

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Microbiología II**



**Influencia de las levaduras en los procesos de fermentación y  
conservación de vinos blancos sobre polifenoles, polialcoholes  
y azúcares**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**José María Barcenilla Moraleda**

**Directores**

**María Teresa Hernández**

**Carmen Gómez-Coedovés**

**Madrid**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

INFLUENCIA DE LAS LEVADURAS  
SOBRE POLIFENOLES, POLIALCOHOLES  
Y AZÚCARES EN LOS PROCESOS DE  
FERMENTACIÓN Y CONSERVACIÓN DE  
VINOS BLANCOS.

Memoria que para optar al grado de

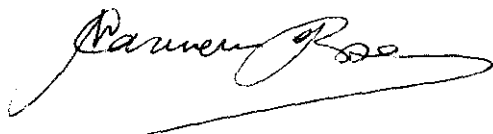
DOCTOR EN FARMACIA

presenta

JOSE MARIA BARCENILLA MORALEDA

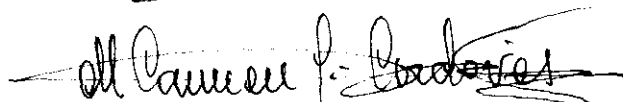
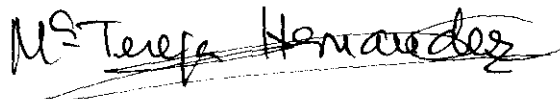
Instituto de Fermentaciones Industriales (Madrid 1990)

Ponente



CARMEN DE LA ROSA JORGE

Directoras



MARIA TERESA HERNANDEZ GARCIA

CARMEN GOMEZ-CORDOVES DE LA VEGA

*A Consuelo*

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A la Dra. Carmen de la Rosa Jorge por haber impulsado el comienzo de esta tesis y ser además ponente de la misma.

A las Dras. Carmen Gomez-Cordovés y Maria Teresa Hernandez por su constante animo, apoyo y dedicación como directoras de este trabajo.

A los compañeros de las unidades de Microbiología y de Biotransformación de productos vegetales del Instituto de Fermentaciones Industriales del C.S.I.C. donde se ha llevado a cabo el presente estudio.

A las bodegas Alvarez y Diez por las facilidades dadas en todo momento.

## ÍNDICE

I. Introducción general .....	1
1. Historia de la enología .....	2
2. Elaboración del vino .....	5
2.1. Vinificación en blanco .....	5
2.2. Vinificación en tinto .....	6
3. Tratamientos químicos de estabilización .....	8
3.1. Anhidrido sulfuroso .....	9
3.2. Acido ascórbico .....	12
3.3. Acido cítrico .....	14
3.4. Enzimas pectolíticos .....	15
4. Características vitivinícolas de la zona de Rueda .	16
5. Los vinos de Nava .....	18
5.1. Variedades de uva .....	18
5.2. Características de los vinos de la zona ....	19
6. Microbiología de mostos y vinos .....	21
7. Compuestos fenólicos .....	28
7.1. Clasificación .....	28
7.2. Fenoles no flavonoideos .....	29
7.3. Otros compuestos fenólicos .....	31
7.3.1. Fenoles flavonoideos .....	31
7.3.2. Compuestos fenólicos polimerizados ..	31
7.4. Biosíntesis de compuestos fenólicos .....	32
7.4.1. Vía del ácido acético .....	34
7.4.2. Vía del ácido siquímico .....	35
7.5. Tirosol y Triptofol .....	37
7.6. Propiedades e influencia de los compuestos fenólicos en los caracteres sensoriales ....	41
7.7. Presencia de compuestos fenólicos en mostos y vinos .....	45

7.8. Factores que afectan a la composición polifenólica de la uva y el vino .....	48
7.8.1. Condiciones de cultivo .....	48
7.8.2. Grado de madurez de la uva .....	49
7.8.3. Vinificación .....	50
7.9. Acción de los compuestos fenólicos sobre los microorganismos .....	51
8. Polialcoholes .....	55
8.1. Glicerol .....	57
8.2. 2-3 Butanodiol .....	57
8.3. Manitol .....	58
8.4. Sorbitol .....	61
8.5. Eritritol .....	63
8.6. Arabitol .....	64
8.7. Inositol .....	66
8.8. Xilitol .....	67
9. Azúcares .....	68
II. Objetivos .....	71
III. Plan de muestreo .....	75
1. Muestras de procedencia industrial .....	78
2. Muestras vinificadas en laboratorio .....	81
IV. Estudio microbiológico .....	85
1. Toma de muestras y aislamientos .....	87
2. Métodos y medios de clasificación .....	89
2.1. Pruebas morfológicas .....	89
2.1.1. Examen microscópico .....	89

2.1.2. Formación de ramificaciones pseudomielceliarias .....	90
2.1.3. Esporificación .....	91
2.2. Pruebas fisiológicas .....	92
2.2.1. Fermentación de azúcares .....	92
2.2.2. Asimilación de azúcares .....	94
2.2.3. Asimilación de nitratos .....	96
2.2.4. Escisión de arbutina .....	97
2.2.5. Poder fermentativo .....	98
2.2.6. Formación de velo .....	100
3. Diagnóstico y nomenclatura .....	101
4. Resultados y discusión .....	103
4.1. Agentes fermentativos de los mostos Verdejo y Jerez .....	103
4.1.1. Cepas identificadas .....	103
4.1.2. Poder fermentativo de las levaduras identificadas en los mostos .....	107
4.2. Estudio de la fermentación de mostos Verdejo y Jerez con diferentes cepas de levadura ...	109
4.2.1. Variedad Verdejo .....	110
4.2.1.1. Levaduras de la colección del I.F.I. ....	110
4.2.1.2. Levaduras de bodega .....	112
4.2.1.3. Mosto Verdejo filtrado con levaduras de la colección del I.F.I. ....	114

