmentos y llega a desaparecer por completo de la superficie del vino. Dos veces al año el microorganismo asciende para dar crianza al vino por coincidir la temperatura de la bodega con la óptima para el desarrollo en fase de flor, siendo las épocas más activas en los meses de abril a mayo y de agosto a septiembre.

Las soleras se almacenan en bodegas que suelen estar en los sitios más aireados de la población y, debido al grueso de sus muros y a la altura de sus techos, su temperatura es bastante uniforme, siendo además práctica ha

bitual el regarlas periódicamente durante los meses calurosos.

Clarificación y estabilización

El vino extraído de las soleras se lleva a conos de roble o a depósitos de cemento vidriado donde se somete a clarificación, operación muy importante pues uno de los caracteres más apreciados en el fino es su brillantez y transparencia de color.

Como clarificante se usa la clara de huevo batida, en cantidades de cuatro a veinte por bota. Según Marci - lla (44), por la acción del alcohol y de los taninos del vino, la albúmina coagula de un modo bastante enérgico y rápido arrastrando las partículas en suspensión que causan turbideces y dejando el líquido limpio.

Para completar este tratamiento, al cabo de unos días se agrega al vino tierra de Lebrija a razón de 1 Kg por bota. González (33) describe a este clarificante como una arcilla de grano muy fino, capaz de producir una suspensión coloidal que, al coagularse, engloba en su masa y sedimenta las sustancias extrañas que contengan los vinos.

Desde hace algunos años se va imponiendo en Jerez la estabilización de los vinos por el frío aunque, por el elevado coste de las instalaciones, sólo las bodegas más importantes están en condiciones de disponer de este servicio. Por la acción del frío se precipita bitartrato po

tásico al disminuir su solubilidad y este proceso va siempre acompañado de floculación de coloides. Así se evitan los enturbiamientos tartáricos, tan frecuentes al producirse cambios de temperatura.

La estabilización por frío, tan corriente ya en otros países, es de la mayor importancia para los vinos de flor, en gran parte destinados a la exportación y cuyos principales mercados están en naciones de clima frío, al menos relativamente.

Alteraciones microbianas

El vino de flor, por su graduación alcohólica alta, está bastante protegido contra las invasiones microbianas pero, debido a que la crianza transcurre en contacto con el aire exterior, no es raro que sufra contaminaciones bacterianas que, si bien en general no son de tal carácter que lleguen a inutilizarlo, pueden retrasar su evolución y su salida al mercado. La extensión de las infecciones se agrava por la mezcla íntima de los vinos de todas las botas en el sistema de soleras.

Aunque con la difusión, cada día mayor, del ácido sulfuroso se van reduciendo las alteraciones microbianas, las que subsisten habitualmente tienen la suficiente importancia para representar grandes pérdidas y aumento de los costes de producción.

Según refiere González Gordón (33), las alteracio-

nes más corrientes son la peste, el picado, la nube microbiana y el ahilado. La primera, que consiste en que el vino adquiere olores desagradables, suele provenir de fermentaciones defectuosas, por la presencia de organismos no deseables o de falta de limpieza en los utensilios que entran en contacto con el vino. En ambos casos su prevención es fácil.

El picado o acetificación se presenta cuando los vinos se encuentran bajos de alcohol. Bobadilla (4) dice que el remedio y preventivo son fáciles, encabezado a 15-15,5° y prudente sulfitación, aunque esto realmente no quita la infección y sólo la paraliza.

Las alteraciones más graves son la nube y el ahilado, singularmente este último que llega a impedir el buen desarrollo del velo en los vinos que lo padecen.

Aquella se manifiesta por un enturbiamiento del vino que parece debido, en opinión de Marcilla (44) a microorganismos, anaerobios facultativos, pero que se multiplican y actúan mejor en condiciones de moderada aerobiosis, con preferencia después de un trasiego en contacto con el aire. Se presenta en todas las etapas de la crianza, singularmente en las épocas en que han caído los velos de levaduras. Como remedio se suele utilizar la sulfitación, recomienda Bobadilla (4), pero la eliminación de los microorganismos por este procedimiento es sólo aparente y con frecuencia se reproduce la turbidez cuando el ácido sulfuroso pierde su poder antiséptico

al pasar a formar parte de combinaciones dentro del vino.

Por último el ahilado aparece como un cambio en la consistencia del vino que se hace más viscoso, dejando una desagradable sensación al paladar y, cuando se trasvasa, cae en chorro unido, como el aceite, con un ruido sordo, bien distinto del habitual. Parece ser debido a la acción de ciertas bacterias, entre las que predominan bacilos cortos y cocos, que producen sustancias viscosas.

Generalmente la alteración no es muy profunda y no falta quién la suponga relacionada con la tendencia del vino a ser fino. En opinión de Bobadilla (4) la baja acidez es decisiva para su aparición y propone acidular y sulfitar el vino para detener la infección; la consistencia viscosa desaparece al cabo de unas semanas de crianza con flor. Tampoco en este caso el remedio es definitivo, como no lo es la aireación o la clarificación y filtrado que propone González (33).

LA CRIANZA CON FLOR EN OTROS PAISES

La exportación de vinos de Jerez fué, durante el si glo XIX en constante aumento alcanzando una media anual de unas 40000 botas. A comienzos del siglo actual se ini ció un descenso que se acentuó en los años que siguie - ron al final de la guerra de 1914, llegando en 1923 a - la cifra de 23000 botas exportadas. De nuevo, a partir de 1924, volvió a crecer el consumo mundial de estos vi - nos y, en tal situación, nada tiene de extraño que otros países vinícolas, de condiciones climáticas adecuadas, comenzaran a interesarse en la crianza con flor. Los re sultados no fueron muy prometedores al principio pero, merced a la labor de algunos investigadores en la reso lución de problemas tales como la conveniente elección de cepas y terrenos, manipulación de la materia prima y, sobre todo, el adecuado empleo de levaduras de flor, se fué consiguiendo una mejora gradual de los tipos y hoy países como Africa del Sur, California y Australia pro - ducen calidades que, ayudadas por ciertas legislaciones sobretarifas aduaneras, compiten en el mercado con las de Jerez, al menos para el gusto del consumidor corrien te.

Los sistemas de crianza, aunque están basados en el seguido en Jerez, difieren en general de él en que pres

cinden del sistema de soleras por antieconómico y cuidan singularmente de que la elaboración se lleve en las mejores condiciones de pureza. La eliminación de las soleras obliga a dar al vino un periodo de envejecimiento en madera después de que ha estado el tiempo conveniente bajo flor.

En África del Sur, Niehaus (47), introductor de este tipo de crianza, recomienda fermentar los mostos, enyesados, con cultivos puros de levaduras de flor en tanques cerrados. Terminada la fermentación se deja decantar el vino durante dos semanas, se trasiega para separar las heces y se encabeza con una mezcla de vino y alcohol hasta 16-16,5°. A continuación se trasvasa a pipas o botas de roble donde se inocula con heces de los tanques de fermentación. Los envases se tapan flojamente y se almacenan en bodegas frescas y bien ventiladas donde se deja desarrollar la flor durante un plazo de 15 a 18 meses. Acabada la crianza, el vino se trasiega a otras botas para su envejecimiento posterior.

En California, Cruess, Weast y Guilliland (22) proponen alcoholizar el vino hasta 15-15,5° y sembrarlo con cultivos puros después de sulfitar con 100 mg de SO_2 / l. El vino se deja un año o dos en crianza y después se encabeza hasta 18° y se envejece en vasijas de roble durante un periodo moderado de tiempo.

Estudios posteriores de Cruess (21) le llevaron a

la puesta a punto de lo que llamó un sistema de soleras modificado que consiste en dejar el vino bajo flor de - 18 a 24 meses en barricas de unos 200 litros. Cuando se considera que ha recibido suficiente crianza se retira la mitad del contenido de cada vasija y se sustituye por vino de un año de análogas características que el primitivo haciéndose una segunda saca de ocho a doce meses - más tarde. Esta solera modificada permite un trabajo continuo durante un número indeterminado de años. El vino extruido se envejece en madera, como es habitual.

Debe vigilarse constantemente la evolución del vino por medio de catas periódicas, análisis de acidez volátil y exámenes microscópicos. En caso de aparición de bacterias lácticas o acéticas, una sulfitación hasta 150 mg/l, seguida de filtración del vino y resiembra de velo en el envase afectado permite corregir la alteración.

Son bastantes las bodegas californianas donde la fase de crianza se lleva en tanques de cemento de 50 cm. de profundidad, con unos 5000 litros de vino, en los que se trabaja de la misma forma que en las soleras modificadas. En estas vasijas, al ser mayor que en las botas la relación de superficie con velo a volumen de líquido, se realiza una crianza más rápida aunque con el inconveniente de que el vino adquiere a veces un desagradable sabor "a levaduras".

Se han hecho diferentes intentos de dar solución al problema de mantener en las bodegas la temperatura más

conveniente para el desarrollo del velo. En el clima de California es más importante conseguir una buena refrigeración que calefacción y el sistema que parece más eficaz es el adoptado por Berg (3) de refrigeración por aire acondicionado. La calefacción, en invierno y primavera, es por medio de radiadores de gas natural y ambos sistemas están regulados termostáticamente. Los resultados obtenidos parecen buenos aunque, debido al gran volumen de las bodegas de crianza, el procedimiento resulta caro.

En Australia, donde la crianza con flor fué introducida por De Castella (24) hacia 1908, la técnica seguida, según describe Chaffey (23), consiste en encabezar el vino hasta un poco menos de 16% de alcohol, sulfitarlo hasta 100 mg/l y sembrarlo con cultivos puros de levadura en fase de velo. Se considera recomendable el sistema de soleras pues la periódica adición de vino a cada vasija repone el azúcar consumido por la levadura y activa ésta.

En 1940 Fornachon (27), patrocinado por la Australian Wine Industry, inició un extenso estudio de la crianza con flor con miras a su posible modificación y mejora. Concede la máxima importancia al vino base, que ha de ser limpio, claro y de poco color, seco, con no más de 2 g/l de azúcares, bajo contenido en taninos y con pH comprendidos entre 3,1 y 3,4, condiciones que reúnen en grado óptimo los procedentes de uva Palomino. Los resul

tados de sus trabajos le llevaron a proponer una técnica que, en general, no difiere de la descrita por Chaffey. Señala como principales causas de fracaso en la crianza la falta de oxígeno por insuficiente aireación sobre el velo, el exceso de alcohol o de azúcares fermentables, el bajo contenido en nitrógeno o ácidos y el empleo de levaduras de baja calidad.

Señalemos, por último que también en Rusia y, recientemente, en Canadá se producen vinos criados con flbr.

CRIANZA DE VINOS TINTOS CON FLOR

Si bien entre las condiciones tradicionalmente buscadas en los vinos para criar con flor figura la de ser blancos y con bajo contenido en taninos, existen estirpes de levaduras que forman velo sobre vinos tintos. En Montánchez (Cáceres) se producen vinos tintos, de poco color, los cuales, después de fermentar, son trasegados a tinajas de poca cabida, dejando bastante vacío, donde crean un velo, formado por auténticos *Saccharomyces*, que desarrolla en tales vinos aromas y gustos típicos.

En 1953 Castelli y Cantarelli (8,9) aislaron, de un velo formado espontáneamente en vino tinto italiano, varias cepas que resultaron ser de *S. oviformis*. Los efectos de su acción sobre el tinto seguían en líneas generales los mismos caminos que sobre blancos, esto es: disminución de alcohol y de acidez volátil, aumento de etanal y acetoina, pero había ~~un aumento ligero~~ de glicerina y disminución de butilenglicol en lo que difería de la crianza de blancos. Los caracteres organolépticos se mejoraron algo pero, después de 15 o 20 días bajo flor, el vino adquirió cualidades de decrepitud y se avinagró fácilmente.

ESTADO ACTUAL DE LAS INVESTIGACIONES SOBRE
EL PROCESO DE CRIANZA CON FLOR

Naturaleza del microorganismo

Los primeros investigadores que se ocuparon del proceso de la crianza con flor supusieron, basados en las semejanzas macroscópicas, no muy grandes ciertamente, del velo de levaduras con las llamadas "flores" de los vinos, que el organismo productor de la flor era un *Mycoderma*. En este sentido se definió Roques (57) que fué quien - primero publicó una descripción detallada del proceso de crianza en Jerez (1903). Pero los caracteres de los vinos invadidos de *Mycoderma* son muy diferentes de los que tienen los criados con flor y ya De Castella (24) - ponía en duda la identidad de ambos microorganismos.

En 1933 Marcilla (43) daba cuenta de que la formación de velo en los vinos de Jerez era debida a un *Saccharomyces* y a la misma conclusión llegaba Frolov-Bagreev según refieren Prostosserdov y Afrikian (52) quienes aislaron, en vinos de Armenia, una levadura, capaz de formar velo, de caracteres morfológicos y fisiológicos similares a las encontradas en Jerez y a la cual denominaron *S. cheresiensis*, var. *armeniensis*.

Desde 1933 hasta 1936 Marcilla, Alas y Feduchy (45) estudiaron las levaduras de la zona de Montilla. En su

trabajo, publicado en 1939, afirmaron haber caracterizado una nueva especie, el *S. beticus*, con tres razas α , β y γ . Esta, de gran poder fermentativo, a diferencia de las *Pichia*, *Hansenula* y *Mycoderma* con escasa o nula capacidad de convertir los azúcares en alcohol, fue considerada como la principal responsable de la evolución de los vinos bajo flor.

Casi al mismo tiempo Schanderl (59) hizo investigaciones sobre la formación de velo en 138 cepas de su colección pertenecientes al género *Saccharomyces*, llegando a la conclusión de que puede considerarse la formación de velo como una propiedad general de las levaduras de este género más bien que de las levaduras de Jerez. El sabor que comunican al vino varía según las especies y los caracteres del vino base.

En los años siguientes fueron muchos los trabajos realizados sobre la naturaleza de las levaduras de flor que, si bien no permitieron confirmar de un modo total las afirmaciones de Schanderl, demostraron la existencia de otras especies de levaduras que desarrollan velo sobre vino y que pueden contribuir a la aparición de los caracteres del vino fino. En 1944 Prostossordev (51) - identificó unas cepas, obtenidas de vino de Jerez, como *S. heterogenicus* en tanto que otras procedentes de un velo sobre vino de Armenia resultaron ser de *S. oviformis*. Mrak y Phaff (46) encontraron que la raza γ de *S. beticus* debía ser considerada como *S. chevalieri*. Lod-

der y Kreger van Rij (40) establecieron la identidad del *S. beticus* (r) con el *S. fermentati* y del *S. cheresiensis* con el *S. oviformis*.

La posibilidad de que levaduras de géneros distintos del *Saccharomyces* intervengan en la crianza con flor ha sido investigada en diversas ocasiones pero no parece haber testimonios suficientes para afirmar que esto ocurra. De Castella (24) habló de los efectos beneficiosos de ciertas levaduras apiculadas presentes en el mosto al comienzo de la fermentación y algo parecido indicó Bobadilla (4). Marcilla, Alas y Feduchy (45) aislaron varias especies del género *Pichia* en vinos de Jerez y Hohl y Cruess (34) encontraron *Pichia*, *Hansenula* y *Torulopsis* en vinos de la misma procedencia. Dada su gran capacidad para formar esteres volátiles, los autores supusieron que podían tener influencia en el aroma y sabor del vino pero esto parece dudoso pues ha sido imposible conseguir su desarrollo en vinos con más de 14 grados de alcohol. Frolov-Bagreev y Saenko (30) experimentaron con *Hansenulas* seleccionadas de vinos análogos, siguiendo la técnica de mantenerlas en cultivo, durante tres días, en un mosto que luego sembraron con levaduras de flor de alto poder fermentativo. Según ellos se incrementó de esta forma la producción de acetal y esteres volátiles y se aceleró la formación de aroma en el vino bajo velo. Estas aseveraciones no se han visto confirmadas en los trabajos de otros investigadores y For-

nachon (27) indica que, en sus ensayos con Pichia y Hansenula en conjunción con levaduras de flor, no consiguió que la calidad del vino fuese mejor que la alcanzada en una crianza normal.

Factores que afectan a la formación de velo en fase aerobia.

Al enjuiciar la influencia que un determinado factor pueda tener en la formación del velo ha de tenerse en cuenta que su influjo viene modificado por el de otros de los que intervienen en la composición del medio. Señalemos que, en general, se aprecia bastante concordancia en los resultados obtenidos por investigadores de distintos países aunque trabajan en muchos casos con cepas y aún con especies de levaduras diferentes, sembradas sobre vinos que, necesariamente, han de ser de composición sólo parecida.

Las levaduras no pueden actuar en fase de velo bajo condiciones tan rigurosas como en anaerobiosis. Su adaptación natural a las variaciones que el medio experimenta es más difícil y sólo puede realizarse dentro de límites relativamente estrechos.

Fueron Marcilla, Alas y Feduchy (45) quienes primero realizaron un estudio sistemático de la crianza con flor y de los requerimientos de la levadura para su desarrollo. Encontraron que las cepas por ellos estudiadas formaban velo en vinos con 10 a 17% de alcohol sien-

do el contenido óptimo de 13,5-14,5^o, resultados muy parecidos a los obtenidos por Hohl y Cruess (34) cuyas cepas toleraron de 10 a 16^o y, por habituación, formaron un velo ténue en vinos hasta de 17^o. Fornachon (27) señala el mismo límite máximo aunque afirma que el velo se forma mejor a medida que baja el contenido en alcohol - del medio, por lo menos hasta 4^o.

Los límites de temperatura son considerablemente - más estrechos que aquellos entre los que se realiza la fermentación del mosto y están determinados, más que ningún otro factor, por la composición del vino. Marcilla y col. (45) señalaron de 10 a 25^oC. con un óptimo de 15-17^o y resultados análogos obtuvieron Bobadilla (4), Cruess (21) y Fornachon (27) entre otros, todos ellos - trabajando sobre vinos que reunían las condiciones ideales para la crianza con flor.

En la resistencia de la levadura en fase de velo al SO₂ influyen la cantidad de levadura empleada en la siembra, la fase de vida, velo o depósito, del inóculo y el que la sulfitación se haga antes o después de la formación del velo, según Marcilla y col.(45), pero, fundamentalmente, influye el que el SO₂ se encuentre en forma libre o combinada, ésta de escaso o nulo poder anti-séptico, lo que está estrechamente relacionado con la - composición del vino. Así se explica la discrepancia que se aprecia en los resultados obtenidos, pues mientras Marcilla y col.(45) encontraban que dosis de 100 mg/l retra

saron hasta el trigésimo día la formación del velo, Bobadilla, en comunicación personal a Cruess (21), refería que se obtienen desarrollos fácilmente en vinos con 180 mg/l. y el mismo Cruess observó su formación en 30 días en vinos con dosis de 350 mg/l. Los resultados de Fornachon (27) se acercan más a los de Marcilla pues no consiguió desarrollo de velo en vinos con más de 150 mg/l hasta después de 4 semanas cuando la concentración de SO_2 había caído a 20 ó 40 mg/l.

Los taninos, que Cantarelli (9) considera imprescindibles para la formación de velo, retrasan o impiden su aparición cuando están en exceso, como ya indicaban Marcilla y col. (45) y Fornachon (27), aunque éstos encontraron que cantidades mínimas en los vinos son perjudiciales para la flor.

De las experiencias realizadas para la determinación del pH más conveniente para el velo puede deducirse que es adecuada a toda la escala en que suelen estar los vinos sanos. Marcilla y col. (45) indican la escala de 2,7-4,1 con un óptimo de 3,2; Bobadilla (4), 2,8-3,5; Cruess (21), 2,65-3,95 y Fornachon (27), 2,8-4,8. Todos ellos observan que el velo se forma lentamente a pH por debajo de 3,0.

En cuanto a los ácidos, individualmente considerados, parecen influir sobre el velo, más que nada, por las variaciones de pH que inducen en el medio. Así creen Marcilla y col. (45) probable que actúen los ácidos tar-

tárico y málico, de los que la levadura soporta concentraciones de 10 y 6 gr/l respectivamente siempre que el pH del medio lo permita. El ácido láctico, por lo menos hasta 3 g/l, activa la formación de velo. El ácido succínico tampoco actúa como inhibidor y de ácido acético son toleradas, en fase de velo, concentraciones hasta de 3 g/l, notablemente superiores a las que pueden soportar las levaduras en fase aerobia. Cruess (21) observó desarrollo normal de velo en vinos a los que había añadido ácido tartárico hasta que la acidez total alcanzó 15 g/l y consiguió resultados similares por adición de ácidos cítrico y láctico.

No está claro el influjo de los restos de azúcares pues mientras Chaffey (23) los considera imprescindibles para el mantenimiento de la actividad del velo y señala que el vino destinado a crianza con flor debe contener como mínimo 1-1,6 g/l, Fornachon (27) opina que estas cantidades no tienen acción sobre el velo y concentraciones más altas retrasan su formación.

También se han investigado profusamente los efectos de la adición de diversas sustancias nutritivas, vitaminas y factores de crecimiento, con resultados contradictorios de los que parece deducirse que un determinado factor sólo estimulará la formación de velo en un medio que sea deficitario de él, pero si ya se encuentra en las cantidades requeridas, un exceso sobre ellas no afecta al velo o lo hace desfavorablemente.

Entre las sustancias nutritivas se han ensayado con preferencia las que aportan nitrógeno, ya en forma mineral u orgánica. Allan (1) y Chaffey (23) no encontraron efecto alguno en la adición de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, Cruess (21) consiguió estimular grandemente el velo con cantidades de 1-5 g/l de fosfato y Saenko (58) encontró efectiva la adición de 10-400 mg/l de nitrógeno en forma de NH_3 y ensayó el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ con buenos resultados. Para Forna chon (27) los vinos contienen en general las cantidades de nitrógeno que requiere la levadura, incluso cuando son tan bajas como 100 mg/l, pero observó que siempre se acelera algo la formación de velo por adición de nitrógeno en forma fácilmente asimilable. Freiberg y Cruess (29) refieren que $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, peptona, urea y, sobre todo, mezclas de estos compuestos añadidos al vino, determinan un incremento en el peso del velo.

En cuanto a las vitaminas y factores de crecimiento, las más efectivas para Cruess (21) fueron el ac. ascórbico y la biotina en tanto que Nielsen, citada por Freiberg y Cruess (29) no considera esencial la biotina ni el ac. pantoténico. Estos mismos investigadores afirman que el ac. ascórbico, en dosis de 1-2 g/l inhibe la formación de velo, como también lo hacen la riboflavina y β -alanina, mientras que Castor y Archer (17), trabajando sobre medios sintéticos, concluyen que el pantotenato es esencial y que la β -alanina puede sustituirlo. Van Zyl (63) encuentra que la biotina es necesaria para un

buen desarrollo de la flor y que su acción se intensifica por la adición de aminoácidos; meso-inositol y pantotenato tienen poco efecto sobre el velo en tanto que -
tiamina y aneurina no le afectan.

Hay unanimidad de criterios a cerca de la muy favorable acción del extracto o autolizado de levadura, que aporta al vino gran variedad de vitaminas, factores nutritivos y de crecimiento. Sobre este punto coinciden -
Cruess (21), Saenko (58), Fornachon(27) y Freiberg y -
Cruess (29) entre otros.

Cambios metabólicos producidos en el vino
bajo flor

El vino bajo flor está sometido a unas condiciones especiales como consecuencia, de una parte, del quimismo oxidativo de la levadura y, de otra, del medio reductor creado en el interior del vino al ser consumido por el velo el oxígeno disuelto y ser impedido por aquél el aporte de nuevas cantidades del exterior. La combinación de ambas acciones origina transformaciones de las sustancias contenidas habitualmente en los vinos, que se manifiestan por la aparición de caracteres organolépticos diferenciales.

Es fundamental poder estudiar estos cambios metabólicos en medios sintéticos, donde pueda seguirse sin grandes interferencias la evolución de cada componente, pero existe la dificultad de conseguir sustratos donde la flor pueda tener un desarrollo comparable al que alcanza en los vinos. Marcilla y col. (45) empleaban un medio base con: K_2HPO_4 , 0,2 g; $MgSO_4$, 0,1 g; $CaSO_4$, 0,05 g; NaCl, 0,01 g; peptona Witte, 0,25 g y agua hasta 100 ml, adicionado de alcohol hasta unos 10%. A distintas porciones de este medio agregaron, respectivamente, glucosa, fructosa, glicerina y los ácidos contenidos en el vino uno a uno. Inoculados con levadura, sólo en el medio con ácido

láctico se formaron islotes de velo que no llegaron a cubrir totalmente la superficie del líquido. Fornachon(27) en sus estudios sobre la evolución de etanal, utilizó un medio semejante, pero con extracto de levadura en lugar de peptona y conteniendo además 5 g/l de glicerina y 6 mg/l de Fe^{+++} , etanol en cantidades variables y HCl suficiente para llevar su pH a 3,2, en el cual se formaba un tenue velo que cubría totalmente su superficie. También Castor y Archer (17) se sirvieron de un complejo medio de cultivo que incluía fosfato mono y dipotásico, SO_4^{--} , Cl^+ , Mg^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Na^+ , glucosa, arabinosa, etanol, glicerina, ac. tartárico, málico y acético y todos los aminoácidos y factores de crecimiento que se han caracterizado en los vinos. En este medio la masa del velo formado fué algo más de la mitad que en el vino testigo. En un medio que incluía KH_2PO_4 , $MgSO_4$, $CaCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$, H_3BO_3 , Zn^{++} , Mn^{++} , TI^+ , Fe^{+++} , Cu^{++} , I^+ , factores de crecimiento, aminoácidos y alcohol como alimento ternario consiguió van Zyl (63), en seis meses, un desarrollo de velo que calificó como regular, pero en sus ensayos de metabolismo tuvo que recurrir a utilizar, como medio de cultivo, vino, donde la formación de velo fué mucho más rápida. Con glicerina y ac. acético en sustitución del alcohol, el desarrollo fué menor.

Los primeros análisis detallados de vinos de flor son los publicados por Marcilla, Alas y Feduchy (45) realizados sobre vinos criados, en condiciones estériles, en

escala de laboratorio y sobre muestras procedentes de bodegas. Sus resultados concuerdan, en líneas generales, con los de los análisis, completos o parciales, publicados posteriormente por Fiorenzano (25, 26) y Fornachon (27) entre otros. De ellos se deduce que el etanol disminuye, a lo largo de la crianza, por evaporación y, singularmente, por reacciones de oxidación; la glicerina se consume en notable proporción, se forma gran cantidad de etanal, los esteres volátiles aumentan, aunque no mucho, la acidez volátil llega a reducirse casi a cero y el potencial red-ox cae desde valores de unos 400 mvolts, hasta 200 y aún 100 mvolts. y, tras un cierto tiempo, vuelve a elevarse.

Veamos ahora con más detalle algunas de las transformaciones que sufren los vinos.

La importancia del etanol en la crianza con flor no ha llegado a ser puesta realmente de manifiesto aunque es un hecho sobradamente conocido su disminución constante. La pérdida de alcohol fué atribuida, como queda dicho, en parte a la evaporación y en parte a reacciones de oxidación en las que se forma etanal, que se acumula parcialmente en el vino y del cual la mayor proporción se oxida a ac. acético y, por último, a CO_2 y H_2O . Este hecho, observado por Marcilla y col. (45), fué comprobado posteriormente por numerosos investigadores, entre ellos Fornachon (27), que considera al etanol necesario para el buen desarrollo del velo, según deduce del he -

cho de que, en medios sintéticos privados de alcohol, só lo se forma una tenue película de flor.

La pérdida de alcohol puede ser, en la bodega, has ta de 1,5% al año según las condiciones de temperatura, acceso de aire sobre el velo y relación superficie/volumen del líquido. Marcilla y col.(45) no descartan la posibilidad de que una pequeña proporción sea utilizada por la levadura en su nutrición pero la suponen insignificante en presencia de otras sustancias ternarias como glicerina, azúcares, y ac. láctico y succínico que consideran más fácilmente asimilables. La misma suposición hace van Zyl (63), quién encuentra que el 4% del alcohol utilizado por el velo, en un medio sintético, se ha transformado en etanal y ac. acético. Trata de seguir la evolución del 96% restante, con el aparato de Warburg, pero no llega a ninguna conclusión porque el consumo de alcohol es muy lento en el medio empleado.

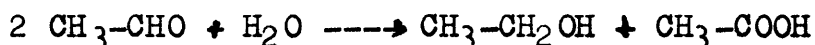
El etanal, que se forma en cantidades generalmente de 300-400 mg/l pero que pueden llegar hasta 700-800 mg/l según las condiciones del medio, es generalmente considerado como el componente más típico de los vinos de flor, hasta el punto de que Fornachon sostiene que hay correlación entre el carácter de flor, determinado mediante cata, y la cantidad de etanal presente en el vino. Naturalmente esta correlación es menos regular cuando se comparan vinos de diferente origen.

Por supuesto, la acumulación de etanal no es, por sí sola, suficiente para comunicar carácter de flor a un vino, pues sabor y aroma son resultado de fenómenos muy complejos, pero es indudable la primordial importancia a este respecto del aldehído y sus productos de transformación. Sisakyan y col. (60) sugieren que las cualidades de crianza dependen más de la relación etanal/acetal que de la cantidad absoluta del primero, correspondiendo las mejores calidades de los vinos ensayados a valores de 1,21-1,26 para aquella relación. Pero las concentraciones de acetal encontradas por Sisakyan son notablemente más altas que las que permite el equilibrio teórico etanal/acetal, lo que induce a suponer que el método de análisis empleado, que no figura en sus trabajos, contiene considerables causas de error.

Fornachon (27) hace notar también la presencia en el vino de otros compuestos derivados del etanal, como acetoina y, quizás, otros productos secundarios y Casas (14) estudia el contenido en 2,3-butilenglicol y acetoina de algunos vinos de flor. La cantidad de ésta por término medio, 19 mg/l, resulta ser alta en comparación con las concentraciones habituales en otros tipos y lo mismo sucede con el butilenglicol. Casas recoge la idea, sugerida por varios autores, a cerca de la posibilidad teórica de que el glicol provenga de hidrogenación de la acetoina formada en una condensación acetoinica de etanal-

e indica que, puesto que durante la crianza se forma etanal, según ha sido confirmado repetidamente, y está presente en plena actividad el sistema enzimático de la levadura, nada se opone a que tales reacciones puedan llegar a verificarse.

Respecto al origen del etanal, no parece existir duda alguna de que procede del alcohol, como demuestra Fornachon (27). Su acumulación en el vino depende de la naturaleza de éste y de la relación superficie/volumen, y nunca transcurre de un modo regular. Generalmente hay una formación bastante rápida en las primeras semanas seguida de un periodo en que la concentración permanece estacionaria o disminuye y de otro en que se vuelve a elevar o continúa cayendo. Es mayor en condiciones de mayor acceso de aire y, si la cantidad de éste sobre el velo es insuficiente, el etanal se puede consumir según la reacción:



siendo el ac. acético destruido por la acción de la levadura, a lo que puede deberse la caída de etanal que se observa después de su rápida formación inicial. Cuando el velo ha alcanzado un buen desarrollo se espesa y se arruga haciéndose difícil el acceso de oxígeno a muchas de las células que lo forman, las cuales, en estas condiciones, pueden consumir etanal según la reacción anteriormente expuesta. Confirma esta idea el hecho, referido -

por Fornachon (27), de que la adición de sustancias que favorecen el desarrollo del velo, como sales amónicas y extracto de levadura, perjudica la acumulación de etanal porque mayor número de células son forzadas a vivir en condiciones de anaerobiosis.

La evolución de los ácidos ha sido estudiada por Marcilla y col. (45), Chaffey (23), Cruess (21) y Bobadilla y Navarro (5) entre otros. Aunque hay modificaciones, a veces profundas, en el contenido de algunos de ellos, el pH del vino no varía o apenas lo hace. La acidez volátil, ac. acético casi exclusivamente, y la acidez fija, integrada principalmente por los ácidos tartárico, málico, cítrico, succínico y láctico, disminuyen, aunque en distinta proporción.

El ácido acético se reduce, al ser utilizado como alimento por la levadura, hasta 0,1-0,3 g/l pero, bajo ciertas condiciones, puede aumentar por transformación del etanal o, según Bobadilla, del ac. láctico, por la acción del velo. Su metabolismo en medios sintéticos fué estudiado por van Zyl (63) quien comprobó que su utilización iba acompañada de una disminución de rH en tanto que el pH y la acidez fija permanecían constantes. No pudo encontrar el camino de transformación del ácido pero observó al microscopio la acumulación de gotas de grasa en las células de levadura lo que le indujo a suponer que el ac. acético tiene un papel preponderante en la

síntesis de grasas, que podría hacerse a través del ciclo del ac. cítrico y una parte del ácido tendría que oxidarse a CO_2 y H_2O para proporcionar energía.

La disminución de la acidez fija en la crianza no suele pasar de un 20% de la inicial. Individualmente considerados, el ac. tartárico es el más abundante y, a veces, casi el único ácido del vino antes de iniciarse la crianza, no es afectado por la acción de la levadura y sólo es atacado por algunas especies de bacterias. Su concentración disminuye por precipitación, pero no más que en vinos añejados por otros procedimientos no biológicos.

El ácido málico puede desaparecer en parte por transformación malo-láctica durante el tiempo transcurrido entre la fermentación del mosto y el descube y alcoholización del vino antes de pasar a las botas de crianza, esto es, durante los meses del otoño e invierno. En otoños templados se puede perder hasta un tercio del ácido inicial por esta causa pero, después de encabezado el vino, la graduación alcohólica alta impide la actuación de las bacterias, en opinión de Bobadilla (15). La levadura de flor no actúa sobre el ac. málico pero puede disminuir algo durante la crianza.

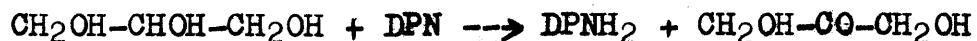
Los ácidos cítrico y succínico no son afectados por el velo de levaduras y no varían con el tiempo.

No está clara la explicación del aumento de ac. láctico en los vinos sometidos a crianza, ni la causa que

lo origina. La levadura es capaz de consumir este ácido, como ya observó Marcilla (45), y en los vinos no aparece sino una parte del total producido no obstante lo cual en las zonas de Jerez y Montilla llegan a acumularse en el vino hasta 2,5 g/l, lo que puede representar cantidades mayores que de cualquier otro ácido, incluso el tartárico. Este hecho, comprobado primeramente por Marcilla (45) en vinos criados en condiciones estériles, ha sido confirmado por numerosos análisis posteriormente, pero el aumento de ac. láctico no es general en los vinos de flor no españoles y Fornachon (27) señala que nunca se observa en las bodegas australianas.

En cuanto a su origen, Marcilla (45) supone que está en la transformación metabólica de la glicerina a través de un hidrato de metilglioxal ($\text{CH}_3\text{-CO-CH(OH)}_2$), en tanto que Bobadilla (5), basándose en la disminución progresiva del ácido málico, afirma que el ácido láctico se origina en una transformación malo-láctica por la acción de bacterias y a la misma conclusión llega Fornachon(27) quien supone que las experiencias de Marcilla no fueron realizadas en condiciones totalmente estériles. Recientemente van Zyl(63) estudió su formación en vino pero no encontró aumento de concentración. En medio sintético con glicerina, al cabo de 10 meses de desarrollo del velo, se formó ac. láctico en concentración de 0,1 g/l con un consumo de glicerina de 10 g/l. Van Zyl comprobó su presencia por cromatografía sobre papel, que no reveló

la existencia de ningún otro ácido. También encontró mí nimas cantidades de dioxiacetona, confirmando las expe- riencias de Fornachon (27), y, demostrada ya la trans - formación glicerina-dioxiacetona, por Hoffman-Ostenhof , según la reacción:



admite la posibilidad de que, por transformaciones suce- sivas, llegue a ac. láctico que puede ser utilizado en el metabolismo de la levadura. En vinos no encuentra aumen to de este ácido.

Los cambios observados en las cantidades de azúca- res presentes en los vinos bajo flor dependen en gran - manera de los métodos de análisis seguidos. Las materias reductoras de la solución de Fehling apenas disminuyen y, en algunos casos, aumentan ligeramente. Sin embargo el azúcar fermentable, analizado mediante determinacio- nes de materia reductora antes y después de someter las muestras a fermentación por levadura en condiciones cons tantes, disminuye siempre. El aumento en materia reduc- tora puede ser debido, como ya apuntaba Marcilla (45) , a la presencia de otras sustancias que no sean hexosas, ni siquiera azúcares.

No ha sido estudiada, sino superficialmente, la evo lución del nitrógeno. Unicamente se sabe que el nitróge no total disminuye constantemente pero apenas se indica nada en la bibliografía a cerca de las distintas formas

en que éste puede estar presente en el vino. Sólo recientemente van Zyl (63) estudió la evolución de algunos aminoácidos en medios sintéticos.

Ensayos de aceleración del proceso de crianza

El sistema jerezano de soleras, aunque lento y antieconómico, permite la obtención de vinos de una calidad y uniformidad extraordinarias. Los métodos de crianza seguidos habitualmente en otros países, que ya han sido descritos, representan una ganancia de tiempo, material y mano de obra aunque la calidad muchas veces no se sostenga.

Tendiendo a acelerar los procesos de la crianza, durante los últimos años se han llevado a cabo diversos ensayos que, en general, tienen en común el empleo de una mayor aireación como medio de apresurar los procesos bioquímicos del metabolismo de la levadura y, por consiguiente, la evolución de los componentes del vino. Los resultados obtenidos en escala de laboratorio o semiindustrial no fueron tan definitivos como para que se hayan continuado en una escala mayor.

Ter-Karapetyan (62) estudió las reacciones biológicas de la levadura de flor en cultivo sumergido en vino y expuso que, por efecto de la aireación, se aceleran las reacciones bioquímicas y, mediante regulación del acceso de aire y de su difusión en el líquido, se pueden

dirigir aquellas. Fornachon, citado por Rankine (53), obtuvo carácter de flor pasando el vino por una columna - de virutas de roble. Crowter y Truscott (19,20) utilizaron el procedimiento de sembrar el vino con un 2% de levadura y airearlo mediante bombes intermitentes duran- te unas semanas. Observaron acumulación de etanal e in- tensa multiplicación celular y, despues de algunos meses en envases de roble, el vino presentaba cierto carácter de flor pero distaba mucho de poder ser considerado co- mo análogo al de Jerez.

2ª PARTE

ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA CRIANZA.

SECCION I

ESTUDIO DE LA CRIANZA EN LA BODEGA

Variación de algunos componentes del
vino durante la crianza.

Indudablemente los análisis de los vinos proceden -
tes de bodegas aportan datos sólo de relativo valor. Las
especiales características de las bodegas de crianza de-
terminan que, en algunos casos, las modificaciones que se
observan en los vinos puedan ser debidas a la acción de
microorganismos capaces de coexistir con la levadura du-
rante el período de crianza. Además, la composición de las
muestras puede variar de un modo considerable como conse-
cuencia de las operaciones habituales en la bodega: tra-
siegos, sacas, rociados...y, por otra parte, las sacas no
siempre son periódicas, sino que a menudo se hacen depen-
diendo de las demandas del mercado, y no existe uniformi-
dad en la edad de los vinos de las escalas que ocupan po-
siciones análogas en las distintas bodegas, todo lo cual
obliga a trabajar con un número bastante elevado de mues-
tras para poder deducir consecuencias aceptables.

Toma de muestras

Las muestras, procedentes de seis bodegas de Jerez
y de cuatro de Montilla, fueron enviadas en los años 1954
y 1955. Comprendían dos series de cada bodega, cada serie

formada por un vino de un año, un cierto número de criaderas y una solera. A fin de reducir en lo posible los inconvenientes que acabamos de indicar se tomaron, en el mismo mes de septiembre de los dos años, de sistemas formados, cada uno, por el mismo número de criaderas, seis los de Jerez y tres los de Montilla. Cada muestra representaba la media del contenido de varias botas de la misma escala.

Procedimientos analíticos

Acetal. Método puesto a punto por Campos (7).

Acetoína. Procedimiento, adaptado al vino por Casas y Arnedo (15), basado en el de Lemoigne de oxidación con FeCl_3 a diacetilo, transformación en dimetilglioxima y precipitación de ésta con sal níquelosa.

Acidez fija. Por diferencia entre acidez total y volátil.

Acidez total. Valoración con NaOH N/10 empleando indicador externo de rojo-fenol, según describen Ribéreau-Gayon y Peynaud (56, pag.99).

Acidez volátil. Por arrastre de vapor en el aparato de Ca zenave-Farré, eliminación de CO_2 , valoración con NaOH N/10 y deducción del SO_2 según recomienda Jaulmes. (Peynaud (56), pag. 122, 127, 128).

Acido cítrico. Cromatografía sobre papel según Lugg y Overell (41) directamente sobre el vino.

Acido láctico. Oxidación cérica, tras defecación del vino

con subacetato de plomo, y evaluación del etanal formado, según el procedimiento de Casas (12).

Acido málico. Estimación por cromatografía sobre papel, basada en el método de Ribéreau-Gayon (54), modificado por nosotros en el sentido de emplear técnica ascendente y butanol-ac. fórmico como disolvente de desarrollo (Lugg y Overell (41)), que permiten una mayor finura en la observación de las manchas de ácidos.

2,3-butilenglicol. Oxidación peryódica a etanal y evaluación de éste después de destilación, de acuerdo con Peynaud (50), haciendo la valoración final de etanal según la modificación de Casas (13).

Densidad. A 15°C. Con picnómetro.

Etanal. Método de Jaulmes y Espezel (35) adaptado a los vinos por Ribéreau-Gayon y Peynaud (55), modificado por Casas (13).

Etanal (en vinos tintos). Procedimiento de Casas (13) con la variante de Campos (7).

Etanol. Oxidación crómica por el método de Semichon y Flanzzy descrito por Peynaud (56) pag. 35.

Extracto seco. Procedimiento de Houdart (Peynaud (56) pag. 79).

Glicerina. Oxidación peryódica, destrucción del HIO_4 sobrante con solución de As_2O_3 y valoración del exceso de éste con solución de I_2 N/50, según la técnica de Fleury y Lange descrita por Peynaud (16), pag. 334.

Materias reductoras de la solución de Fehling. Método de

Bertrand aplicado al vino defecado con sales de plomo. Los resultados se expresan en mmol/l, de glucosa. (Peynaude (56), pag. 285).

Nitrógeno amínico. Por diferencia entre nitrógeno formol y amoniacal.

Nitrógeno amoniacal. Destilación después de alcalinizar el vino con MgO, recogiendo el destilado sobre solución de H_2SO_4 N/20 y valorando el exceso de éste con NaOH N/20 según la técnica de Boussingault descrita por Peynaude (56), pag. 367.

Nitrógeno formol. Método de Sörensen (Peynaude (56), pag. 368), aplicado sobre 50 ml. de vino, modificado en el sentido de determinar electrométricamente el punto final.

Nitrógeno total. Micro-Kjeldahl. Oxidación, con selenio y $HClO_4$, de 20 ml de vino evaporados casi a sequedad, según la técnica de Mallol (42). Arrastre por vapor del NH_3 , después de alcalinizar, el cual se recoge sobre H_2SO_4 N/20 y valoración del exceso de éste con NaOH N/20 empleando indicador de Shiro-Tashiro.

pH. Electrometría con electrodo de vidrio.

SO_2 total. Valoración con solución de I_2 N/50 después de hidrólisis alcalina, por el método de Ripper (Peynaude (56), pag. 384).

Sulfatos. Determinación gravimétrica en forma de $BaSO_4$ (Peynaude (56), pag. 244).

Resultados

Los datos que han servido para construir las gráficas que se incluyen a continuación representan los valores medios de doce muestras de cada escala de Jerez y ocho de cada escala de Montilla.

Comentario

En el examen de las gráficas en conjunto, no se aprecian diferencias, sino cuantitativas, entre la evolución de los componentes en los vinos de Jerez y Montilla. Con respecto a la pérdida de glicerina, formación de etanal, acetal y butilenglicol, y disminución de densidad y extracto durante la crianza, singularmente a la evolución de los dos componentes primeramente citados, considerados como los más típicos, los vinos de las soleras de Montilla tienen, por término medio, el mismo grado de crianza que las 4ª criaderas de Jerez. La crianza en ambas regiones sigue caminos análogos pero en Montilla es menor el tiempo que los vinos permanecen en el sistema de soleras y, además, por tener un clima más extremado, son más cortos los períodos de condiciones climáticas favorables para el normal desarrollo del velo.

Llama la atención el hecho de que sólo la glicerina, junto con los ácidos láctico y málico, varía de un modo regular durante toda la crianza. Su disminución, es continuada, no sólo en cuanto a los valores medios

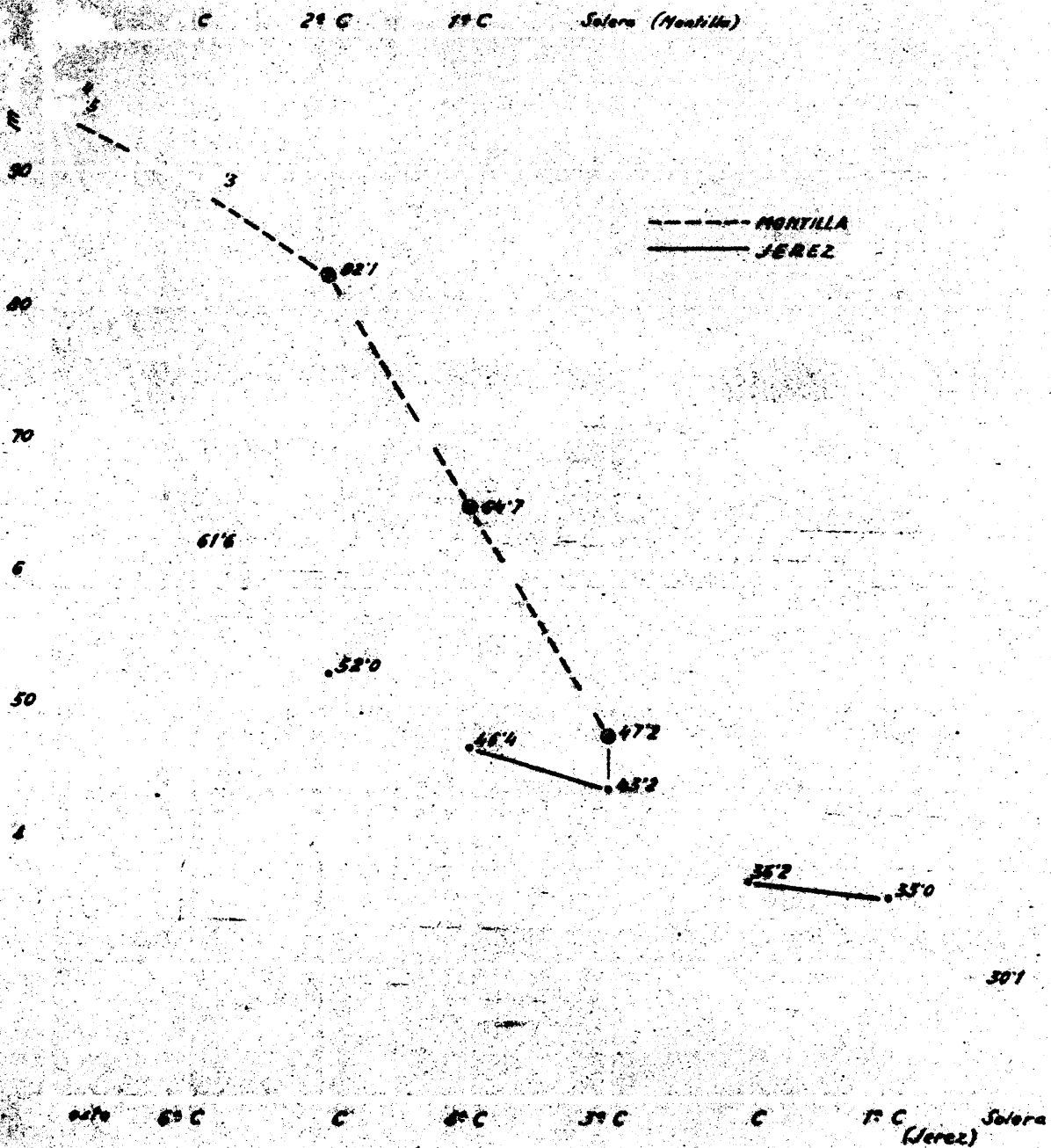


Fig. 1.- Evolucion de la glicerina durante la crianza.

de las series (fig. 1), sino también, dentro de cada se
rie, con la excepción de dos de Jerez y una de Montilla
entre las analizadas. En un sistema de soleras el vino
que contiene menos glicerina es el de evolución más avan
zada y aún esto puede admitirse en líneas generales al
comparar vinos de distintos sistemas.

Puede pues, el contenido de glicerina servir como
base para el conocimiento del grado de crianza mucho
mejor que el de etanol, frecuentemente tomado como
índice, el cual, aunque tiene tendencia a aumentar, lo
hace de un modo bastante irregular y, bajo ciertas condi
ciones, disminuye según ya se ha indicado oportunamente
y según puede verse en la curva correspondiente (fig.2).

Por otra parte es práctica fácil la adición de eta
nal a un vino joven y no lo sería tanto la eliminación
de glicerina.

Es la glicerina el constituyente que acusa mayor va
riación durante la crianza. Su enorme disminución, en com
paración con cualquier otro, indica que debe ser la prin
cipal fuente energética para la levadura.

Aunque en realidad es el etanol el más utilizado -
pero su desaparición no puede apreciarse, en la fig. 2 ,
debido a los rociados periódicos a que se someten las
criaderas, que lo hacen permanecer prácticamente constan
te. Sólo puede observarse el encabezado de los mostos -
de Jerez, más bajos de alcohol que los de Montilla.

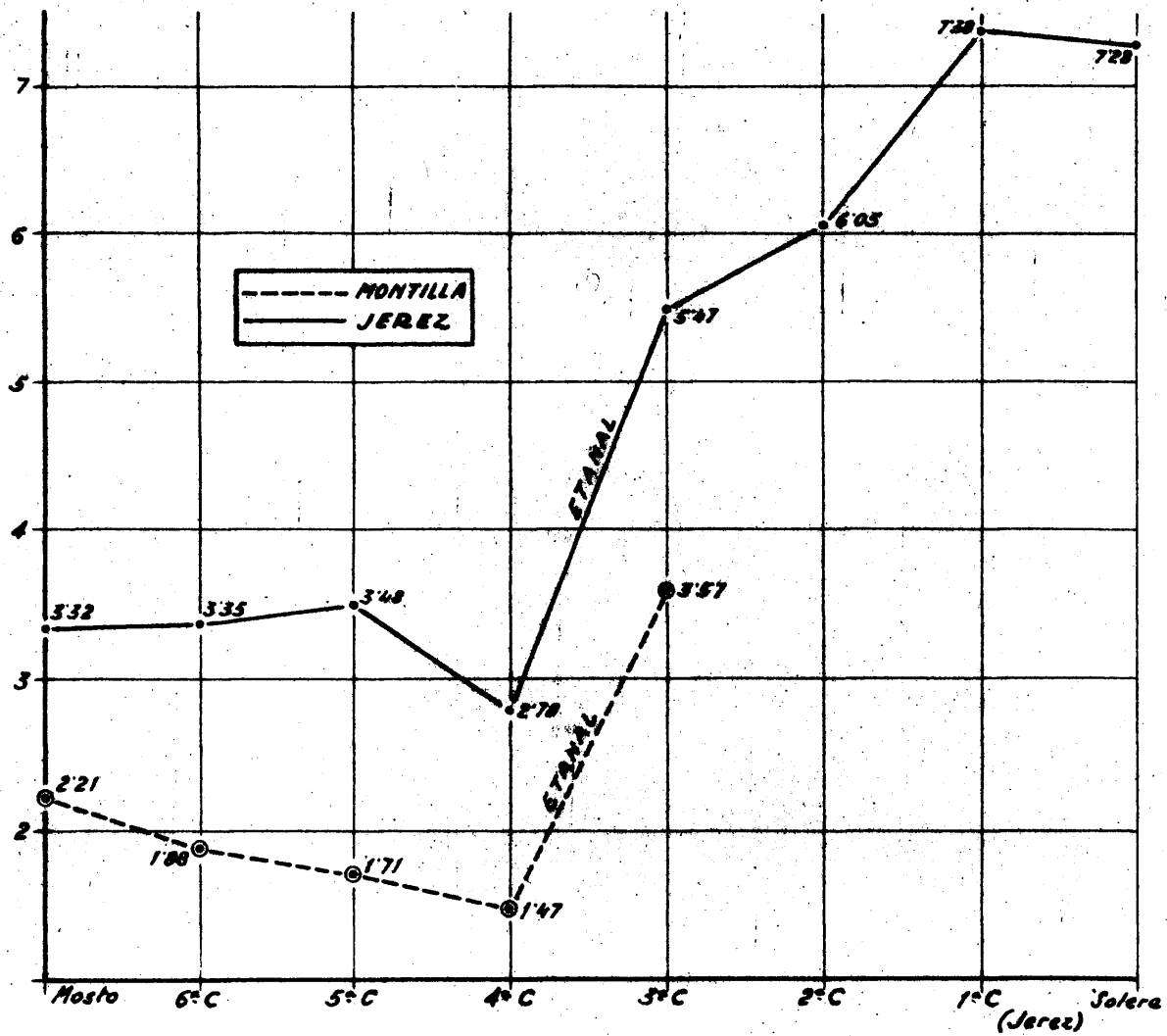
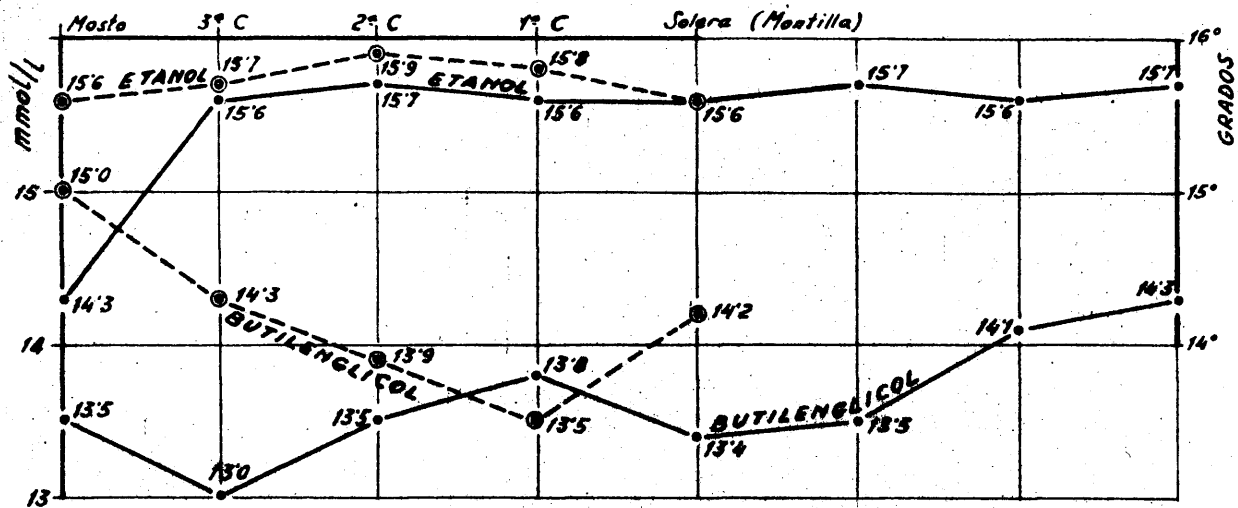


Fig. 2.- Etanol y productos de su transformación en función del tiempo de crianza.

De los productos formados en el metabolismo del etanol, es al etanal al que se concede la mayor importancia. Su concentración aumenta extraordinariamente aunque no de un modo regular (fig. 2).

El contenido relativamente alto de etanal en los mostos se puede explicar teniendo en cuenta que se acumula rápidamente en las primeras etapas de la crianza y durante el año, por lo menos, que el mosto permanece almacenado en depósitos, antes de pasar a las botas de crianza, se inicia siempre formación de velo, produciéndose durante este plazo, cantidades de etanal de dos a cuatro veces mayores que las que suelen aparecer en vinos de otras regiones.

Otros componentes, que se forman sólo en pequeñas cantidades, parecen originados en una evolución del etanal. Tales son acetal, acetoina y 2,3-butilenglicol.

Al primero se le señala gran importancia en el aroma y sabor de los vinos de flor. Se forma en mayor proporción en las últimas etapas de la crianza cuando ya se ha acumulado bastante etanal (fig. 3) y, por ello, en los vinos de Montilla aparece en escasa cantidad y aún llega a faltar por completo en algunas criaderas y soleras.

En relación con el etanal su concentración aumenta constantemente, como puede deducirse de la pendiente, casi siempre negativa, de las curvas correspondientes (fig. 4)

3°C 2°C 1°C Solera (Montilla)

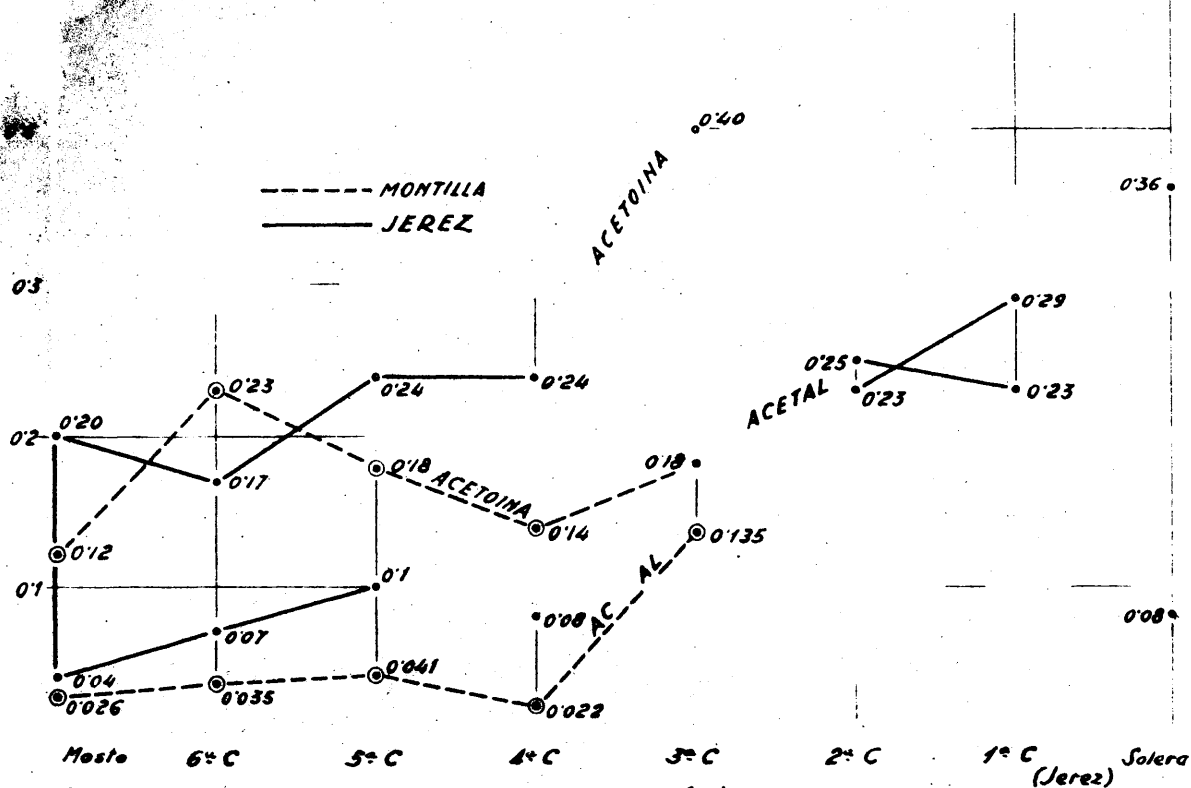


Fig. 3.- Evolucion de acetal y acetoina.

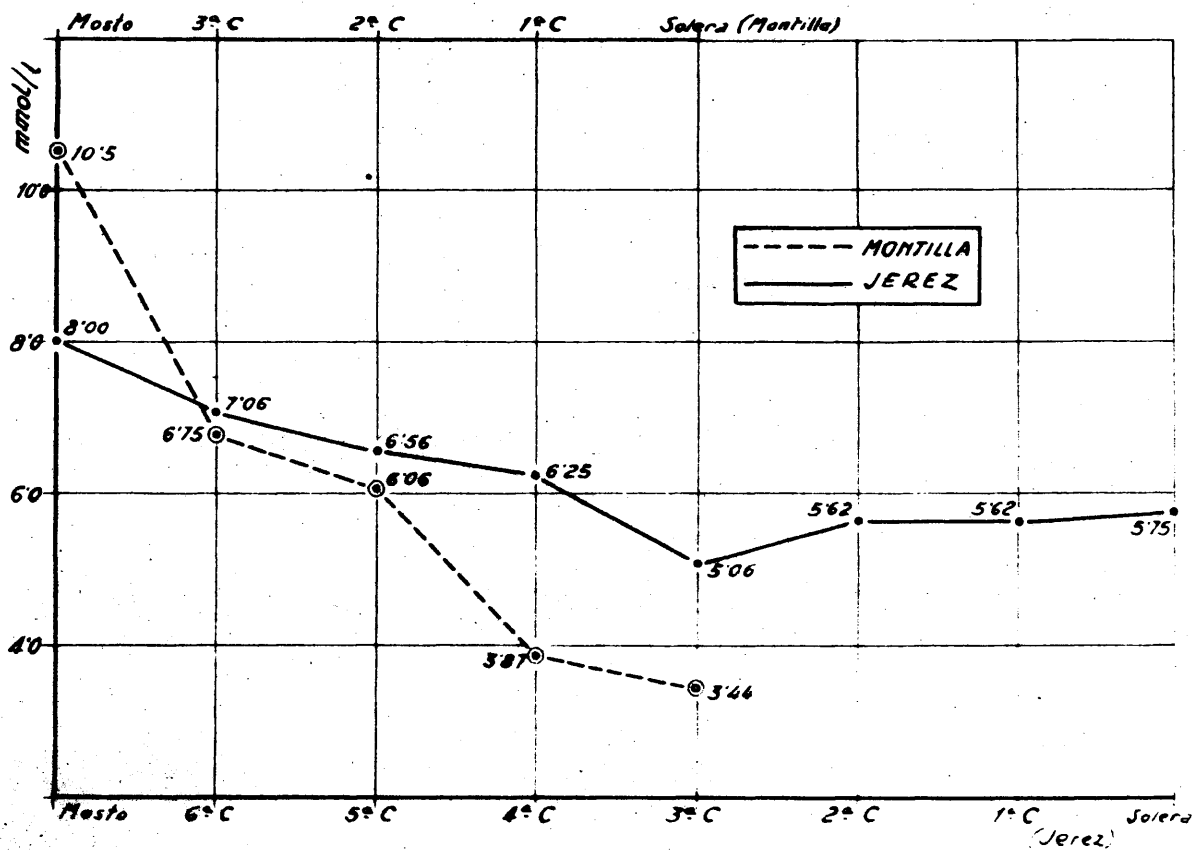


Fig. 8.- Concentracion de materias reductoras en relacion con el tiempo de crianza.

La acetoina (fig.3), que puede proceder de una condensación acetoinica de etanal, tiene una variación sumamente irregular en la que destaca, sin embargo, un aumento de concentración hasta cierto punto a partir del cual se reduce de nuevo. Y el butilenglicol (fig.2), dentro también de su irregularidad, manifiesta una clara tendencia a aumentar, aunque en pequeña proporción. En todo caso, el contenido en estos componentes de los vinos de flor es superior al de los vinos sometidos a otros sistemas de envejecimiento.

La formación de glicol y acetoina transcurre con menos rapidez que la de etanal, según se deduce de las curvas que indican la relación de sus concentraciones (fig.4).

Las curvas de acidez total y fija (fig.5) presentan un mínimo, lo que indica la existencia de dos fenómenos opuestos uno de los cuales predomina hasta cierto momento a partir del cual se impone la influencia del otro. Efectivamente existe, de un lado, la pérdida de acidez por precipitación de bitartrato potásico, por utilización del ac. acético por la levadura y también por consumo de los ácidos málico y cítrico por ataques bacterianos y, de otro, formación de acidez en el metabolismo y autólisis de la levadura, debida principalmente a la acumulación de ac. láctico.

Pero no sólo a este ácido se debe tal incremento, pues la acidez fija no láctica (fig.5), si bien como las

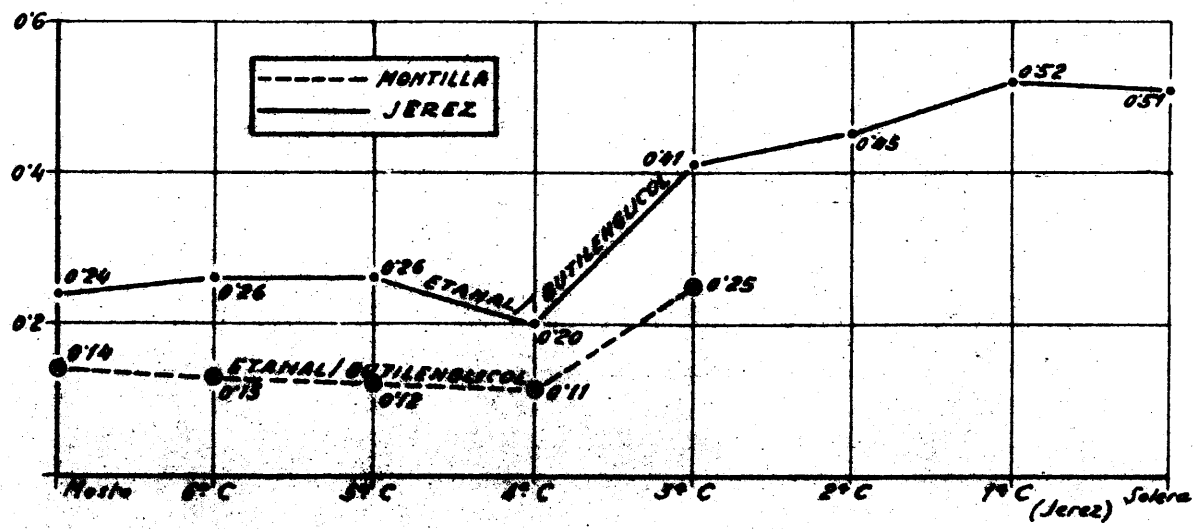
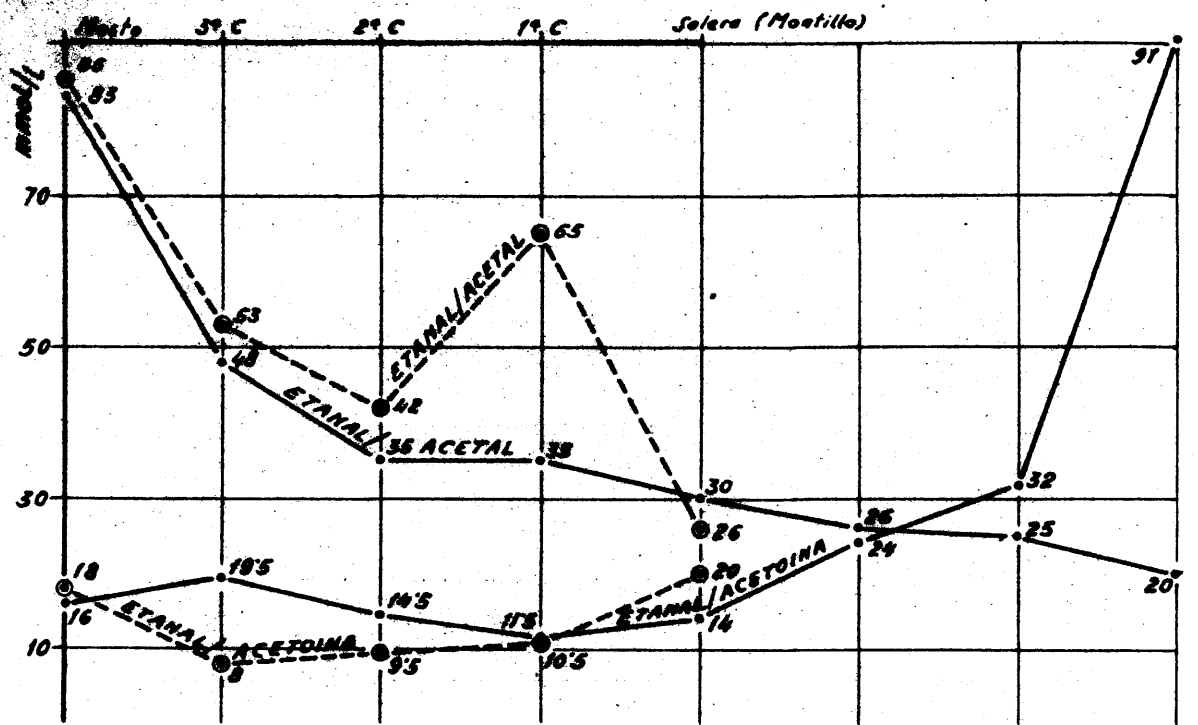


Fig. 4.- Relación de etanol a sus productos de transformación.

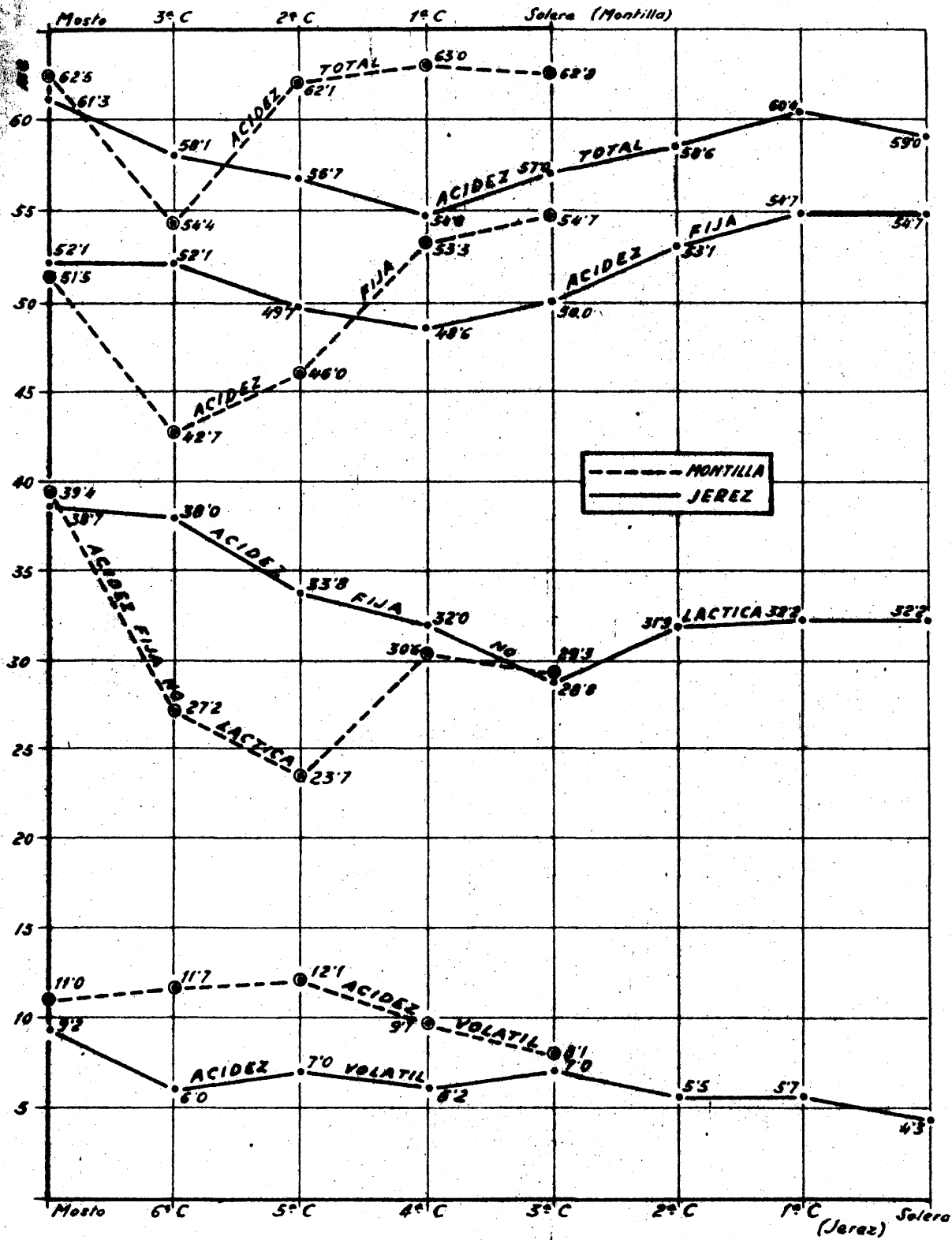


Fig. 5.- Variación de la acidez durante la crianza.

otras disminuye al comienzo, tiende más tarde a aumentar, lo que demuestra la formación de otros ácidos. Y no basta para explicar este aumento la formación de ácidos libres al ser incorporados a la sustancia celular las cationes de sales minerales presentes en el vino, pues solo representan una parte del incremento, según hemos comprobado al estudiar la variación de acidez en medios sintéticos.

La más acusada disminución de acidez total se aprecia en el mosto antes de pasar a las botas de crianza. Aunque durante el tiempo que se mantiene el mosto en botas o depósitos desarrolla algo de velo, su evolución no suele ser muy intensa y por ello predomina notoriamente el efecto de disminución. Después de un cierto plazo en crianza, la acidez aumenta hasta superar a la existente en la última criadera, que es donde realmente aquella se inicia.

El mismo camino sigue la acidez fija aunque su aumento es más marcado.

La gradual aproximación de las dos curvas de acidez indican la pérdida de ac. volátil, más acusada en los vinos de Montilla que tienen una acidez inicial más alta debida, entre otras posibilidades, a que las especies de levaduras que pueden producir cantidades de alcohol tan altas como tienen los vinos de aquella región también suelen formar mayores cantidades de ácido acético durante la fermentación.

La acidez volátil disminuye siempre en el vino terminado con relación al mosto, pero con numerosos altibajos en su trayectoria (fig. 5), que pueden representar el resultado de ataques bacterianos, más evidentes durante las épocas en que la flor no actúa, y de la evolución del etanal por la acción de la levadura bajo condiciones de anaerobiosis.

De acuerdo con el pequeño aumento de acidez el pH - tiene una ligera tendencia a disminuir (fig. 6) pero en general varía poco y se mantiene dentro de los límites - considerados como más adecuados para la fase de velo.

En cuanto a los ácidos individualmente considerados, la concentración de ácido málico, nunca muy grande en los mostos, se reduce hasta límites por debajo de la sensibilidad del método analítico. La disminución es rápida (fig. 7) si es debida a la actividad del velo o de bacterias será objeto de estudio especial. Puede realizarse su transformación en ácido láctico pero en todo caso la cantidad que desaparece del primero es muy inferior a la que se forma del segundo.

El bajo contenido de los mostos en ácido málico puede deberse a la fermentación malo-láctica, pues los datos están tomados de vinos de un año. Abona esta posibilidad el que los mostos de Montilla, de una graduación alcohólica tal que crea condiciones difíciles para la actividad bacteriana, tienen casi doble concentración de ácido máli-

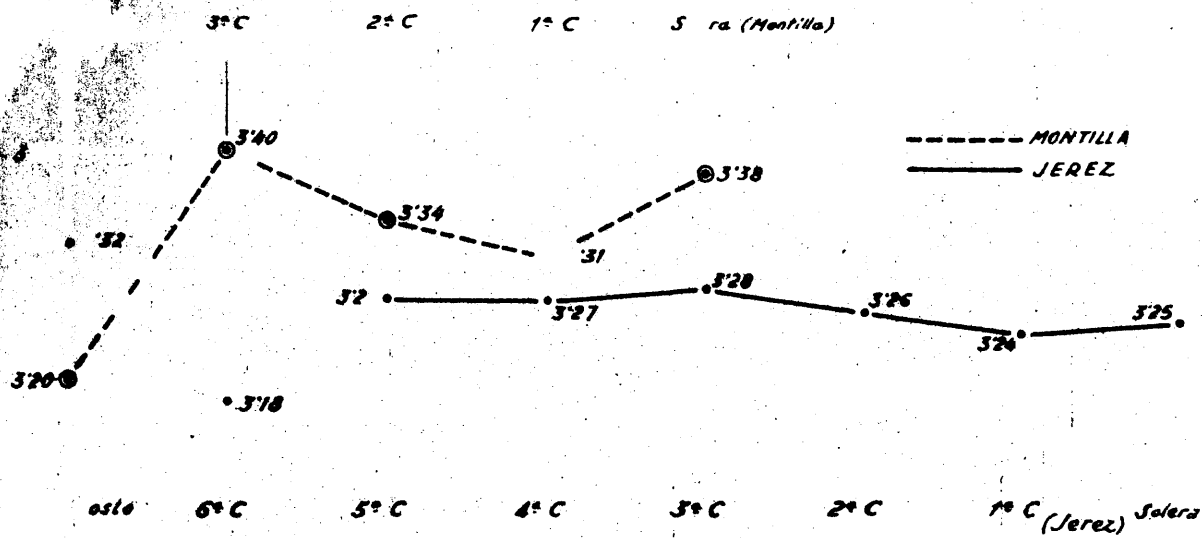
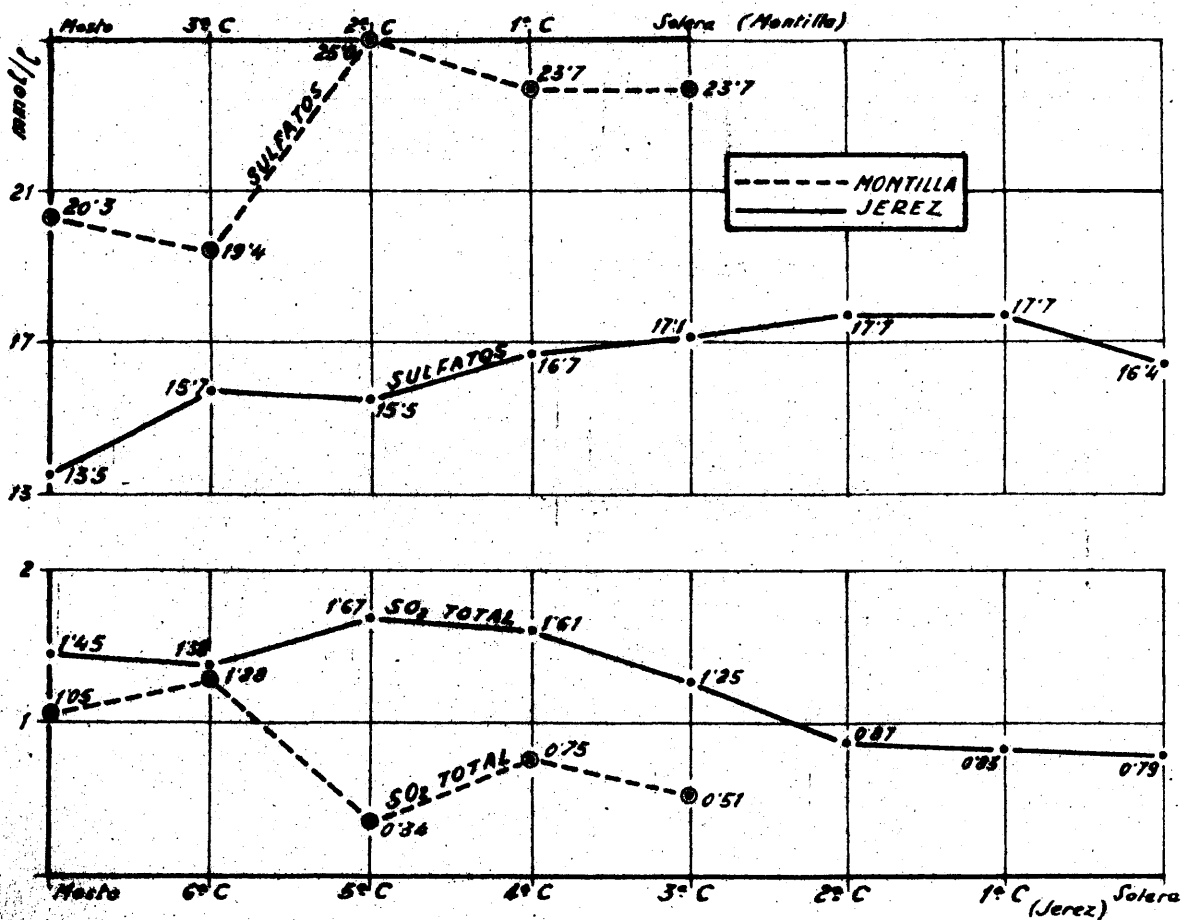


Fig. 6.- pH en relación con el tiempo de añejamiento.



12.- Concentración de SO₂ y sulfatos en las criaderas.

co que los de Jerez, lo que resultaría extraño aún tratándose de mostos procedentes de variedades ~~procedentes~~ ^{diferentes} de uva. Otras posibles razones serían el clima adverso y la fermentación y conservación del mosto en vasijas grandes.

Análogo camino que el ácido málico sigue el ácido cítrico, cuya desaparición pudo observarse en todas las series (tabla I)

T A B L A I

Variación del ácido cítrico durante la crianza en la bodega

Mosto	6°C	5°C	4°C	3°C	2°C	1°C	Solera	Región
+	+	+	-	-	-	-	-	Jerez
+				+	-	-	-	Montilla

Debido a que el método analítico apenas permite más que su determinación cualitativa nos hemos limitado a señalar con signos (+) la abundancia relativa de ácido y con signos (-) la imposibilidad de detectar su presencia.

El ácido láctico aumenta notablemente en la crianza (fig. 7). De mostos con un contenido inicial de 1 g/l se llega a duplicar esta cantidad e incluso a triplicarla en alguna bodega aislada. Este incremento es mayor en las criaderas más jóvenes y señala cierta correspondencia con la disminución de glicerina que para algunos autores es el origen de este ácido, lo que nos ha movido a realizar un estudio más completo, en medios adecuados, de la posi-

ble relación que los une. Al final de la crianza persis
te, aunque menos marcado pues no hay que olvidar que el
ácido láctico es fuente nutritiva para la levadura.

La curva que indica la variación de la concentra -
ción de materias reductoras de la solución de Fehling
también presenta un mínimo en las criaderas de Jerez -
(fig. 8). Las acciones opuestas son, en este caso, el -
consumo de azúcares por su utilización en el metabolismo
de la levadura y la formación de acetoina, dihidroxiace -
tona y otros reductores por la misma causa. En Montilla,
donde la crianza es más corta, no se llega a apreciar -
sino la disminución.

Para estudiar la evolución del nitrógeno en sus di -
ferentes formas sólo hemos podido disponer de ocho mues -
tras de cada criadera de Jerez y de seis de Montilla, -
por lo que las consecuencias no pueden tener el mismo va
lor que en los casos anteriores.

Sin embargo se puede destacar el hecho de que en -
las curvas representativas vuelven a aparecer mínimos ,
(fig. 9), sin que en ningún caso se observe una caída -
progresiva del nitrógeno, ni dentro de cada serie, con
muy raras excepciones, ni en los valores medios, sino un
descenso hasta cierto límite seguido de un estacionamien -
to o una elevación posterior de la concentración, no fal -
tando series en que esta elevación se manifiesta desde
la última criadera. Hecho que concuerda con los resulta

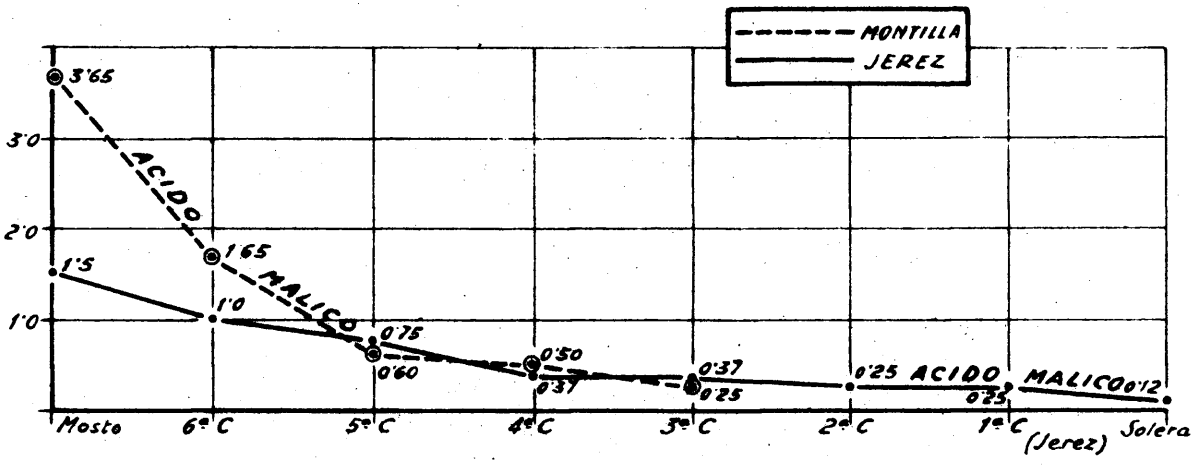
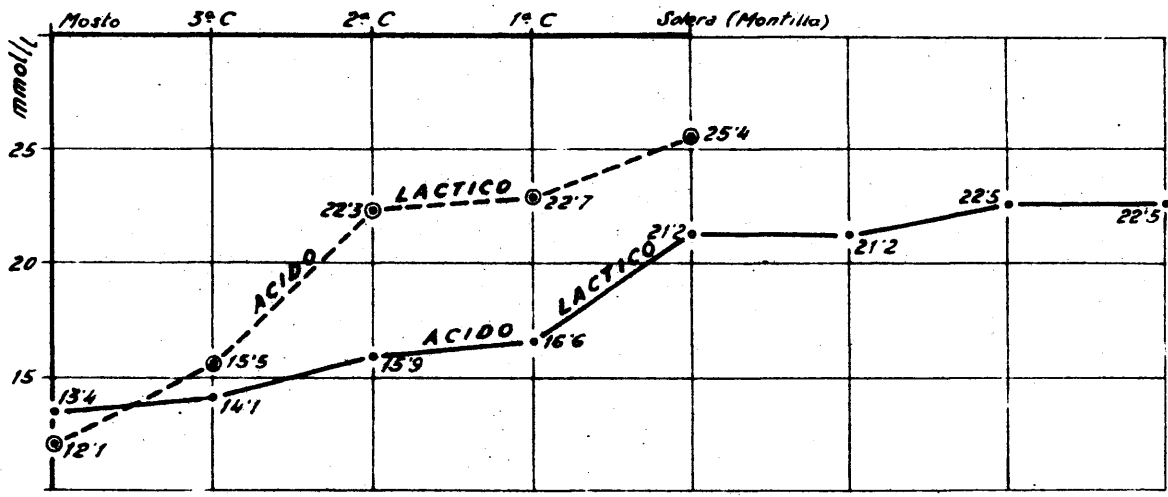


Fig. 7.- Evolucion de los acidos málico y láctico.

dos de experiencias más recientes, realizadas por nosotros en escala de laboratorio, a temperaturas convenientes y con desarrollo constante de velo.

En estas condiciones, después de un descenso de la concentración del nitrógeno en todas sus formas se llega a un estado en que tiende a permanecer constante, lo que indica la existencia de un equilibrio entre la cantidad de este elemento incorporada a la estructura celular de la levadura y la vertida por ésta al medio en el catabolismo y autólisis, cuya consecuencia inmediata es que el vino contiene siempre el nitrógeno total que puede precisar la flor pues constantemente revierte a él en formas asimilables. El predominio de uno u otro fenómeno depende, en un momento dado, de que las condiciones externas sean favorables o no para el desarrollo de la flor y de ahí que los valores de nitrógeno puedan ser los antes referidos.