4.2.1.4. Comparación entre fermentaciones espontanea e inducidas .....	116
4.2.2. Variedad Jerez .....	118
4.2.3. Diferencias del poder fermentativo y grado alcohólico en función de las levaduras y mostos utilizados .....	120
4.3. Estudio de las levaduras residuales en vinos con diferentes tratamientos .....	123
5. Conclusiones .....	130
V. Estudio de compuestos fenólicos .....	133
1. Cromatografía en capa fina (CCF) .....	135
1.1. Introducción .....	135
1.2. Materiales y métodos .....	136
1.2.1. Eluyentes .....	136
1.2.2. Reveladores .....	138
1.3. Preparación de las muestras para CCF y CLAE	141
1.4. Resultados y discusión .....	142
1.4.1. Mostos .....	143
1.4.2. Fermentados de mostos de la variedad Jerez .....	145
1.4.3. Fermentados de mostos de la variedad Verdejo .....	147
1.4.3.1. Fermentación espontánea, con tres levaduras de la colección del I.F.I., con tres levaduras autóctonas utilizadas en bodega, con tres levaduras de la colec-	

ción del I.F.I. sobre mosto sin filtrar .....	147
1.4.3.2. Fermentación levaduras de la co- lección del I.F.I. sobre mosto filtrado y sin filtrar y con le- vaduras de bodega sobre mosto sin filtrar .....	151
1.4.4. Vinos elaborados en las bodegas de Nava del Rey .....	156
1.4.4.1. Vinos varietales de Verdejo ..	156
1.4.4.2. Vinos varietales de Viura ....	160
1.4.4.3. Vinos varietales de Jerez ....	162
1.4.4.4. Vinos de la mezcla de varie- dades .....	166
1.4.4.5. Vinos de los fangos de la variedad Verdejo .....	170
1.4.4.6. Vinos de los fangos de la mezcla de variedades .....	172
1.4.4.7. Vinos varietales de Verdejo con levaduras de bodega .....	174
1.4.5. Actuación de especies filmógenas ....	176
1.4.5.1. Vinos para desarrollar velo ..	176
1.4.5.2. Vinos tras permanencia bajo velo .....	181
1.4.6. Vinos comerciales .....	181
2. Cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) .....	187
2.1. Introducción .....	187
2.2. Materiales y métodos .....	189
2.3. Resultados y discusión .....	195

2.3.1. Mostos .....	195
2.3.2. Fermentados de mostos de la variedad Jerez .....	198
2.3.3. Fermentados de mostos de la variedad Verdejo .....	201
2.3.3.1. Fermentación espontánea, con tres levaduras de la colección del I.F.I., con tres levaduras autóctonas utilizadas en bodega, con tres levaduras de la colección del I.F.I. sobre mosto sin filtrar .....	201
2.3.3.2. Fermentaciones con inducción por levaduras de bodega .....	207
2.3.3.3. Fermentación levaduras de la colección del I.F.I. sobre mosto filtrado y sin filtrar y con levaduras de bodega sobre mosto sin filtrar .....	210
2.3.4. Vinos elaborados en las bodegas de Nava del Rey .....	216
2.3.4.1. Vinos varietales de Verdejo ..	216
2.3.4.2. Vinos varietales de Viura ....	222
2.3.4.3. Vinos varietales de Jerez ....	227
2.3.4.4. Vinos de la mezcla de variedades .....	233
2.3.4.5. Vinos de los fangos de la variedad Verdejo .....	238

2.3.4.6.	Vinos de los fangos de la mezcla de variedades .....	243
2.3.4.7.	Vinos varietales de Verdejo con levaduras de bodega .....	247
2.3.5.	Actuación de especies filmógenas ....	251
2.3.6.	Vinos comerciales .....	253
2.4.	Conclusiones .....	256
VI.	Estudio de polialcoholes .....	259
1.	Materiales y métodos .....	261
1.1.	Preparación y derivatización de las muestras para C.G. ....	261
2.	Resultados y discusión .....	266
2.1	Mostos .....	266
2.2	Fermentados de mostos de la variedad Jerez	267
2.3	Fermentados de mostos de la variedad Verdejo	269
2.3.1	Fermentación espontánea, con tres levaduras de la colección del I.F.I., con tres levaduras autóctonas utilizadas en bodega, con tres levaduras de la colección del I.F.I. sobre mosto sin filtrar .....	269
2.3.2	Fermentación con inducción por levaduras de bodega .....	271
2.3.3	Fermentación levaduras de la colección del I.F.I. sobre mosto filtrado y sin filtrar y con levaduras de bodega sobre mosto sin filtrar .....	273

2.4	Vinos elaborados en las bodegas de Nava del Rey .....	276
2.4.1.	Vinos varietales de Verdejo .....	276
2.4.2.	Vinos varietales de Viura .....	279
2.4.3.	Vinos varietales de Jerez .....	281
2.4.4.	Vinos de la mezcla de variedades.....	284
2.4.5.	Vinos de los fangos de la variedad Verdejo .....	286
2.4.6.	Vinos de los fangos de la mezcla de variedades .....	288
2.4.7.	Vinos varietales de Verdejo con levaduras de bodega .....	291
2.5.	Actuación de especies filmógenas .....	293
2.6.	Vinos comerciales .....	296
3.	Conclusiones .....	297
VI.	Estudio de azúcares .....	299
1.	Materiales y métodos .....	301
2.	Resultados y discusión .....	301
2.1.	Mostos .....	301
2.2.	Fermentados de mostos de la variedad Jerez.	302
2.3.	Fermentados de mostos de la variedad Verdejo	303
2.3.1.	Fermentación espontánea, con tres levaduras de la colección del I.F.I., con tres levaduras autóctonas utilizadas en bodega, con tres levaduras de la colección del I.F.I. sobre mosto sin filtrar .....	303

2.3.2.	Fermentación con inducción por levaduras de bodega .....	304
2.3.3.	Fermentación levaduras de la colección del I.F.I. sobre mosto filtrado y sin filtrar y con levaduras de bodega sobre mosto sin filtrar .....	306
2.4.	Vinos elaborados en las bodegas de Nava del Rey .....	306
2.4.1.	Vinos varietales de Verdejo .....	307
2.4.2.	Vinos varietales de Viura .....	308
2.4.3.	Vinos varietales de Jerez .....	310
2.4.4.	Vinos de la mezcla de variedades ....	312
2.4.5.	Vinos de los fangos de la variedad Verdejo .....	315
2.4.6.	Vinos de los fangos de la mezcla de variedades .....	316
2.4.7.	Vinos varietales de Verdejo con levaduras de bodega .....	317
2.5.	Actuación de especies filmógenas .....	319
2.6.	Vinos comerciales .....	320
3.	Conclusiones .....	321
VII.	Conclusiones .....	323
VIII.	Bibliografía .....	327

## I. - INTRODUCCIÓN GENERAL



En la tecnología de alimentos, el proceso de fermentación alcohólica representa una etapa obligada y decisiva en la elaboración de muchos de estos; el producto final está constituido en unos casos por el fermentado íntegro (vino, cerveza) y en otros por su destilado (ron, whisky). En España, una de las industrias alimentarias de mayor importancia, tanto tradicional como económicamente, es la industria enológica.

El vino puede definirse como la bebida obtenida de la fermentación alcohólica, completa o parcial del mosto de uva. Sin embargo, vinos procedentes de regiones distintas difieren marcadamente en sus caracteres organolépticos. Ello es debido, al menos en parte, a factores edafológicos, botánicos y climáticos, que condicionan la composición química del mosto la cual a su vez influye sobre la microflora que interviene en su fermentación espontánea.