El aumento en nitrógeno durante la crianza, es bastante claro en las criaderas de Montilla y no tan aparente en las de Jerez teniendo en cuenta la poca seguridad que podemos tener en nuestras deducciones. Pudiera guardar relación con la idea tan extendida de que la levadura en fase de velo es capaz de utilizar nitrógeno de la atmósfera, punto que ha sido estudiado con algún detenimiento en la 3ª parte de esta tesis.

También crece la concentración de nitrógeno formol en los vinos de Montilla, quizá porque en la autólisis -

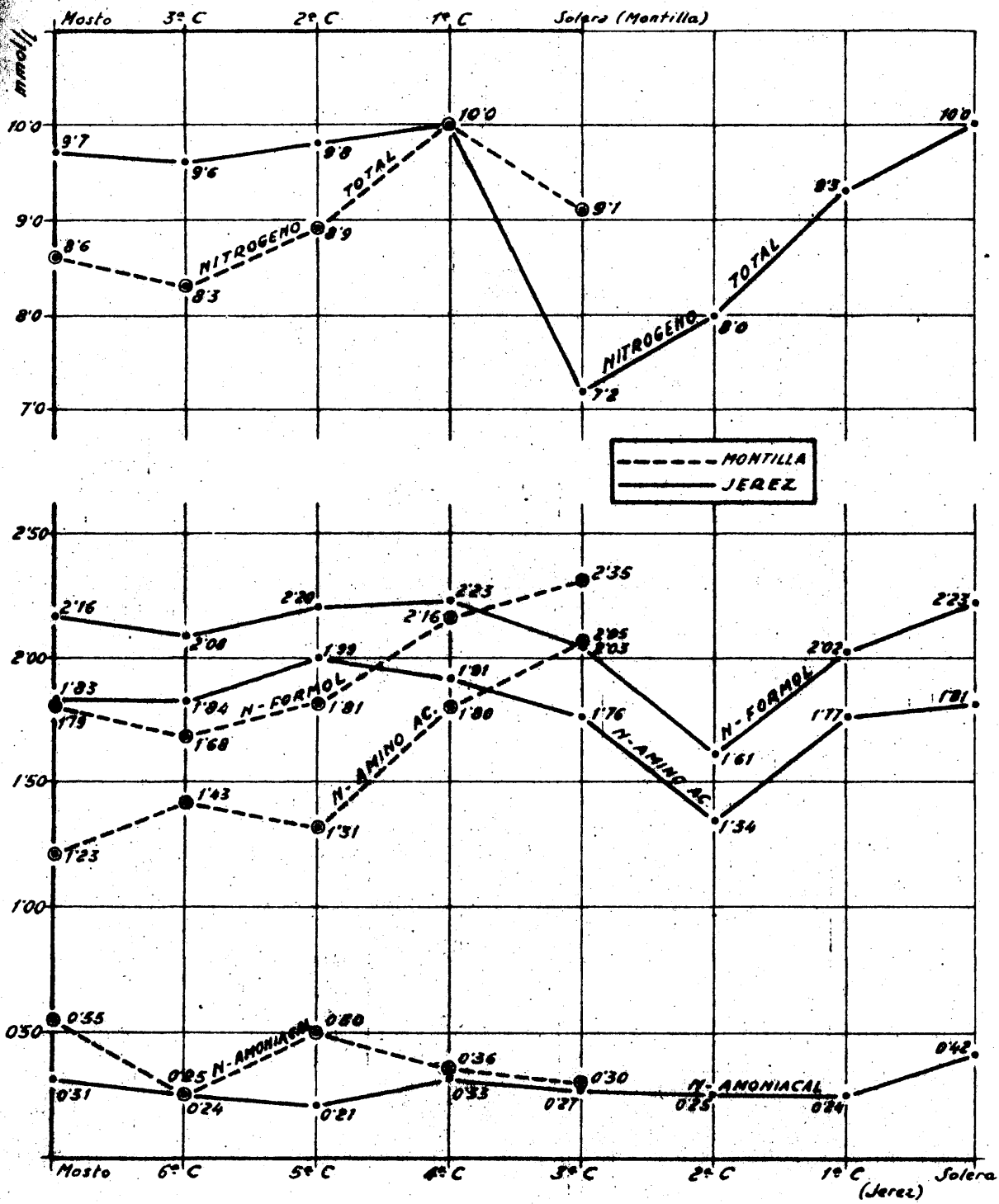


Fig. 9.- Evolucion del nitrógeno durante la crianza en bodegas.

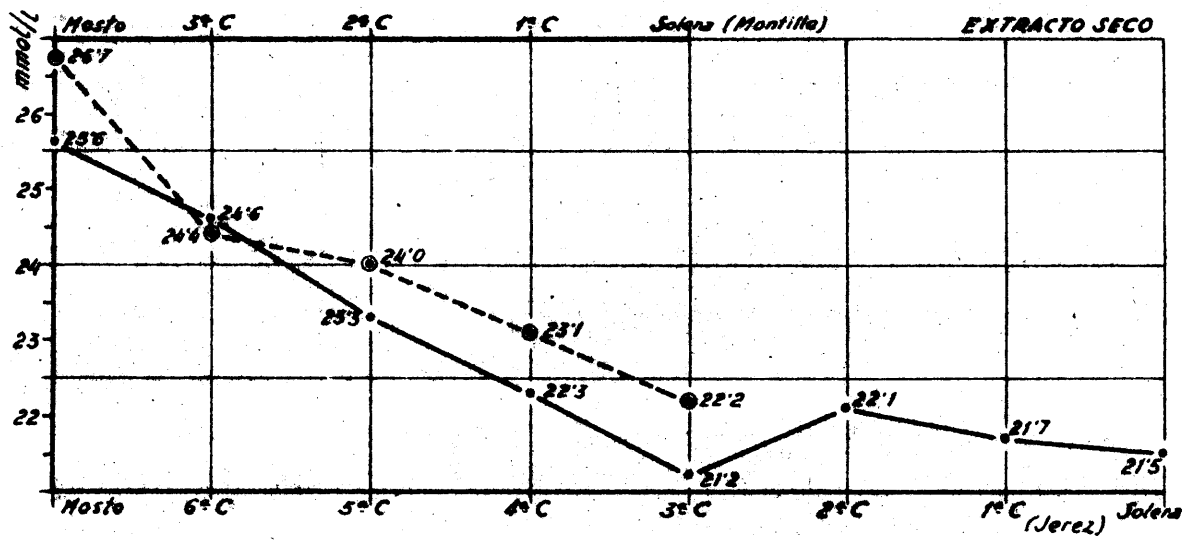
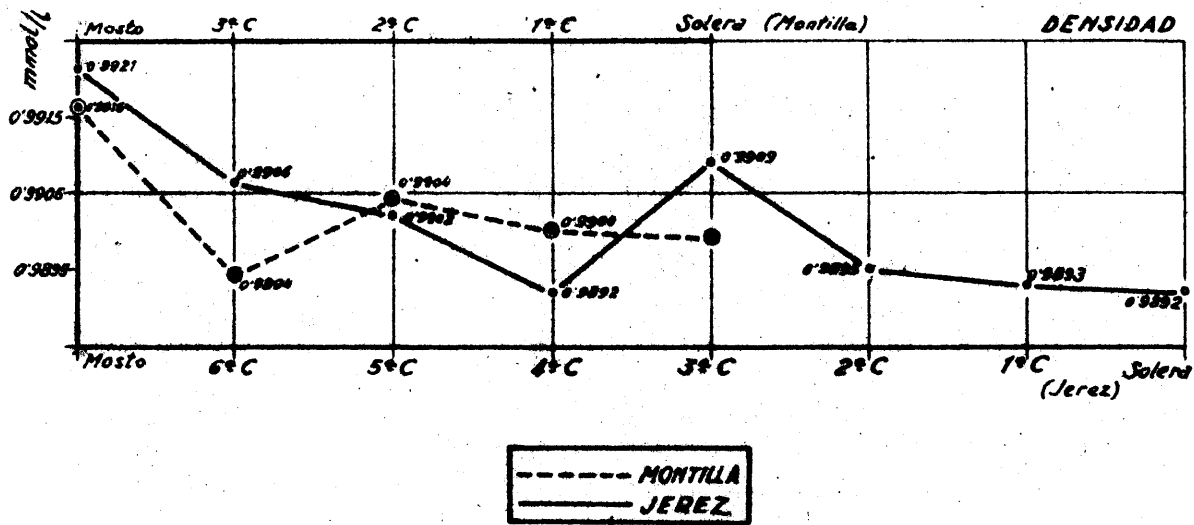
de la levadura se liberan con preferencia aminoácidos o péptidos.(fig. 9)

Prácticamente el mismo camino sigue el nitrógeno - amínico (fig. 9), que sólo se diferencia del anterior - en el nitrógeno amoniacal, siempre existente en muy pequeña cantidad.

Y en cuanto a este último (fig. 9), la concentración presente es tan baja que no es posible establecer sino - que parece tener tendencia a permanecer constante, tal vez porque, estando en tan pequeñas concentraciones, la levadura prefiere utilizar nitrógeno en otras formas más asequibles.

La densidad y el extracto seco disminuyen poco (fig. 10 y 11) pero constantemente, lo que está de acuerdo con la desaparición de los componentes más densos, glicerina, ac. tartárico y ac. málico, sólo en parte sustituidos por otros más ligeros, como etanal y ac. láctico. Ambas curvas presentan una primera rama de mayor pendiente que coincide, más o menos, con la mayor pérdida de glicerina y acidez total. El extracto, en las criaderas de Jerez, disminuye con notable regularidad en las primeras fases de la crianza para después mostrar una mayor tendencia a permanecer constante. En Montilla sólo se aprecia disminución, también muy regular.

Por último, de los componentes minerales, hemos seguido la evolución de sulfatos y ac. sulfuroso (fig.12)



Figs. 10 y 11.- Densidad y extracto seco segun el tiempo de crianza.

La concentración de sulfatos es siempre muy alta como consecuencia de la adición de yeso al mosto antes de fermentar, práctica muy discutida pero llevada a cabo en casi todas las vendimias. Durante la permanencia del vino en las criaderas aumenta todavía más llegando a alcanzar, en algunas bodegas, valores de 4,5-5,5 g/l expresados como K_2SO_4 .

Las curvas que representan la variación del SO_2 y SO_4 siguen caminos opuestos tramo a tramo, correspondiendo a un aumento del primero una disminución del segundo y viceversa, aunque estas variaciones no se corresponden mol a mol.

SECCION II

ESTUDIO DE LA CRIANZA EN EL LABORATORIO

Se trataba de conocer la posibilidad de llevar la crianza bajo condiciones que permitieran su fácil control y una mayor rapidez y comodidad en la realización de todas las operaciones que implica.

De acuerdo con tales propósitos se hizo una selección de levaduras capaces de formar velo y las que dieron mejores resultados en las pruebas a que fueron sometidas se sembraron en matraces con poco volumen de vino, siguiendo mediante análisis la evolución de éste.

Después, con el fin de encontrar una relación de superficie con velo a volumen de vino que permitiera hacer una crianza ni tan rápida que se hiciera difícil su control ni tan lenta que resultara larga, se realizaron experiencias en cubetas de vidrio, con vino hasta distintas alturas, teniendo en cuenta, primordialmente, los caracteres organolépticos del vino obtenido y los resultados se aplicaron al planeamiento y diseño de una bodega para crianza controlada de vinos en las condiciones más favorables para su rápida evolución.

Por último se estudió la evolución de vinos tintos bajo flor y la posibilidad de dar crianza a vinos blancos y tintos de diferentes procedencias.

Capitulo 1º

ELECCION DE LEVADURAS

Aislamiento y selección

Las levaduras procedían de muestras de vino en botellas, tomadas de diversas criaderas de Jerez y Montilla, y se aislaron siguiendo la técnica de la escuela de Perugia (Castelli e Inigo) (16). En total se tomaron 35 cepas con las que se realizó una primera selección teniendo en cuenta la rapidez del desarrollo y el aspecto del velo formado, resistencia al SO₂ y formación de productos típicos, singularmente etanal.

El desarrollo se siguió en mosto estéril y en vino. Cada cepa fué sembrada en tres tubos de ensayo con 8 ml de mosto estéril de 13º Beaumé y en otros tres con la misma cantidad de un vino blanco manchego, de un año, encabezado a 15,5º de alcohol y cuyas características analíticas pueden verse en la pag. 75. Los tubos, tapados con algodón cardado, se mantuvieron en estufa a 15-18ºC. El desarrollo fué el siguiente:

a) En vino formaron velo

En 10 días las cepas nº 7,8,9,10,11,12,13,14,18

En 20 " " " 1, 2, 4, 6, 20

Las restantes cepas tardaron muchos mas tiempo en formar velo o no lo formaron. Los más vigorosos fueron los de las cepas 7 y 13 con apreciable diferencia sobre las demas.

b) Desarrollo en mosto. En unos 12 días todas las cepas terminaron su fermentación y formaron velo

en 10 días las nº 7, 8, 11, 12, 13, 14, 20

en 20 días 1, 3, 4, 6, 18

Todas las restantes llegaron a formar con el tiempo un velo tenue. La cepa 13 tuvo un desarrollo claramente mejor que las otras.

Resistencia al ac. sulfuroso

Tomamos en consideración solo las cepas que desarrollaron velo en el ensayo previo, esto es, las nº 1,2,3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 18, 20. Se prepararon series de tubos de ensayo con vino blanco análogo al utilizado anteriormente, conteniendo 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, mg/l de SO₂. Cada cepa se sembró en 3 tubos. Desarrollaron, en 15 días

Cepas nº 1,2,3,4,6,9,20,	hasta	75 mg/l. de SO ₂			
" 11, 12,	"	100	"	"	"
" 10, 14,18,	"	125	"	"	"
" 13,	"	150	"	"	"
" 7, 8,	"	175	"	"	"
Ninguna	"	200	"	"	"

Formación de productos típicos

Para este estudio se hizo una primera selección, teniendo en cuenta los resultados de las experiencias anteriores, en la que se escogieron las cepas nº 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 18, 20, que se sembraron en tubos de ensayo con vino manchego encabezado a 15,5º y sulfitado a 80 mg/l. Con los velos formados se inoculó una serie de matraces erlenmeyer de 500 ml con 300 ml de vino de la misma clase. Cada cepa se sembró en dos matraces, para obtener muestras medias, y se dejaron otros dos como testigos. Los matraces, tapados flojamente con algodón cardado, se mantuvieron en estufa a 15-18°C. Tardaron de 13 a 18 días en cubrirse de velo arrugado. A los 45 días se hicieron análisis cuyos resultados se exponen en la tabla II.

Comentario

La evolución del vino en matraces fué mas acusada, en general, que en bodegas de crianza. Todas las levaduras, sin excepción, formaron etanal en cantidades siempre superiores a las medias de las soleras y con frecuencia dobles o triples que aquellas. Así mismo la glicerina se consumió en proporciones solo comparables a las que se pierden en una crianza en botas y se observaron fuertes pérdidas de alcohol, que es el componente mas

T A B L A II

Resultados analíticos de la actividad de algunas cepas de "flor"

	Glicerina (mmol./l.)	Etanol (g)	Etanal (mmol./l.)	Ac. total (meq./l.)	Ac. volátil (meq./l.)	Ac. fija (meq./l.)	Ac. láctico (meq./l.)
Vino base inicial	103,4	15,5	2,7	55,4	4,1	51,3	4,0
Vino base final	104,1	14,9	3,1	51,3	7,5	43,8	4,6
Cepa nº 7	20,3	12,0	11,7	52,0	3,8	48,2	6,5
" 8	24,1	11,6	8,1	51,3	4,0	47,3	7,0
" 9	48,6	11,3	11,9	60,3	13,2	47,1	10,0
10	40,1	11,5	11,8	55,7	11,0	44,7	7,5
11	39,5	11,4	12,8	57,9	8,6	49,3	8,0
12	46,7	11,4	10,9	55,8	12,1	43,7	9,0
13	32,7	10,7	10,1	55,6	7,3	48,3	8,1
14	39,2	11,2	20,9	53,1	10,4	42,7	9,7
18	50,8	12,0	15,2	61,0	9,2	51,8	12,8
20	47,3	11,9	13,8	50,6	6,9	43,7	11,6

utilizado por los microorganismos, en una cantidad hasta tres veces mayor que la glicerina, lo que indica una especial importancia de este constituyente, que será objeto de posterior estudio. La acidez total aumentó y la acidez fija disminuyó en relación con los testigos. De ácido láctico, aunque en valor absoluto no se formaron cantidades importantes, el incremento representó del 50 al 300%. Los aumentos de acidez volátil, que algunos matraces presentaban con relación al testigo, fueron debidos a un comienzo de acetificación en los medios, fácil al debilitarse el contenido en alcohol.

La rápida evolución del vino en pequeños volúmenes abre la posibilidad de realizar en poco tiempo una crianza controlada del mismo, al menos por lo que respecta a las primeras fases.

Después de esta serie de ensayos escogimos las cepas nº 7,8,13,14, las tres primeras por su desarrollo y resistencia, y porque formaron bastante etanal con un buen consumo de glicerina; la última porque, con buen desarrollo y aceptable resistencia al SO_2 , formó cantidades extraordinarias de etanal.

Caracterización

Se empleó la técnica de Lodder y Kreger van Rij

Las pruebas de asimilación de azúcares se hicieron sobre caldo de carne adicionado de un 2% del azúcar examinado en tubos de ensayo provistos de campanas invertidas, sistema Durham,

Para la asimilación de azúcares se siguió la técnica de Capriotti (10) y en la asimilación de nitratos y de etanol como único alimento carbonado, la de Stelling Dekker (61).

El poder fermentativo se determinó sobre 50 ml de mosto de uva adicionado de azúcar hasta un 30%, estéril, en matraces erlenmeyer de 100 ml provistos de válvula Müller. El CO₂ desprendido se midió por pérdida de peso.

La esporulación se observó sobre agar-Gorodkova y sobre placa de yeso.

En el cuadro adjunto se dan los resultados de las diferentes pruebas y los diagnósticos realizados. La interpretación de las claves es:

Aspecto de la colonia en gelatina-mosto después de 4 días a 19°C.

M. Colonia redonda, gibosa, con bordes netos. Color blanco o amarillento. No fluidifica la gelatina.

Aspecto microscópico de las células en mosto de uva después de 48 horas a 25-28°C.

A. Células elípticas globosas aisladas o en grupos de pocas unidades.

B. Células globosas u ovales aisladas o en pequeños grupos.

Aspecto microscópico en agar-malta después de 48 horas a 25-28°C.

A. Células elípticas aisladas o en parejas. Gemación - polar, dimensiones normales.

B. Caracter del cultivo en mosto después de 30 días a 20-22°C.

A. Mosto turbio y depósito abundante.

Caracter del cultivo en agar-malta después de 60 días a 18-20°C.

A. Pátina bien desarrollada, lisa, de color blanco mas o menos amarillento.

Punción en gelatina-mosto después de 45 días a 18°C.

A. Desarrollo en clavo con cabeza elevada, fuerte ruptura de la masa sin fluidificación.

Capítulo 2º

CRIANZA EN MATRACES

Material y medio

Se ensayaron las cepas nº 7, 8, 13, 14, Para cada una se preparó una serie de 15 matraces erlenmeyer de 500 ml con 300 ml de mosto de Montilla, sulfitado a - 120 mg/l y clarificado con bentonita para eliminar las levaduras y otros microorganismos eventualmente presentes.

Las cepas se sembraron previamente en matraces de 100 ml con 50 ml de vino análogo tyndalizado y de los velos formados se tomaron, con asa de platino en condiciones estériles, cuatro asas para cada matraz de la experiencia.

Otra serie de 12 erlenmeyer, sin sembrar y adicionada de 1 g/l de NaF para evitar desarrollos microbianos, se dejó como testigo.

Durante toda la experiencia la temperatura fué mantenida entre 15 y 18°C.

Los métodos de análisis son los descritos en las pag. 48 a 50. Se hizo un análisis inicial del mosto y los restantes, al primero a los 14 días de la inoculación y después cada ocho días hasta terminar, empleando

en cada caso el contenido medio de tres matraces. Para determinar el peso del velo formado la levadura se recogió en filtros tarados, se lavó bien y se desecó, primero a 35° y luego, durante doce horas, en estufa a 70-75°. La pesada se hizo con un error menor que 5 mg. Las masas de velo que se representan en las gráficas corresponden a la media por matraz calculada sobre el total recogido de tres matraces.

Comentario

Todas las cepas, incluso perteneciendo a especies diferentes, actuaron sobre el vino de una forma semejante, especialmente cuando los velos habían tenido ya bastante desarrollo, hecho interesante que demuestra la posibilidad de llevar la crianza con cultivos puros, de una sola especie, en fase de velo sin que el vino pierda cualidades respecto al añejado con levaduras espontáneas, donde pueden concurrir, y de hecho concurren, especies diversas.

Destaca la cepa 7 de *S. oviformis* por ser de superior actividad que las restantes, muy similares entre sí. Su multiplicación celular fué más activa y, paralelamente, fué mayor el consumo de las fuentes carbonadas (alcohol, acidez volátil y glicerina) y la formación de etanal y de sustancias ácidas.

Las curvas que representan el desarrollo de los ve-

PESO DE VELO

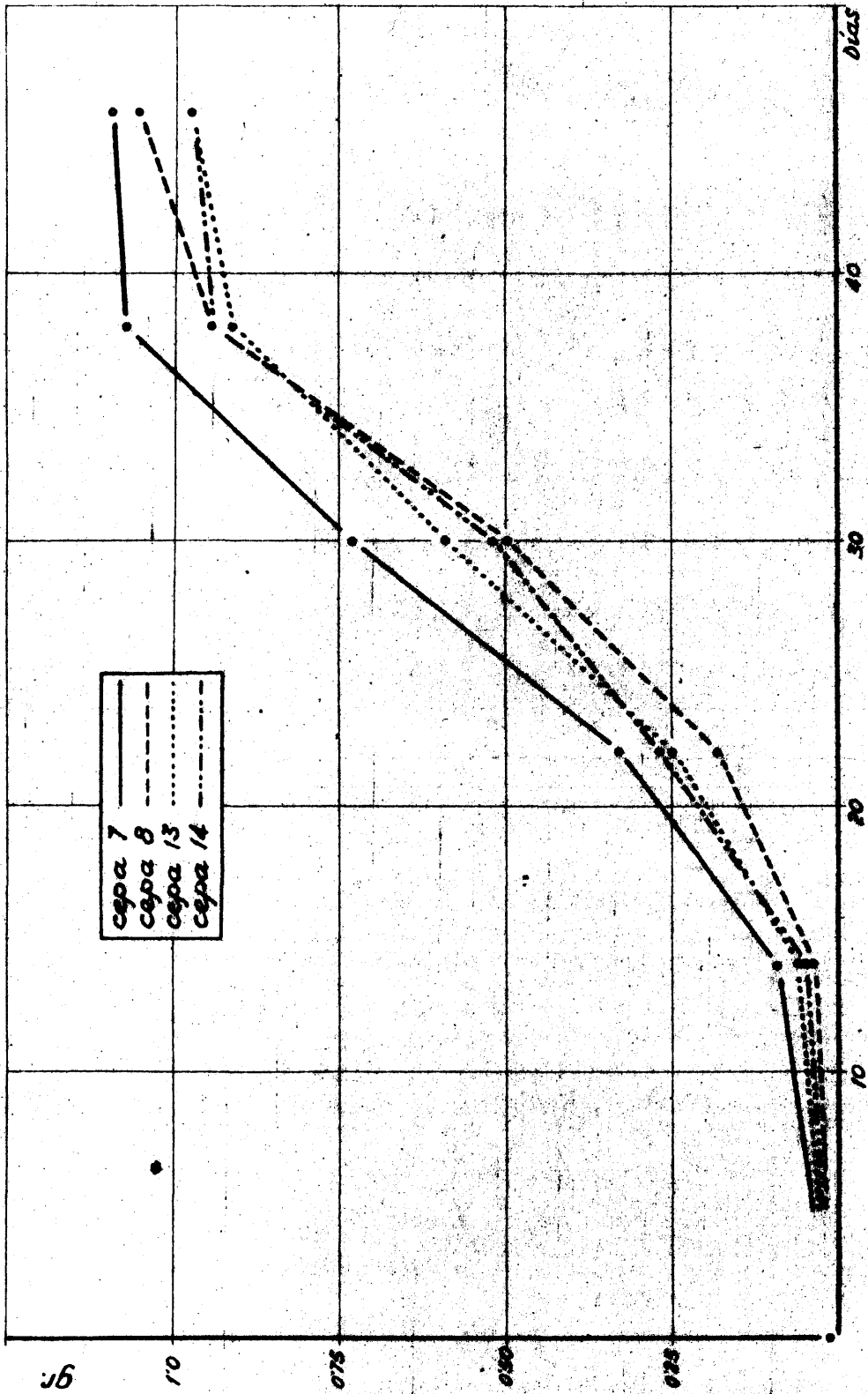


Fig. 13

GLICERINA

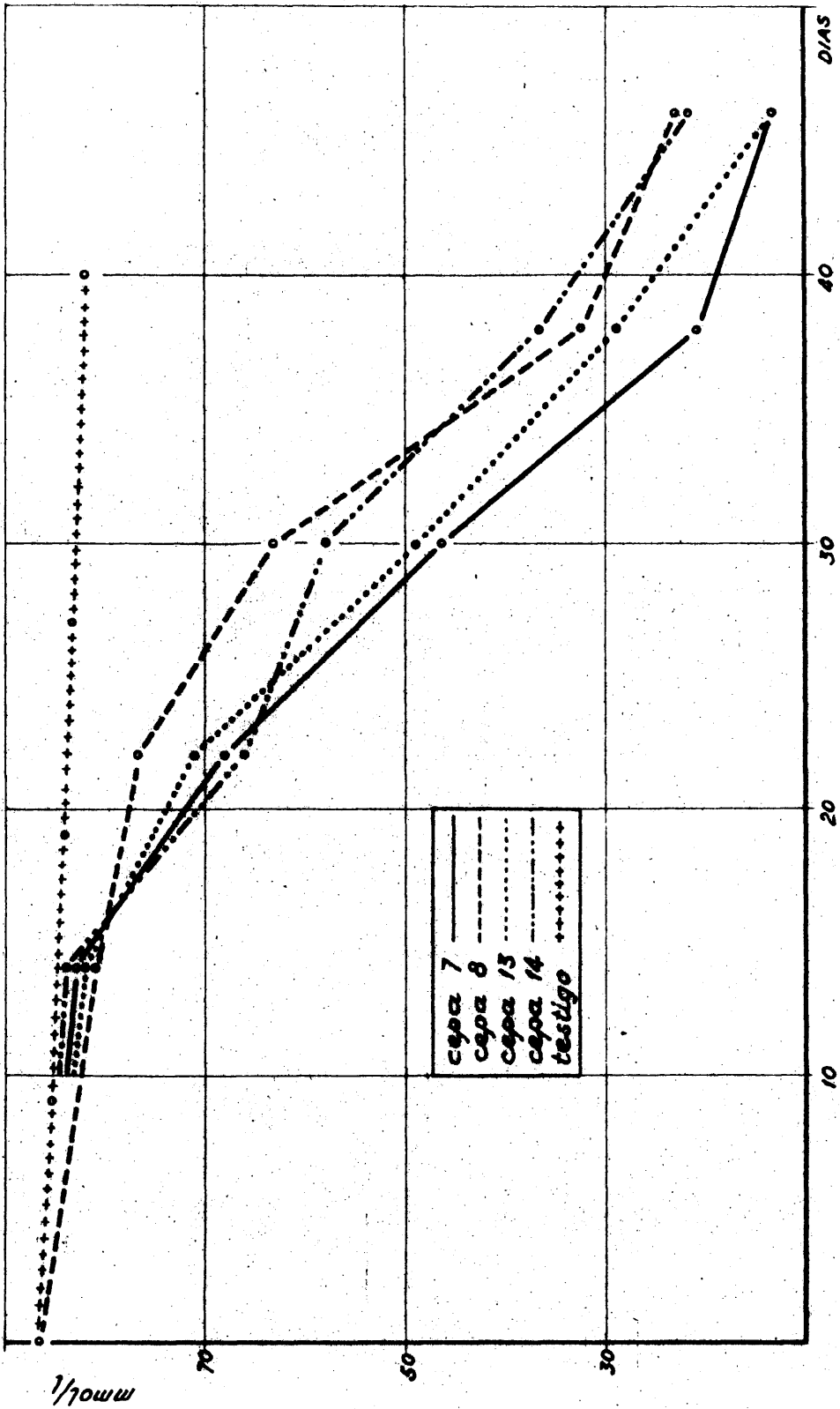


fig. 14

los (fig.13) están formadas por tres ramas claramente diferenciadas. Una primera en que el aumento de peso es pequeño en valor absoluto, aunque hay muy activa multiplicación, y que corresponde a una pequeña evolución del vino en casi todos sus componentes a excepción de etanol y etanal, a la cual sigue otra rama casi recta y de pendiente pronunciada, coincidiendo con un fuerte consumo de glicerina, acidez volátil y etanol en tanto que el etanal deja, prácticamente, de acumularse y tiende a permanecer constante, y una tercera en la que el velo apenas crece en peso quizá debido a la falta de factores nutrientes y al exceso de productos catabólicos, y también a la dificultad de acoplarse más células en la superficie de que disponen.

Se confirma la amplia utilización de la glicerina por la levadura, 6 g/l durante el ensayo. La curva correspondiente (fig. 14) sigue un camino inverso de la que da el aumento de peso; casi nula disminución al principio, consumo rápido y más suave al final, en tanto que en los testigos apenas hubo variación.

Aunque también hay pérdida de alcohol en los testigos (fig. 15), por evaporación, ésta representa apenas el 40% de la pérdida total, durante el transcurso del ensayo, con relación a la cepa 7 y no llega al 50% para las demás, lo que significa que se han utilizado por el microorganismo de 14 a 20 g/l, de dos a tres veces más

ETANOL

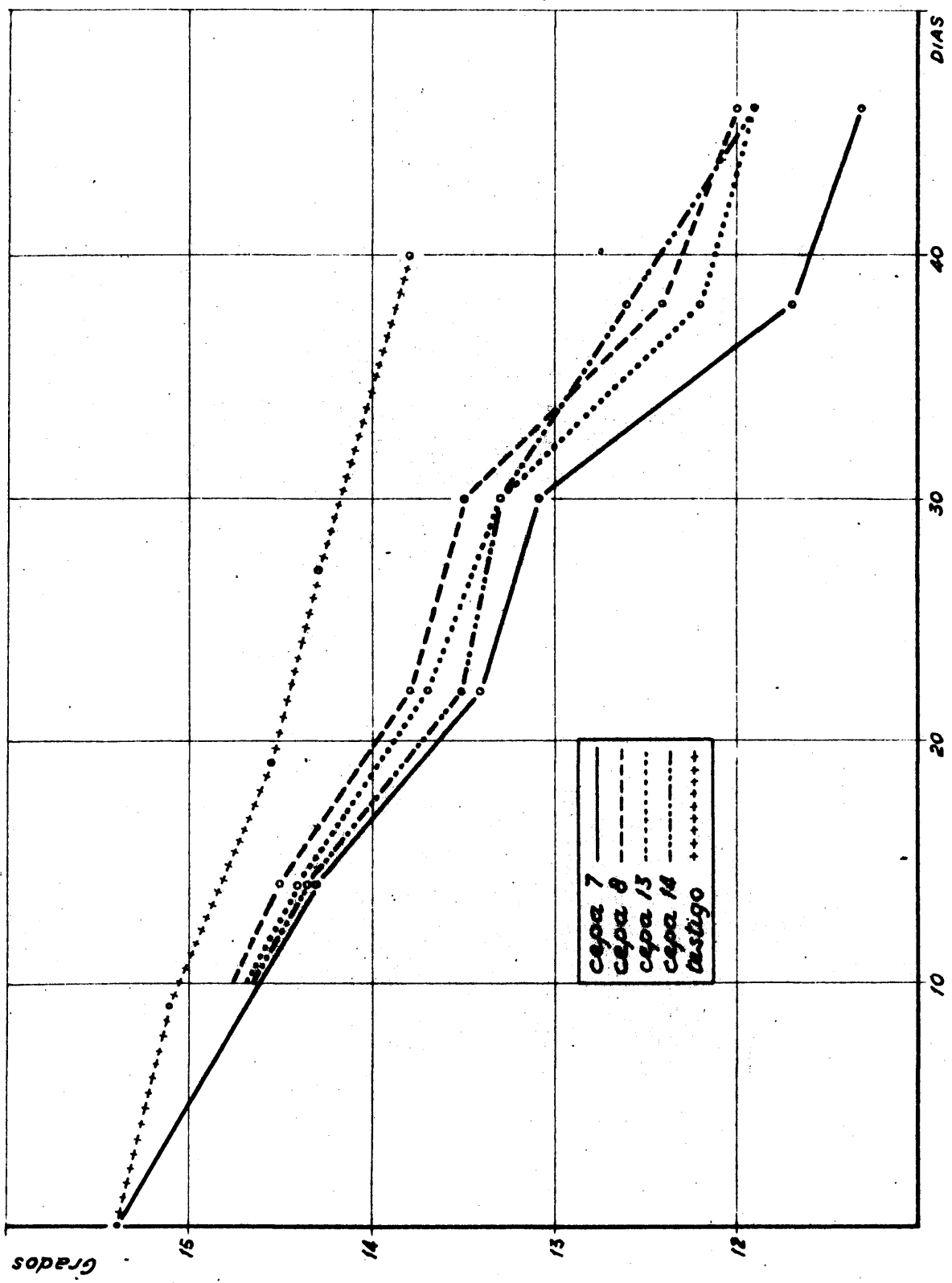


fig. 15

ETANAL

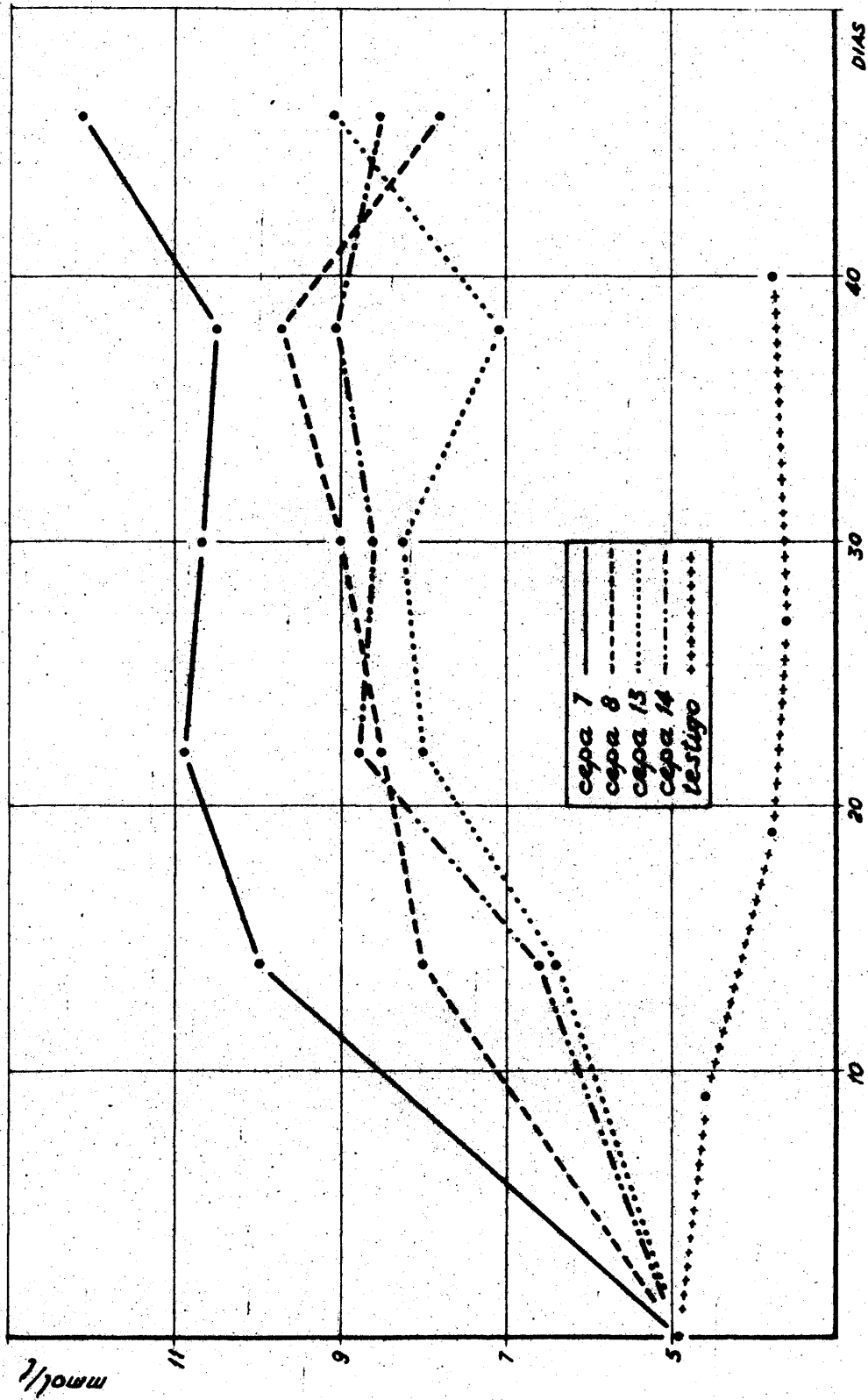


fig. 16

BUTILENGLICOL

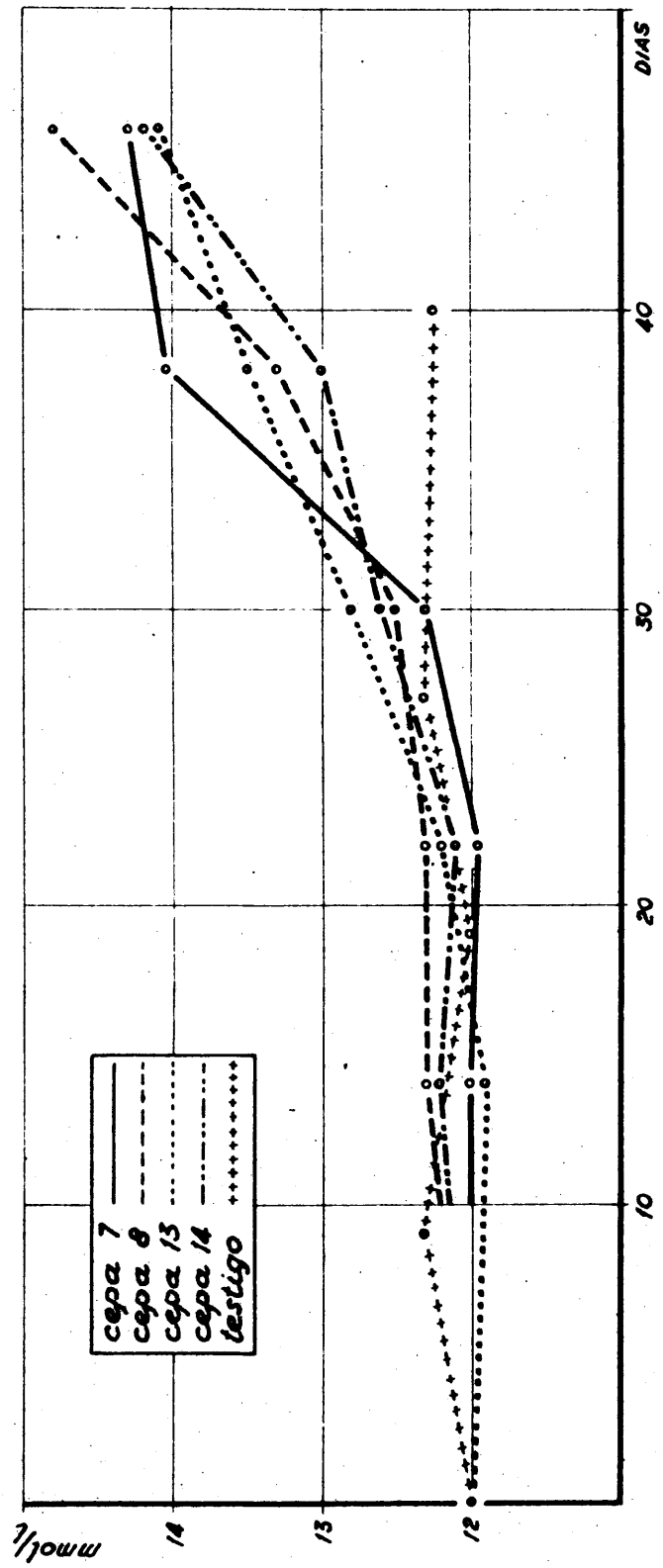


fig. 17

que de cualquier otro componente. Esto supone una pérdida que puede parecer exagerada por que se presenta a la vista pero que no es mayor que la existente en la bodega, si bien allí no se hace tan patente al corregirse con los rociados.

De los considerados productos de transformación del etanol, como etanal y butilenglicol, las variaciones son las correspondientes a una crianza avanzada (fig. 16 y 17).

Destaca el hecho de que el glicol sólo comienza a acumularse claramente después de transcurrida la mitad del tiempo de experiencia cuando la concentración de etanal tiende, con algunas alternativas, a permanecer constante.

La máxima cantidad de acetaldehído aparece cuando todavía no se ha espesado el velo de flor, lo que contrasta con la poca actividad de la levadura en esta fase sobre la acidez fija y volátil, ac, láctico, butilenglicol y glicerina, que apenas varían. Puede decirse, a la vista de las gráficas que, en las primeras etapas de su desarrollo, la levadura actúa casi exclusivamente sobre el etanol y sus derivados.

No ha podido apreciarse formación de acetal, producto también de evolución del etanal.

Las curvas de acidez total y fija (f. 18 y 19) presentan mínimos hacia la mitad del tiempo de la experiencia

ACIDEZ TOTAL

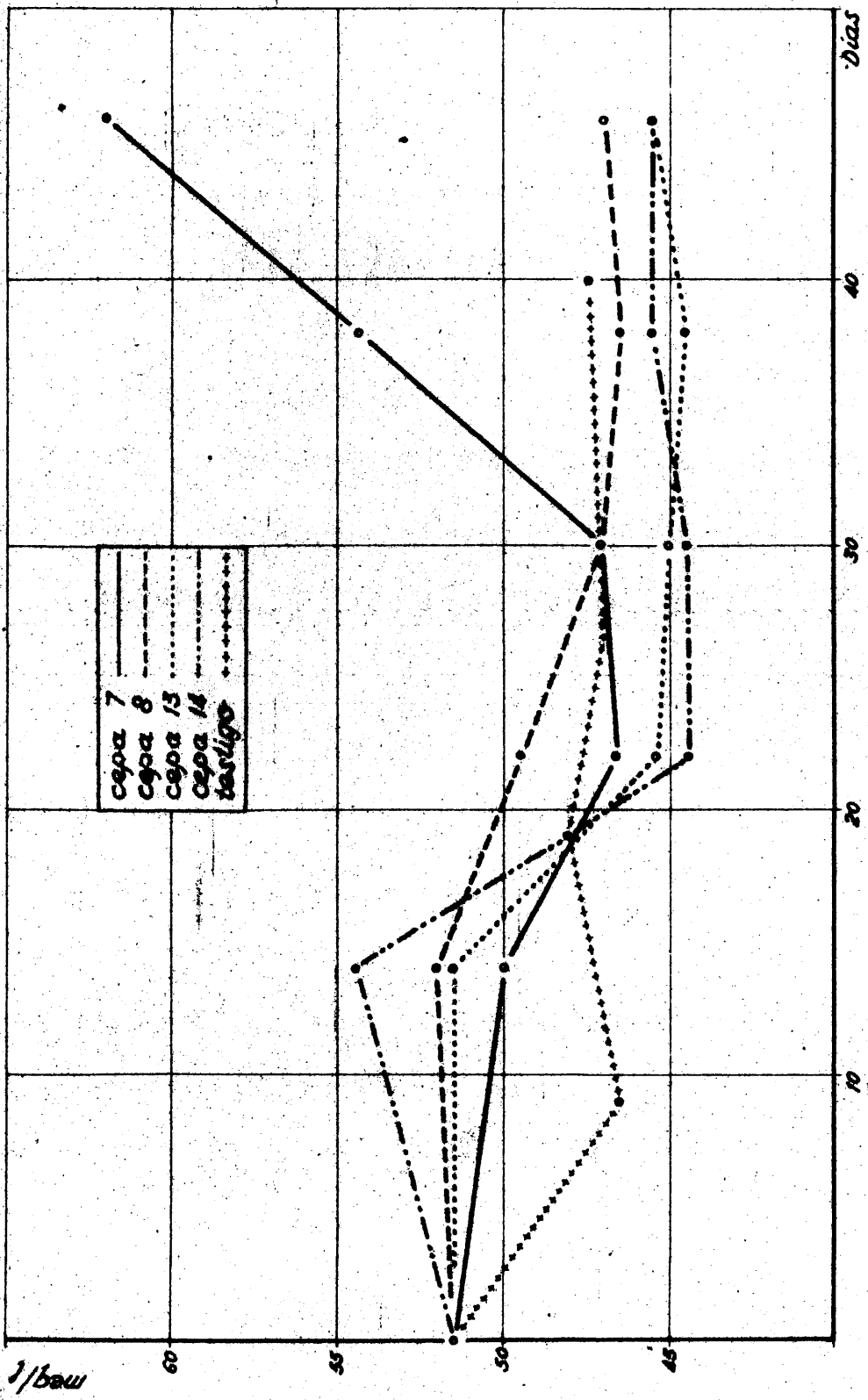
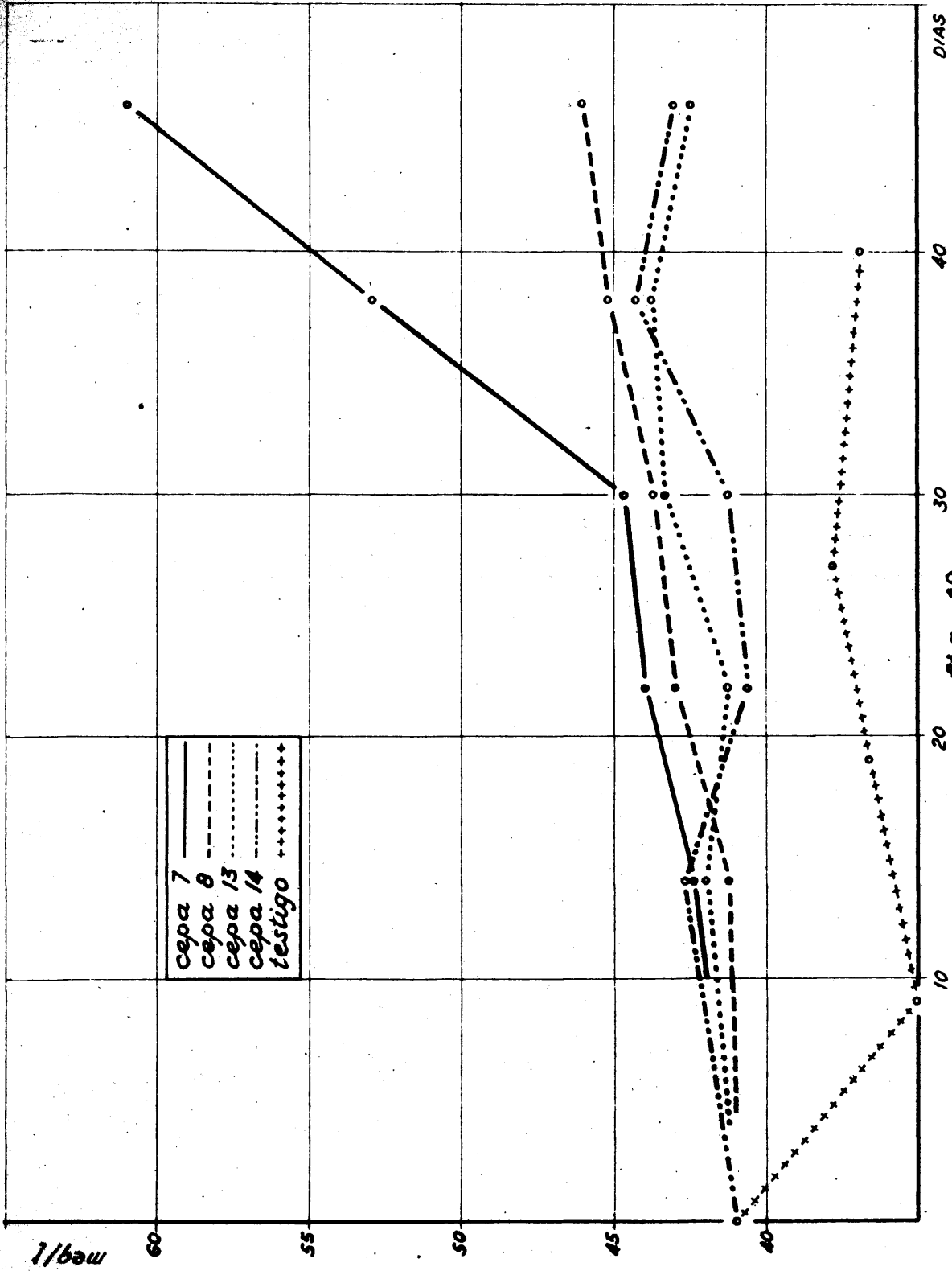


fig. 18

ACIDEZ FIJA



DIAS

fig. 19

ACIDEZ VOLATIL

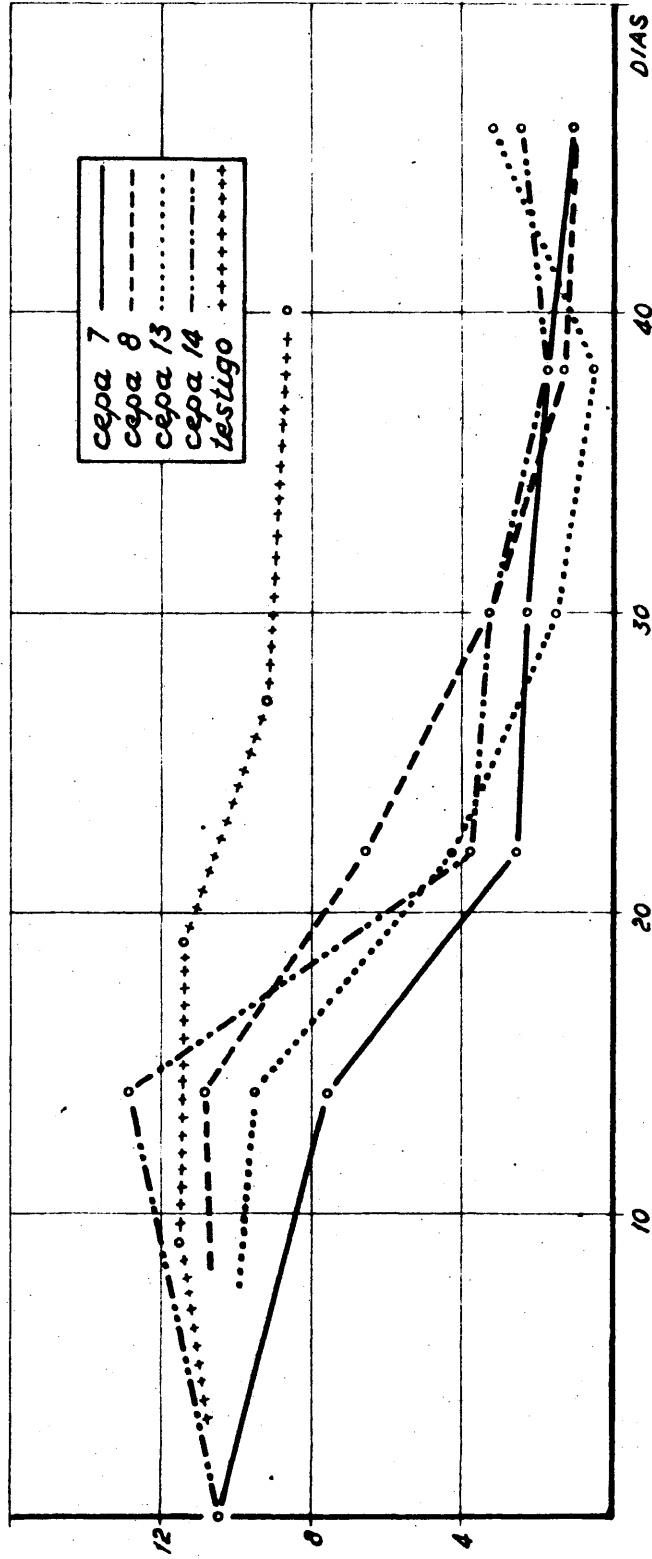


FIG. 20

y después se elevan ligeramente para todas las cepas. El aumento, en general, es pequeño análogamente a lo que sucede en la bodega. Sólo destaca el que resulta de la actividad de la cepa 7, que no es debido a la acidez volátil o al ácido láctico, como puede apreciarse por la simple inspección de las curvas respectivas (fig. 20 y 21), si no a sustancias formadas en el metabolismo, tal vez en la autólisis, de la levadura.

Durante el mismo período hubo en los testigos, como era de esperar, disminución de acidez.

Ninguna particularidad en la pérdida de acidez volátil (fig. 20), si no es que llega a reducirse, prácticamente, a cero con todas las cepas en el transcurso de la experiencia.

La irregular variación del ácido láctico (fig. 21) se debe a que, al ser utilizado por la levadura, puede predominar eventualmente esta circunstancia sobre su formación. La tendencia más clara es de aumento, si bien no en proporciones comparables al que presenta en la bodega.

Las materias reductoras de la solución de Behling no pueden tener mucha influencia, en sí, en el desarrollo del velo pues su utilización es sólo en pequeña escala. También aquí, como en la bodega, las curvas presentan mínimos en todos los casos (fig. 22), cuyas causas suponemos las mismas que en aquella (pag. 64).

Por último, en la tabla III, que recoge las varia -

ACIDO LACTICO

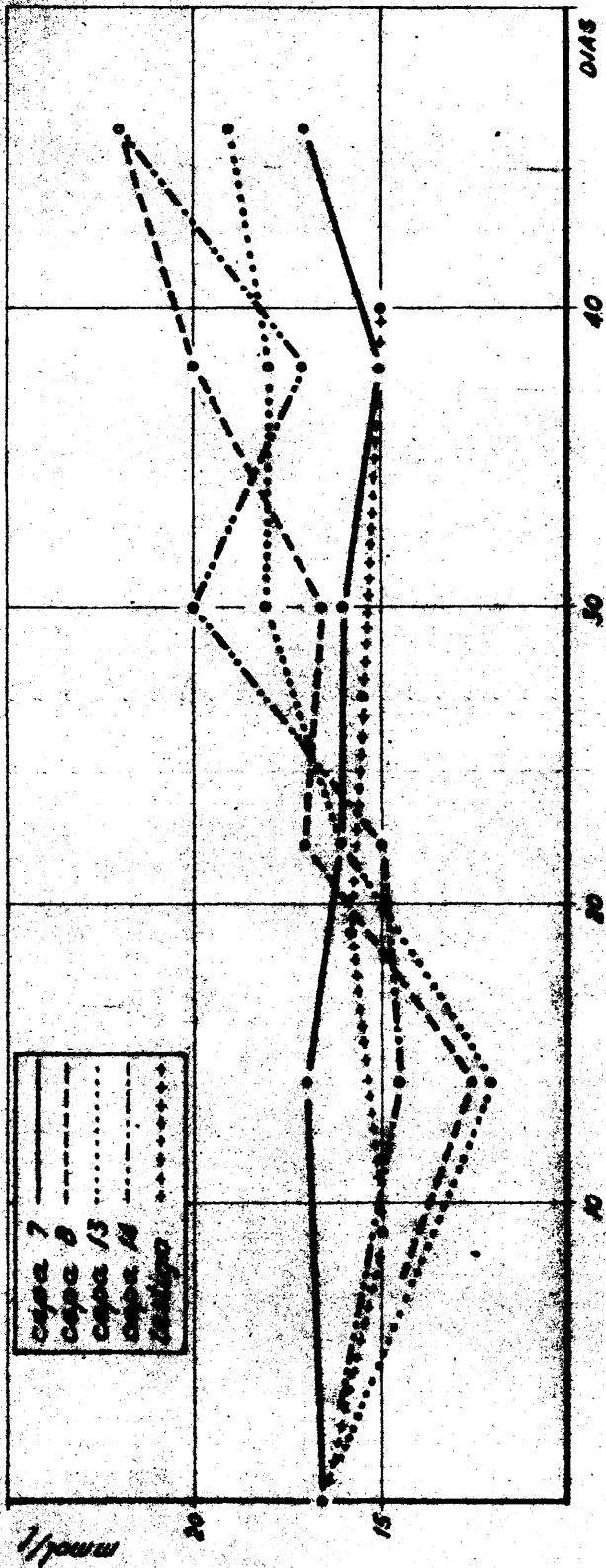


Fig. 21

MATERIA REDUCTORA

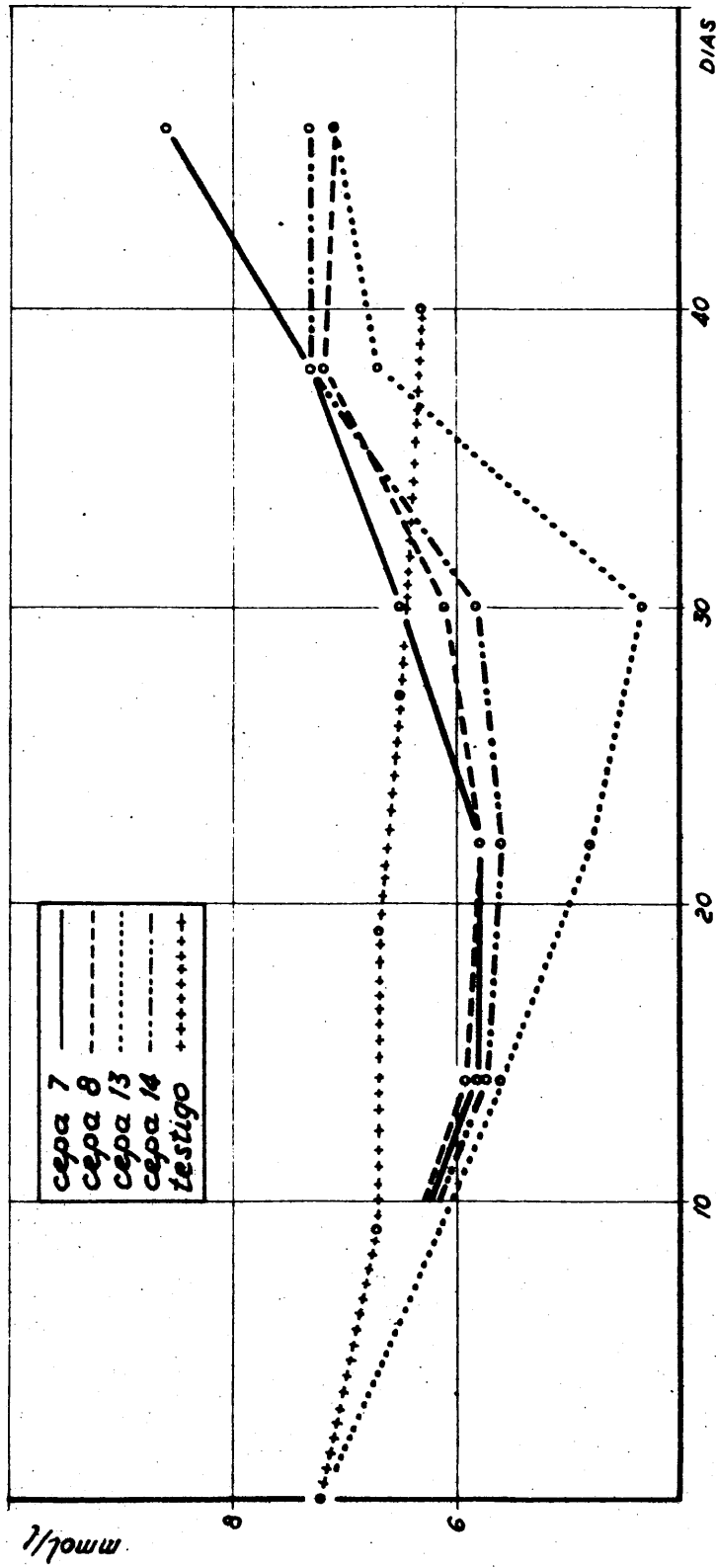


fig. 22

ciones en la composición del vino durante la experiencia en comparación con las que tienen efecto en la bodega, se revela una gran similitud en la evolución que sigue el vino en ambos casos no sólo cualitativamente, en cuanto a los constituyentes estudiados, sino también en valores cuantitativos.

Las tendencias que se manifiestan en la bodega se acentúan, en general, al actuar la levadura bajo una relación superficie/volumen tan alta, de 1/4,7. En 45 días se produjeron cambios metabólicos que requieren años para efectuarse en las condiciones de la bodega, lo que abre el camino a la posibilidad de acelerar muchas veces la velocidad de envejecimiento, al menos por lo que se refiere a sus primeras fases, hecho muy importante en la producción de vinos baratos de flor, de gran consumo en el mercado.

De los nueve componentes comparados fué más avanzada la evolución en seis de ellos. Sólo la acidez total, ácido láctico y acetal se transformaron en menor proporción, lo que no tiene gran importancia en cuanto a los dos primeros que no deben ejercer mucha influencia en el carácter de flor. No así el acetal, cuya presencia parece tener tanto influjo en el aroma y sabor del vino.

La disminución de la concentración de glicerina, siempre deseable en esta clase de vinos, resultó algo excesiva y, por consecuencia, el gusto fué un poco más

T A B L A I I I

Variación de la composición del vino durante la crianza en matraces en comparación con la que tiene efecto en la bodega.

		Montilla	Jerez	Laboratorio
Glicerina	I	94,5	95,4	86,5
	F	47,2	30,1	17,8
	D	- 47,3	- 65,3	- 68,7
Etanal	I	2,2	3,3	4,9
	F	3,6	7,3	9,4
	D	+ 1,4	+ 4,0	+ 4,5
Butilengl.	I	15,0	13,5	12,0
	F	14,2	14,3	14,3
	D	- 0,8	+ 0,8	+ 2,3
Acetal	I	0,03	0,04	0,0
	F	0,14	0,36	0,0
	D	+ 0,11	+ 0,32	0,0
Ac. total	I	62,5	61,3	51,5
	F	62,8	59,0	50,1
	D	+ 0,3	- 2,3	- 1,4

T A B L A I I I (continuación)

		Montilla	Jerez	Laboratorio
Ac. fija	I	51,5	52,1	41,0
	F	54,7	54,7	48,3
	D +	3,2	+ 2,6	+ 7,3
Ac. volátil	I	11,0	9,2	10,5
	F	8,1	4,3	1,8
	D -	2,9	- 4,9	- 8,7
Ac, láctico	I	12,1	13,4	16,5
	F	25,4	22,5	20,0
	D +	13,3	+ 9,1	+ 3,5
Mat. reduct.	I	10,5	8,0	7,2
	F	3,4	5,7	7,6
	D -	7,1	- 2,3	+ 0,4

I.- Concentración inicial.

F.- Concentración final.

D.- Diferencia.

áspero de lo conveniente. Esto podría naturalmente evitarse interrumpiendo antes la crianza, toda vez que ha resultado que, en general, va más lejos que en la bodega y esta pérdida de glicerina no constituiría ningún inconveniente grave para su buena marcha si no existieran más razones que aconsejan la búsqueda de otras condiciones para el proceso.

La más importante de las cuales es la aparición del sabor "a levaduras", a consecuencia del abundante depósito de microorganismo en autólisis y del pequeño volumen de líquido en relación con la superficie, que resulta difícil de impedir pues se presenta cuando la crianza aún no ha avanzado lo suficiente.

También es de tener en cuenta que, para llevar la crianza de la misma forma que en la experiencia, se requerirían vasijas de superficie demasiado grande en cuanto hubieran de contener los volúmenes de vino usuales en los envases de tipo industrial.

Capítulo 3º

CRIANZA Y RELACION SUPERFICIE/VOLUMEN

Material y métodos

En una primera experiencia se utilizaron dos cubetas de vidrio de base rectangular, conteniendo 5 y 10 litros de vino de Montilla, hasta una altura de 8 y 16 cm respectivamente, y otra de base cuadrada con 15 litros de vino y 34 cm de profundidad. Las relaciones de superficie a volumen eran de 1 cm² a 6, 12, y 32 cm³.

El vino, previamente sulfitado a 140 mg/l y clarificado con bentonita, se distribuyó como queda dicho y las cubetas fueron inoculadas con cepa 7 en fase de velo y mantenidas a 15-18°C.

La crianza transcurrió con normalidad y a los 20 días ya los velos cubrían totalmente las superficies de las cubetas.

Se hizo un análisis inicial y otros tres a los 20, 30 y 40 días de la siembra, para lo que se tomaron muestras representando la composición media, a distintas alturas, del contenido de cada vasija.

Para confirmar los resultados, los ensayos se repitieron en las mismas condiciones.

Los métodos de análisis fueron los mismos descritos en las pag. 48-50. Los resultados expresan la media de las dos series de experiencias.

Comentario

Se ocha de ver inmediatamente la influencia de la relación de superficie a volumen en la velocidad de transformación. Para casi todos los componentes las curvas presentan un claro escalonamiento (fig. 23 a 31) en el sentido de una evolución menos avanzada al disminuir aquella relación, hecho que es especialmente cierto para las curvas de etanol y etanal (fig. 23 y 24) de escalonamiento completo en todos sus puntos sin que se corten o se toquen en ningún momento, singularmente las de aquel, donde se aprecia claramente la proporcionalidad entre la disminución de concentración y la relación superficie/volumen. Esta proporcionalidad todavía se observa, en parte, en las curvas de etanal y aparece menos marcada en las restantes, aunque se conserva su gradación.

Las mayores diferencias de evolución se dieron en la cubeta de 15 l. con relación a las otras dos, muy similares entre sí. En ella, la acidez total y fija (fig. 25 y 26) apenas disminuyen y sólo en los 10 últimos días pareció insinuarse el mínimo característico de que ya hemos hablado al estudiar la crianza en bodega, en tanto

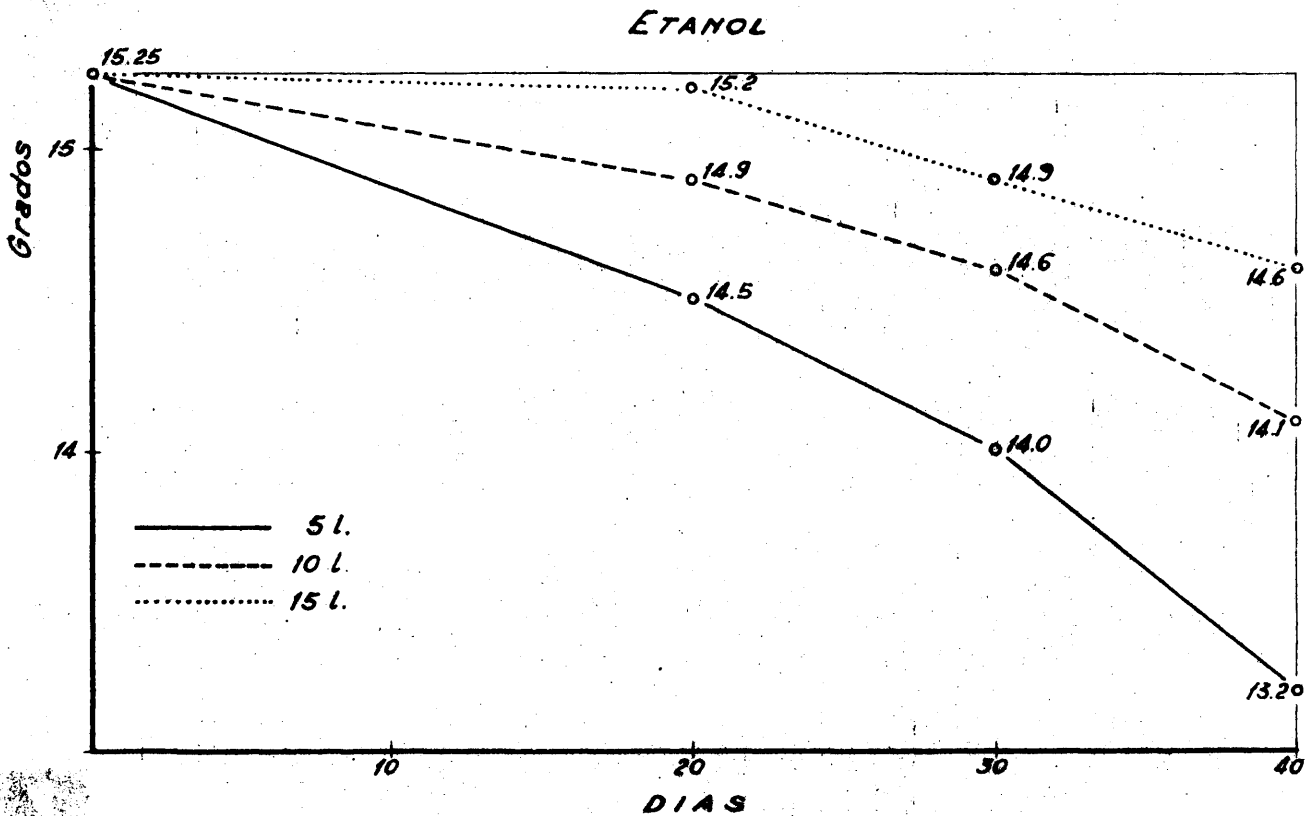


fig. 23

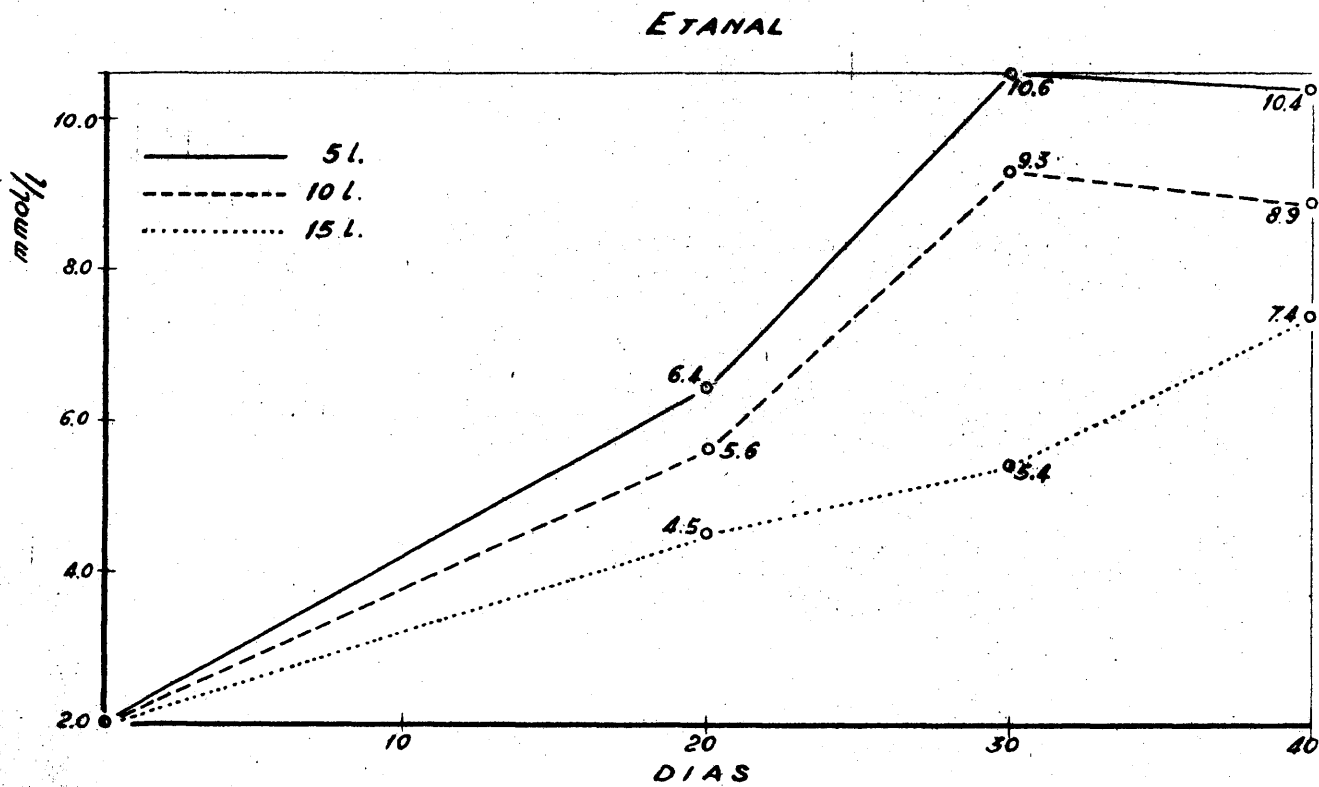


fig. 24

ACIDEZ TOTAL

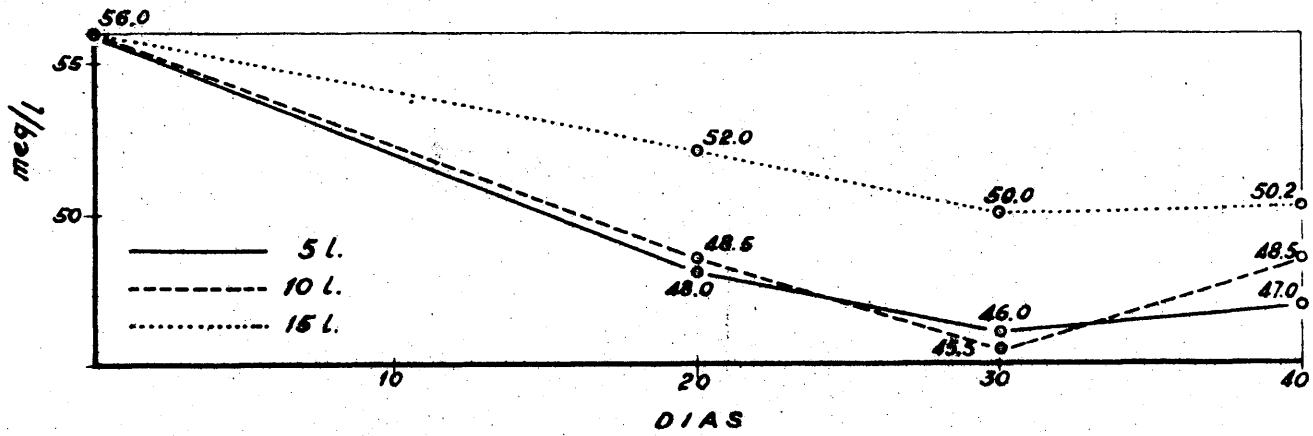


fig. 25

ACIDEZ FIJA

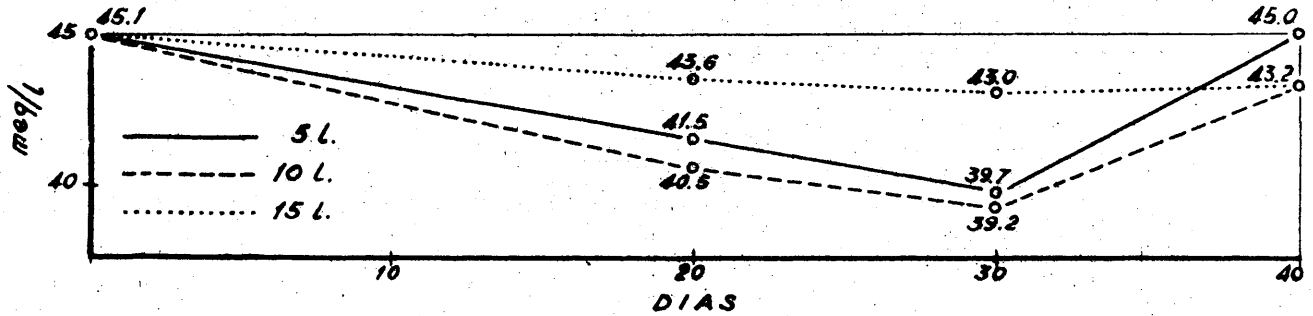


fig. 26

ACIDEZ VOLATIL

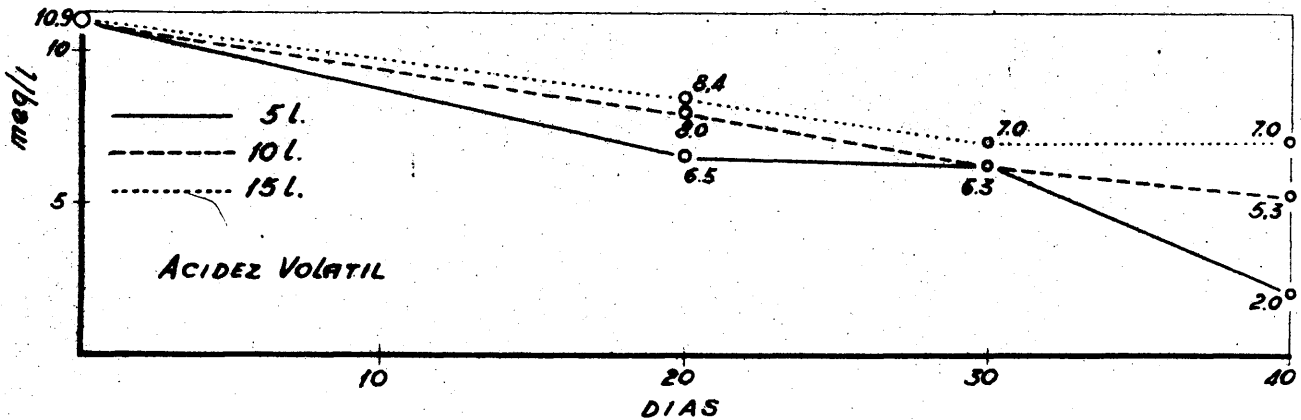


fig. 27

que es la típica la forma de las otras dos curvas .

Muy escasa fue también la pérdida de acidez volátil (fig. 27) que sólo se redujo a $2/3$ en comparación con $1/2$ y $1/4$ en volúmenes menores. Esta última disminución, en la vasija de 5 litros, es ya francamente alta y la reducción a la mitad en la cubeta de 10 litros es muy aceptable.

En cuanto al ac. láctico (fig. 28), es de notar - que aparece en menor cantidad en la cubeta de 5 l, donde la crianza es más avanzada, lo que puede ser debido a su utilización por la levadura al faltarle nutrien - tes más asequibles a causa de su mayor rapidez de desarro - llo.

Algo análogo que en las curvas de ac. total o fija sucede con las de materias reductoras (fig. 29) donde - no aparecen mínimos más al aumentar la relación de su - perficie a volumen. Este es un indicio de progreso en la crianza pues ya se ha visto que la elevación de la con - centración de reductores es característica de las fases avanzadas.

De los componentes más típicos, entendiendo por ta les aquellos cuya evolución influye más en el carácter del vino, el alcohol (fig. 23) disminuyó, en la cubeta de 5 l., en cantidades de 2%, que pueden considerarse - excesivas desde el punto de vista económico, y en pro -

ACIDO LACTICO

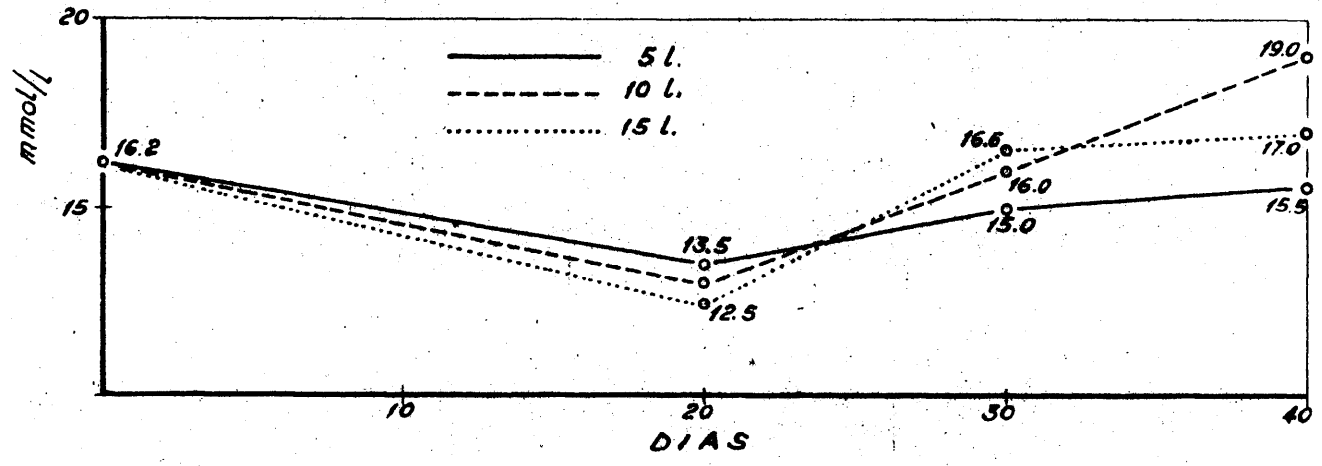


fig. 28

MATERIAS REDUCTORAS

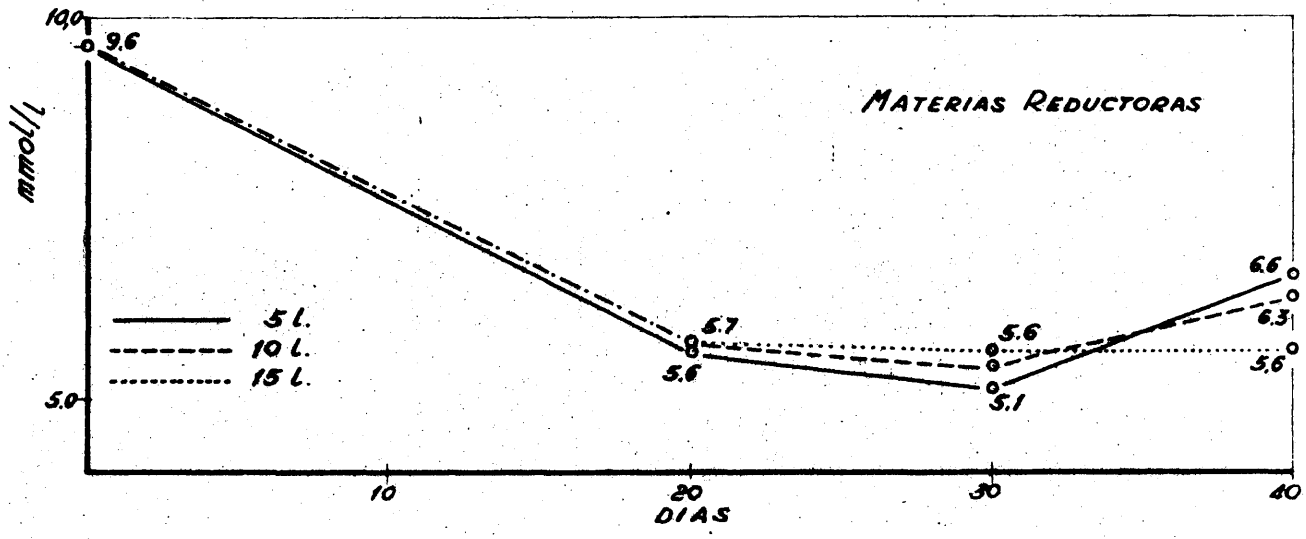


fig. 29

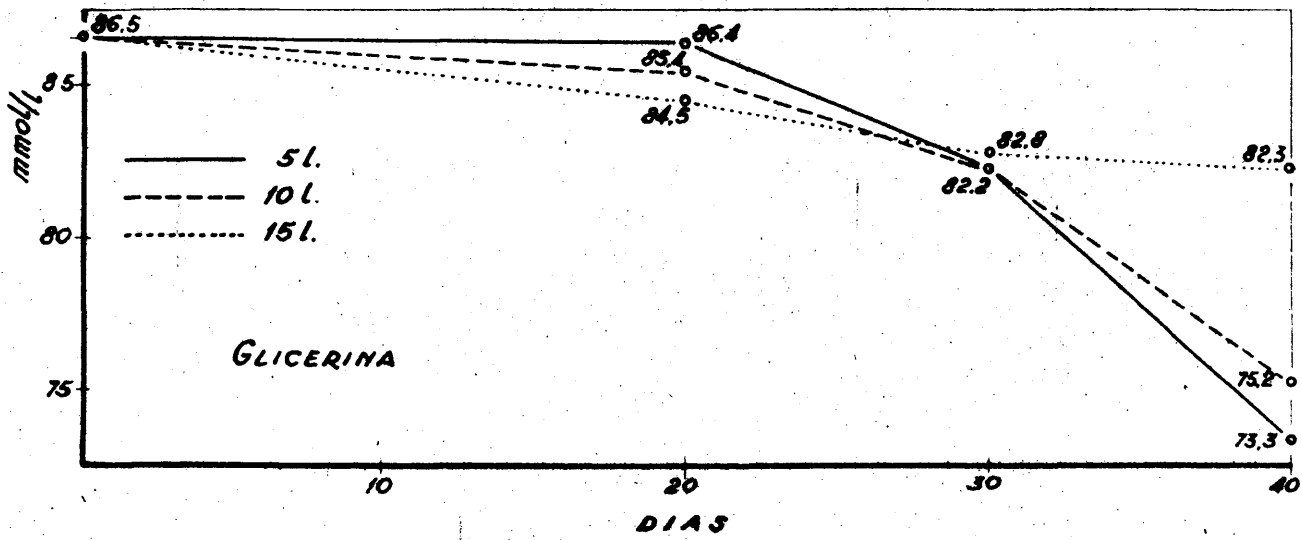


fig. 30

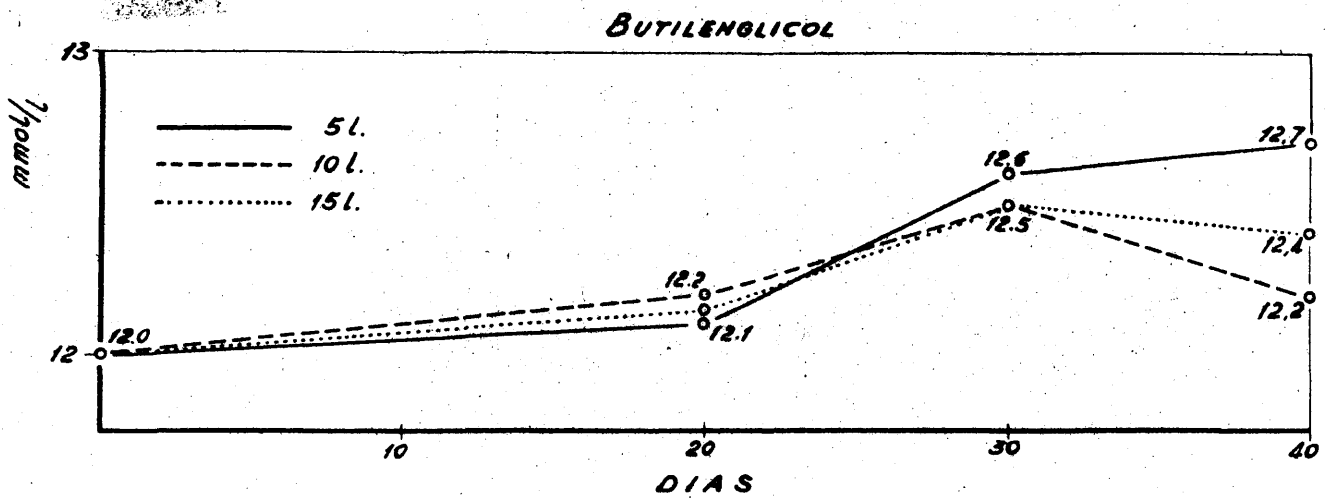


fig. 31

porciones de 1 y 0,5^o, que entran en los límites de lo razonable, en las otras dos.