### 1.- HISTORIA DE LA ENOLOGÍA.

El cultivo de la vid y la elaboración del vino son conocidos en la región Mediterránea desde tiempo inmemorial. Según la tradición judeocristiana, Noé fue el primer hombre que cultivó la vid y que elaboró vino: *"Noé agricultor, comenzó a labrar la tierra y plantó una viña. Bebió de su vino, y se embriagó y quedó desnudo en medio de su tienda."* (Génesis, 9, 20-21).

Los griegos poseían un dios "viticultor y enólogo" Dionisos; los romanos y también los fenicios elaboraban vino que incorporaban a sus celebraciones y por tanto a su cultura.

La aparición del cultivo de la vid y de la elaboración de vino en la Península Ibérica parece estar ligada a las actividades comerciales de los pueblos griegos. M. Díez (1977) cita, en apoyo de esta hipótesis, el descubrimiento en las islas Baleares de restos arqueológicos de una nave griega que transportaba plántones de vid, que presumiblemente eran importados por las colonias griegas de la Península Ibérica desde la metrópoli.

Los romanos extendieron el cultivo de la vid en su imperio. En tiempos de Estrabon, la vid se extendía por todas las costas mediterráneas y atlánticas de la Península Ibérica, pero no por las riberas del Cantábrico, hecho que el autor atribuye fundamentalmente a la inclemencia del tiempo.

En la Edad Media, la viticultura, como otras muchas actividades humanas, decayó profundamente, y solo fue salvaguardada en los dominios de las ordenes religiosas, muchas de ellas asentadas en terrenos altos y aislados, lo cual hizo necesaria la selección de nuevas variedades capaces de resistir las bajas temperaturas.

La tradición indica que como consecuencia de las peregrinaciones a Santiago de Compostela algunas cepas alemanas fueron traídas a España dando origen a la variedad Albariño.

A partir del siglo XV el cultivo de la vid se propagó desde el viejo continente a las tierras colonizadas por los españoles, portugueses, ingleses y holandeses.

Las primeras cepas llegaron al Caribe en 1493 expandiéndose luego por toda América. Los colonos holandeses las llevaron a África del Sur en el siglo XVII y los ingleses las aclimataron en Australia en la segunda mitad del siglo XVIII.

Actualmente España es el país que mayor extensión dedica a la viña y el tercer productor de vino. (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación 1988 - 1989).

## 2.- ELABORACIÓN DEL VINO.

### 2.1.- Vinificación en blanco.

El proceso de vinificación (figura II.1) comienza, una vez recolectada la uva, con el despalillado, mediante el cual se elimina el raspón; posteriormente se procede al estrujado para conseguir el mosto.

El mosto obtenido sufre un proceso de desfangado (clarificación del mosto por decantación) y cuando se considera terminado este, se realiza un trasiego del mosto ya limpio, a otro envase para que comience la fermentación, que debe transcurrir a temperatura moderadamente baja para obtener un vino con la mayor cantidad posible de aromas primarios, los más apreciados en vinos

jóvenes (Ribereau-Gayon y Peynaud 1962., Ribereau-Gayon y col 1976).

Finalizada la fermentación, es necesario realizar un trasiego para separarlo cuanto antes de levaduras y otras materias que se depositan en el fondo del recipiente de fermentación y cuyo contacto prolongado produciría características organolépticas desagradables.

## 2.2.- Vinificación en tinto.

Una vez la vendimia estrujada y despalillada se lleva a fermentar; la fermentación se produce en presencia de los orujos para conseguir que el color, presente en los hollejos, se difunda en la masa del líquido; este proceso de maceración es lo que caracteriza y diferencia la elaboración de tintos y blancos.

Al terminar la fermentación alcohólica, se procede al descube, separándose el vino de los orujos. El vino se pasa a un recipiente distinto en el que sufrirá la fermentación maloláctica que proporciona al vino finura y suavidad, al transformar un ácido acerbo y duro, el málico, en otro más suave y untuoso, el láctico.