De etanal (fig. 24) había en el medio, al terminar la experiencia, de 300 a 400 mg/l, concentraciones del orden de las que contienen las soleras de Jerez, lo que viene a confirmar que su formación es rápida al comienzo de la crianza.

Poca disminución en la concentración de glicerina - (fig. 30) que no llega al 15% de la cantidad inicial en el mejor de los casos. Prácticamente nula hasta el pleno desarrollo del velo y escasa en los diez días siguientes, sólo después de un mes pareció iniciarse en las cubetas de 5 y 10 l. la rápida caída que ha sido característica de la crianza tanto en la bodega como en matraces con poco volumen de vino. En la vasija de 15 l. la curva continó su descenso suave hasta los 40 días.

No hubo formación de acetal ni aparición de acetofna y apenas se pudo apreciar variación en el butilenglicol (fig. 31) que manifiesta, no obstante tendencia a aumentar, más claramente en la cubeta de 5 l.

Los análisis químicos fueron completados con pruebas de cata con el fin de llegar a conclusiones prácticas sobre el grado de crianza.

También en cuanto a las características organolépticas se encontró, como era de esperar, una gradación -

del añejamiento, mayor en las cubetas de 5 y 10 litros y poco marcado en la de 15 l. No hubo gran diferencia de calidades entre los productos de las dos primeras vasijas, lo que está de acuerdo con los resultados de los análisis, comparables a las de vinos con dos años de crianza en bodega según dictamen de catadores profesionales, salvo principalmente en que el vino de la vasija de 5 l. adquirió el desagradable sabor "a levaduras".

Todos los vinos resultaron bien en cuanto a color y aroma pero quedaron algo "blandos" al paladar debido al contenido excesivamente alto de glicerina.

A la vista de los resultados de los análisis de composición química y de los exámenes organolépticos aparece como más aconsejable, de entre las relaciones superficie/volumen estudiadas, la de 1/12 si el plazo de crianza ha de ser de unos 45 días. Pues la crianza en la cubeta de 10 l. resultó casi tan avanzada como en la de 5 l. con la ventaja definitiva de poderse controlar mejor y poderse dar por terminada antes de la aparición del sabor "a levaduras".

También, como veremos más adelante, se pueden construir, conservando dicha relación, vasijas con capacidad industrial, y de dimensiones tales que se haga cómodo su emplazamiento y su manejo, empleando materiales que resulten a precios razonables.

La pérdida de alcohol en la crianza no es excesiva,

como en la cubeta de 5ll., y la acumulación de etanal, su
ficiente.

Queda además la posibilidad de hacer aumentar algo
el volumen, hasta 1/15 o 1/20, y compensar la pequeña -
disminución de la velocidad de añejamiento con una pro-
longación del tiempo bajo flor.

Lo que no puede hacerse es aumentar la superficie
sin peligro de perder la dirección del proceso ni dismi
nuirla hasta las proximidades de 1/30, que lo haría ya
poco apto por su lentitud para los fines propuestos, crian
za muy rápida de vinos baratos.

Capítulo 4º

PLANTEAMIENTO DE UNA BODEGA PARA CRIANZA RAPIDA
DE VINOS.

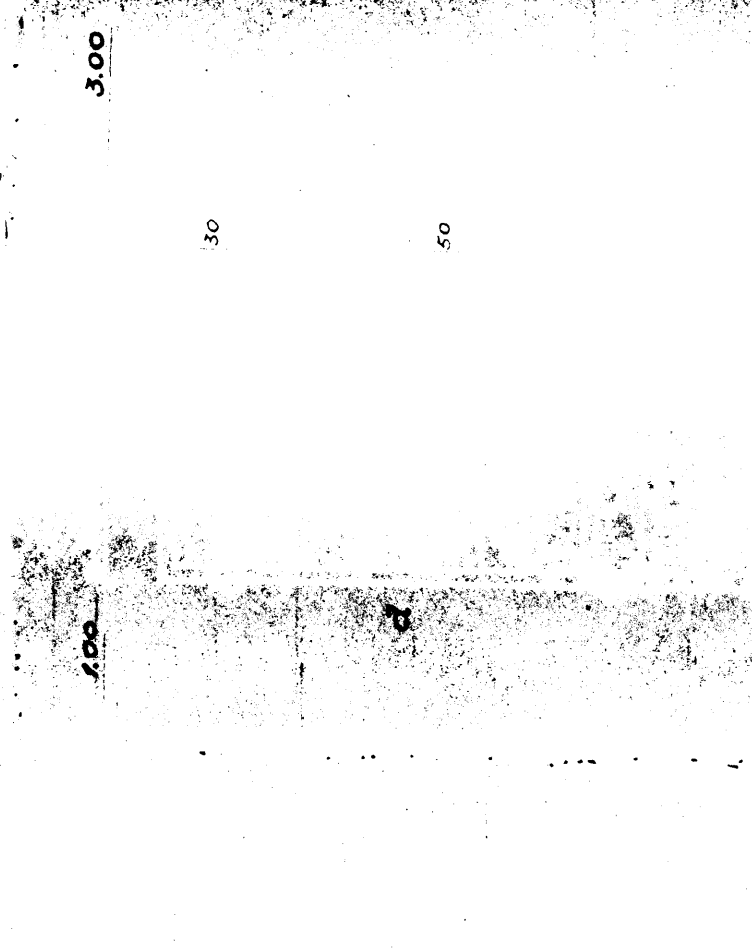
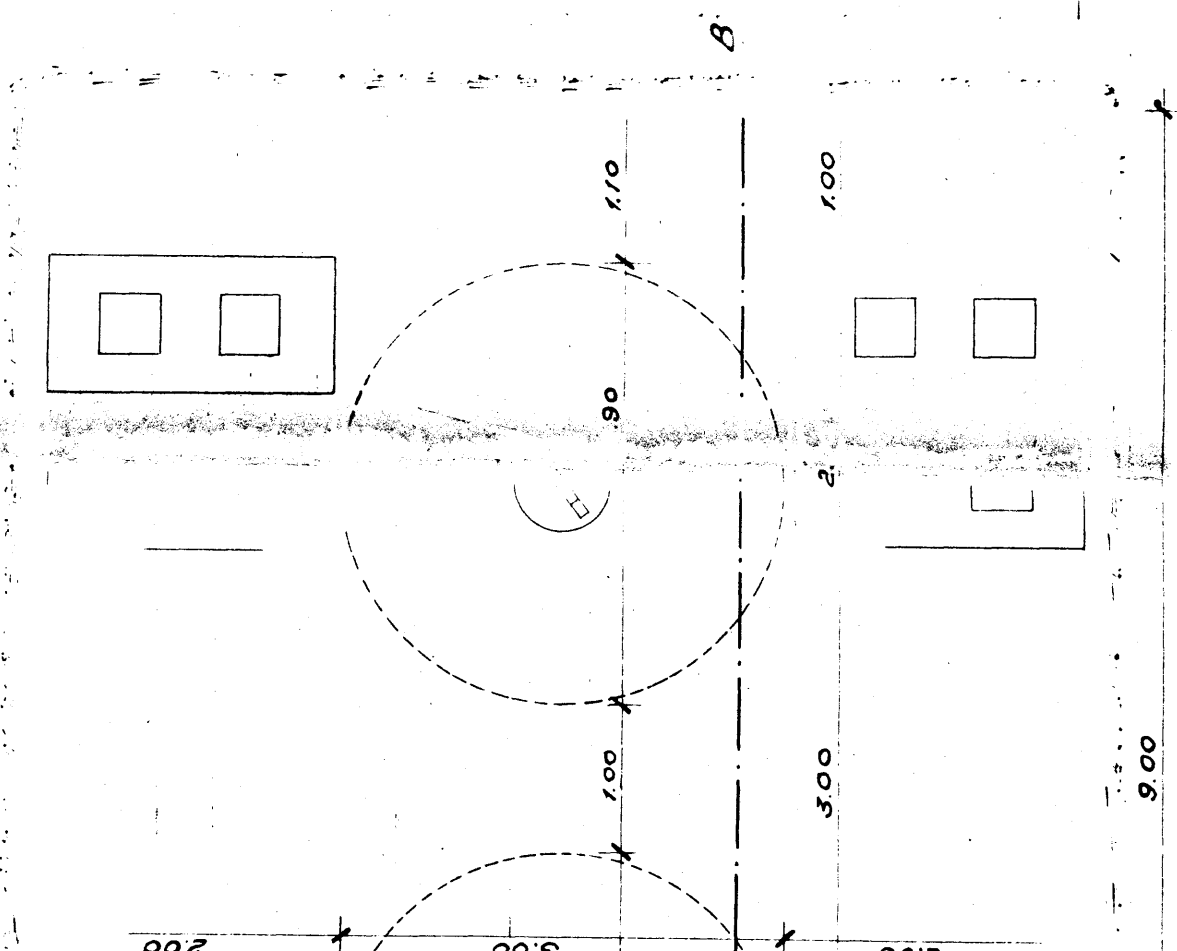
Los principales problemas a resolver en relación - con la aceleración natural o bioquímica del proceso de crianza con flor se derivan de conseguir que el velo tenga un desarrollo permanente y no sólo cuando las circunstancias climáticas sean favorables.

La estabilización de la temperatura en una bodega es costosa, y en la introducción bibliográfica damos - cuenta de algunos intentos para conseguirla siquiera fuera sólo en parte, por el gran volumen que representa y porque aislar paredes y suprimir huecos tampoco entra en lo fácilmente realizable.

Dentro de la bodega la disposición del vino en escalas formadas por cientos de botas sobre ser determi-nante, con gran medida, del volumen que necesariamente - ha de ocupar la carga, pues la forma de los envases obliga a dejar mucho espacio vacío entre ellos, dificulta - las operaciones que deben realizarse en toda bodega ya que el acceso a las escalas no es cómodo, sobre todo a las inferiores. Y en las botas, la relación de superfi-cie a volumen es de tal modo pequeña que la crianza ha-

Planta

Sección



Escala 1:50

3.00

9.00

bría de transcurrir forzosamente con lentitud aún cuando la temperatura fuera siempre favorable.

Sin entrar en detalles que requerirían el conocimiento de las condiciones climatológicas de la región donde hubiera de instalarse la bodega, se expone en la fig. 32 adjunta un esquema de lo que podría ser una instalación que permitiera la crianza controlada y rápida de vinos con flor, salvando los inconvenientes que acabamos de exponer y facilitando todas las operaciones que implica.

Está planeada para una producción de 80.000 litros de vino en un plazo de 45-60 días, que hace un total anual de unos 10.000 Hl., y consta de una planta, de nueve metros de longitud, siete de anchura y cinco de altura, excavada de forma que su techo quede por lo menos un metro bajo tierra para disminuir los efectos de las variaciones de la temperatura exterior. La regulación térmica de la bodega se completa por dos radiadores de cualquier tipo corriente, pues su volumen total no es muy grande. Durante las épocas de máximo calor puede adoptarse fácilmente un sistema de refrigeración que tampoco sería caro.

Cuatro bastidores metálicos (*) provistos de estantes, adosados a las paredes y dejando entre sí espacios suficientes para permitir un fácil acceso, soportan, cada uno, diez pares de envases, ochenta en total, hasta una altura de cuatro metros.

Dos trujales cilíndricos (b) con capacidad individual de unos 20.000 litros sirven, respectivamente, para almacenar el mosto antes de entrar en crianza y para recoger el vino terminado.

La instalación se completa, en lo esencial, con dos depósitos (c) de unos 3.000 litros a los que se envía el mosto del trujal y desde los cuales se realiza fácilmente el llenado de los envases.

El tipo de envase propuesto es la bandeja plana de 1,50 0,75 0,30 m. (d). Va provista de tapa con orificios tapados flojamente para facilitar la aireación del velo. En uno de sus costados, a 2 cm del fondo, hay una llave de descarga a la que puede adaptarse una conducción de politeno u otro material inatacable.

Diversos materiales han sido ensayados antes de adoptar el más conveniente para la construcción de las bandejas. Aparte del vidrio se estudió la aplicación de materias plásticas, como cloruro de polivinilo y poliéster, acero inoxidable, hierro esmaltado, aluminio recubierto de pintura antiácida y chapa "glassuritada".

El vidrio podría ser muy útil pero tiene el inconveniente casi insalvable de la dificultad de construir vasijas de tan grandes dimensiones.

El poliéster y la pintura antiácida comunicaron a los vinos sabores desagradables y lo mismo hizo la pintura antiácida llamada "glassurit", aunque hubo de trans

currir más tiempo hasta que su sabor pasó al vino. Los demás materiales no fueron causa de ninguna anomalía.

El más idóneo resultó el acero inoxidable, de extraordinaria resistencia mecánica y de duración indefinida. Tiene el inconveniente de su precio alto que puede reducirse construyendo la bandeja de chapa fina montada sobre madera.

Más barato es el hierro esmaltado, no pesa demasiado y, si se conserva sin resquebrajaduras, no ofrece peligro de aportar iones metálicos al vino.

Y en cuanto al cloruro de polivinilo, tiene en contra su fácil deformabilidad, que obligaría a dotar al envase de una armazón, y el que algo de su colorante pasa al vino pero resulta a buen precio y cabe en lo posible envinar previamente el envase.

Para iniciar la crianza el mosto, sulfitado y clarificado, se encabeza a 15% de alcohol y pasa a las bandejas donde se siembra con cultivos puros de levadura, en fase de velo, obtenidos en condiciones estériles. Una vez alcanzado el añejamiento deseado, que debe controlarse por medio de análisis, las vasijas se vacían a través de las llaves de descarga que, por su situación a 2 cm del fondo dejan un resto de 20 l. de líquido en la bandeja, del que se puede retirar la mayor parte del velo y conservar una pequeña porción como siembra para una nueva cantidad de mosto. El vino terminado se clarifica y se en

sivas grava innecesariamente el producto. La crianza debe durar todo lo posible para que se consuma la mayor cantidad de glicerina, lo que requiere su prolongación más allá de las etapas en que se acumula el etanal, que no es sino una entre las muchas características del vino criado y no la única importante.

Todas estas necesidades las cubre, como hemos dicho, la bodega que acabamos de plantear, la cual reúne, sobre las de tipo tradicional, algunas ventajas entre las que son de destacar:

- 1ª Menor coste del material y reducción del equipo necesario.
- 2ª Aprovechamiento más racional del espacio disponible.
- 3ª Reducción de la mano de obra y aumento de su rendimiento.
- 4ª Mayores facilidades para la limpieza y conservación de la bodega.
- 5ª Mecanización de las principales operaciones que la crianza implica.
- 6ª Sustitución de las botas por envases más baratos y que permiten hacer una elaboración más rápida y una manipulación más cómoda.
- 7ª Posibilidad de llevar a cabo el envejecimiento durante todo el año en las condiciones más favorables con un coste razonable.
- 8ª Acortamiento considerable del plazo de crianza, lo que determina tanto el abaratamiento del producto como la

rápida amortización de los costes de instalación y -
producción.

- 9ª Aumento del rendimiento por vasija. Cada bota de la solera en una bodega con la disposición usual produce unos 450 litros de vino por año y requiere otras dos o tres sin producción para los oportunos trasiegos. Cada bandeja puede producir en el mismo tiempo hasta 1300 litros, esto es, tres veces más.

Capítulo 5º

CRIANZA CON FLOR DE VINOS TINTOS

Paralelamente a los ensayos sobre crianza de vinos, blancos y de características apropiadas para tal fin, se estudió la posibilidad de utilizar las levaduras de flor para modificar y mejorar los caracteres de vinos tintos, tema sobre el cual la bibliografía es escasa.

El estudio fué menos extenso que en los vinos blancos y se encaminó más directamente a su aplicación práctica. Incluye la selección de las cepas apropiadas y ensayos de crianza en cubetas.

Selección de cepas

Se partió de las cepas capaces de formar velo sobre vinos blancos, las nº 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 18 y 20 (pag. 73) con las que se hicieron pruebas de resistencia al ac. sulfuroso y de formación de productos típicos.

Resistencia al ac sulfuroso

Este ensayo se condujo de la misma forma que se había hecho con los vinos blancos (pag. 73).

Desarrollaron en 15 días:

hasta 75 mg/l de SO ₂	las cepas nº	1, 2, 4, 9, 11, 20.
" 100 " " " " "	"	3, 6.
" 125 " " " " "	"	10, 12.
" 150 " " " " "	"	8, 14, 18.
" 175 " " " " "	"	13.
" 200 " " " " "	"	7.

La resistencia de las levaduras al SO₂ resultó prácticamente igual que en los vinos blancos, salvo muy pequeñas diferencias.

Formación de productos típicos.

Se escogieron, en una primera selección, las cepas nº 7, 8, 10, 13, 14 y 18 que, sembradas primero sobre vino blanco manchego encabezado a 15,5º, fueron inoculadas en fase de velo sobre los matraces objeto de la experiencia, que se condujo en forma análoga a la descrita en la pag. 74.

Al cabo de 12-16 días todos los matraces tenían un espeso velo de flor.

Los métodos analíticos son los expuestos en las pag. 48 a 50 y los resultados de los análisis, hechos a los 45 días de la siembra, pueden verse en la tabla IV.

T A B L A I V

Actividad de algunas cepas de "flor" sobre vinos tintos

	Vino base	Cepa 7	Cepa 8	Cepa 10	Cepa 13	Cepa 14	Cepa 18
Glicerina (mmol/l.)	102,0	33,5	33,0	48,5	35,3	50,0	66,5
Etanol (g)	15,3	13,0	13,1	12,2	12,9	12,8	12,5
Etanol (mmol/l.)	0,9	10,6	11,1	12,0	11,7	13,2	13,4
Ac. total (meq./l.)	65,6	64,3	62,5	73,9	63,2	71,4	52,5
Ac. volátil (meq./l.)	7,5	3,0	3,0	28,6	4,0	6,2	25,5
Ac. fija (meq./l.)	58,1	61,3	59,5	45,3	59,2	65,2	27,0
Ac. láctico (mmol/l.)	12,0	13,0	13,0	15,5	13,0	13,0	15,0
Mat. red. (g./l.)	3,42	1,84	1,80	2,40	2,33	2,21	2,63

Hubo un total paralelismo en la forma de actuar el velo sobre vinos blancos y tintos. Los componentes objeto de análisis sufrieron evolución en el mismo sentido y del mismo orden, lo que indica que la naturaleza del substrato no afectó mucho al metabolismo de la levadura, resultado que podía esperarse después de comprobar que los velos desarrollaron más o menos a la vez en ambos casos y que apenas hubo diferencias de resistencia al ac. sulfuroso.

Se notó disminución de etanol, si bien no en tan gran proporción como en los blancos, por término medio de 2-3% frente a pérdidas de casi 4% en aquellos. El etanol aumentó hasta 10 veces en relación con el testigo - pero su concentración en valor absoluto, de 10-13 mmol/l, no presentó diferencias con los blancos y evoluciones normales tuvieron también los demás componentes: reducción de glicerina, hasta una quinta parte de la inicial, y de materias reductoras de la solución de Fehling, ligera variación de la acidez total y fija, con tendencia a aumentar, y disminución de la acidez volátil hasta un 50% de la primitiva. El incremento de ésta en dos matraces se supone debido a la acción bacteriana. También hubo aumento del ácido láctico, aunque no muy significativo.

Las cepas más útiles para los vinos blancos lo fueron asimismo para los tintos, esto es, las cepas nº 7,

8 y 13 cuya favorable acción aparece aquí más destacadamente que en el ensayo anterior. Además de presentar la máxima resistencia al ac. sulfuroso y poder actuar en las condiciones más desfavorables, consumieron, en igual plazo de tiempo, menos alcohol que las otras y más glicerina, materias reductoras y acidez volátil, componentes, todos ellos, cuya eliminación hasta límites muy bajos es deseable en la crianza con flor. La formación de etanal fué suficiente en todos los casos.

Crianza en cubetas

Vistos los resultados de la actividad de las levaduras capaces de formar velo sobre vinos tintos, se consideró inútil estudiar con más detalle la crianza en matraces y, sólo a modo de confirmación de la similitud con la crianza de blancos, se hizo un ensayo duplicado en cubetas de vidrio con 10 litros de vino tinto de Navalcarnero hasta 16 cm de altura, utilizando la cepa 7 de *S. oviformis*.

El vino base procedía de la misma remesa que el empleado en la selección de cepas y había sufrido ligeras modificaciones en su composición salvo en ac. láctico de variación más pronunciada. Sulfitado con 160 mg/l y clarificado con gelatina, fué sembrado con levadura cultivada en fase de velo sobre vino blanco estéril.

En ambos ensayos los vinos tardaron unos 18 días en

quedar totalmente cubiertos de velo y fueron objeto de tres análisis a los 20, 30 y 40 días de la experiencia.

Los métodos analíticos se exponen en las pag. 48 a 50.

En las figuras 33 a 40 se incluyen los resultados medios de las dos series, junto con las medias de los ensayos de crianza de vinos blancos en cubetas de 10 l. para poder establecer comparaciones.

Comentario

La simple inspección de las gráficas hace innecesario insistir en la no existencia de diferencias interesantes con la evolución de vinos blancos.

La similitud resulta realmente extraordinaria en cuanto a la mayor parte de los componentes. Acidez fija (fig. 33), total (fig. 34), volátil y láctica (fig. 35) siguen caminos casi paralelos tramo a tramo, mientras que en etanol (fig. 37) y etanal (fig. 38) las curvas se cruzan y se mantienen siempre muy próximas, cosa lógica pues partiendo de cantidades iniciales casi iguales de estos componentes se llega a concentraciones finales análogas.

Las mayores diferencias encontradas en glicerina (fig. 36) y materia reductora (fig. 39) deben atribuirse a que, por estar presentes en mayor cantidad en los tintos, fueron utilizadas en mayor proporción al comien

ACIDEZ FIJA

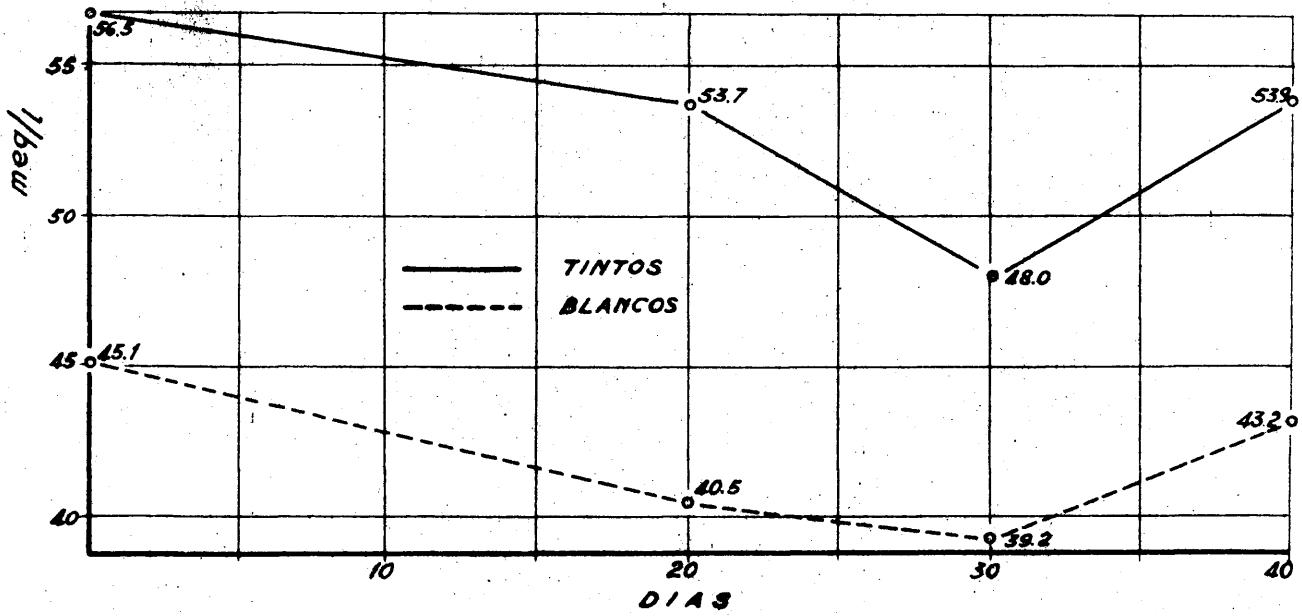


fig. 33

ACIDEZ TOTAL

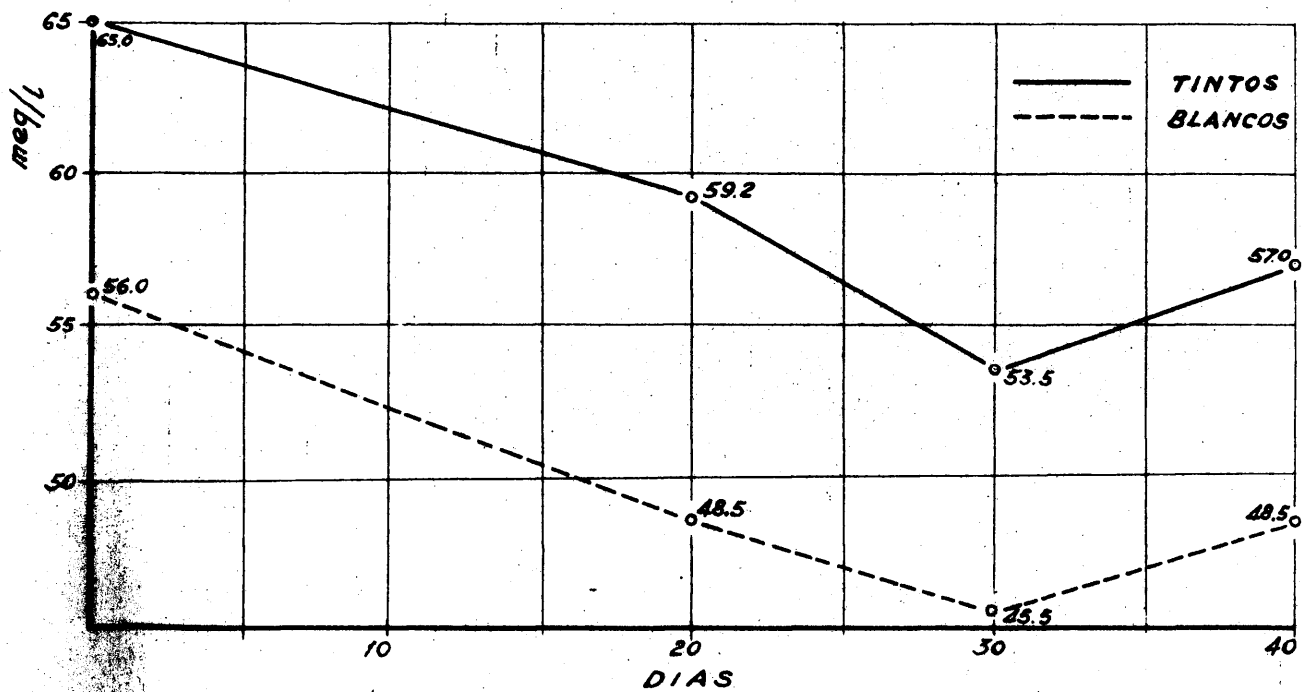


fig. 34

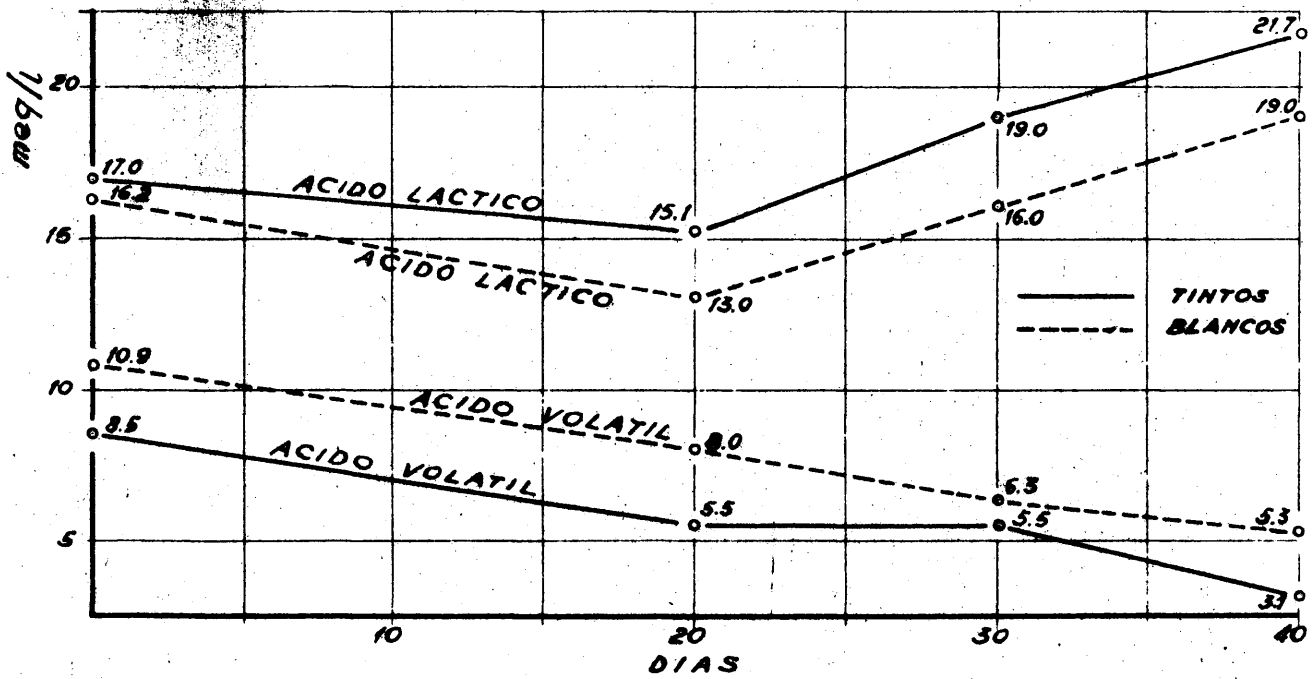


fig. 35

GLICERINA

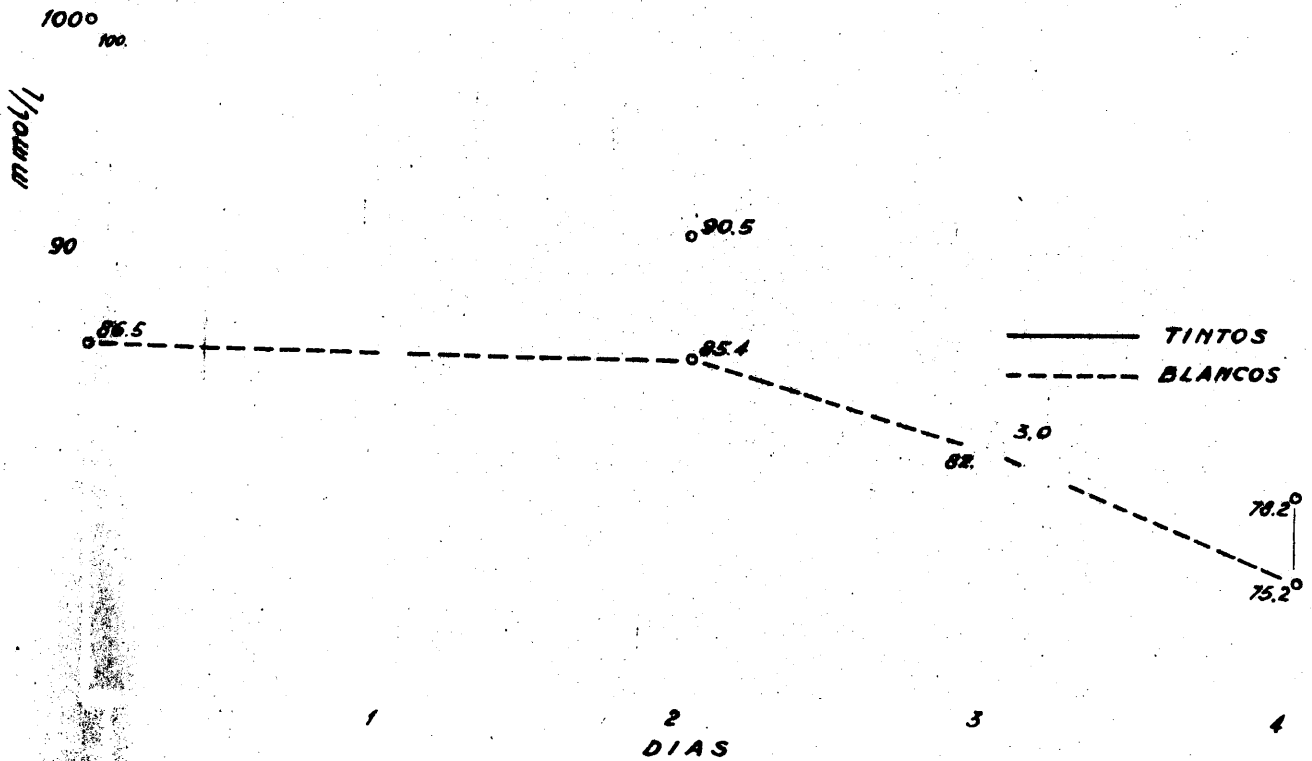


fig. 36

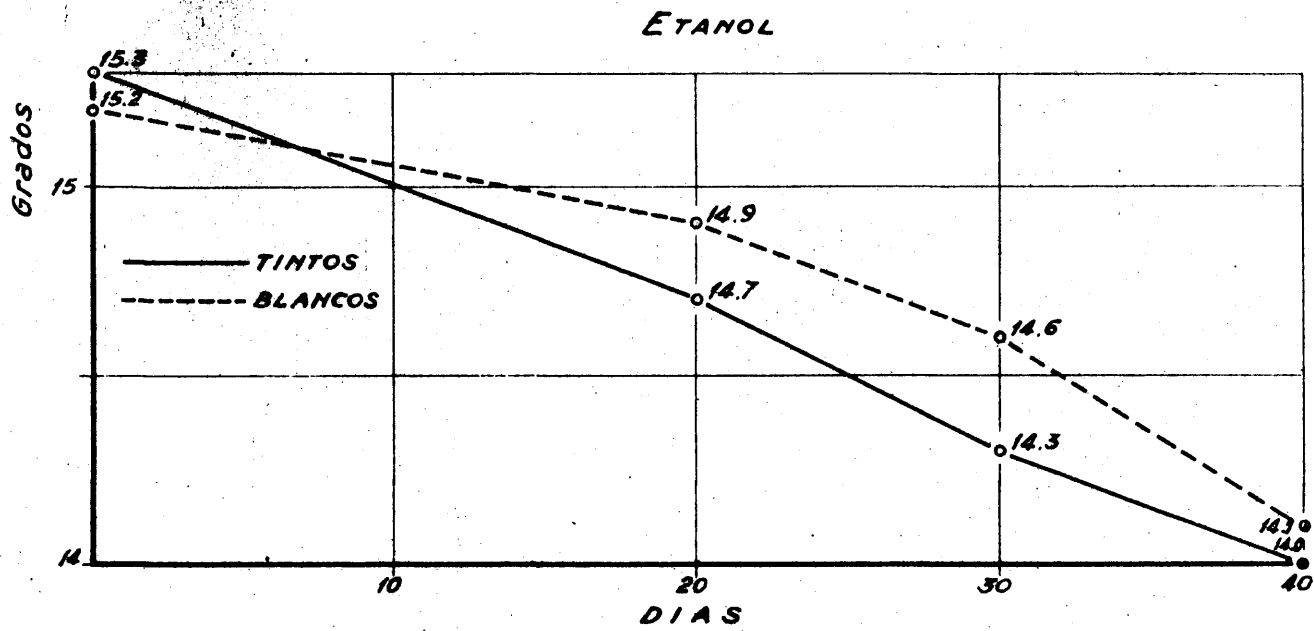


fig. 37

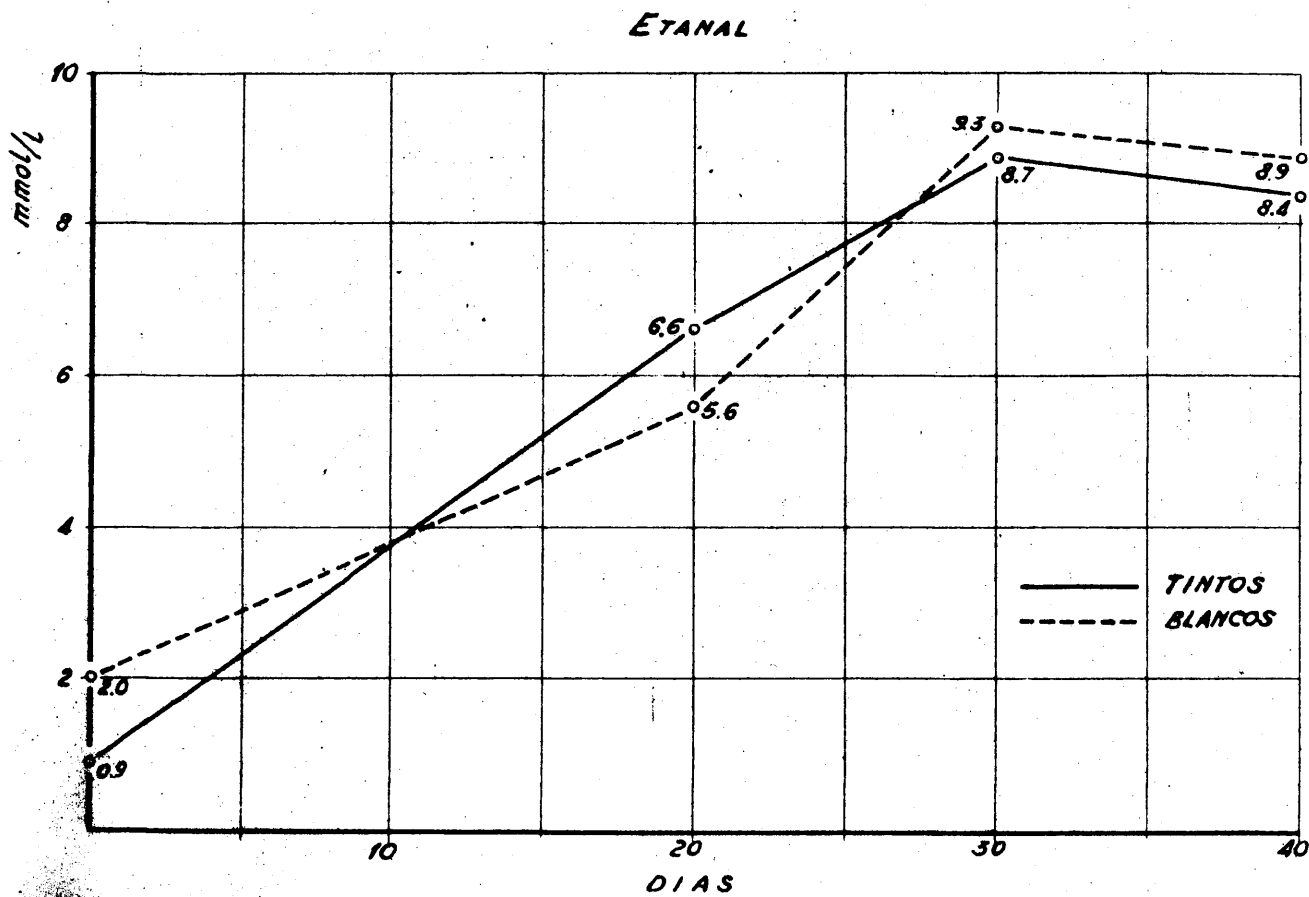


fig. 38

MATERIA REDUCTORA

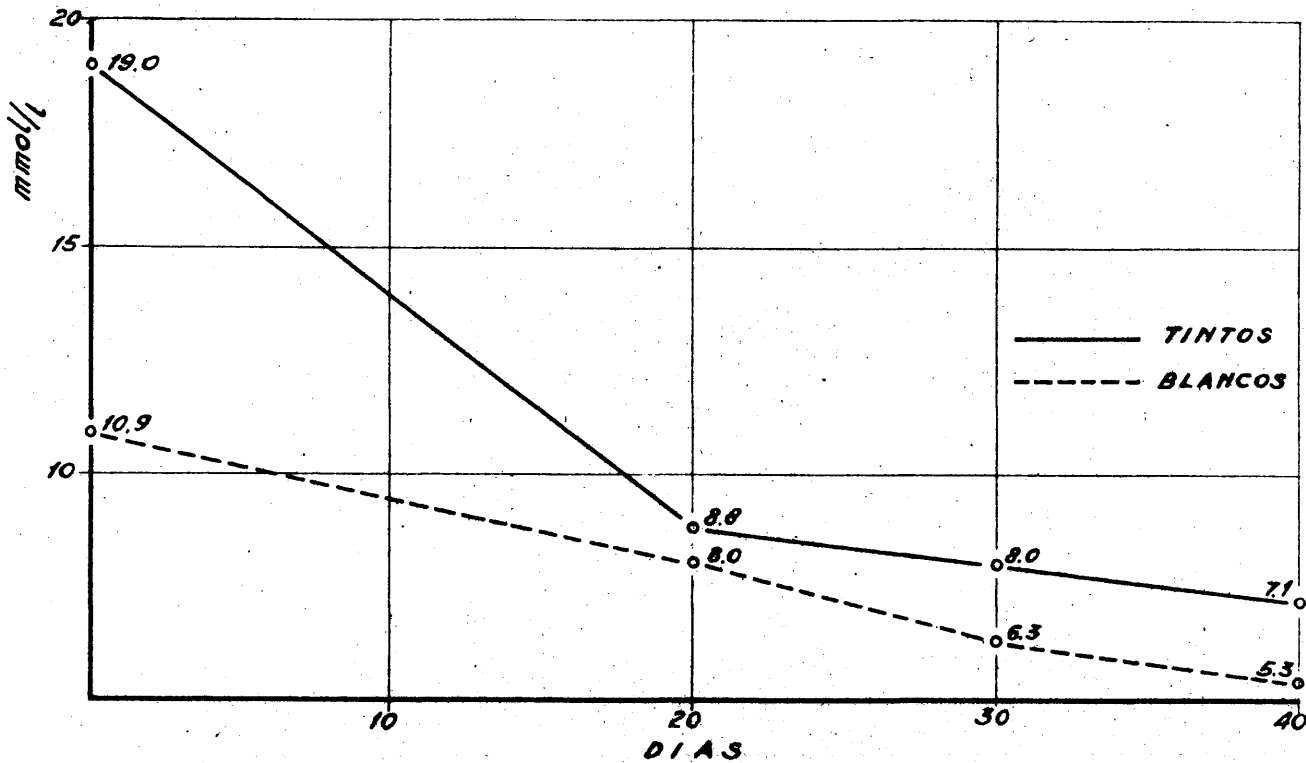


fig. 39

2.3. BUTILENGLICOL

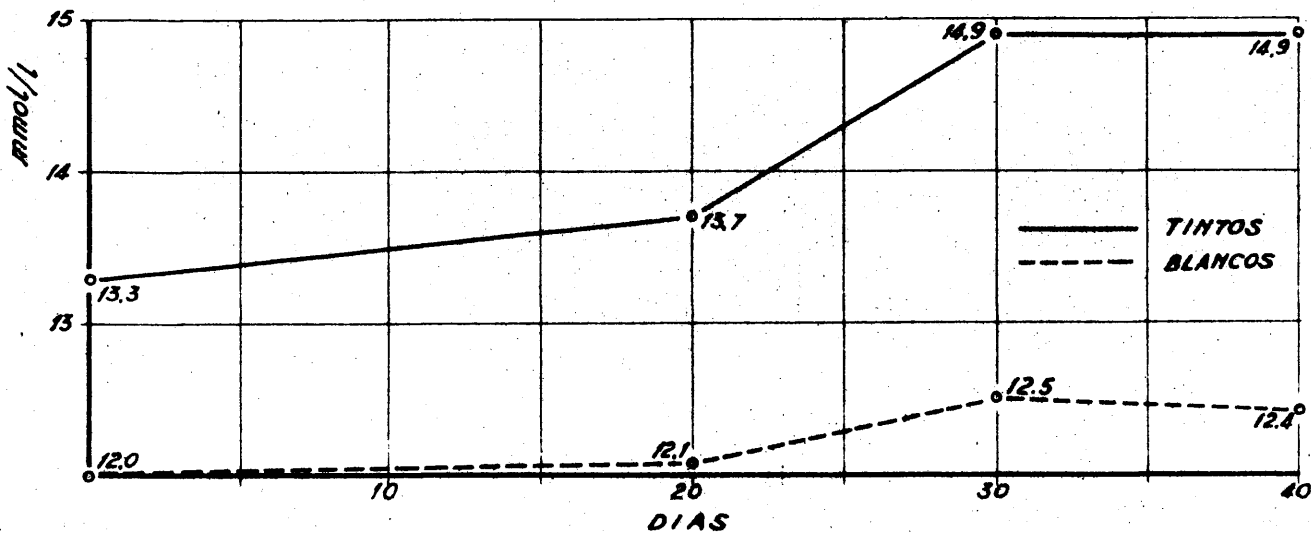


fig. 40

T A B L A V

Incrementos producidos en las concentraciones de algunos componentes del vino blanco y tinto durante su crianza en condiciones análogas.