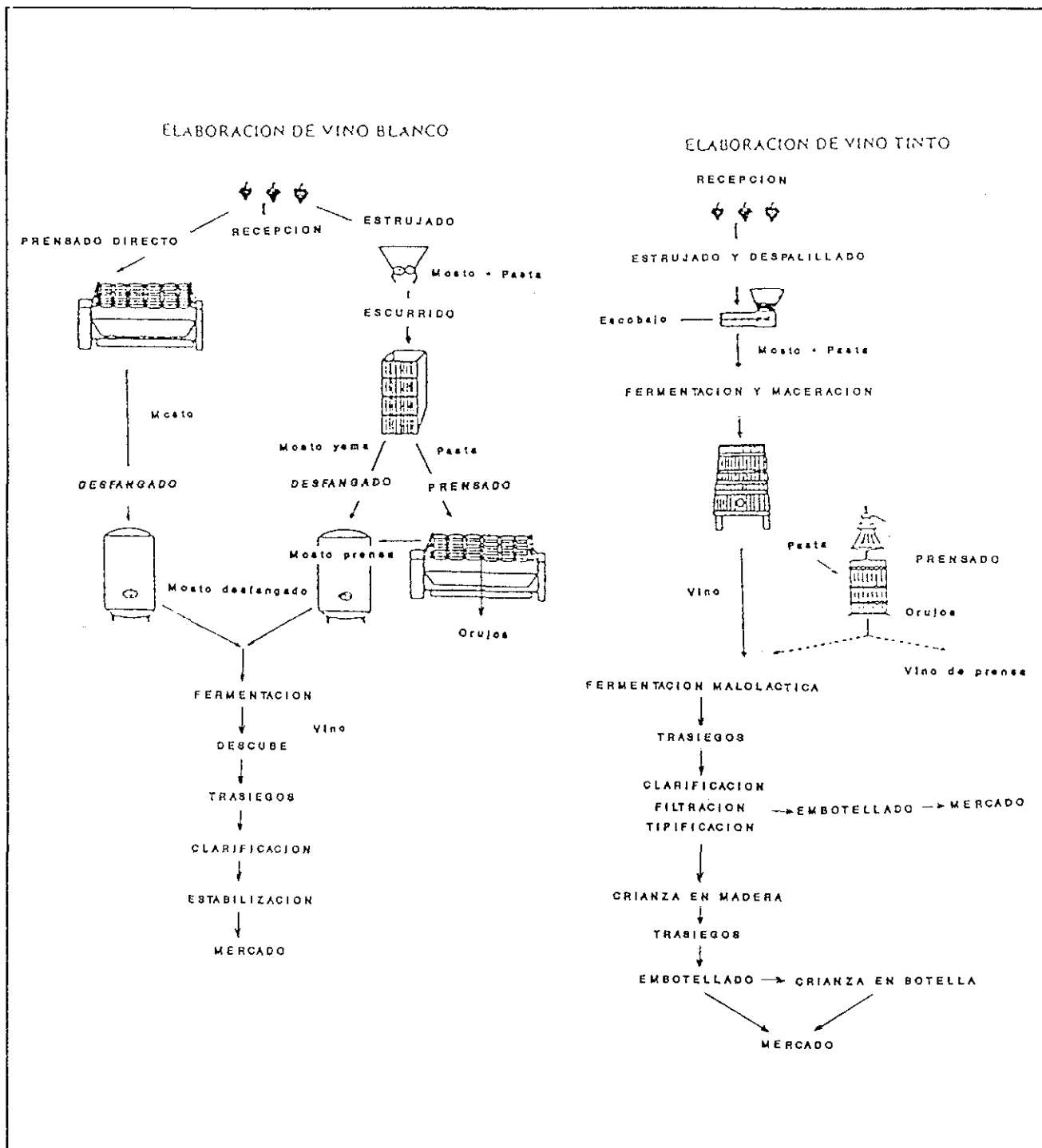


Figura II.1

Esquema de vinificaciones

### 3.- TRATAMIENTOS QUÍMICOS DE ESTABILIZACIÓN.

Una vez obtenido el vino es preciso que este pueda mantenerse en perfectas condiciones de limpidez y transparencia durante el tiempo que haya de ser conservado hasta su consumo.

El vino, después de terminada la fermentación, inicia una lenta clarificación espontánea, la limpidez adquirida de esta forma natural requiere tiempo y no siempre se alcanzan los niveles de exigencia en el mercado vinícola. Por esta razón se hace necesario agilizar y perfeccionar el proceso natural; recurriéndose bien a la adición de sustancias inocuas autorizadas por la legislación, bien al uso de la acción mecánica, sometiendo al vino a centrifugación y a operaciones de filtrado y abrillanado.

Hay que tener en cuenta que la clarificación no es necesariamente un proceso de estabilización, entendiéndose como tal el conjunto de operaciones que tienen como finalidad la conservación de la limpidez a lo largo del tiempo.

Los distintos procesos de estabilización aplicables al vino se basan en los resultados de ensayos de comportamiento al ser sometido a condiciones de conservación.

Cualquier tratamiento de estabilización aplicado al vino persigue dos objetivos fundamentales: la eliminación de microorganismos y la preservación de su integridad fisicoquímica. Hay

pues que distinguir entre "estabilidad biológica" y "estabilidad fisicoquímica". Para un técnico enólogo, el significado será distinto que para un microbiólogo del vino; para el primero significara un sentido absoluto, mientras que para el segundo esto no es así, puesto que el vino es un sustrato de gran labilidad, sobre todo si es joven, susceptible de comunicar posibilidad nutricional y, por tanto, de dar nueva vida a numerosas especies microbianas. El vino no es biológicamente estable por naturaleza; aunque por su alto contenido en etanol y bajo pH sea de los alimentos de fermentación con mayor estabilidad (Suarez e Iñigo 1990)

### 3.1.- Anhidrido sulfuroso.

La introducción del anhídrido sulfuroso como antiséptico en el tratamiento del mosto, representó un importante avance en la enología al ofrecer la posibilidad de prevenir y evitar diversas alteraciones que pueden afectar al proceso de vinificación. Su empleo es una práctica corriente en el proceso de elaboración del vino y su uso esta extendido en todo el mundo.

El anhídrido sulfuroso tiene una serie de ventajas, tales como seleccionar la microflora de la uva, proteger los mostos y los vinos contra alteraciones microbianas (Aerny 1986 a,b,c), enzimáticas y químicas (Ribereau-Gayon y col 1977), favorecer la mayor obtención de alcohol etílico y facilitar un color más intenso y estable (Mateos 1985. Sanchez-Infante 1986. Singleton y col. 1980). Es también agente impulsor del desfangado (Mareca

1982). El sulfuroso tiene también inconvenientes, como seleccionar las levaduras según la sensibilidad que estas presentan al antiséptico y no atendiendo a sus cualidades enológicas (Iñigo 1971) o entorpecer e incluso impedir la fermentación maloláctica.

La eficacia antiséptica del anhídrido sulfuroso (Beech y Thomas 1985) es función de las formas moleculares que se encuentran en el medio, únicamente la forma  $\text{SO}_3\text{H}_2$  es activa. Esta forma depende directamente del pH, de manera que cuanto menor sea este mayor será la cantidad de anhídrido sulfuroso en forma molecular activa (Huss y Ecker 1977. Scopfer y Aerny 1985).

La distinta resistencia que ofrecen los microorganismos al sulfuroso, se debe a la mayor o menor facilidad de transporte de la forma molecular activa a través de la membrana plasmática, el paso puede ser por difusión simple (Stratford y Rose 1986) o por transporte activo (Macris y Markakis 1974). Su acción como antioxidante ha sido revisada por Ribereau-Gayon y col. (1976-1977). La forma más activa es la disociada, que se oxida por la acción del oxígeno del aire.

Es también necesario tener en cuenta que el  $\text{SO}_2$  y el  $\text{SH}_2$  son productos que naturalmente aparecen en el vino, debido a que son producidos por las levaduras en pequeña proporción a partir de los aminoácidos azufrados (Eschembruch 1974. Bidan 1985. Bravo y García 1987).

Desde el punto de vista organoléptico, la presencia del anhídrido sulfuroso es negativa para el aroma del vino, debido a que es una molécula con bajo umbral y olor desagradable (Cabezudo 1988).

En los últimos años se tiende a suprimir o a emplear la menor cantidad posible de aditivos en los alimentos y principalmente en aquellos que, como el vino, pueden ser consumidos diariamente. Esta iniciativa se basa en los estudios realizados sobre el sulfuroso en el organismo humano y que en algunos casos puede llegar a hacer desaconsejable su utilización (Lueck 1980).

El sulfuroso resulta altamente irritante sobre las mucosas y presenta cierta toxicidad cuando se ingiere en determinadas cantidades. Este último aspecto fue estudiado por el Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios de la F.A.O. y de la O.M.S., que determinaron en 1972, que niveles de hasta 0,35 mg SO<sub>2</sub>/Kg de peso pueden ser ingeridos sin peligro; ahora bien, cantidades que superen los 1,5 mg de SO<sub>2</sub> pueden ocasionar graves riesgos, tales como avitaminosis con relación a la vitamina B1, obstaculización de la digestión, espasmos, dolores de cabeza, etc. (Hamond 1976).