Componente	T I N T O	B L A N C O
Acidez total (meq/l)	- 8,0	- 7,5
Acidez volátil (meq/l)	- 5,4	- 5,6
Acidez fija (meq/l)	- 2,6	- 1,9
Acido láctico (meq/l)	+ 6,6	+ 6,0
Etanol (g)	- 1,3	- 1,1
Etanal (mmol/l)	+ 7,5	+ 6,9
Butilenglicol (mmol/l)	+ 1,6	+ 0,4
Glicerina (mmol/l)	- 12,3	- 10,2
Materia reduct. (mmol/l)	- 11,9	- 5,6

zo. Despues de 20 días, cuando las concentraciones ~~se~~ habian hecho mas próximas, tambien sus respectivas curvas tienden a seguir análogos caminos.

Solo hubo discrepancia en la producción de 2,3-butilenglicol (fig.40) y no se **observó** formación de acetales.

En la tabla V pueden verse los incrementos comparados de todos los constituyentes objeto de análisis, los de glicerina y ac. láctico estan considerados a partir de los 20 días del ensayo. La diferencia en cinco componentes no llega al 10%, en dos de ellos es menor que el 20% y solo en materia reductora y butilenglicol alcanza cifras mayores.

Por último se indicana continuación algunas de las modificaciones producidas en los caracteres organolépticos del vino durante la crianza.

El vino original era un tinto de Navalcarnero, vinificado con la casca, que habia tomado el color "morapio" propio del gusto de la región. De sabor era áspero y basto. Su crianza fué acompañada por un gran depósito de materia colorante que continuó sedimentando durante algun tiempo despues de clarificado y embotellado hasta que el vino tomó el color de piel de cebolla típico de los vinos tintos rancios. Bajo la acción del velo se afinó grandemente ya en las primeras etapas y perdió por completo su aspereza. Su aroma se hizo mas suave y rico en matices y adquirió gusto a vino de flor .

Capítulo 6º

CRIANZA CON FLOR DE VINOS DE DIFERENTES
ORIGENES.

A continuación y para terminar los estudios sobre aspectos generales de la crianza, se exponen algunos de los ensayos de crianza de vinos blancos y tintos hechos, en cubetas de 10 litros, con objeto de comprobar la evolución de sus caracteres organolépticos.

Los vinos objeto de estudio fueron:

B l a n c o s

- Valdepeñas, 1955. Alcohol, 13º. Típico de La Mancha.
- Manzanares, 1955 } 13-14º. De distintas partes de La
" 1956 } Mancha, con los caracteres usuales
" 1956 } de los vinos de esta zona.
- Almeria 1956. 11º. Vino hecho con uva de mesa. Al
go insípido y con sabor a holle -
jos.
- Montilla , 1955 } Alcohol, 15,5º. Característicos
" 1956 } de Los Ruedos. Ideales para la -
crianza con flor.
- Jumilla, 1957. 11º de alcohol. Vino de quema he
cho con desperdicios de uva de -
Almeria. Bastante buena calidad
dentro de lo que podía esperarse.

T i n t o s

- Navalcarnero, 1955. Alcohol, 15,3%. Muy gordo y bas
to.
- " 1956. Análogo al anterior.
- Cadalso de 1957. 14,5%. Seco y del tipo corriente
los Vidrios te de pasto.
- Valdepeñas, 1956. 13,9%. Fino de buena calidad.
- " 1957. 12,0%. Mismas características.
- Navarra, 1956. 14,0%. Edulcorado con sacarina,
calidad corriente.
- Jumilla, 1955. 17,0%. Envejecido en madera dura
rante dos años.
- " 1956. 16,0%. Ligeramente abocado. Muy
fino.
- " 1957. 15,5%. Tinto de doble pasta para
ra coupage. Mucho color y sabor
astringente.

Los vinos de Jumilla eran todos bien equilibrados
y de calidad excelente.

Todos los vinos, según conveniencia, fueron encabe-
zados hasta unos 15-15,5% con alcohol vínico de buena -
calidad o se diluyeron hasta la misma concentración con
agua conteniendo las cantidades de ac. tartárico necesa
rias para que su acidez total no variase. Se inocularon
con cepas 7 y 8 los blancos y con 7 y 13 los tintos y se
sometieron a periodos de crianza de unos 40 o 45 días,

al cabo de los cuales fueron descubados, clarificados y embotellados.

Comentario

La evolución fué normal en todos los casos a excepción del tinto de Navarra, del que hubo que prescindir por haberse acetificado.

La crianza de los vinos tintos fué siempre acompañada de abundante depósito de materia colorante, incluso el de Jumilla, 1955 que ya había estado sometido a añejamiento en madera.

Los caracteres organolépticos de los vinos blancos solo resultaron realmente mejorados cuando el vino base reunía condiciones para la crianza. Tal fué el caso de los mostos de Montilla, mientras los demás, si bien mejoraron y se afinaron algun tanto, no llegaron a adquirir un tipo franco y definido.

En cuanto a los tintos, en todos los casos se consiguió una mejora patente de su calidad, incluso en los que habían estado sometidos previamente a envejecimiento. Fueron características de su evolución la pérdida total o casi total del tipo inicial, sustituido por la aparición de caracteres de flor casi siempre muy acusados, la notable disminución del color y la aparición de un aroma más fresco.

Resumiendo, de nuestros ensayos se deduce que la crianza con flor es siempre aconsejable para mejorar la calidad de los vinos tintos comunes y el aumento de gas to que esto representa queda compensado con creces por el valor superior del producto obtenido. La aplicación de crianza a los blancos debe ser objeto de estudio pre vio en cada caso, pues en muchos tipos de vinos no re - sultará económica.

SECCION III

ESTUDIO ESPECIAL DE ALGUNOS ASPECTOS DEL METABOLISMO DE LA LEVADURA EN VINOS Y EN MEDIOS SINTETICOS.

El vino bajo velo debe sufrir profundas transformaciones que los análisis de que es objeto habitualmente no reflejan más que de un modo grosero. Para tratar de conocer más a fondo el metabolismo de la levadura se requiere un estudio más profundo de su acción sobre los componentes del medio en que actúa en condiciones tales que se pueda seguir fácilmente su evolución. Por esta razón, si bien en algunos casos las experiencias se pudieron llevar a cabo sobre vino, estéril o no, en general se dejó sentir la necesidad de utilizar un medio sintético de desarrollo que, guardando analogías con el vino, permitiera estudiar en cada caso sólo los componentes deseados evitando interferencias de otras sustancias presentes en los medios naturales.

Los trabajos que se exponen a continuación comprenden el estudio del metabolismo de diversas fracciones nitrogenadas en medio estéril y la evolución del etanol, glicerina y ácidos en medios sintéticos.

Capítulo 1º

EVOLUCION DEL NITROGENO

Los resultados de los análisis realizados con la intención de seguir la evolución del nitrógeno durante la crianza en la bodega daban lugar a suponer que pudiera existir una asimilación, por el velo, del nitrógeno atmosférico, opinión de la que participan numerosos autores según ya quedó expuesto.

La presente experiencia tiene por objeto comprobar la posible utilización del nitrógeno del aire por el velo y el estudio de la evolución del nitrógeno total, formol, amoniacal y amínico por la acción de la levadura en vino estéril.

Material y métodos

Una serie de matraces erlenmeyer de 100 ml. con 85 ml de mosto de Montilla se esterilizó en autoclave a $\frac{1}{2}$ atm durante 10 minutos. A consecuencia de la esterilización los matraces perdieron unos 12 ml de líquido por término medio, al tiempo que la graduación alcohólica del vino descendía de 16,4º a 10,2. Con una mezcla de alcohol y agua, al 40% aproximadamente del primero, añadida en condiciones de esterilidad, se elevó la concen-

tración del vino hasta unos 14,5^o y el volumen final, a 80 ml. 32 matraces se sembraron con cepa 7 en fase de velo, cuatro asas cada uno y otros tantos se dejaron como testigos. La temperatura fué mantenida alrededor de 16^o.

A los ocho días en todos los matraces se había formado un velo tenue que cubría totalmente la superficie del vino. Los velos prosiguieron su desarrollo normal, al cabo de 16 días eran espesos y arrugados y un poco - más tarde, sobre los 20 días, empezaron a aparecer fragmentos de velo viejo en su cara inferior. En días sucesivos se inició el desprendimiento de estas porciones - de velo viejo, que ya no cesó hasta el fin de la expe - riencia.

Se hizo un análisis inicial del contenido del vino en las distintas fracciones nitrogenadas y después, otros ocho durante los 76 días de la experiencia, los cinco - primeros con intervalos de ocho días y los tres últimos cada doce días.

Cuatro matraces con velo y otros tantos testigos - fueron empleados para cada análisis. Después de separar los velos por filtración, el líquido recogido, junto con las aguas de lavado, se diluyó exactamente hasta un 50% sobre el volumen inicial pero en los datos analíticos se expresan las concentraciones con relación al primitivo volumen de vino.

Para seguir la posible utilización del nitrógeno - atmosférico por el velo se determinó a lo largo de toda

la experiencia la suma del nitrógeno total del medio sem
brado más el de la levadura y se comparó con el nitrógen
o total del testigo correspondiente. Una concentración
menor en el testigo que en el vino-velo durante el ensa
yo indicaría la existencia de la asimilación buscada.

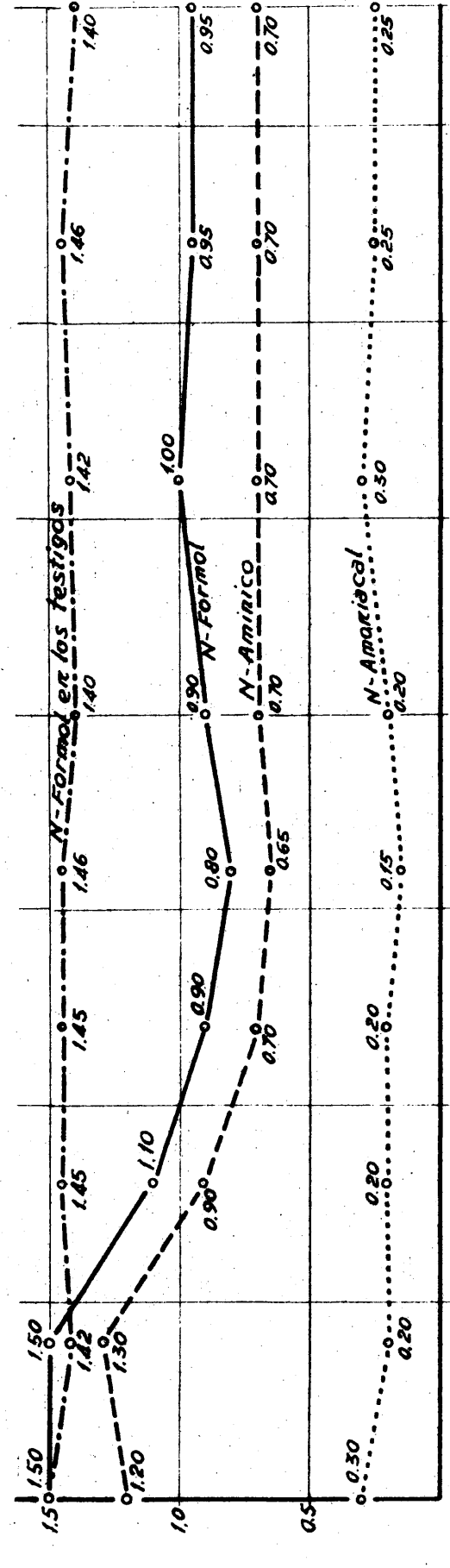
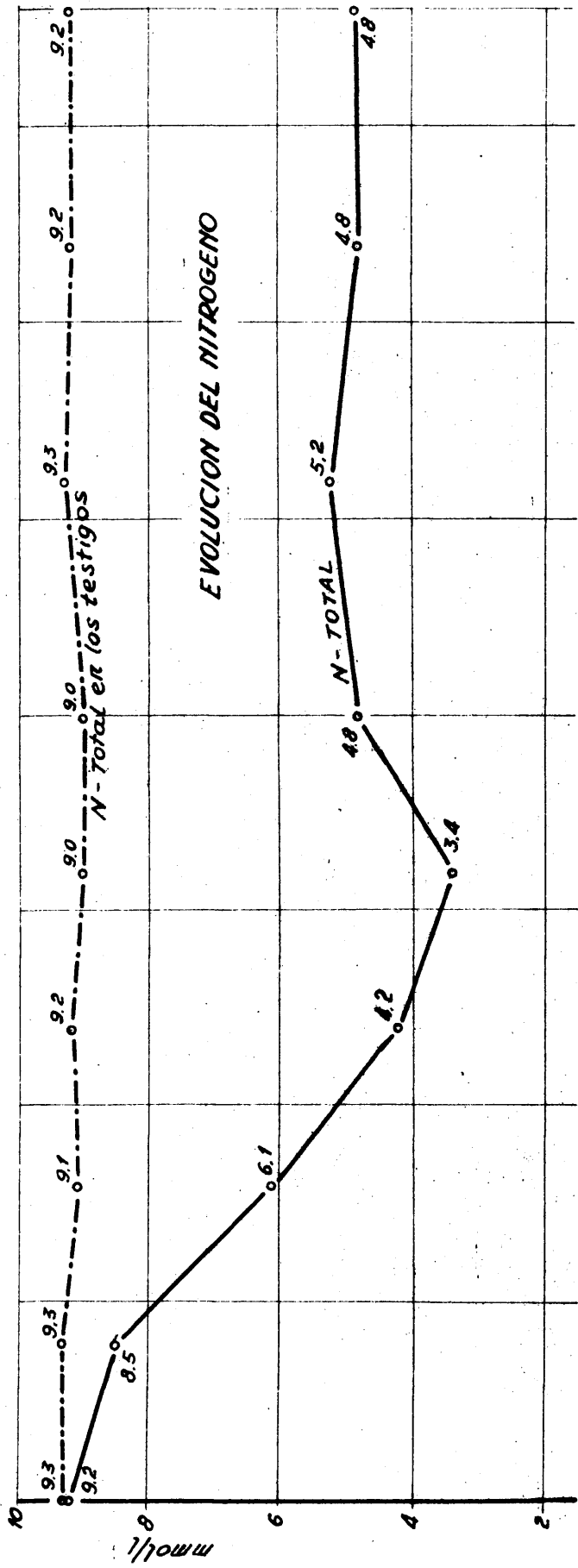
Los métodos analíticos de las fracciones nitrogena
das en medios líquidos se describen en la pag. 50. El ni
trógeno total del velo se valoró sobre muestra de unos
0,15 g de levadura seca y sus concentraciones están refer
idas siempre a peso de ésta.

El primer análisis de nitrógeno total, a los ocho
días de la experiencia, se hizo sobre el conjunto de pa
pel de filtro y depósito de velo porque la pequeña cantid
ad de materia sólida colectada hizo imposible su separar
ación del filtro. Del total encontrado se dedujo la pequeñ
ña proporción debida a impurezas del papel.

La determinación de la masa del velo se explica en
la pag. 80 y la materia seca colectada está referida a
la cantidad de velo que correspondería proporcionalmen
te a 1 litro de medio.

Comentario

En la fig. 41 se incluyen las curvas de concentraci
ón del medio en nitrógeno total y en fracciones nitro
genadas durante el ensayo. También se representa la var
iación del nitrógeno total y formol en los testigos -



D I A S f i g . 4 1

sin sembrar, que no son sino las que pueden atribuirse a los errores de los métodos analíticos y a las diferencias de composición lógicas en unos medios de cultivo - iguales sólo estadísticamente. Se ha considerado inútil la representación de nitrógeno amoniacal y amínico en - los testigos, el primero por no presentar, prácticamente, variaciones y el segundo por ser casi igual que el nitrógeno formol.

En los ocho primeros días las concentraciones de - nitrógeno en el medio sufrieron muy pequeña variación - por ser también muy pequeña la cantidad de velo presente. Durante los 15 días siguientes hubo un fuerte incremento de masa del velo y su curva (fig. 42) es prácticamente una recta de pendiente muy pronunciada en tanto que el nitrógeno y las fracciones nitrogenadas cayeron análogamente de un modo muy marcado y en línea casi recta (fig. 41). A los 32 días se alcanzó un máximo en el desarrollo del velo correspondiendo con mínimos en las concentraciones de nitrógeno del medio y a partir de este momento hasta el final de la experiencia el peso del velo parece mantenerse constante con la excepción de un aumento registrado en el último velo colectado, que pudo ser accidental pues no correspondió con variaciones simultaneas de nitrógeno.

La autólisis de la levadura se puede poner de manifiesto por la constante disminución del tanto por ciento

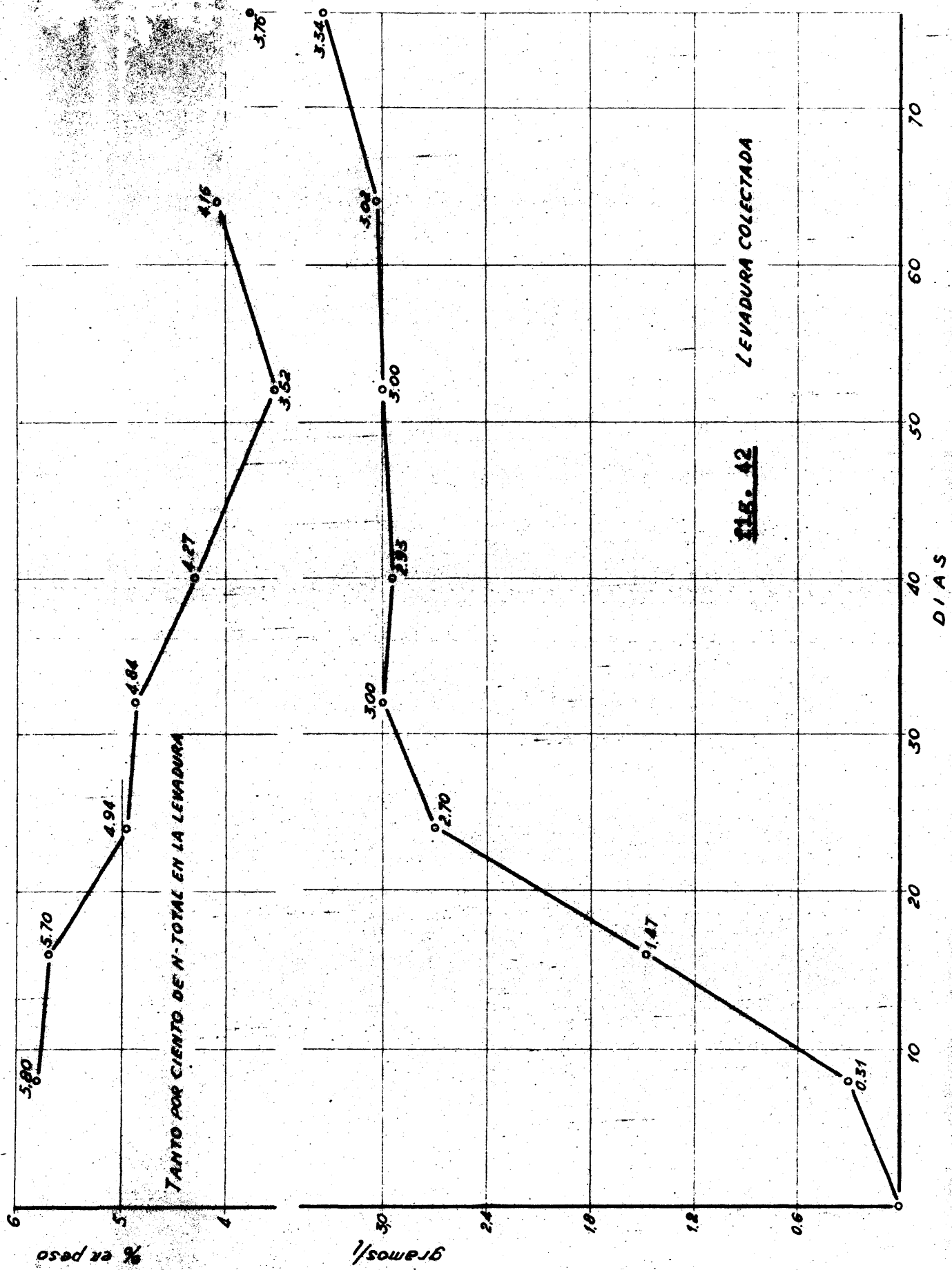


Fig. 42 LEVADURA COLECTADA

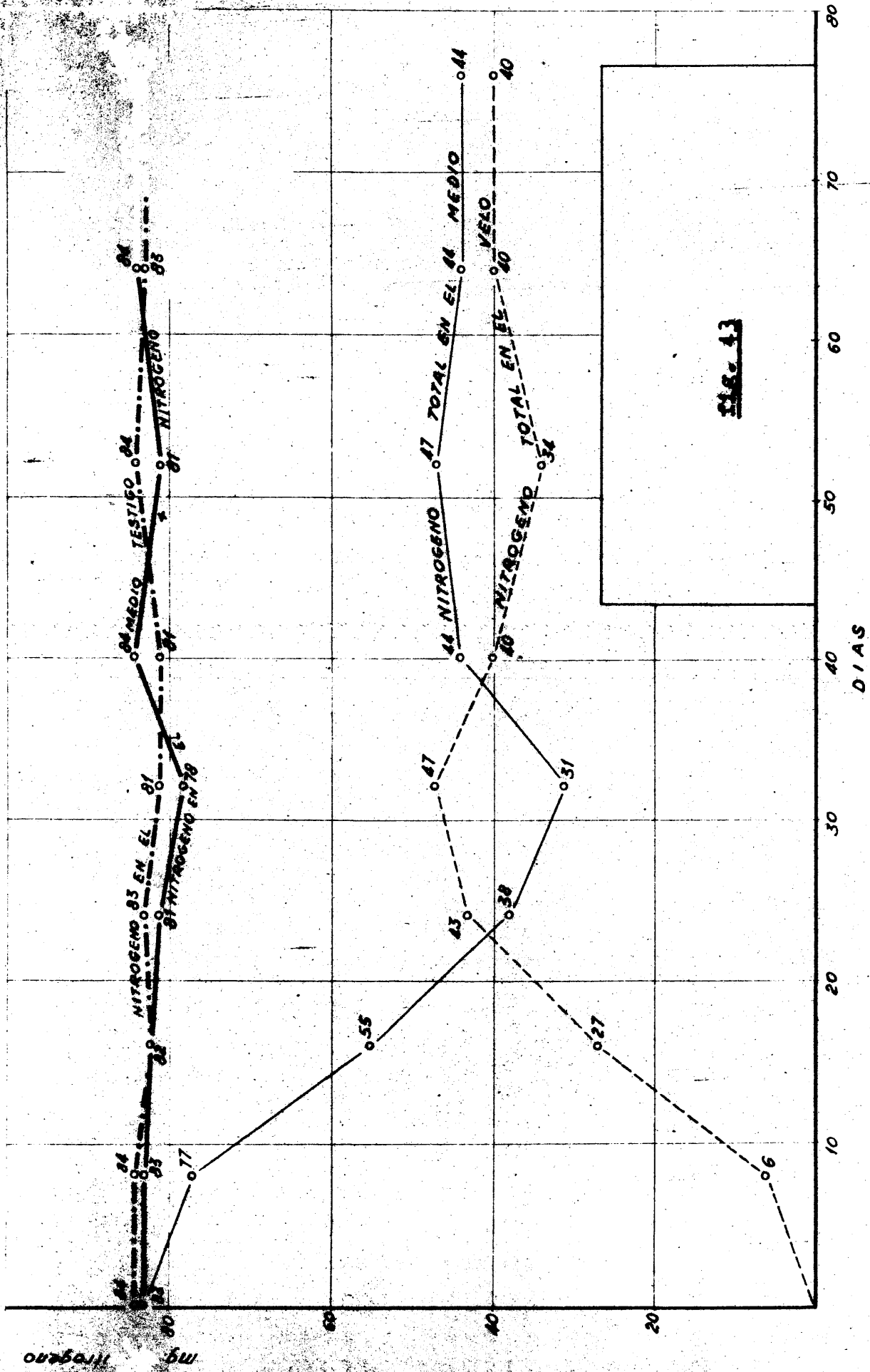


Fig. 43

to de nitrógeno en el velo (fig. 42) que demuestra la existencia de una desintegración de la estructura celular con liberación de sus constituyentes. Fué simultánea con la multiplicación del microorganismo y se hizo patente desde el momento en que se pudo disponer de levadura seca en cantidad suficiente para el análisis de su contenido en nitrógeno.

Apenas perceptible hasta los 16 días, cuando la gran mayoría de las células eran jóvenes, se manifestó claramente, con una disminución de casi un 20% en el contenido de nitrógeno del velo, al tiempo que se empezaban a notar adherencias de levaduras viejas. El fenómeno se acentuó a continuación y a los 52 días el nitrógeno total del velo era apenas el 60% del inicial. Ya en adelante la autólisis pareció detenerse lo mismo que la multiplicación celular y la evolución del nitrógeno en el medio.

Los mínimos que presentan todas las curvas de nitrógeno señalan el punto en que el nitrógeno liberado en la autólisis equilibró al consumido por la levadura. Después pasó a predominar la primera, aumentó la concentración de nitrógeno en el medio y disminuyó el tanto por ciento en la levadura hasta que, a partir de los 52 días se detuvo todo proceso.

La disminución de las fracciones nitrogenadas en el medio fué proporcional a sus concentraciones respectivas sin que la levadura mostrase preferencia por ninguna en

particular. Nitrógeno formol, amínico y amoniacal fueron asimilados aproximadamente hasta un 50% del contenido inicial en 32 días y el nitrógeno total se redujo al 37% en el mismo plazo. A partir de los 52 días éste se repartió aproximadamente por mitad entre el velo y el medio.

Para tratar de poner de manifiesto una posible asimilación de nitrógeno atmosférico por la levadura en fase de velo se estudió la variación de la cantidad total presente en el medio sembrado y en la levadura colectada comparando la suma de ambas con el nitrógeno existente en los matraces testigos.

Los resultados pueden verse en la fig. 43 en la que los mg de nitrógeno en el medio, en los testigos y en el velo están referidos a 320 ml que es el contenido en volumen de cuatro matraces separado para cada ensayo.

Las dos curvas, de variación de nitrógeno en el velo y en el medio, empiezan, la primera prácticamente en cero y la segunda en su valor más alto. A medida que se asimila nitrógeno del medio su curva cae y aumenta simétricamente el nitrógeno en el velo que; a los 32 días, alcanza un valor máximo y después vuelve a bajar pero manteniéndose ya en valores casi constantes y muy próximos entre sí en ambas curvas.

La suma del nitrógeno total en el medio y en la levadura permaneció prácticamente constante todo el tiempo, si bien presentaba diferencias con la concentración

en los testigos, éstas fueron de pequeña monta, un máximo de 3 mg, y no mostraron tendencia definida en ningún sentido pues lo mismo aparecían en más que en menos. Es necesario, por tanto, atribuirlos a errores de las determinaciones sin que pueda en ningún momento pensarse en un aumento de nitrógeno en el medio ~~sembrado~~, incluido el velo, sobre el del testigo, de donde queda claro que, en las condiciones de la experiencia, no tuvo efecto ninguna asimilación de nitrógeno atmosférico.

Capítulo 2º

PUESTA A PUNTO DE UN MEDIO DE CULTIVO DONDE LA
LEVADURA PUEDA DESARROLLAR EN FASE DE VELO.

Requerimientos en sustancias carbonadas
ternarias.

Los microorganismos ensayados fueron:

- Cepa 7 de *S. oviformis*
- " 8 " *S. oviformis*
- " 13 " *S. chevalieri*
- " 14 " *S. oviformis*

Se partió de un medio inicial que contenía, además de peptona y urea como fuentes de nitrógeno y aminoácidos, las sales minerales que satisfacen las necesidades de los microorganismos en general y los factores de crecimiento presentes en la melaza de caña. Sobre él se estudió la utilización por la levadura de las materias carbonadas ternarias habitualmente presentes en el vino, alcohol, glicarina y azúcares.

En otra experiencia que se relatará más adelante se hicieron ensayos de asimilación de ácidos orgánicos.

Todos los productos empleados fueron de la casa Merck con garantía de pureza.

MEDIO INICIAL (A₁)

MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,8	g/l
CaSO ₄ .2H ₂ O.....	0,43	"
K ₂ SO ₄	0,6	"
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,2	"
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,009	"
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,004	"
FeCl ₃ .6H ₂ O.....	0,024	"
Urea.....	0,8	"
Peptona.....	2,5	"
Melaza de caña.....	0,5	ml/l
H ₂ SO ₄ para llevar el pH aprox. a 3,2.		

Sobre esta base se prepararon las series siguientes:

- 1.- Medio A₁ + glicerina (10 g/l)
- 2.- " " + etanol (13%)
- 3.- " " + glucosa (5 g/l)
- 4.- " " + " + glicerina
- 5.- " " + etanol + "
- 6.- " " + " + glucosa
- 7.- " " + " + " + glicerina

En todas las series se pusieron las mismas concentraciones de glucosa, etanol y glicerina indicadas para las tres primeras.

Las series fueron distribuidas, cada una en 10 matraces de 100 ml, a razón de 70 ml por unidad, los cuales

se esterilizaron a 0,5 atm durante 10 min. A continuación a cada matraz de las series 2, 5, 6 y 7 se agregó alcohol hasta una graduación final de 14%, quedando los matraces con unos 80 ml de volumen total. Un volumen igual de agua estéril fué añadido a las series sin alcohol.

Los matraces de cada serie se sembraron, de dos en dos, con las cepas 7, 8, 13, 14 cultivadas previamente hasta formar velo sobre vino estéril, quedando como testigo dos matraces sin sembrar. La temperatura se mantuvo entre 15 y 18°.

A los 20 días se determinó la masa de los velos formados y se hicieron análisis de las sustancias carbonadas en comparación con los testigos.

Los métodos analíticos fueron los mismos empleados para vinos, descritos en las pag. 48-50, con algunas pequeñas modificaciones sin importancia.

Comentario

La intensidad del desarrollo y las masas de los velos formados, así como la utilización por la levadura de los nutrientes del medio, fueron muy similares para las cuatro cepas salvando las pequeñas diferencias de actividad ya señaladas en nuestros ensayos sobre vinos. Por ello juzgamos inútil presentar los resultados completos de esta experiencia y en la tabla VI se reproducen sólo los de la cepa 7, una vez más la de mayor actividad.

T A B L A V I

Desarrollo del velo en medios sintéticos en relación con la fuente ternaria
de materia carbonada.

Serie	Desarrollo	Peso del velo 2 matraces	Alcohol (g)		Azúcares (g/l)		Glicerina (g/l)	
			Medio	Testigo	Medio	Testigo	Medio	Testigo
1	escaso	0,03 g.	-	-	-	-	8,8	9,1
2	muy bueno	0,17 "	9,8	10,8	-	-	-	-
3	escaso	0,02 "	-	-	4,2	4,5	-	-
4	escaso	0,02 "	-	-	5,0	5,1	8,9	9,3
5	muy bueno	0,16 "	10,1	10,8	-	-	5,4	8,7
6	muy bueno	0,13 "	10,2	10,7	4,0	4,7	-	-
7	muy bueno	0,13 "	10,0	10,5	4,0,	4,6	5,7	9,3

Destaca a primera vista un hecho cuya extensión fué objeto de comprobación ulterior. El alcohol, en un medio sintético tal como el empleado, es imprescindible para que la levadura desarrolle en fase de velo . En ausencia de etanol, caso de las series 1, 3 y 4, no hubo prácticamente formación de velo y la mayor parte de la escasa multiplicación celular fué de levadura caída al fondo - de los matraces y actuando en fase anaerobia. Aún cuando el medio disponía de otros nutrientes, en cantidad suficiente, la levadura en fase de velo, sembrada en la superficie del medio, se limitó a subsistir sin multiplicación aparente.

Si el medio contiene alcohol hay un activo desarrollo que no parece ser acelerado por la presencia de glicerina o glucosa, tanto si acompañan al alcohol por separado como cuando el medio contiene los tres compuestos simultáneamente.

En todos los casos la levadura, como en el vino, - usó de todas las fuentes ternarias presentes lo que se tradujo en una disminución del consumo de alcohol con relación a la serie 2, pero siendo éste, no obstante, el componente más utilizado.

Formación de velo sobre un vino con canti-
dades crecientes de alcohol.

Para comprobar si la influencia del alcohol en la formación del velo es tan importante cuando la levadura actúa sobre un medio rico en nutrientes y adecuado para su desarrollo como al actuar en medios sintéticos, se privó lo más completamente posible de alcohol a un vino de Montilla, de características óptimas para la crianza con flor, por destilaciones repetidas al vacío, reponiendo con agua destilada el volumen inicial, a temperatura inferior a 55° para evitar posibles alteraciones.

Con este destilado, agregándole agua y alcohol en distintas proporciones, se prepararon series de matraces de 100 ml desde 0 a 18° alcohólicos, con intervalos de 2°, de modo que el volumen final fuese aproximadamente el primitivo del vino. El alcohol se añadió después de esterilizar a vapor fluyente y el volumen final fué de unos 80 ml en cada matraz.

La composición media del líquido resultante en los matraces fué:

Etanol.....	0,1-18°
Etanal.....	0,0
Acidez total....	4,5 g/l (en ac. tartár.)
Acidez volátil..	0,0
Acido láctico...	1,2 g/l
Glicérina.....	9,7 "
Materia reduct..	3,4 "

Cuatro series fueron sembradas con cepa 7 y otras cuatro, con cepa 13 en fase de velo.

Se tomó nota del día en que se apreció un comienzo franco en el desarrollo de los velos, entendiéndose por tal el momento en que los islotes de velo, inicialmente sembrados, empezaban a extenderse y a aumentar claramente de tamaño. (Esta apreciación es meramente subjetiva pero tiene valor informativo)

A los 20 días se dió por terminada la experiencia y la levadura se recogió y se pesó en seco como se indica en la pag. 80. Los resultados se refieren al contenido de cuatro matraces cada muestra.

Comentario

Tanto en rapidez de desarrollo como en masa de velo colectada la cepa 7 superó a la cepa 13, pero, salvando las diferencias de actividad, las dos especies se comportaron de forma análoga una vez más.

En el vino privado casi completamente de alcohol - (fig. 44) las levaduras iniciaron la expansión del velo en seis y nueve días pero el desarrollo se detuvo en poco tiempo y permaneció estancado en tanto que el pequeño depósito inicial de levadura en el fondo de los matraces aumentaba de volumen claramente, hecho ya observado en medios sintéticos sin alcohol (pag. 141).

Al crecer la graduación alcohólica desde 0,1 a 8%,

Desarrollo del velo en relacion con la concentracion alcoholica de un vino.

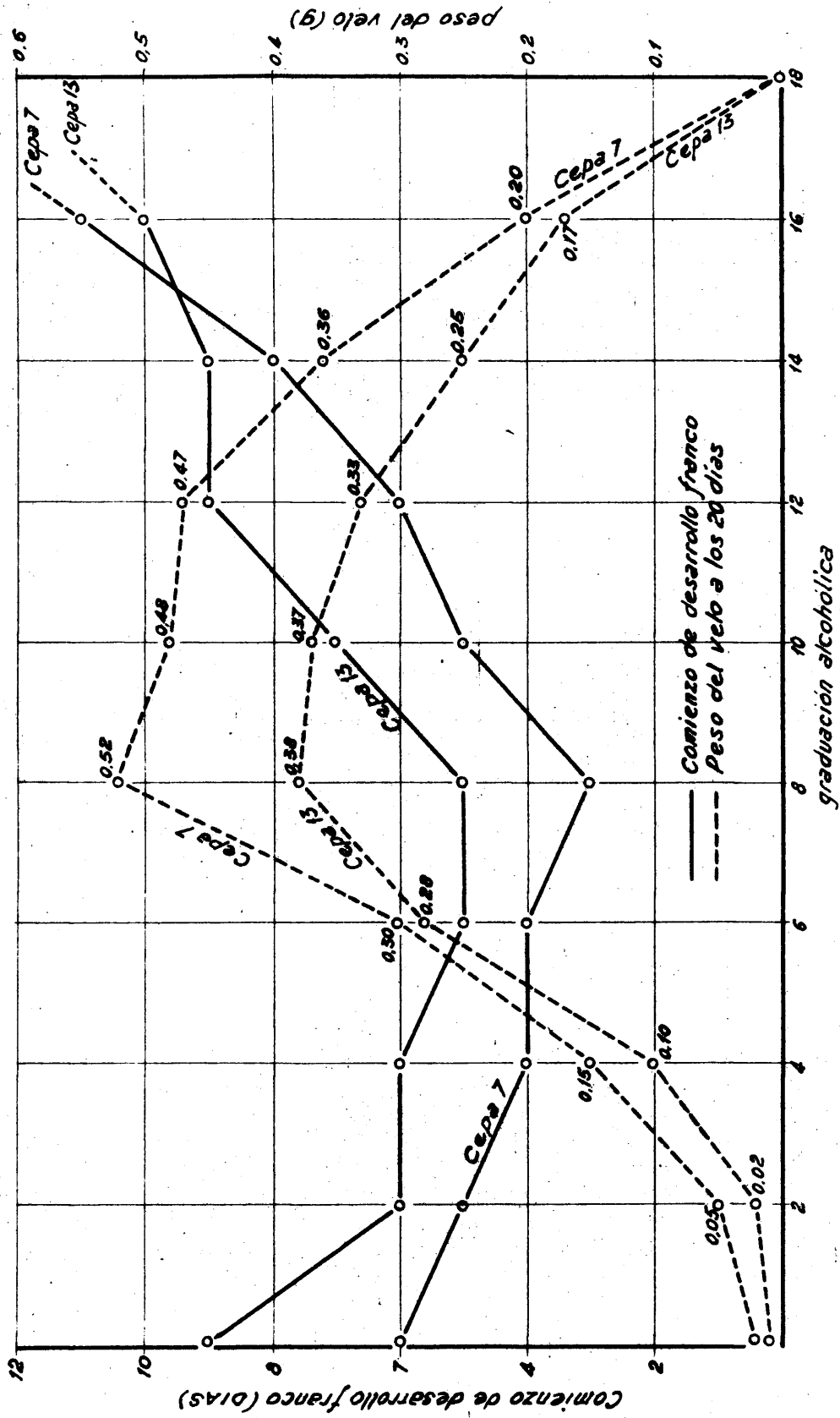


fig. 44

las células se multiplican cada vez más rápidamente y a esta última graduación la cepa 7 tardó sólo 3 días, y la cepa 13 cinco, en iniciar su desarrollo. Simultáneamente el peso del velo a los 20 días creció casi en razón directa y para la concentración de 8° alcanzó un máximo en las dos cepas.

En adelante, al seguir aumentando la concentración alcohólica, se fué retrasando el comienzo del desarrollo franco si bien, una vez iniciado, transcurrió con rapidez de forma que la masa de levadura colectada, aunque disminuyó con relación al máximo, se mantuvo bastante próxima a él hasta los 12° iniciándose desde aquí un marcado retraso en el desarrollo, que tardó en comenzar 10 y 11 días cuando el alcohol llegó a 16°, y disminuyendo también fuertemente la cantidad de levadura colectada. Las curvas de las dos cepas van aproximándose, por caer más rápidamente la cepa 7, y en vino de 16° se recogió casi la misma masa de velo. Para graduaciones de 18° ya la levadura no pudo iniciar el desarrollo en fase aerobia.

Concentraciones de alcohol excesivamente altas inhiben el desarrollo del velo y si son bajas retrasan el comienzo de su formación. Existe una concentración mínima, aproximadamente de 1°, necesaria para que se forme velo y un óptimo de condiciones favorables alrededor de 8°. La máxima tolerancia al alcohol por la levadura en fase de velo fué de unos 17°.

De los ensayos de desarrollo del velo en medios - sintéticos, descritos en páginas anteriores, y en vinos con cantidades crecientes de etanol son de destacar los siguientes hechos:

En medios sintéticos conteniendo sales minerales , factores de crecimiento, sustancias nitrogenadas y etanol la levadura tuvo un buen desarrollo en fase de velo.

En medios análogos sin alcohol no se formó velo en presencia de otras sustancias carbonadas ternarias, glicerina o glucosa. La escasa multiplicación celular transcurrió principalmente en fase anaerobia.

En vino desalcoholizado tampoco hubo formación de velo a pesar de que aquel contenía todos sus componentes excepto etanol.

En el mismo vino hubo desarrollo de flor en cuanto se le adicionó alcohol.

De todo lo cual se sigue que el alcohol no sólo es imprescindible para que la levadura forma velo sino que es la causa, al menos inmediata, de que desarrolle de tal forma. El etanol impide el crecimiento de microorganismos perjudiciales al vino. De él depende la formación de velo y permite controlar el peso total obtenido de levadura evitando desarrollos excesivos que paralelamente llevan consigo un gran consumo de alcohol.

Necesidades de algunos factores de crecimiento para el desarrollo en fase de velo

Medio A₂. Preparado sobre la base del medio A₁ (pag. 139) sin melaza y con alcohol a 14°. Se ha puesto esta graduación, a pesar de estar lejos de la óptima para el velo, porque, próxima a la habitual en vinos de flor, todavía le permite un desarrollo bastante rápido.

En este medio se estudió el efecto sobre el velo de los siguientes factores de crecimiento, por separado y en conjunto:

Biotina..... 50 µg/l
Mesoinositol..... 90 mg/l
Pantotenato cálcico.... 70 "
Aneurina..... 2,5 "

Combinando estos factores se prepararon 10 series:

Serie 1. Medio A₂

- " 2. " " + biotina
- " 3. " " + mesoinositol
- " 4. " " + aneurina
- " 5. " " + pantotenato
- " 6. " " + todos los factores
- " 7. " " + " " " sin biotina
- " 8. " " + " " " " mesoinositol
- " 9. " " + " " " " aneurina
- " 10. " " + " " " " pantotenato

Los ensayos se condujeron de la forma descrita en las pag. 139-140 empleando para la siembra cepa 7 de *S. oviformis* cultivada previamente en fase de velo sobre medio A₁ estéril con alcohol.

En la tabla VII se recogen los resultados de la acción, sobre el velo, de los factores añadidos al medio.

T A B L A V I I

Serie	Desarrollo	Peso del velo a los 20 días. (2 matraces)
1	casi nulo	0,01 g
2	bueno	0,11 g
3	escaso	0,03 g
4	casi nulo	0,01 g
5	muy escaso	0,01 g
6	bueno	0,15 g
7	escaso	0,01 g
8	bueno	0,10 g
9	bueno	0,11 g
10	bueno	0,13 g

En el medio A₂ sin factores de crecimiento (s. 1) - el desarrollo fué casi nulo. Y no se incrementó más que ligeramente por la acción de ac. pantoténico o aneurina (s.4,5). Más efecto, aunque en todo caso muy pequeño, pareció producir el mesoinositol (s.3) pero fué la biotina (s.4), de entre los cuatro factores de crecimiento - ensayados por separado, la que determinó un incremento del velo comparable al que pudo producir la adición de melaza.

El mayor desarrollo de velo se consiguió en la serie 6, con la adición de los cuatro factores, lo que indica que la acción de la biotina se puede ver reforzada por la de los otros tres. La supresión de aneurina y pantotenato (s.9,10) tuvo poco efecto en el velo y algo más se notó la falta de mesoinositol (s.8). Pero estos últimos factores reunidos no fueron capaces de ejercer casi ninguna acción sobre el velo en ausencia de biotina (s.7).

Se deduce pues claramente que la biotina es indispensable para que la levadura actúe en fase de velo sobre medios de las características de los reseñados. A los demás factores se les puede considerar útiles para incrementar su acción pero sin que su efecto sea apreciable cuando falta la biotina ^{de}salvo, en pequeña escala, el mesoinositol.

Desarrollo en fase de velo sobre medios
conteniendo ácidos orgánicos.

El objeto de la experiencia fué completar los estudios sobre asimilación, por el velo, de las sustancias carbonadas ternarias presentes en los vinos.

Como medio de cultivo se empleó el A₃, obtenido a partir del medio A₂ (pag.146) adicionado de factores de crecimiento, quedando con la composición siguiente:

MEDIO A₃

MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,8	g/l
CaSO ₄ .2H ₂ O.....	0,43	"
K ₂ SO ₄	0,6	"
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,2	"
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,009	"
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,004	"
FeCl ₃ .6H ₂ O.....	0,024	"
Urea.....	0,8	"
Peptona.....	2,5	"
Biotina.....	50	µg/l
Mesoinositol.....	90	mg/l
Pantotenato cálcico.....	70	"
Aneurina.....	2,5	"
H ₂ SO ₄ para llevar el pH aprox. a 3,2.		
Alcohol a 14º, añadido después de este		
rilizar el medio en autoclave a 1 atm.		
durante 10 minutos.		

El microorganismo utilizado fué, una vez más, la cepa 7 de S. oviformis cultivada previamente sobre medio A₃ estéril.

Sobre la base del medio A₃ se prepararon series de matraces, con 80 ml de volumen final por término medio, sustituyendo la acidez sulfúrica por ácidos tartárico, málico, cítrico, láctico y acético en concentraciones suficientes para llevar el pH del medio a 3-4. El alcohol se añadió, como ya quedó indicado, después de esterilizar. Con cada ácido se dispusieron cuatro series de matraces dejando otras tantas como testigos.

Otras series análogas, sustituyendo el alcohol por un volumen igual de agua destilada estéril, se emplearon para estudiar la posible asimilación de los ácidos en ausencia de etanol.

A los 20 días se hizo una toma de muestras y su análisis como se expone en la pag. 140.

Comentario

Los datos que aparecen en la tabla VIII confirman que en medios con alcohol hubo, como era de esperar, gran desarrollo de velo y éste fué escaso en su ausencia.

En los medios sin etanol, con ac. láctico y acético, alimentos adecuados para la levadura (series I,J), ésta se multiplicó más activamente que en las series F,G,H - con ac. tartárico, málico o cítrico. Singularmente el -

T A B L A V I I I

Desarrollo del velo en medios conteniendo ácidos orgánicos. A los 20 días de la siembra se determinó acidez final y masa de velo. S.-Medio sembrado. T.-Testigo.

<u>SERIES CON</u> <u>ALCOHOL</u>		Ac. inicial (meq/l)	Acidez final (meq/l)	Masa de velo 4 matraces
A)	S	35,2	36,0	0,31 g
Ac. tart.	T	35,2	37,0	
B)	S	44,3	45,2	0,24 g
Ac. málico	T	44,3	46,9	
C)	S	37,1	37,1	0,20 g
Ac. cítrico	T	37,1	37,3	
D)	S	48,4	34,2	0,22 g
Ac. láctico	T	48,4	48,9	
E)	S	61,3	31,4	0,26 g
Ac. acético	T	61,3	60,5	
<u>SERIES SIN</u> <u>ALCOHOL</u>				
F)	S	39,7	40,3	0,03 g
Ac. tart.	T	39,7	40,1	
G)	S	52,8	52,6	0,05 g
Ac. málico	T	52,8	52,6	
H)	S	41,3	41,0	0,03 g
Ac. cítrico	T	41,3	41,1	
I)	S	52,5	36,8	0,08 g
Ac. láctico	T	52,5	53,0	
J)	S	73,5	1,1	0,10 g
Ac. acético	T	73,5	71,7	

ácido acético fué consumido de un modo casi total y el pH pasó de 4,0 a 7,5 en 20 días. El ácido láctico se redujo en un 30% en el mismo plazo pero la multiplicación celular fué menor. Los otros tres ácidos no fueron utilizados aparentemente por el velo.

Con la excepción de la serie A, con ac. tartárico, donde la multiplicación de las células fué extraordinaria, en todas las demás series con alcohol la materia celular fué colectada en cantidades parecidas, sin que la presencia y consumo de ácidos asimilables se tradujera en un incremento apreciable de la masa del velo.

Por lo que respecta a la utilización de los ácidos por la levadura, los ácidos láctico y acético fueron fácilmente asimilados, hecho repetidamente comprobado por distintos investigadores. La pequeña diferencia en ácido málico respecto al testigo (serie B) permite abrigar dudas respecto a su utilización y los otros dos ácidos, tartárico y cítrico no fueron asimilados en medios con alcohol ni sin él, por lo que la pérdida de ac. cítrico durante la crianza en la bodega (pag. 63) ha de ser atribuida a la actividad bacteriana.

Capítulo 3º

EL ORIGEN DEL AUMENTO DE ACIDEZ DEL MEDIO
DURANTE EL DESARROLLO EN FASE DE VELO.

Tratando de encontrar el origen del aumento de acidez fija durante el desarrollo de la flor, los ensayos descritos en las páginas anteriores se continuaron durante un periodo de 80 días haciendo determinaciones de pH, acidez total y volátil y ácido láctico en todos los medios con alcohol y sin alcohol excepto en las series con ácido acético (E y J, tabla VIII).

Las condiciones de la experiencia y de los análisis son las mismas entonces descritas (pag. 148 y sig.)

Comentario

En la tabla IX se reproducen los datos correspondientes a los medios con alcohol conteniendo ác. tartárico y málico donde, por haber tenido un extraordinario desarrollo de flor, los resultados fueron mas interesantes.

El estado de los velos fué, en ambas series, el siguiente:

A los 20 días. Velos espesos y arrugados.

" " 40 " . La mayor parte del velo había caído en casi todos los matraces.

" " 80 " . Seguía el abundante depósito y en la superficie del líquido aparecía una tenue película de velo nuevo.

En los restantes medios el desarrollo del velo fué escaso y no hubo apenas variación de acidez, lo que demuestra que ésta está estrechamente ligada con la actividad celular.

En la serie A, con ac. tartárico, hubo un gran aumento de acidez, que empezó a hacerse patente después de los 20 días y fué tan marcado que a los 80 días llegaba a los $\frac{2}{3}$ de la acidez inicial.

En la serie B, con ac. málico, pareció iniciarse una ligera flexión de la acidez en relación con los tes tigos aunque la determinación de ac. málico no permitió comprobar ninguna variación de concentración, hecho que pudo ser debido a la imprecisión del método analítico. Esta ligera disminución inicial y su posterior incremento se pueden explicar por una asimilación del ac. málico por la levadura, que superaría primero y compensaría después en parte el aumento de acidez producido por el metabolismo del microorganismo. En cualquier caso la utilización del ac. málico sería lenta y en pequeña escala y no puede atribuirse a ella la casi total de saparición de este ácido durante la crianza en la bode-

ga , que ha de ser debida, por consiguiente, a la acción bacteriana.

Estos aumentos de acidez fueron tan claros que en la serie A condujeron a una disminución de 0,3 unidades del pH y solo en pequeña parte pueden atribuirse a los ácidos liberados al ser utilizados por la levadura los cationes de las sales minerales presentes en el medio. Tampoco pueden explicarse por la formación de ac. acético o láctico producidos por la actividad celular, el primero en el metabolismo anaerobio de etanal y el segundo por evolución de glicerina o de ácido málico. De aquel se formaron cantidades ínfimas, registradas solo a partir de los 40 días, en tanto que de ácido láctico, aún sin existir glicerina, y sin haber ácido málico en la serie A, aparecieron cantidades relativamente importantes aunque tampoco suficientes para explicar totalmente el aumento de acidez. La formación de ácido láctico, que será objeto más adelante de atención especial, fué nula en los primeros 20 días y tuvo efecto, principalmente, a partir de los 40 días cuando la mayor parte de los velos habían caído y la levadura actuaba en fase anaerobia.

Caracterización de los ácidos.

La caracterización individual de los ácidos responsables del aumento de acidez se llevó a cabo por cromatografía sobre papel.

T A B L A I X

Desarrollo del velo y evolución de la acidez en medios sintéticos conteniendo alcohol y ácidos tartárico y málico. Las determinaciones de pH se hicieron reproduciendo aproximadamente el volumen primitivo antes de diluir el 50 %.

Serie A) con ácido tartárico

		Medio inic.	20 días	40 días,	80 días
pH	S	3,3	3,3	3,2	3,0
	T	3,3	3,3	3,3	3,3
Acidez (meq/l)	S	35,2	40,0	53,7	59,5
	T	35,2	37,0	38,1	38,3
Ac. acet. (meq/l)	S	0,0	0,0	2,0	4,2
	T	0,0	0,0	0,0	0,0
Ac. lact (meq/l)	S	2,0	2,0	4,0	8,2
	T	2,0	2,0	2,0	2,0
Masa de velo(g) 4 matrac.		0,00	0,62	1,54	1,67

S.- Medio sembrado.

T.- Testigo.

T A B L A I X (continuación)

Serie B) con ácido málico.

Las determinaciones de pH se hicieron como en la serie A. Se hizo también una estimación cuantitativa de ácido málico por cromatografía sobre papel, según se describe en la pag.

		Medio inic.	20 días	40 días	80 días
pH	S	3,3	3,3	3,3	3,3
	T	3,3	3,3	3,3	3,3
Acidez (meq/l)	S	44,3	45,2	44,8	52,2
	T	44,3	46,9	48,1	48,1
Ac.málico g/l.	S	3,0	3,0	3,0	3,0
	T	3,0	3,0	3,0	3,0
Ac.acet. (meq/l)	S	0,0	0,0	2,2	2,2
	T	0,0	0,0	0,0	0,0
Ac.lact. (meq/l)	S	2,0	2,0	3,8	5,6
	T	2,0	2,0	2,0	2,0
Masa de velo(g) 4 matrac.		0,00	0,48	1,41	1,50

S.- Medio sembrado.

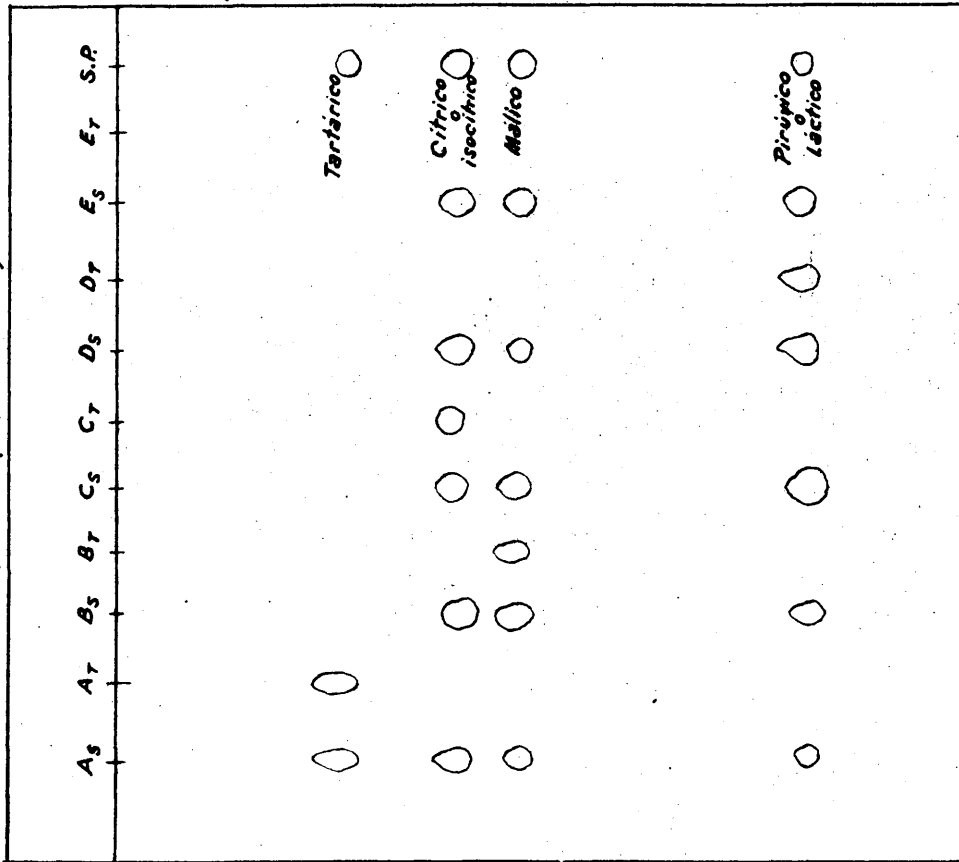
T.- Testigo.

Técnica empleada.

a) Cromatografía de ácidos. Las muestras, de 10 ml, fueron pasadas a través de una columna catiónica de Zerolitt 225, después se concentraron al vacío en un desecador de cloruro cálcico a la temperatura ordinaria y se pasaron por una columna aniónica de Zerolitt FF de donde, por elución con $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 1,5 N, se extrajeron únicamente los ácidos orgánicos quedando retenidos los ácidos minerales. El exceso de eluyente se eliminó por evaporación al vacío a temperatura menor de 40° y el residuo, disuelto en poca agua se pasó de nuevo por la columna catiónica y se concentró al vacío. Las muestras así preparadas se sometieron a cromatografía descendente, sobre papel Whatman nº1, empleando butanol-ac. fórmico 4 N (1:1) como disolvente de desarrollo. El revelado se hizo con azul de bromofenol.

b) Cromatografía de cetoácidos. Se siguió la técnica de Cavallini y Frontali (18) separando los cetoácidos, con solución clorhídrica de 2,4-dinitrofenilhidrazina, del medio desproteinizado y del eluido de la columna aniónica con los mismos resultados. El precipitado de 2,4-dinitrofenilhidrazonas, extraído y purificado con acetato de etilo, se disuelve en tampón de fosfato de pH 7,2 y se desarrolla con butanol-etanol-agua (4:1:5). Como revelador se utiliza una solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina.

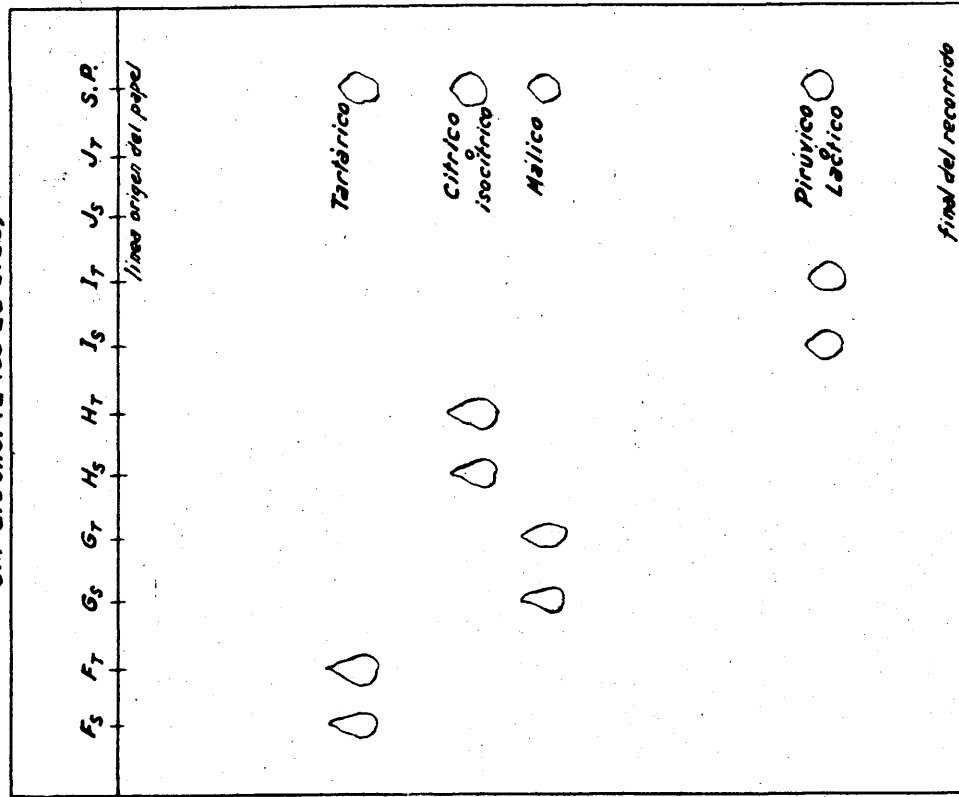
**CROMATOGRAMA N° 1.- Formación de ácidos en medios
con alcohol (a los 20 días)**



Disolvente.- Butanol- ac. fórmico
Papel Whatman núm. 1

fig. 45

**CROMATOGRAMA N° 2.- Formación de ácidos en medios
sin alcohol (a los 20 días)**



Cromatografía descendente
Tiempo de desarrollo 11,5 horas
S.- Medio sembrado
T.- Testigo

final del recorrido

En la figura 45 se reproducen esquemáticamente los cromatogramas hechos sobre muestras, a los 20 días, de las series con alcohol y sin él. La posición de las manchas en la figura es solo aproximada. Para la caracterización de los ácidos se fijó su situación en relación con la de testigos en soluciones puras. Las letras colocadas en el origen del cromatograma indican las series A a J de la tabla VIII y los subíndices expresan el medio sembrado S o el testigo T respectivamente. Los puntos S.P. representan los ácidos en soluciones puras.

En todos los medios con alcohol (series A a E) aparecieron unas manchas que, identificadas, resultaron corresponder a los ácidos isocítrico o cítrico, málico y pirúvico o láctico cualquiera que fuese el ácido inicial del medio, y en las series F a J sin alcohol no se observaron manchas de este tipo ni siquiera en el medio J, con ácido acético, donde se formó un velo bastante abundante. En esta serie y en la serie E no aparecieron manchas pertenecientes al ácido acético que, sin duda, fué eliminado en la concentración inicial de la muestra.

Repetidos los cromatogramas con muestras a los 40 días de la experiencia (fig. 46) se reprodujeron exactamente los resultados anteriores.

Los R_F de los ácidos pirúvico y láctico son muy próximos en casi todos los disolventes de desarrollo y por es

ta causa no fué posible hacer su distinción pero, puesto que el análisis cuantitativo reveló ausencia de ácido láctico (tabla IX) en los primeros 20 días, hemos puesto de manifiesto la existencia de ácido pirúvico separándolo como 2,4-dinitrofenilhidrazona y sometiendo ésta a una cromatografía sobre papel, como se describe en la pag. 154. El cromatograma, que se reproduce en la fig. 46, reveló la presencia de ac. pirúvico sin que pudiera caracterizarse ningún otro cetoácido, quizá por encontrarse en concentraciones demasiado pequeñas.

Por si estos ácidos procedieran de la autólisis de la levadura, se colectaron cantidades de velo que, después de lavado con agua destilada, se sometieron a autólisis en las condiciones siguientes, tomadas de Joslyn (36) y de Joslyn y Vosti (38):

Tampón de ac. cítrico 0,1 M y NaOH N/1 a pH 3,5, saturado con cloroformo, a temperatura de unos 33°.

El mismo tampón, a la misma temperatura, con acetona al 10%.

El mismo tampón con 2,4-dinitrofenol que, según los autores, acelera nueve veces la autólisis a 33°. El dinitrofenol se añadió en cantidad suficiente para formar una solución 0,01 M.

Tampón de ac. tartárico y bitartrato a pH 3,3, con un 10% de acetona, a 43°.

En los cromatogramas, realizados según se indica en la pag. 154, no se encontraron más ácidos que los correspondientes a los tampones.

Teniendo en cuenta este hecho, y el que los ácidos en medio sintético ya habían aparecido a los 20 días de la experiencia cuando la autólisis sólo pudo tener efecto en muy pequeña escala, se puede afirmar que los ácidos málico, cítrico y pirúvico no se formaron en la autólisis.

En estos mismos cromatogramas tampoco apareció ácido láctico lo que parece descartar que tenga este origen inmediato el que se acumula en los medios en que la flor actúa.

Aunque los ácidos minerales, liberados por la asilación de los cationes de las sales, han de quedar retenidos en la columna aniónica, también se hicieron cromatogramas, en soluciones puras, de H_2SO_4 y H_3PO_4 que son los únicos ácidos que pueden aparecer en el medio A_3 - (pag. 148) pues todas las sales minerales que en él figuran tienen como aniones SO_4^{--} , PO_4^{--} y Cl^- y el HCl se evaporaría en la concentración previa y no podría aparecer en los cromatogramas.

Los resultados (fig. 46, nº5) demuestran la imposibilidad de confundir los ácidos minerales con los orgánicos.

Y, por último, los aminoácidos quedan reteni-

dos en la columna catiónica y tampoco pueden interferir.

Por todo lo cual hemos de admitir que realmente ha habido formación de ácidos isocítrico o cítrico, málico y pirúvico en el metabolismo de la levadura en fase de velo y, puesto que sólo se encontraron en medios con alcohol, parece lógico que se formen en el metabolismo de esta sustancia.

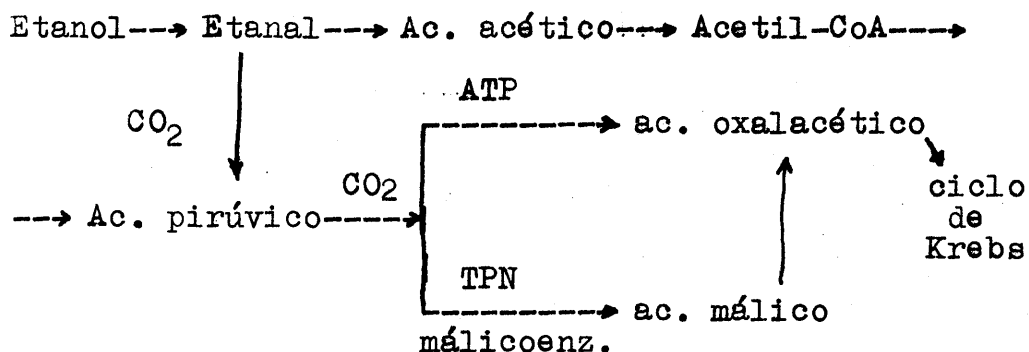
Resumiendo, en el aumento de acidez que se produce en los medios donde actúa la levadura de flor pueden concurrir:

- 1º. La desaparición de cationes de las sales minerales, aunque no a corto plazo.
- 2º. La acumulación de los ácidos láctico y acético, este último circunstancialmente.
- 3º. La posible liberación de otros ácidos o aminoácidos no determinados en la autólisis.
- 4º. La formación de ácidos cítrico o isocítrico, málico y pirúvico o láctico en el metabolismo del microorganismo.

El papel de estos ácidos en el metabolismo se puede explicar teniendo en cuenta que los dos primeros intervienen en el ciclo de Krebs (fig.51, pag. 172) y que algunos microorganismos pueden metabolizar el alcohol, en parte, a través de este ciclo según demostraron Foster y Waksman (28), quienes trabajando con *Rhizopus nigri* -

cans obtuvieron ácido fumárico a partir de alcohol en - cultivo de sustitución.

El ac. pirúvico puede proceder del etanol, pasando por etanal, ac. acético y acetil-CoA, y ser un escalón intermedio para la entrada en el ciclo, mediante la carboxilación de Wood-Werkman a ac. oxalacético o la modificación de Ochoa (48) a ac. málico.



Todo lo cual sugiere que el etanol puede ser en parte utilizado por la levadura de flor de forma análoga a como lo hacen otros microorganismos, dando previamente lugar a ac. pirúvico que se incorporaría al ciclo de - Krebs después de transformarse en ac. oxalacético o málico. Parte de los ácidos del ciclo se pueden acumular en medio y ser parcialmente los responsables del aumento de acidez fija en los medios en que actúa la levadura de flor.

Capítulo 4º

EL ORIGEN DEL ACIDO LACTICO QUE SE FORMA
DURANTE LA CRIANZA CON FLOR.

El aumento de la concentración de ácido láctico durante la crianza con flor es un hecho referido por varios autores (pag. 42-44) y comprobado repetidamente a lo largo de estos trabajos (pag. 63, 91, 103, 122 y 153).

Según queda indicado en la parte teórica, se señala que su origen está en la evolución de glicerina o ácido málico, pero como la cantidad de ácido láctico formado durante la crianza no guarda relación con la de málico que desaparece y, por otra parte, en medios sin glicerina ni ácido málico se ha encontrado aumento de acidez láctica, hemos tratado de poner en claro cuales puedan ser las fuentes de procedencia de este ácido. Con este fin se realizaron varias series experimentales, con vinos y medios sintéticos, que se describen a continuación.

1º. Evolución de ácido málico y láctico

a) en vinos en bodega.

Ya se ha indicado (pag. 63) como durante la crianza en la bodega el ácido málico cayó hasta concentracio

nes por debajo de la sensibilidad del método analítico empleado en su determinación. Pero el aumento de ácido láctico fué muy superior y, por ello, sólo en parte puede ser atribuido a la evolución de aquel ácido.

b) en vinos en el laboratorio.

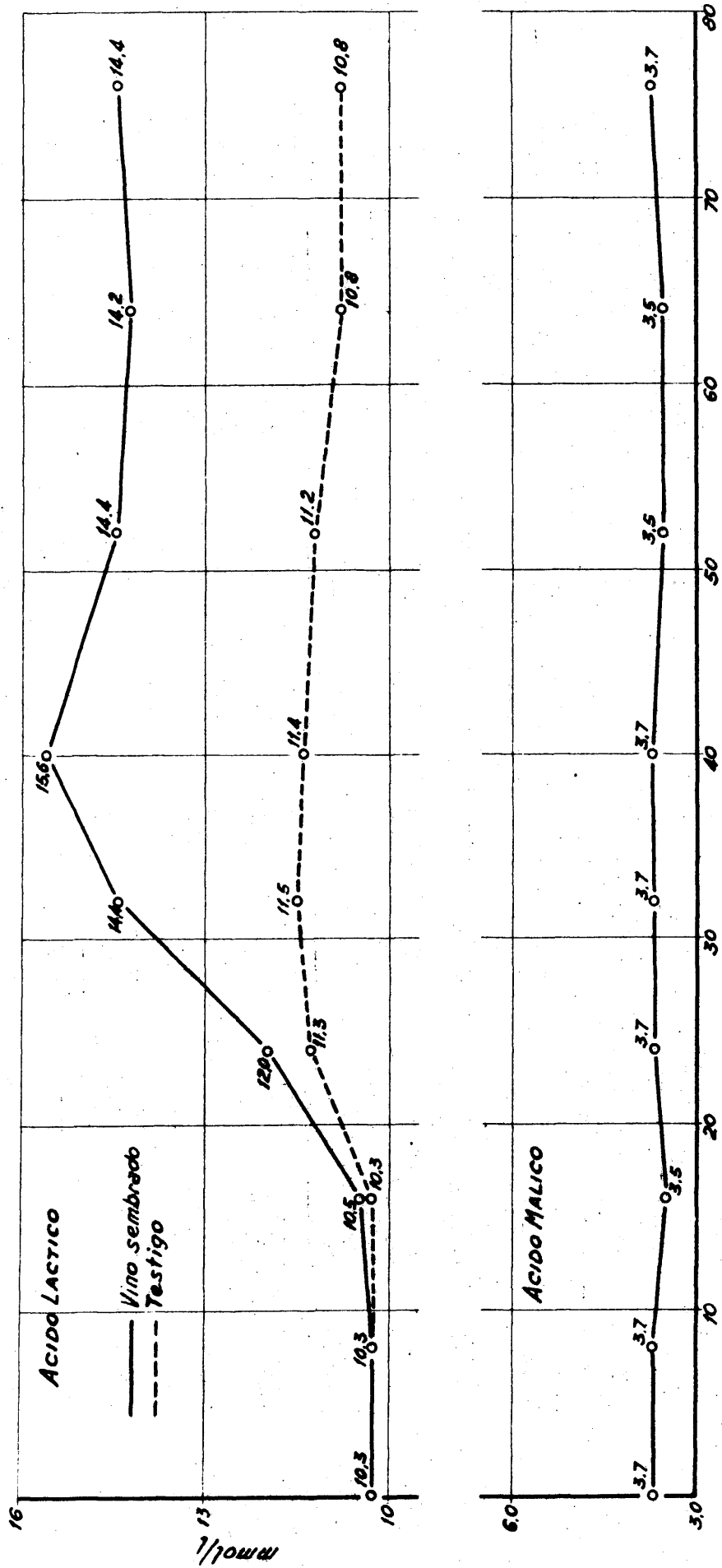
Para descartar la intervención bacteriana en la posible transformación malo-láctica se siguió la evolución de ac. málico y láctico sobre vino estéril en la misma serie experimental que sirvió para estudiar la evolución de la materia nitrogenada (pag. 131 y sig.). El planeamiento y desarrollo de la experiencia son los mismos allí descritos.

El bajo contenido inicial de ác. málico era muy favorable para poder apreciar cualquier variación de su concentración, 0,5 g/l. Los análisis se hicieron como se indica en las pag. 48 y 49.

Dentro de los errores propios del método analítico, la concentración de ácido málico permaneció constante durante toda la experiencia (fig. 47) en tanto que la de ácido láctico comenzó a elevarse claramente a partir de los 24 días, llegó a un máximo a los 40 días y después descendió ligeramente, manteniéndose prácticamente constante a partir del día 52.

El incremento máximo, de 4,2 mmol/l con relación al testigo, fué de tal magnitud que superó a la cantidad total de ácido málico existente en el vino por lo que se

Evolución de ácido málico y láctico en vino estéril.



DIAS
fig. 47

ha de concluir que sólo una parte del ácido láctico acumulado en los vinos puede proceder del ac. málico.

En relación con el desarrollo del velo (pag. 134 y sig.) el aumento de la concentración de ac. láctico coincidió con el comienzo de la autólisis y alcanzó un máximo casi al mismo tiempo que aquella (fig. 42).

c) en medio sintético estéril.

En la pag. 151 y sig. (cap. 3^o) se comentan los resultados de la evolución de acidez en medios sintéticos conteniendo alcohol y ac. málico en los que se observó formación de ac. láctico y sólo ligeras variaciones de ac. málico.

El aumento de concentración de ac. láctico, más lento, sin duda, que en el ensayo a) que acabamos de referir, fué claro a partir del momento en que los velos de levadura habían caído en gran parte.

2^o. Evolución de glicerina y ac. láctico.

a) en vinos.

Puesto que la glicerina es uno de los componentes asimilados en mayor escala por la levadura, su disminución es siempre muy marcada y aunque, como ya queda indicado (pag. 63), en la bodega parece señalar cierta correspondencia con el aumento de ac. láctico, en nuestros ensayos en matraces (pag. 91) la concentración de este ácido evolucionó de forma diferente según las cepas de

levadura pero sin guardar mucha relación con la disminu
ción de glicerina.

b) en medios sintéticos con alcohol.

Medio A₃ (pag. 148) con unos 10 g/l de glicerina.

Cepas 7, 8 y 13 sembradas en matraces de 100 ml con
70 ml de medio.

La preparación y desarrollo de este ensayo fueron
como se describe en la pag. 139 y sig. Los análisis, se
gún se indica en la pag. 140, empleando cuatro matraces
para cada muestra, se hicieron, el primero a los 10 días
y los demás cada 8 días.

Los velos desarrollaron como sigue:

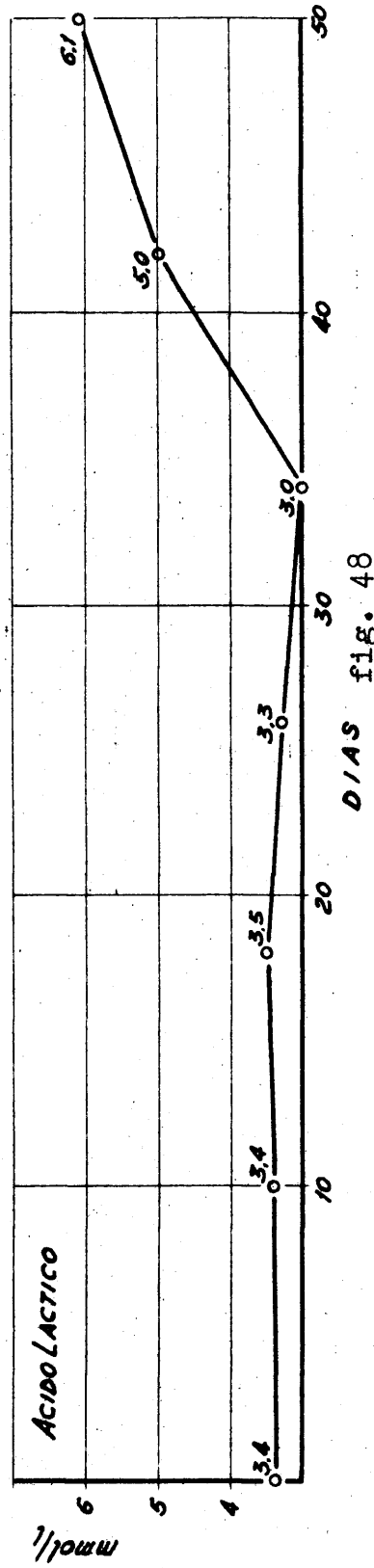
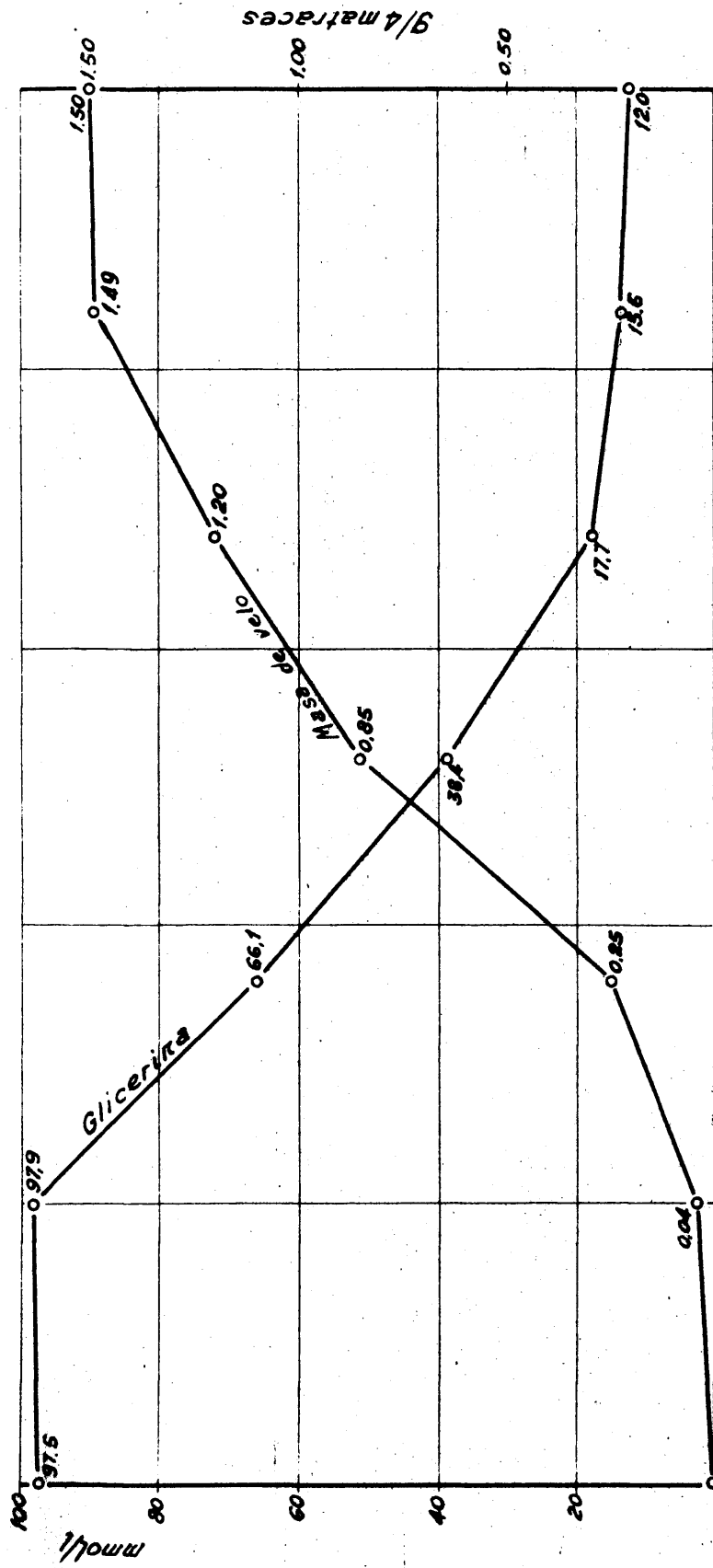
- A los 10 días. Comienzo de desarrollo franco. La cepa
13 lleva cierto retraso.
- " " 20 " . Velos arrugados y espesos. Continúa el
retraso de la cepa 13.
- " " 30 " . Desarrollo normal en todos los matraces.
La cepa 13, a la misma altura que las
otras. Se inicia el depósito de velo.
- " " 40 " . Abundante depósito en todos los matra-
ces.
- " " 50 " . Casi todos los velos han caído.

Comentario

Es de destacar (fig. 48, 49, 50) aparte del excelen

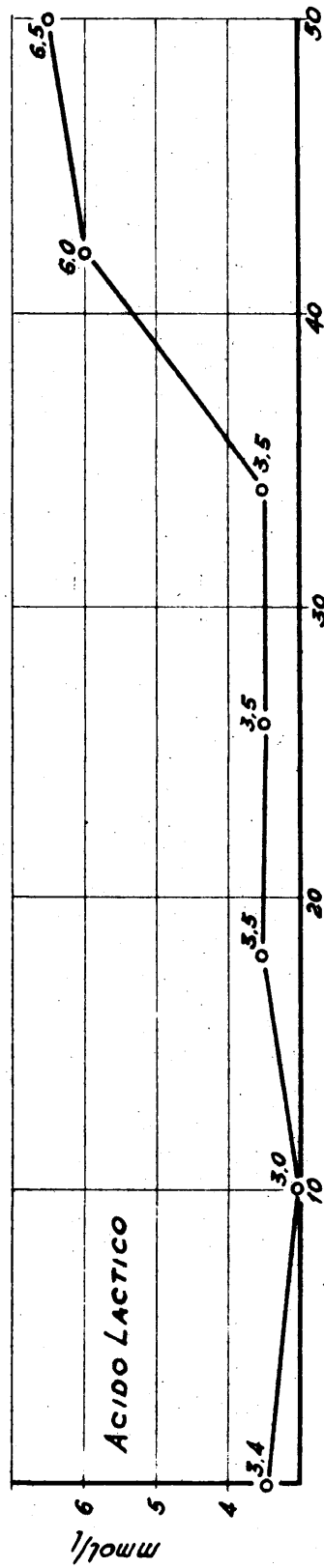
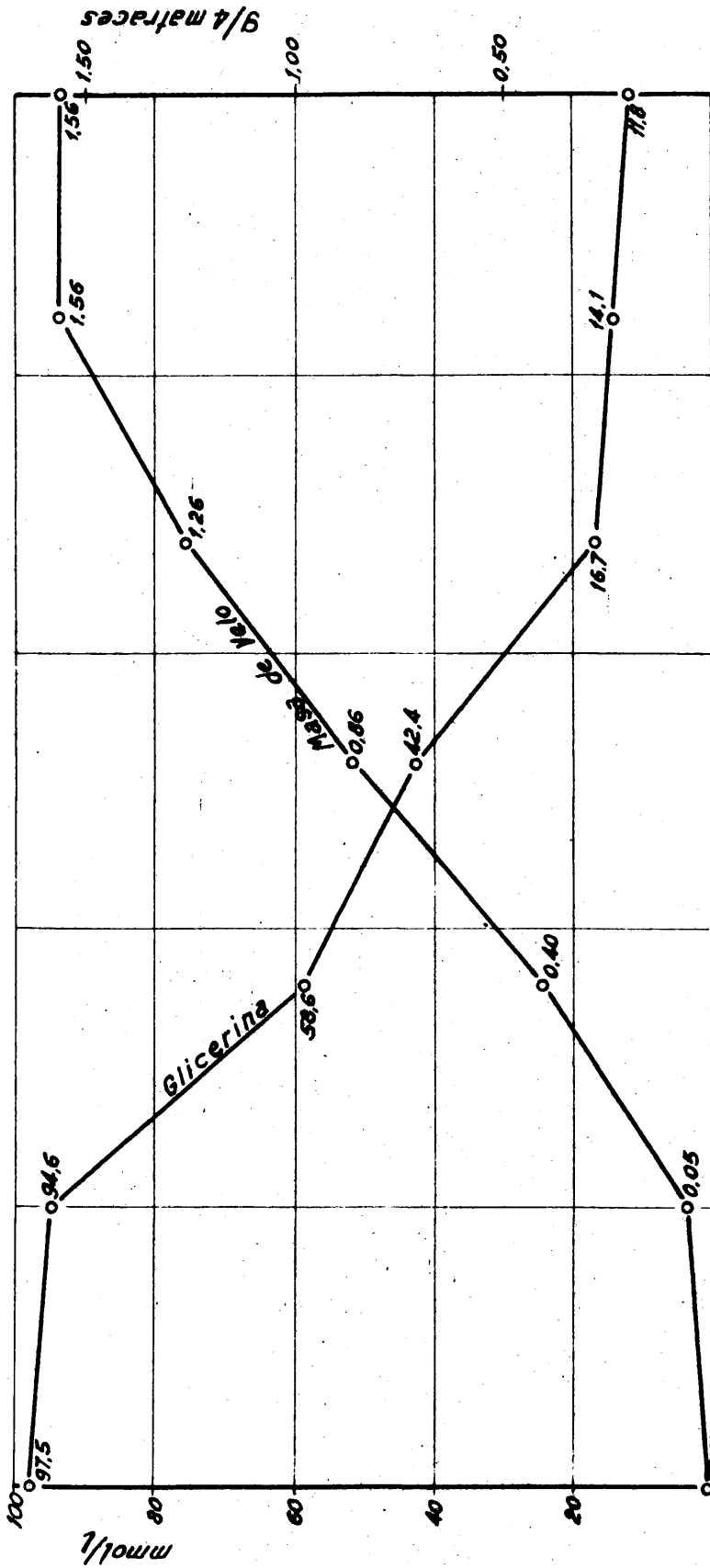
Evolución de ácido láctico y glicerina por la acción de cepas de "flor" en medio sintético.