La supresión del anhídrido sulfuroso en la elaboración de vinos es un proceso factible siempre que se tomen las debidas precauciones (Margheri y Versini 1986. Iñigo 1986. Bravo e Iñigo 1989). Se requiere una vendimia sana, grado óptimo de madurez en las uvas, tecnología adecuada y utilización de levaduras seleccionadas.

Entre los aspectos tecnológicos que permiten disminuir la cantidad de SO<sub>2</sub> destacan: instalaciones adecuadas por su higiene y facilidad de desinfección, prensado suave y con escaso contacto con el aire y estabilización por frío.

Se han propuesto diversos métodos para eliminar la adición de anhídrido sulfuroso, entre ellos tenemos:

- Sustitución del SO<sub>2</sub> por otros antioxidantes como el ácido ascórbico, (Ough 1987).
- Uso de clarificantes con centrifugación y/o filtración del mosto (Galassi y Mancini 1985).
- Tratamientos térmicos (Usseglio-Tomasset 1985).
- Ultrafiltración tangencial (Reglero 1987).

### 3.2.- Ácido ascórbico.

La búsqueda de algún producto que sustituyera al anhídrido sulfuroso desembocó finalmente en el descubrimiento de la acción reductora del ácido ascórbico (vitamina C), naturalmente presente en muchas frutas y que es una sustancia imprescindible en la alimentación humana.

El ácido ascórbico tiene mayor poder reductor que el ácido sulfuroso; sanitariamente es totalmente inofensivo y, además no altera el sabor ni el olor de los alimentos en los que se encuentra. Sin embargo, la vitamina C no presenta actividad bactericida y no puede por tanto emplearse como sustitutivo del

sulfuroso en cuanto remedio de enfermedades y defectos de los vinos, sin embargo puede actuar como coadyuvante de gran valor en lo que se refiere al tratamiento y maduración de estos.

La adición de ácido ascórbico a los mostos permite limitar los efectos de las oxidaciones enzimáticas. Flanzky (1959) indica que la presencia de ácido ascórbico ayuda al mantenimiento del color y conservación del aroma afrutado. Cassignard, citado por Ribereau-Gayon y Peinaud (1961), constata que el ácido ascórbico asegura una buena protección contra los efectos de la oxidación en el curso de la vinificación en blanco y conserva el gusto afrutado y aroma fresco en los vinos.

Cordonnier (Ribereau-Gayon y Peynaud 1961) al estudiar la quiebra oxidásica llega a la conclusión de que los efectos antioxidantes del ácido ascórbico y del anhídrido sulfuroso se potencian cuando actúan conjuntamente, por lo que son necesarias dosis menores de cada uno de ellos para conseguir los mismos efectos.

Los vinos ricos en hierro que se enturbian después de aireación por precipitación férrica, permanecen limpios tras la adición de ácido ascórbico; esto permite embotellar sin tratamientos especiales vinos con exceso de hierro. El ácido ascórbico contrarresta el efecto de pequeñas aireaciones pero no actúa contra una oxidación drástica o media, su papel se limita a proteger el vino de la aireación durante el proceso de embotellado, ya que después el vino permanece al abrigo del aire.

Las ventajas que el ácido ascórbico produce son:

- Protección contra la oxidación más eficaz que la del sulfuroso.
- Permite la obtención de vinos con niveles de oxido-reducción más bajos, con lo que se favorece el desarrollo de aromas.
- Elimina las precipitaciones férricas de los vinos consecuencia de una aireación en vinos con alto contenido en hierro.
- Evita las consecuencias desfavorables de la aireación desde el punto de vista gustativo.

La desventaja es que solo asegura la protección de los vinos en caso de aireación pasajera.

### 3.3.- Ácido cítrico.

La acidificación de mostos y vinos por adición de ácido cítrico cristalizado está permitida, siempre que el mosto o vino resultante no contenga más de un gramo por litro de dicho ácido.

Sin embargo, al tratarse de un producto fácilmente degradable por numerosas especies de bacterias lácticas, viene relegado por el uso del ácido tartárico, más resistente al ataque de microorganismos que solamente consiguen degradarlo en vinos con pH superior a 6.

Los valores en ácido cítrico de vinos blancos sobrepasan raramente los 450 mg/l en vinos ordinarios y 600 mg/l para los vinos procedentes de podredumbre noble. Las dosis son habitualmente menores en vinos tintos, especialmente en aquellos que han sufrido la fermentación maloláctica.

#### 3.4.- Enzimas pectolíticos.

Productos también utilizados en los tratamientos de vinos son los enzimas pectolíticos, llamados enzimas clarificantes o enzimas de filtración. Son sustancias obtenidas a partir de micelios desecados de *Aspergillus*, *Penicillium*, y *Botrytis* y del residuo seco de los medios de cultivo sobre el que se desarrollan.

Con la clarificación enzimática se consiguen vinos que se distinguen por su bello color y su limpidez. Cuando se acompaña de encolado se consiguen resultados muy superiores a los obtenidos cuando se realiza solamente este último tratamiento.

La actividad de estos enzimas es muy variable, unos se caracterizan por la actividad diastásica casi exclusivamente pectolítica, debido a las pectinasas o poligalacturonasas que pueden escindir pectinas y transformarlas en moléculas solubles; otros contienen un enzima que precipita la pectina, la pectasa; y otros, los enzimas proteolíticos, degradan las proteínas.

Estos enzimas son utilizados principalmente en dos casos:



La localidad de Nava del Rey (figura II.2), entre los ríos Trabancos al oeste, Zapardiel al este y Duero al norte, pertenece a la provincia de Valladolid, se encuentra situada en la meseta castellana y sus caracteres orográficos son los propios de esta formación. El conjunto forma una plataforma con una altitud media aproximada a los 800 m. (Ministerio de Agricultura. I.N.D.O.)

Con excepción de las terrazas fluviales pertenecientes al Cuaternario, el resto de los suelos de la provincia pertenecen al Neoceno, y dentro de esta edad, la mayor parte al Mioceno Vindoboniense. Las zonas que parecen reunir mejores condiciones para la implantación del viñedo son las terrazas del Cuaternario junto a los cauces de los ríos, las rañas<sup>1</sup> del Plioceno intercaladas con calizas y margas del Vindoboniense y los materiales detríticos y calcáreos del Mioceno inferior.

El clima es continental con influencia atlántica, yendo las lluvias persistentes asociadas a vientos del suroeste (ábregos). La lluvia media anual es próxima a los 400 mm. El promedio anual de días cubiertos es de 85 y de 95 el de despejados. Corresponde a la provincia un promedio de 2600 horas de sol efectivo. La temperatura media anual esta entre 12 °C y 13 °C, con valores extremos de 36°C (finales de Julio) y de -6°C (Enero). El período libre de heladas abarca desde principios de Mayo a mediados de Octubre.

---

<sup>1</sup>Acumulación de cantos rodados, con origen en un sistema de erosión árido o por un sistema de erosión periglacial.

## 5.- LOS VINOS DE NAVA.

Hace varios años los vinos que se producían en lo que hoy es la Denominación de Origen Rueda eran más conocidos como los vinos de la Nava, debido a la gran cantidad que se elaboraba en este municipio y también a su calidad. Cuando se crea la D.O. la zona de producción comprende un total de 70 términos municipales repartidos entre las provincias de Valladolid, Segovia y Avila.

Los marcos de plantación de Nava del Rey y en general de todos estos términos se reparten entre el "marco real" y el "tresbolillo", este último en las plantaciones más antiguas, con distancia entre plantas de 2,80x2,80 y 3x3 m. La densidad de plantación es de 1100 a 2500 cepas/Ha con producciones de 3,5-4 kg/cepa (datos para la variedad Verdejo). También existen plantaciones en espaldera con distintas densidades de plantación, con el fin de adaptar el viñedo a las últimas técnicas en viticultura.

### 5.1.- Variedades de uva.

**Verdejo blanco.-** Variedad principal implantada en la zona por los mozárabes, puede considerarse hoy como autóctona ya que su adaptación a sido tal, que cuando sale de ella pierde todas sus características peculiares, habiendo conseguido resistir fríos y sequías.

Viura.- Procedente de Rioja con el fin de probar su adaptación, aporta a los vinos aromas típicos de esta variedad.

Palomino (Jerez).- Variedad de Jerez que llegó después de la Filoxera y como reacción a la misma.

Otra variedad experimental que ha sido aprobada por el reglamento de la D.O. dada su buena adaptación, es la Sauvignon blanc que proporciona calidad a los vinos en que se encuentra.

### 5.2.- Características de los vinos de la zona.

Los vinos elaborados en esta zona de producción tienen como denominador común el aporte de la variedad de uva Verdejo y según la proporción en la que entre y el tipo de crianza a la que se someten se clasifican en: vinos blancos de mesa y vinos generosos o de licor.

**Vinos blancos de mesa: Rueda y Rueda superior.**

Rueda. Elaborado con un mínimo de Verdejo del 25%, se aprecian con amplitud las características de la Viura y de la Jerez sin perder el matiz varietal de la Verdejo.

Rueda superior. Vino elaborado con un mínimo de Verdejo del 85% y criado en madera de roble americano como mínimo durante seis

meses. También se da como vino afrutado sin crianza. De color amarillo paja pálido, con tonos acerados y verdosos típicos de la variedad. Aromas característicos con matices afrutados. En boca son vinos de cuerpo con posgusto amargo. La graduación oscila entre 11,5-13°.

**Vinos generosos o de licor:** Pálido Rueda y Dorado Rueda. Son reliquia de las elaboraciones históricas de la Nava y en general de la Denominación de Origen.

Pálido Rueda. Vino generoso de crianza biológica bajo velo de flor con un mínimo de graduación de 15° y cinco años en madera de roble americano. Son vinos pálidos, ligeros, secos y fragantes. Amplios de aroma y boca.

Dorado Rueda. Es un pálido cuya crianza en velo de flor ha sido cortada, prolongándose su envejecimiento hasta adquirir un color caoba e intensidad de aromas y sabores que le dan sus características de generoso. Su graduación mínima es de 15°.

## 6.- MICROBIOLOGÍA DE MOSTOS Y VINOS.

Caignard Latour, en 1835, demuestra que los microorganismos vivos presentes en los mostos de fermentación son levaduras pertenecientes al reino vegetal.

Pasteur (Ribereau-Gayon y col), con quien nace la enología científica, demuestra definitivamente el origen biológico de las fermentaciones, oponiéndose a la teoría, mantenida por Berzelius y Liebig, que daba a la fermentación un origen meramente químico. Más tarde describe la fermentación alcohólica y láctica y demuestra la correlación entre estructura microbiana y función bioquímica. Obtiene por primera vez cultivos de levaduras diferentes y establece el origen y ciclo de algunas especies en la naturaleza. Demuestra también que las levaduras se encuentran sobre el hollejo de los granos maduros y no en su interior.

El danés Hansen (Ribereau-Gayon, J., Peynaud, E. 1962) establece los fundamentos de la taxonomía de levaduras. Guillermond (Gibbs, B.M., Shapton 1968) realiza estudios citológicos y describe la estructura interna de la célula de levadura.

Las levaduras, según Lodder (1970), se definen como hongos en los que la forma predominante de su ciclo de vida es la unicelular.

Los primeros microbiólogos que estudiaron las transformaciones mosto-vino, observaron que en la fase inicial de la fermenta-

ción espontánea predominaban células en forma de limón, levaduras apiculadas, a medida que el proceso avanza las formas apiculadas pierden su predominio y aparecen en el medio otras de forma globosa, a veces alargadas, y finalmente otras de forma elíptica, que al consumir todos los azúcares del medio floculan y se depositan. Estos microbiólogos estaban interesados por la funcionalidad de las levaduras vínicas, es decir las transformaciones bioquímicas que realizaban al desarrollarse en el mosto de uva y más concretamente en los productos finales que originaban y quedaban acumulados en el vino. Se vio que las levaduras apiculadas producen escasa cantidad de alcohol y notable proporción de compuestos volátiles, dejando mucho azúcar en el medio, por el contrario, la levadura elíptica produce más alcohol, menos metabolitos secundarios y consume mayor cantidad de azúcar.

De estas observaciones surgieron las experiencias de Müller-Thurgau (Arroyo 1962) que propone el alejamiento de las levaduras apiculadas del proceso fermentativo; aparece al concepto de "vino tecnológico" y con ello la utilización de la molécula de anhídrido sulfuroso,  $SO_2$ , para la esterilización del mosto. La vinificación se hizo cómoda y retrasó la investigación microbiológica.

El estudio microbiológico planificado por diferencias ecológicas de zonas vitivinícolas se inicia en España con la llegada de Castelli, quien junto a Iñigo (1957), recoge 29 muestras de mosto de la zona de la Mancha, para posteriormente realizar su examen microbiológico. En años sucesivos, el equipo de

microbiología del Instituto de Fermentaciones Industriales del C.S.I.C. ha realizado una labor amplia y exhaustiva sobre las regiones españolas con Denominación de Origen y Denominación Específica. De los resultados de estos trabajos se evidencian, a grandes rasgos, algunos hechos muy notables:

- En la fermentación espontánea de los mostos de uva españoles, se diferencian tres fases, en cada una de las cuales intervienen levaduras de distintas especies que se suceden de forma precisa.