α) CEPA 7 (*S. oviformis*)



DÍAS fig. 48

b) CEPHA 8 (*S. oviformis*)



DIAS fig. 49

te desarrollo de los velos el hecho, repetido con las tres cepas, de que la mayor parte de la glicerina se consumió durante los 35 primeros días, coincidiendo con la mayor pujanza en la multiplicación de la levadura, sin que se produjera aumento apreciable en la concentración de ac. láctico. No hubo, por tanto, correspondencia entre la glicerina consumida y el ácido producido pues éste se acumuló en el medio principalmente en los últimos días de la experiencia, cuando aquella apenas variaba ya.

En relación con el velo es de notar que la mayor parte del ácido láctico apareció en el medio a partir del momento en que el depósito de levaduras comenzó a hacerse manifiesto y continuó creciendo progresivamente a la par que el sedimento aumentaba.

c) en medios sintéticos sin alcohol.

Medio A₃ sustituyendo el alcohol por un volumen igual de agua destilada estéril y añadiéndole unos 10 g/l de glicerina. La experiencia se preparó de la misma forma que el ensayo anterior.

No consideramos necesario reproducir los resultados porque, según sucede siempre en medios sin alcohol, la multiplicación celular fué escasa, de 0,08 g de velo como máximo en 60 días, la glicerina se consumió en pequeña cantidad y no apareció ac. láctico en concentraciones apreciables en ningún momento.

d) medio sintético sin glicerina y sin ac. málico.

De los ensayos descritos en la pag. 151 y sig., cap. 3º, sobre medios sintéticos conteniendo sólo alcohol y ac. tartárico se pueden deducir las mismas consecuencias que se exponen en el apartado c), pag. 162.

3º. Acido láctico en la autolisis

Puesto que a lo largo de todas las experiencias a que nos venimos refiriendo parecía establecerse una relación entre la autolisis de la levadura y la formación de ac. láctico, los autolizados obtenidos en los ensayos - que se relatan en la pag. 156 y sig. fueron analizados en busca de ac. láctico con resultado negativo en todos los casos.

Consideraciones finales

- 1º Es un hecho comprobado que el ácido láctico se acumula en el medio durante el desarrollo de la flor.
- 2º No procede de modo indispensable de la glicerina o del ácido málico pues también aparece cuando estos constituyentes faltan en el medio nutritivo.
- 3º El metabolismo de la glicerina o del ac. málico no conduce necesariamente a ac. láctico, pues en la serie b) pag. 161 no hubo pérdida de ac. málico y se formó ac. láctico y en la serie b) pag. 163 este ácido no se formó mientras había gran consumo de

glicerina y apareció más tarde cuando ésta permanecía casi constante.

4º Se ha visto siempre que su aparición está relacionada de un modo bastante claro con la formación de sedimento de levaduras.

5º No parece proceder de la autólisis en sí.

Lo que indica que, sin descartar que una parte del ácido acumulado en el medio pueda provenir de transformaciones de glicerina o de ac. málico, también puede tener parcialmente origen en el metabolismo de la levadura, o en la transformación de productos de su autólisis, sin intervención, al menos directa de aquellos componentes.

Tal origen puede estar en la utilización por la levadura, en fase anaerobia, de los carbohidratos residuales del medio o de los suyos propios, liberados en el proceso autolítico, y también en la reducción del ac. pirúvico formado previamente en la degradación de aquellos o en el metabolismo del alcohol (pag. 159).

Lo que parece estar fuera de toda duda es que el ácido láctico es un producto de formación puramente anaeróbica sin relación con la fase oxidativa del velo.

Capítulo 5º

EL ALCOHOL EN EL METABOLISMO EN FASE DE VELO

A lo largo de nuestros estudios sobre aspectos del metabolismo (pag. 130 y sig.) se ha ido poniendo de manifiesto la importancia que el etanol tiene en el desa-rrollo de la levadura en fase de velo. El hecho de que en medios sin más posibles nutrientes orgánicos que alcohol y peptona la levadura viva y se multiplique induce a pensar que el etanol no sólo es alimento energéti-co sino que se puede incorporar al microorganismo for - mando parte de la sustancia celular, posibilidad ya apuntada por Marcilla y col. (pag. 38) que la juzgan poco - probable, El 4% del alcohol se convierte en etanal y ácido acético según van Zyl (pag. 38), quién no llega a ninguna conclusión respecto al 96% restante.

En las páginas siguientes se exponen algunos ensa-yos hechos para conocer si hay intervención del alcohol en la constitución de la célula. La experiencia consis-tió en cultivar la levadura sobre medio nutritivo con → bajas concentraciones de peptona y determinar el conte-nido del velo colectado en carbohidratos, grasas y pro-teínas para establecer comparaciones entre estas frac -

ciones y las sustancias carbonadas presentes en el medio, lo que nos puede permitir comprobar si han de proceder del etanol consumido o pueden tener su origen en otros nutrientes de los que existen en el medio.

Dos series de matraces se sembraron con cepa 7 sobre medio A₃ (pag. 148) conteniendo 0,43 y 1,28 g/l de peptona respectivamente, dejando otras dos como testigos. Cada matraz contenía 70 ml. de medio.

Los velos se desarrollaron lentamente a causa, sin duda, de las bajas concentraciones de peptona. A los 35 días se recogieron como muestra 7 matraces de cada serie y un número igual de testigos.

Métodos de análisis

Determinación del velo recogido. Como en la pag.80.

Nitrógeno total. Según se describe en la pag. 50.

Proteínas. Multiplicando por 6,25 el nitrógeno total.

Grasas. La muestra desecada se tritura, se muele y se mezcla con arena para facilitar su extracción. Se trata primeramente a reflujo, con HCl al 5%, durante cuatro horas para descomponer parcialmente la membrana celular y hacerla más permeable. Después se extrae durante 12 horas, en aparato de Soxhlet, con éter de petróleo de p.e., 40-60°C. El éter, conteniendo la grasa disuelta, se elimina por destilación y el residuo se agota evaporándolo

en estufa a 70°. El contenido en grasa se determina por pesada.

Carbohidratos fácilmente hidrolizables. La muestra se hierve a reflujo durante 4 horas, con HCl al 5%, para hidrolizar los azúcares. Después de enfriar el líquido se neutraliza con sosa N/1. Se filtra y sobre una porción del filtrado se determinan los azúcares reductores según el método de Bertrand adaptado a los vinos (pag. 49).

Comentario

La masa de velo a los 35 días era de 2,70 g/l de medio en la serie con 1,28 g/l de peptona y de 2,50 g/l en la serie con 0,43 g/l, por lo que sólo empleamos esta última en nuestras experiencias teniendo en cuenta que, al ser el medio más pobre en peptona, es más probable que el microorganismo utilice mayor proporción de etanol como fuente carbonada.

Las posibles fuentes de materia carbonada dignas de tenerse en cuenta en un medio tal como el A₃, que ha servido para la nutrición de la levadura, son peptona y etanol pues la urea se emplea fundamentalmente para suministrar nitrógeno aunque también en parte podría aportar carbono. La primera puede servir de proveedor de aminoácidos, sin duda su principal aportación al metabolismo celular, pero también cabe en lo posible que la levadu-

ra utilice los ácidos resultantes de la desaminación. Como el microorganismo no llegó a consumir ni aún la mitad del nitrógeno del medio (tabla X), esta segunda vía de asimilación de la peptona es de tomar en consideración.

T A B L A X

Nitrógeno en el medio de desarrollo y en la levadura.

	Medio.....	400 mg/l
Inicial	Velo.....	0 "
	Medio.....	222 mg/l
Final	Velo.....	180 "

Según puede verse en la tabla XI la fracción carbonada sin nitrógeno (NH_2) de que disponía la levadura para su desarrollo era, a parte del etanol, de 370 mg/l, sin contar la urea, los cuales, sin duda, no llegó a utilizar totalmente.

Al final de la experiencia se habían formado 2,50 g de levadura por litro de medio, cuya composición en materias carbonadas fué:

Proteínas.....	45,1%
Carbohidratos...	17,0%
Grasas.....	5,7%

T A B L A X I

Fracciones de proteínas, grasas y carbohidratos en el medio y en el velo al comienzo y al final de la experiencia. Las proteínas están calculadas multiplicando - por 6,25 el nitrógeno total. La masa de velo es la que correspondería a 1 litro de medio. Las concentraciones están expresadas en mg/l.

FRACCION	PROTEINAS (fracción sin NH ₂)	GRASAS	CARBOHI- DRATOS
<u>Inicial</u> Medio	370	0	0
Velo	0	0	0
<u>Final</u> Medio	?	0	0
Velo	1030	132	425

Etanol consumido. 1,50^g equivalentes a 11,9 g/l.

correspondiendo, por lo tanto, a cada 1 litro de medio:

Proteínas (fracción no nitrog.).....	1030	mg
Carbohidratos.....	425	"
Grasas.....	<u>132</u>	"
	1587	"

En un medio disponiendo de 430 mg/l de peptona, que probablemente fué empleada con preferencia en la elaboración de proteínas propias, la levadura fué capaz de formar hasta 1600 mg, casi cuatro veces más, de cadenas carbonadas que han de provenir, en su mayor parte, del etanol aún suponiendo que existiera asimilación de carbono de la urea. Este hecho está de acuerdo con las observaciones de Kornberg y Krebs (39) quienes, en sus estudios sobre metabolismo intermediario de los hidratos de carbono, encontraron que sustancias como etanol y ac. acético pueden dar lugar a la formación de materia celular en microorganismos capaces de utilizarlos como únicas fuentes de carbono. Tales son el género *Pseudomonans*, algunas cepas de *Esterichia coli* y ciertos mohos estudiados por Ochoa y col. (49)

En la fig. 51 se expone un esquema de las posibles transformaciones del etanol por la acción de la levadura. Los nombres encerrados en recuadros se refieren a compuestos que han sido caracterizados en los medios de cultivo.

El etanol necesariamente ha de intervenir en la for

mación de una parte de las proteínas y, a lo que parece, también, por lo menos en parte, los carbohidratos de reserva y de la membrana celular han de tener igual origen.

La conversión del etanol en carbohidratos supone una curiosa reversibilidad del proceso fermentativo normal y podría llevarse a efecto por intermedio del ácido pirúvico que, según se indicó en la pag. 159, puede ser un compuesto intermedio en el metabolismo del alcohol. Gilvarg y Bloch (32) empleando levadura del género *Torulopsis*, -previamente adaptada a un medio con acetato como única fuente de carbono, lograron la síntesis de carbohidratos previa transformación del ac. acético en pirúvico y, por un proceso semejante, el etanol podría dar lugar a ac. pirúvico y carbohidratos a través de etanal o de ac. acético (fig. 51).

Por último, el etanol también podría servir para la formación de cadenas de ácidos grasos a través de acetyl CoA y constituir de este modo las grasas de reserva de la célula.

El etanal y otros productos de transformación del etanol en medios sintéticos.

Una serie de matraces con 75 ml de medio A₃ y unos 12^o de alcohol fué sembrada con cepa 7 de *S. oviformis*. Otra serie igual, sin sembrar, se dejó como testigo.

La preparación del medio y las condiciones de desarrollo de la experiencia son las mismas que se exponen en la pag. 139 y sig.

Los análisis, cada 10 días, se llevaron a cabo según se indica en la pag. 140. La masa de velo colectada, como en la pag. 80, y está referida a la que correspondría a un litro de medio. Como muestra se tomaron cuatro matraces sembrados y otros tantos testigos.

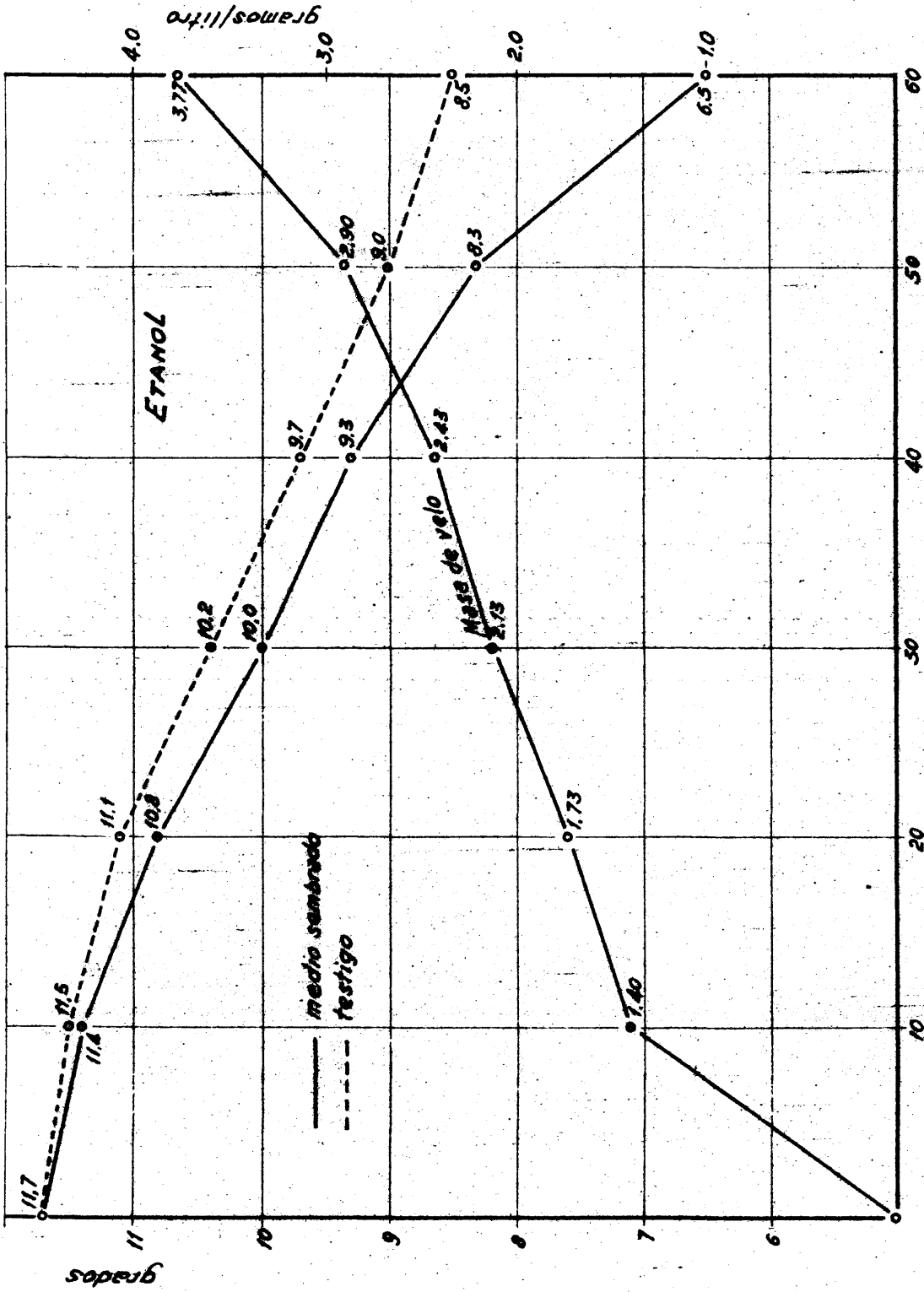
Comentario

En el medio A₃ (pag. 148), casi por completo sintético, la levadura desarrolla de un modo comparable a como pueda hacerlo sobre un vino que tenga las características más convenientes para la crianza, según puede comprobarse comparando las cifras de levadura colectada en la fig. 13 (pag. 81) o en la fig. 42 (pag. 134) con las de la fig. 52 (pag. 175); Los productos típicos formados y el etanol consumido también lo son en magnitudes comparables, teniendo en cuenta las diferencias de volumen en las series de las distintas experiencias.

Puesto que el medio no contenía más que alcohol - puede afirmarse que etanal, butilenglicol y acetoina - (fig. 53) se forman a partir de él, directa o indirectamente. Una vez más, tampoco en medio sintético llegó a producirse acetal.

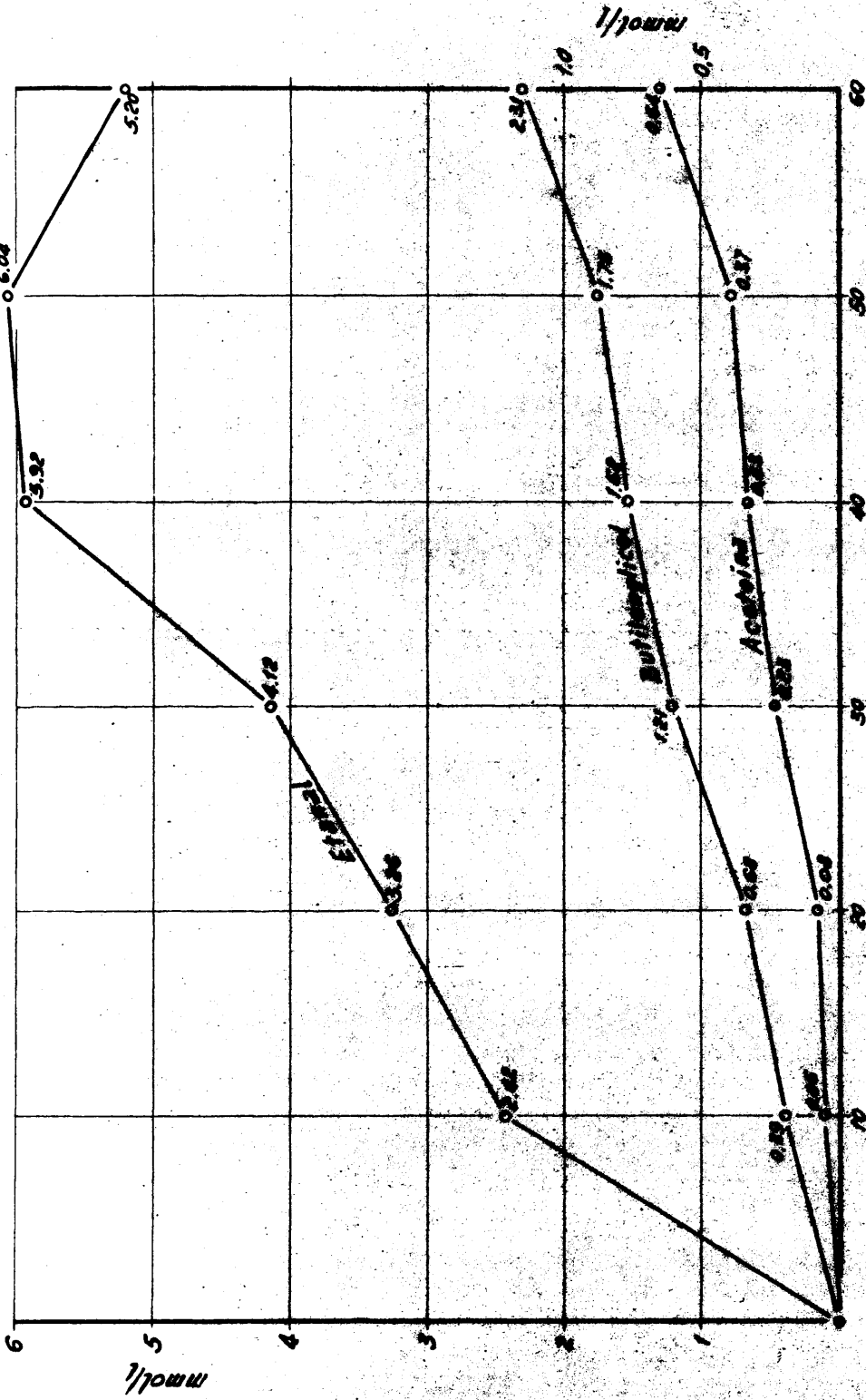
De etanal se formaron en 60 días hasta 5,2 mmol/l

Variación de la concentración de ETANOL en un medio sintético.



DIAS
FIG. 52

Productos de transformación del ALCOHOL en un medio sintético.



DÍAS
FIG. 53

con un máximo de 6,0 a los 50 días y de butilenglicol y acetoina, en cantidades siempre crecientes desde cero , hasta 2,3 y 0,64 mmol/l respectivamente, concentraciones similares, como acabamos de decir, a las que aparecen en vinos bajo flor, lo que confirma que el medio A₃ es perfectamente adecuado para el desarrollo del velo.

C O N C L U S I O N E S

SECCION I

1ª. Se ha realizado, por primera vez, un estudio analítico de la crianza con flor en la bodega hecho sobre un número suficiente de muestras, de todas las criaderas, para que se pueda tener una seguridad relativa en la validez de los resultados obtenidos. La composición de los vinos finos de Jerez es aproximadamente, según los resultados de nuestros análisis: glicerina, 1,5-3,4g/l; etanol, 15,5-16,0²; etanal, 175-530 mg/l; butilenglicol, 1,0-1,8 g/l; acetoina, 0-27 mg/l; acetal, 15-115 mg/l; pH, 3,1-3,5; acidez total, 4,1-4,8 g ac.tart./l; acidez fija, 3,8-4,4 g ac. tart./l; acidez volátil, 0,17-0,35 g ac. acético/l; ácido láctico, 1,3-2,8 g/l; materias reductoras, 0,2-2,1 g/l; densidad, 0,989-0,990; extracto seco, 17,3-25,4 g/l; sulfato potásico 1,7-3,7 g/l. Los caracteres analíticos de los vinos de Montilla son: glicerina, 2,1-5,8 g/l; etanol, 15,5-16,0²; etanal, 65-335 mg/l; butilenglicol, 1,2-1,4 g/l; acetoina, 0-54 mg/l; acetal 0-50 mg/l; acidez total, 4,0-5,1 g ac. tart./l; pH, 3,2-3,6; acidez fija, 3,2-4,5 g ac. tart./l; acidez volátil, 0,2-0,7 g ac. acético/l; ácido láctico, 0,8-3,2 g/l; materias reductoras, 0,4-1,0 g/l; densidad, 0,989-0,991; extracto seco, 20,9-25,4 g/l.

2ª. La crianza en Montilla y en Jerez sigue caminos para lelos pero en Montilla es más corta porque el clima es menos favorable y es menor el tiempo que los vinos per manecen en el sistema de soleras. Con respecto a la pérdida de glicerina, formación de etanal, acetal y bu tilenglicol y disminución de densidad y extracto seco durante la crianza, los vinos de las soleras de Montilla equivalen, por término medio, a los de las 4ª cria deras de Jerez. En esencia los vinos de Montilla se di ferencian de los de Jerez en su menor grado de crianza que se manifiesta, sobre todo, en el escaso o nulo con tenido en componentes que se forman en pequeña canti - dad, como es el acetal de tanta influencia en el carác ter de flor.

3ª. La glicerina es el componente que varía con mayor re gularidad, disminuyendo su concentración a lo largo de la crianza. En un sistema de soleras el vino que con - tiene menos glicerina es el de evolución más avanzada y aún esto puede admitirse, dentro de ciertos límites, al comparar distintos sistemas. Puede establecerse una relación, que se sigue con bastante aproximación, en tre el contenido de glicerina de un vino y su crianza. El fino de Jerez puede considerarse oriado cuando su - concentración de glicerina es de 1,5-3,5 g/l, las sole ras de Montilla contienen, como queda indicado, 2,1-- 5,8 g/l.

4ª. Las concentraciones de acidez total y fija están so-

metidas a dos acciones opuestas: pérdida de acidez por precipitación de bitartrato potásico y por utilización de ácidos por la levadura o por bacterias y, de otra parte, formación de sustancias ácidas en el metabolismo de la levadura. La primera acción suele predominar al comienzo de la crianza, y por ello las curvas de acidez presentan un mínimo, pero en realidad el envejecimiento va acompañado de un aumento de acidez que no es debido solamente a la formación de ácido láctico. Pues la acidez fija no láctica, si bien también disminuye al comienzo, más tarde tiende a aumentar. Con cierta frecuencia predomina el efecto de disminución durante toda la crianza y sin duda por ello algunos autores consideran que es el único existente. Por lo que respecta a los ácidos individualmente considerados, el málico y cítrico llegan a desaparecer en la crianza, el ácido láctico aumenta notablemente y el ácido tartárico disminuye por precipitación pero no por la acción de la levadura o de bacterias.

5ª. No se puede decir que exista disminución de concentración de las fracciones nitrogenadas durante la crianza en la bodega. En general se equilibra la asimilación de nitrógeno por la levadura y su devolución al medio en la autólisis del microorganismo, en todas las criaderas, con predominio de la lisis en algunos casos, siempre en muestras tomadas cuando la flor no actuaba.

6ª. La concentración de sulfatos, siempre alta como conse

cuencia del enyesado, aumenta todavía más durante la crianza y en cuanto a la evolución de los demás componentes estudiados, los resultados coinciden con los que se encuentran en la generalidad de las publicaciones sobre el tema. Disminuyen: ac. acético, materias reductoras, etanol, densidad y extracto seco; aumentan: etanol, butilenglicol y acetal, el pH varía poco y la acetoina aumenta hasta cierto límite para luego disminuir.

SECCION II

7^a. Para iniciar el estudio de la crianza en el laboratorio se hizo una selección de cuatro cepas, entre 35 cepas de formar velo, teniendo en cuenta la resistencia al SO_2 y la formación de productos típicos. De las cuatro cepas con mejores características, tres pertenecen a la especie *S. oviformis* y una a *S. chevalieri* pero todas ellas actúan de forma completamente análoga sobre el vino, hecho que demuestra la posibilidad de hacer la crianza con cultivos puros de una sola cepa sin que el vino pierda calidad respecto al añejado con levaduras espontáneas donde pueden concurrir especies diferentes.

8^a. Teniendo en cuenta la tolerancia media de la levadura en fase de velo al SO_2 se recomienda sulfitar en varias veces, a medida que haga falta, a lo largo de la elaboración. Se puede iniciar la fermentación con 80-90 mg/l, subir esta concentración a 110-120 mg/l antes de pasar el mosto a las criaderas y, eventualmente,

elevarla a 150-160 mg/l, y seguidamente clarificar, en el caso de que se presenten en algunas botas alteraciones microbianas.

9ª. La producción de acetaldéhid~~o~~ está íntimamente relacionada con el período de formación del velo. En las primeras etapas de su desarrollo la flor actúa casi exclusivamente sobre el etanol y sus derivados. Mas tarde utiliza otras fuentes carbonadas, además, glicerina, azúcares y ac. acético principalmente.

10ª. La relación de superficie con velo a volumen de vino tiene una influencia decisiva en la velocidad de la crianza. Si la duración de ésta ha de ser de unos 45 días, la relación más conveniente es la de 1/12 con la cual la evolución del vino es suficientemente avanzada y fácil de controlar, la pérdida de alcohol no es excesiva y el vino no adquiere sabores o aromas desagradables.

11ª. Se propone un tipo de bodega con control de temperatura y del proceso de crianza que podría representar economía en la producción de vinos baratos de flor.

12ª. Se hace un estudio de la crianza de vinos tintos. Salvo en que su evolución va siempre acompañada de un gran depósito de materia colorante, en lo que respecta a todos los componentes estudiados la crianza transcurre de modo completamente análogo que en los blancos, no sólo cualitativa sino también cuantitativamente, lo que demuestra que el substrato sobre el que actúa no

tiene influencia decisiva en el comportamiento de la flor.

12ª. Los caracteres organolépticos de los vinos blancos comunes tratados con flor sólo resultan realmente mejorados cuando el vino base reúne condiciones para la crianza. Si es basto, aún cuando se afina algún tanto, no llega a adquirir un tipo definido. La aplicación de crianza con flor a los vinos blancos debe ser objeto de estudio previo en cada caso pues en muchos tipos de vinos no resultará económica. Los vinos tintos comunes ganan siempre, con la crianza, calidad suficiente para que merezca la pena su tratamiento. Son características de su evolución la pérdida casi completa del tipo inicial, sustituido por el desarrollo de caracteres de flor casi siempre muy acusados, la notable disminución del color y la aparición de un aroma más fresco. Es posible y recomendable siempre emplear levaduras de flor para el envejecimiento acelerado de estos vinos, que pueden ser así dotados de características específicas que les darían extraordinario valor en el mercado.

SECCION III

13ª. Se ha seguido la evolución del nitrógeno en vino estéril. Nitrógeno total, formol, amínico y amoniacal son utilizados por la levadura sin que muestre preferencia por ninguna fracción en particular, Sus concentraciones inicialmente presentes en el vino van dismi-

nuyendo en proporciones parecidas hasta que se alcanza un equilibrio. La autólisis del microorganismo se puede seguir por la disminución del tanto por ciento de nitrógeno en la levadura colectada. Es casi simultánea con la formación del velo, si bien en las dos primeras semanas de desarrollo es apenas perceptible porque la mayoría de las células son jóvenes.

14^a. Se estudia la posible asimilación del nitrógeno atmosférico por la levadura en fase de velo. Para ello se determina con intervalos de tiempo el contenido en nitrógeno del velo y del vino. La constancia de la suma de ambos demuestra la inexistencia de tal asimilación en las condiciones de la experiencia.

15^a. De las experiencias realizadas en medios sintéticos, y en vinos, con cantidades variables de alcohol se deduce que el etanol no sólo es imprescindible para que la levadura forme velo sino que es la causa, al menos inmediata, de ello. Del alcohol depende la aparición del velo y él permite controlar su crecimiento evitando desarrollos excesivos que, paralelamente, llevan consigo un gran consumo de alcohol. En los medios sintéticos utilizados, y en vinos, privados de alcohol no hay desarrollo de flor. Al aumentar la graduación alcohólica el crecimiento se inicia más rápidamente y el velo alcanza mayor peso llegando a un máximo cuando la concentración alcohólica del medio es de unos 8^o. Graduaciones superiores limitan el desarrollo de la flor, aun -

que no mucho hasta los 12-13% a partir de los cuales ya se aprecia claramente una inhibición que es total cuando el vino contiene más de 17% de alcohol.

16ª. Se propone un medio de cultivo, casi completamente sintético, donde la levadura puede vivir en fase de velo y alcanzar un desarrollo comparable al que tiene sobre un vino de las mejores características para la crianza. Tal medio, por su relativa simplicidad, resulta muy adecuado para realizar sobre él estudios del metabolismo de componentes aislados del vino, mucho más difícil de llevar a cabo sobre un vino por las interferencias que se derivan de su compleja composición. En este medio de cultivo la biotina es un factor indispensable. Su acción se refuerza por la del mesoinositol y, en menor escala, por la de otros factores de crecimiénto pero todos estos juntos sin aquélla no tienen apenas acción positiva sobre la multiplicación del microorganismo.

17ª. La levadura no es capaz de asimilar los ácidos tartárico o cítrico ni probablemente el ácido málico y si asimila este último ha de ser en pequeña cantidad. Por ello la desaparición casi total de ácido málico y cítrico durante la crianza en la bodega ha de ser atribuida a acciones bacterianas.

18ª. La actividad metabólica de la levadura en fase de velo produce un aumento de la acidez fija del medio debido, en parte, a la aparición de ac. isocítrico o cítri

co, málico y pirúvico. Estos ácidos, que no se forman en la autólisis del microorganismo, pueden tener su origen en el metabolismo aeróbico del alcohol a través del ciclo de Krebs.

19ª. Se estudia el origen del ácido láctico que aparece durante la crianza con flor. Su formación en la bodega parece guardar relación con la disminución de glicerina y de ácido málico pero no procede de ellos de un modo indispensable pues también aparece en medios en los que éstos faltan. Por otra parte el metabolismo de estos compuestos no conduce necesariamente a ácido láctico y la aparición de éste puede relacionarse de un modo bastante claro con la formación de sedimento de levaduras aunque no procede de la autólisis en sí. Todo lo cual demuestra que tiene que haber algún otro origen para el ácido láctico sin descartar la posibilidad de que pueda proceder en parte de la glicerina o del ácido málico. Tal origen puede estar en la utilización por la levadura, en fase anaerobia, de los carbohidratos residuales del medio o de los suyos propios liberados en el proceso autolítico y también en la reducción del ácido pirúvico formado previamente en la degradación de aquéllos o en el metabolismo del etanol. En todo caso el ácido láctico es un producto de formación puramente anaeróbica sin relación con la fase oxidativa del velo.

20ª. El etanol, además de ser fuente energética para la le

vadura en fase aerobia, es utilizado por ésta en la -
formación de una parte, por lo menos, de las proteínas
y quizá de las grasas de la célula. También en parte -
los carbohidratos de reserva y de la membrana celular
proceden del etanol asimilado, lo que supone la existe-
tencia de una reversibilidad del proceso fermentativo
normal de conversión de azúcares en alcohol. Esta trans-
formación alcohol--carbohidratos puede hacerse a través
de ácido pirúvico. El etanal, butilenglicol y acetoina
que se forman durante la crianza de los vinos también
proceden del etanol directa o indirectamente.

Leída la presente memoria doctoral en
el día de la fecha, el tribunal examinador acor-
dó calificarla con sobrentiende cum laude.

Madrid, 27 de octubre del 1959

~~Ignacio J. Lavador~~ Se Presidente,
M. Lora

~~J. M. Paredes~~ Manuel Ruiz
W. Lora Secundo

B I B L I O G R A F I A

- (1) ALLAN, H.M. "A study of sherry flor". Austr. Brew. and Wine J. 58, Vol. 10, 31-33; 11, 70-71 (1939).
- (2) AMERINE, M.A.; WINKLER, A.J. "Maturity studies with California grapes". "II The titrable acidity, pH, and organic acid content". Proc. Amer. Soc. Horticult. Sc. 40, 313 (1942).
- (3) BERG, L. "Temperature control in flor sherry production". Wines & Vines 36, nº9, 31 (1955).
- (4) BOBADILLA, G.F. "Aplicaciones industriales de las levaduras de flor". Agricultura, 12 (133) , 203-207 (1943).
- (5) BOBADILLA, G.F.; NAVARRO, E. "Vinos de Jerez. Estudio de sus ácidos desde el periodo de madurez de la uva hasta el envejecimiento del vino". Bol. Inst. Nac. Inv. Agron. 9, 473-519 (1949).
- (6) BOBADILLA, G.F.; QUIROS, J.M.; SERRANO, J.J. "Vinos de Jerez. El enyesado de los mostos" . Bol. Inst. Nac. Inv. Agron. 14, nº31, 411 - 446 (1954).
- (7) CAMPOS, M. "Contribución al estudio de la fase de crianza en envase de madera de los vinos de Rioja". Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Madrid. (1956).

- (8) CANTARELLI, C. "L'invecchiamento accelerato dei vi
ni rossi per via biologica". Riv. Viticolt.
e enol. di Conegliano 7, 221-32 (1955).
- (9) CANTARELLI, C. "Aspectos bioquímicos del envejeci-
miento acelerado de un vino tinto por cepas
de *S. oviformis*". Biochim. Appl. 2, 167-190.
(1955). (tit. traduc.)
- (10) CAPRIOTTI, A. "Intorno al saggio di asimilazione
degli zuccheri da parte dei lieviti". Bio -
chim. Appl. 2, nº1, 31-46 (1955).
- (11) CARPENTIERE, F. "Il vino". Edit. Fratelli Ottavi.
Casale Monferrato (1926).
- (12) CASAS, J. "Nuevo método para la determinación del
ácido láctico en los vinos". Rev. Ciencia
Aplic. 7, nº 35, 526-29 (1953).
- (13) CASAS, J. "La determinación de acetaldehído con los
métodos al bisulfito y su aplicación al aná-
lisis de vinos". Rev. Ciencia Aplic. 8, nº37,
103-11 (1954).
- (14) CASAS, J. "Acetoína y sus derivados en los vinos de
crianza de flor". Comunic. al IX Congr. Int ,
de Ind. Agric. y Alim. Madrid. (1954).
- (15) CASAS, J.; ARNEDEO, J. Comunicación personal.
- (16) CASTELLI, T.; IÑIGO, B. "Los agentes de la fermen-
tación vínica en la región manchega y zonas
limítrofes". Ann. Facolt. Agr. Univ. di Peru
gia. Vol. 13, (1957).
- (17) CASTOR, J.G.B.; ARCHER, T.E. "Nutrient requirements

- of growth of the sherry flor yeast, *S. beticus*". Appl. Microb. 5, nº1, 56-60 (1957).
- (18) CAVALLINI, D.; FRONTALI, N. "Quantitative determination of keto-acids by paper partition chromatography". Biochim. and Biophys. Acta 13, 439 (1954).
- (19) GROWTER, R.E.; TRUSCOTT, J.H.L. "Note on the growth of flor yeast". Canad. J. Agric. Sci. 35, 2 (1955).
- (20) GROWTER, R.E.; TRUSCOTT, J.H.L. "The use of agitation in the making of flor type sherry". Am. J. of Enol. 8, nº1, 11-17 (1957).
- (21) CRUESS, W.V. "Investigations of the flor sherry process". Calif. Agric. Exp. Station (Berkeley). Bull. 710 (1948).
- (22) CRUESS, W.V.; WEAST, C.; GUILLILAND, R. "Summary of practical investigations on film yeast". Fruit Products J. 17, 229-31, 251, (1938).
- (23) CHAFFEY, W.B. "Some factors influencing the development and the effect of flor yeasts". Austr. Brew. and Wine J. 58; vol. 9, 33-34; 10, 31-34, 11, 31-32 (1940).
- (24) DE CASTELLA, F. "Sherry, its making and rearing". Victoria Dept. of Agric. J. 7, 442-46, 515-28, 577-83, 621-30, 724-27 (1909).
- (25) FIOREZZANO, G. "Levaduras vónicas que forman velo en relación con la fabricación de jerez y -

- otras aplicaciones". Agric. Ital. (Pisa) 7, 177-99, (1952). (tit. traduc.)
- (26) FIOREZZANO, G. "Cambios en la composición del vino producidos por la actividad bioquímica de las levaduras que forman velo en su fase aerobica". Agric. Ital. (Pisa) 7, 216-31 (1952). (tit. traduc.)
- (27) FORNACHON, J.C.M. "Studies on the sherry flor". Australian Wine Board. Adelaide (1953).
- (28) FOSTER, J.W.; WAKSMAN, S.A. "The specific effect of zinc and other heavy metals on growth and fumaric--acid production by Rhizopus". J. Bact. 37, 599-617 (1939).
- (29) FREIBERG, K.J.; CRUESS, W.V. "A study of certain factors affecting the growth of flor yeast". Appl. Microb. 3, nº4, 208-12 (1955).
- (30) FROLOV-BAGREEV, A.M.; SAENKO, N.F. "Levaduras aisladas de velos de Jerez". Microb. 14, 320-24 (1945). (tit. traduc.)
- (31) GARCIA ANGULO, J.R. "Notas sobre el enyesado". E. Vitic. Moguer (1934).
- (32) GILVARG, C.; BLOCH, K. "The utilization of acetic acid for amino acid synthesis in yeast". J. Biol. Chem. 193, 339 (1951).
- (33) GONZALEZ GORDON, M.M. "Jerez-Xerez-Scheris". Jerez de la Frontera (1948).
- (34) HOHL, L.H.; CRUESS, W.V. "Observations on certain

film-forming yeasts". Fruit Product J. 20, 72-75, 108-11 (1940).

- (35) JAULMES, P.; ESPEZEL, P. "Le dosage de l'acétaldehyde dans les vins et les spiritueux". Ann. Falsif. Fraudes 28, 325-35 (1935).
- (36) JOSLYN, M.A. "Yeast autolysis. I Chemical and cytological changes involved in autolysis". Wallerstein Lab. Com. 18, n°61, 107-21 (1955).
- (37) JOSLYN, M.A.; AMERINE, M.A. "Commercial production of dessert wines". Calif. Agric. Exp. Station Bull. 651, (1941).
- (38) JOSLYN, M.A. VOSTI, D.C. "Yeast autolysis. II Factors influencing the rate and extent of autolysis". Wallerstein Lab. Com. 18, n°62, 191-205 (1955).
- (39) KORNBERG, H.L.; KREBS, H.A. "Synthesis of cell constituents from C₂-units by a modified tricarboxylic acid cycle". Nature 179, 988-91 (1957).
- (40) LODDER, J.; KREGER-van RIJ, N.J.W. "The yeasts. A taxonomic study". North-Holland Publishing Co. Amsterdam (1952).
- (41) LUGG, J.W.; OVERELL, B.J. "'One' and 'Two-dimensional' partition chromatographic separations of organic acids on an inert sheet support". Austral. J. Sci. Research 1, 98, (1948).
- (42) MALLOL, A. "Modificación al método de Kjeldahl para la determinación del nitrógeno". Rev. Real

Acad. Cienc. 2, nº 29, 207 (1945).

- (43) MARCILLA, J. III Congr. Int. della Vite e del Vino (Asti). vol. 2, 489.
- (44) MARCILLA, J. "Viticultura y Enología españolas". Ed. SAETA. Madrid (1949).
- (45) MARCILLA, J.; ALAS, G.; FEDUCHY, E. "Contribución al estudio de las levaduras que forman velo sobre ciertos vinos de elevado grado alcohólico". Anal. Centro Inv. Vin. (Madrid) 1, nº 1 (1936).
- (46) MRAK, E.M.; PHAFF, H.J. "Yeasts". Ann. Rev. of Microb. 2, 1-46 (1948).
- (47) NIEHAUS, C.J.G. "South African sherries". Farming in South Africa 12, 82-85 (1937).
- (48) OCHOA, S. "Biological mechanism of carboxylation and decarboxylation". Phys. Rev. 31, 56 (1951).
- (49) OCHOA, S.; STERN, J.R.; SCHNEIDER, M.C. J. Biol. Chem. 193, 691 (1951).
- (50) PEYNAUD, E. "L'acétilmethylcarbinol et le 2,3-butyléneglicol dans les milieux de fermentation alcoolique. Rev. Ferm. Ind. Alim. 2, 150 , 189 (1947).
- (51) PROTOSSERDOV, N.N. "Tecnología del Jerez". Vinodelie i Vinogradarstvo S.S.S.R. 5, 9-12 (1944).
- (52) PROTOSSERDOV, N.N.; AFRIKIAN, R. "Jerezwein in Armenien". Das Weinland 5, 389-91 (1933).
- (53) RANKINE, B.C. "Yeast cultures in Australian wine -

- making". Amer. J. of Enol. 6, nº3, 11-15(1955).
- (54) RIBEREAU-GAYON, P. "Evaluation de l'acide malique des vins par chromatographie". Ann. Falsif. Fraudes 47, (1954).
- (55) RIBEREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E. "Sur le dosage et la chimie de l'éthanal et ses combinaisons - dans les vins et les alcools". Ann. Institut. Pasteur 73, 777-796 (1947).
- (56) RIBEREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E. "Analyse et contrôle des vins". Librairie Polytechnique Ch. Bé ranger. Paris (1951).
- (57) ROCQUES, X. "Les vins de liqueur en Espagne". Rev. de Viticult. 19, 446, 501, 570, 594 (1903).
- (58) SAENKO, N.F. "Aceleración de la formación del velo por la levadura de Jerez en los vinos". Vinodelie i Vinogradarstvo SSSR 11, nº1, 12-15 (1951). (tit. traduc.)
- (59) SCHANDERL, H. "Untersuchungen über sogenannte Jerezhefen". Wein u. Rebe 18, 16 (1936).
- (60) SISAKYAN, N.M.; POPOVA, E.M.; EGOROV, I.A. "Naturaleza bioquímica de los vinos de Jerez". Bio-khim. Vinodeliya Akad. Nauk. SSSR 2, 69-85 (1948). (tit. traduc.)
- (61) STELLING-DEKKER, N.M. "Die sporogenen Hefen". Amsterdam (1931).
- (62) TER-KARAPETYAN, M.A. "Reacciones bioquímicas en la

formación del jerez". Biokhim. Vinodeliya 4,
83-120 (1953). (tit. traduo.)

(63) van ZYL, J.A. "Beiträge zur Biologie und Frage des
Stoffwechsels der Jerez- und Kahlmhefen". Zen
tralb. f. Bakt. Parasitenk. Infection. u. Hy
giene 2, nº 111 (1958).