- En la primera fase (cuando la fermentación aún no es perceptible) se encuentran levaduras apiculadas, productoras de bajo grado alcohólico y escasa pureza fermentativa, que dan lugar a la aparición en el vino de gran cantidad de sustancias volátiles.

- En la segunda fase (comienzo de la fermentación) aparecen especies de gran pureza fermentativa y productoras de grado alcohólico medio.

- La tercera fase (fermentación tumultuosa) está dominada por distintas especies del género *Saccharomyces*, estas levaduras son las encargadas de finalizar el proceso fermentativo y son productoras de un alto porcentaje de etanol.

- En algunos casos, al cabo de 20-25 días de acabada la fermentación alcohólica, tiene lugar la aparición de velos blastomicéticos en la superficie del vino; esto tiene lugar en la totalidad de las muestras de Andalucía Occidental y en proporción variable, en Valladolid, Extremadura, Aragón y Penedés.

- Las especies de levaduras esporuladas dominan sobre las no esporuladas en zonas cálidas, dándose el caso inverso en zonas frías. Levaduras no esporuladas son mayoritarias en la primera fase fermentativa.

- Existe diferencia de especies entre mostos de zonas frías y cálidas, a título de ejemplo, *Hanseniaspora guilliermondi* se encuentra en zonas cálidas sustituyendo a *Kloeckera apiculata* que se encuentra en zonas frías, la primera es la forma perfecta de la segunda.

- Por último cepas de levadura de cada zona se estudiaron posteriormente con investigaciones más profundas, creandose en el Instituto de Fermentaciones Industriales del C.S.I.C. una colección en la que existen levaduras seleccionadas que se utilizan en la industria (bodegas, fabricación de licores por destilación una vez fermentado el mosto adecuado, panadería, etc.).

-----

La aplicación a escala industrial de levaduras locales seleccionadas para cada zona potenciará el elemento biológico responsable directamente de la transformación mosto-vino, ya que todo vino es obra de levaduras y para conseguir los mejores vinos tecnológicos de cada zona se requiere el uso de levaduras locales seleccionadas.

Algunos de los criterios usados en la selección de levaduras para enología son:

- Capacidad para efectuar una eficaz fermentación alcohólica de azúcares. La capacidad de producir etanol por parte de una levadura, aún siendo la más importante, debe ser tomada como parte de una serie de requerimientos que hagan aceptable su utilización. Así, existen otros microorganismos (bacterias) que producen etanol como producto final de fermentación, junto a otros productos que hacen inaceptable su utilización.

- Tolerancia al etanol. Estrechamente relacionada con la capacidad de producir una fermentación adecuada. Es importante saber que al existir varias fases fermentativas, no todas las levaduras precisan tener la misma tolerancia. Esta tolerancia al etanol indica la capacidad de la levadura de ser viable a concentraciones más o menos altas del mismo; está influida por factores ambientales, incluyendo la concentración de azúcares en el medio, así como los contenidos lipídicos y proteicos de la célula de levadura.

- Producción de compuestos organolépticamente deseables. Se trata de compuestos presentes en muy bajas concentraciones, pero que confieren al vino unas mejores características organolépticas. Un ejemplo muy claro de esto es la formación, por parte de las levaduras de flor, de alcoholes superiores a partir de algunos aminoácidos, de forma que el producto final son los vinos típicos de Andalucía Occidental. Por otra parte si las levaduras que hacen su aparición en la superficie del vino son de tipo *Pichia* o *Candida* el producto se degrada y además se abren las puertas a posibles infecciones y enfermedades.

- Estabilidad y viabilidad. Las cepas de levaduras seleccionadas deben ser estables en el tiempo, viables y además tener la capacidad de producir compuestos de cualidades organolépticas deseables.

- Floculación. Algunas cepas tienen tendencia a aglomerarse y formar flóculos, los cuales se posan en el fondo de la vasija de fermentación. Este fenómeno conocido como floculación, se reconoce como un factor de gran importancia en la producción de bebidas fermentadas. Para alcanzar la máxima conversión de azúcar a etanol, es esencial para la levadura permanecer suspendida en el líquido fermentable y no flocular, pero también la capacidad de la levadura para flocular cuando la fermentación ha terminado es una ventaja, ya que hace más fácil la separación de las levaduras del vino.

- Baja producción de acidez volátil. Lo más destacable en la elaboración de vinos es la obtención de los mismos con poca acidez volátil y alto grado de etanol por unidad de azúcar transformada. La existencia de dosis elevadas de ácidos volátiles, en particular ácido acético, deterioran la calidad. Estos ácidos se forman principalmente por levaduras presentes en la primera fase fermentativa, por tanto, es importante vigilar esta primera etapa y los microorganismos que en ella intervienen.

En cada zona queda establecido un esquema ecológico de levaduras fermentativas y aerobias. En toda España se han encontrado 27 especies de levaduras. Enológica, a la vista de los resultados, se piensa que determinadas especies de levaduras pueden ser consideradas como especies nobles, aptas para llevar a cabo las fermentaciones, y otras inapropiadas para tal fin.

Estudiando los fenómenos de interacciones entre las especies en biotopos naturales, se ha desembocado en una biotecnología de vinificación que consiste en aplicar simultáneamente especies diferentes de levaduras estenoicas y euriocas dominantes en cada comarca enológica sin previa adición al mosto de anhídrido sulfuroso ( $\text{SO}_2$ ).

## 7.- COMPUESTOS POLIFENÓLICOS

La importancia en enología de estos compuestos es bien conocida. Muchos de los factores que afectan a la elaboración de vinos como son, color, acidez, pardeamientos y otras reacciones con el oxígeno etc., están influenciadas por el contenido en compuestos fenólicos. Intervienen en los caracteres organolépticos, sabor, dureza, astringencia.

### 7.1.- Clasificación.

#### Fenoles no flavonoideos

- C<sub>6</sub> .... Fenoles sencillos
- C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>.... Alcoholes, aldehidos y ácidos benzoicos
- C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>.... | Acetofenonas  
| Ácidos fenilacéticos
- C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>.... | Alcoholes, aldehidos y ácidos cinámicos  
| Cumarinas  
| Isocumarinas  
| Cromonas

#### Fenoles flavonoideos

- C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> . | Flavanoles, Flavonas  
| Flavonoles, Isoflavonas  
| Antocianos

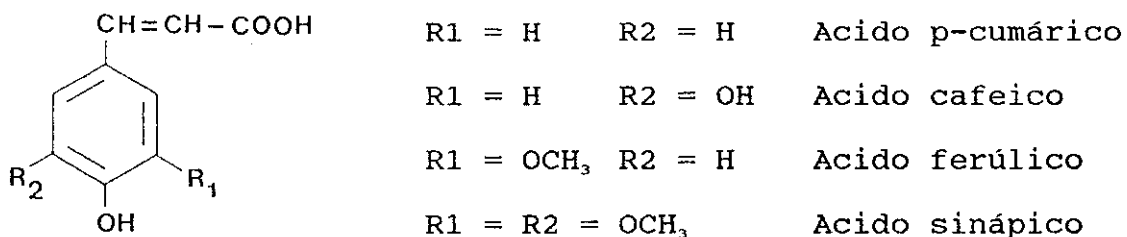
#### Compuestos fenólicos polimerizados

- Ligninas
- Taninos .. | Hidrolizables  
| Condensados

## 7.2.- Fenoles no flavonoideos

Hasta hace pocos años se afirmaba que los ácidos fenólicos no se encontraban libres en los vegetales, y por tanto en el mosto de uva, sino únicamente formando parte de uniones tipo ester. En el caso de los ácidos cinámicos se dan combinaciones con el ácido quínico, con azúcares y con el ácido tartárico. En el caso de los derivados del benzoico las formas de combinación están poco estudiadas (Ribereau-Gayon 1968).

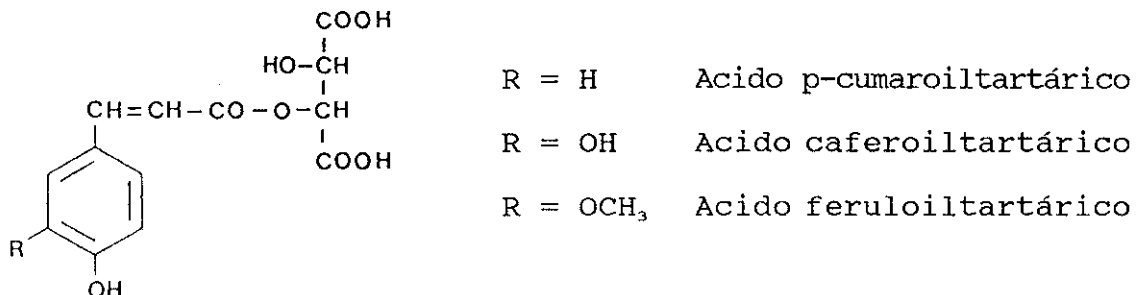
Entre los derivados del ácido cinámico los más frecuentes son:



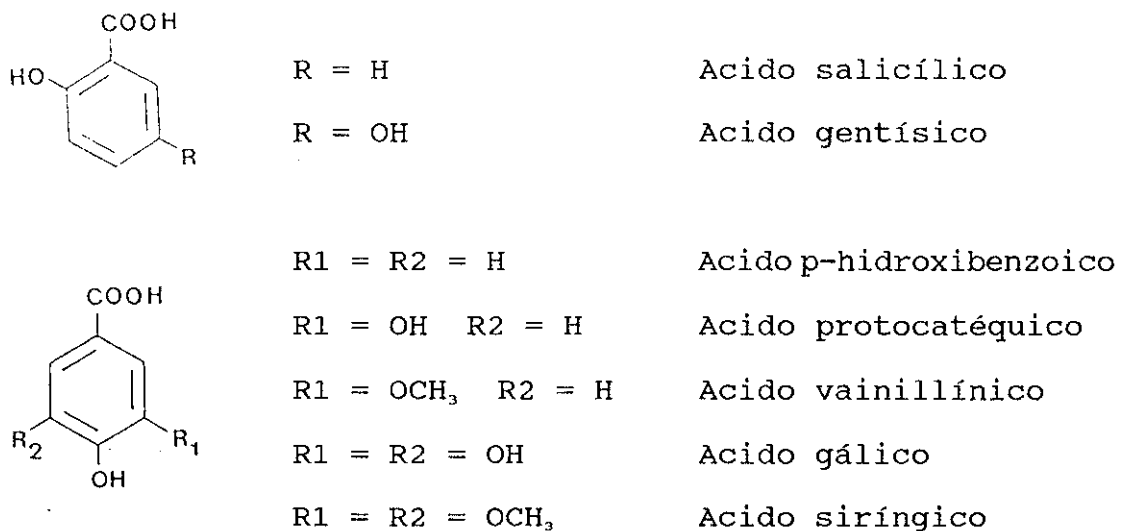
Debido al doble enlace que poseen los ácidos cinámicos, se pueden presentar en forma cis y trans, siendo esta última la más estable y atribuyendoles a ambas formas propiedades biológicas diferentes.

Las combinaciones con los hidroxiaácidos, fundamentalmente con el ácido tartárico, se realizan a través de enlaces tipo

ester entre el grupo carboxílico del grupo cinámico y un grupo alcohólico del hidroxiaácido. La estructura de estos ésteres es la que se muestra en la siguiente figura.



Los mas frecuentes entre los derivados del ácido hidroxibenzoico son:



Los aldehídos fenólicos son los correspondientes a los ácidos en los que el grupo carboxílico esta sustituido por el grupo aldehido.

En cuanto a los alcoholes es de destacar que tanto el tirosol como el triptofol son productos que aparecen en el curso

de la fermentación. Así el tirosol (alcohol p-hidroxifenilacético) procede de la transformación de la tirosina por parte de las levaduras durante la fermentación (Ehrlich 1907) (Singleton, Esau 1969).

### 7.3.- Otros compuestos fenólicos.

#### 7.3.1.- Fenoles flavonoideos

Los flavonoides son compuestos fenólicos que presentan una estructura general del tipo:  $C_6-C_3-C_6$

Los diversos tipos de molécula englobados en este grupo se diferencian en el grado de oxidación y de sustitución del heterociclo intermedio, y a su vez, dentro de cada familia, se diferencian por el número, localización de las funciones fenol y por la metoxilación.

Su forma habitual en la naturaleza es en combinaciones con los azúcares mediante uniones O-heterosídicas y con menor frecuencia C-heterosídicas. Los glúcidos pueden encontrarse esterificados o no.

#### 7.3.2.- Compuestos fenólicos polimerizados

Desde el punto de vista químico los taninos resultan de la polimerización de moléculas fenólicas elementales. Se distinguen dos tipos de taninos, los hidrolizables, también llamados

pirogálicos, y los condensados conocidos como pirocatéquicos. Originan combinaciones estables con las proteínas y con los polisacáridos.

Los taninos hidrolizables están constituidos por una molécula glucídica sobre la que se fijan diferentes compuestos fenólicos. Los taninos condensados están formados por polímeros de catequinas y de leucoantocianidinas.

La lignina es uno de los componentes fundamentales de la madera. El término lignina esta reservado a los constituyentes no glucídicos de la membrana celular. Su estructura es compleja y todavía hoy poco conocida.

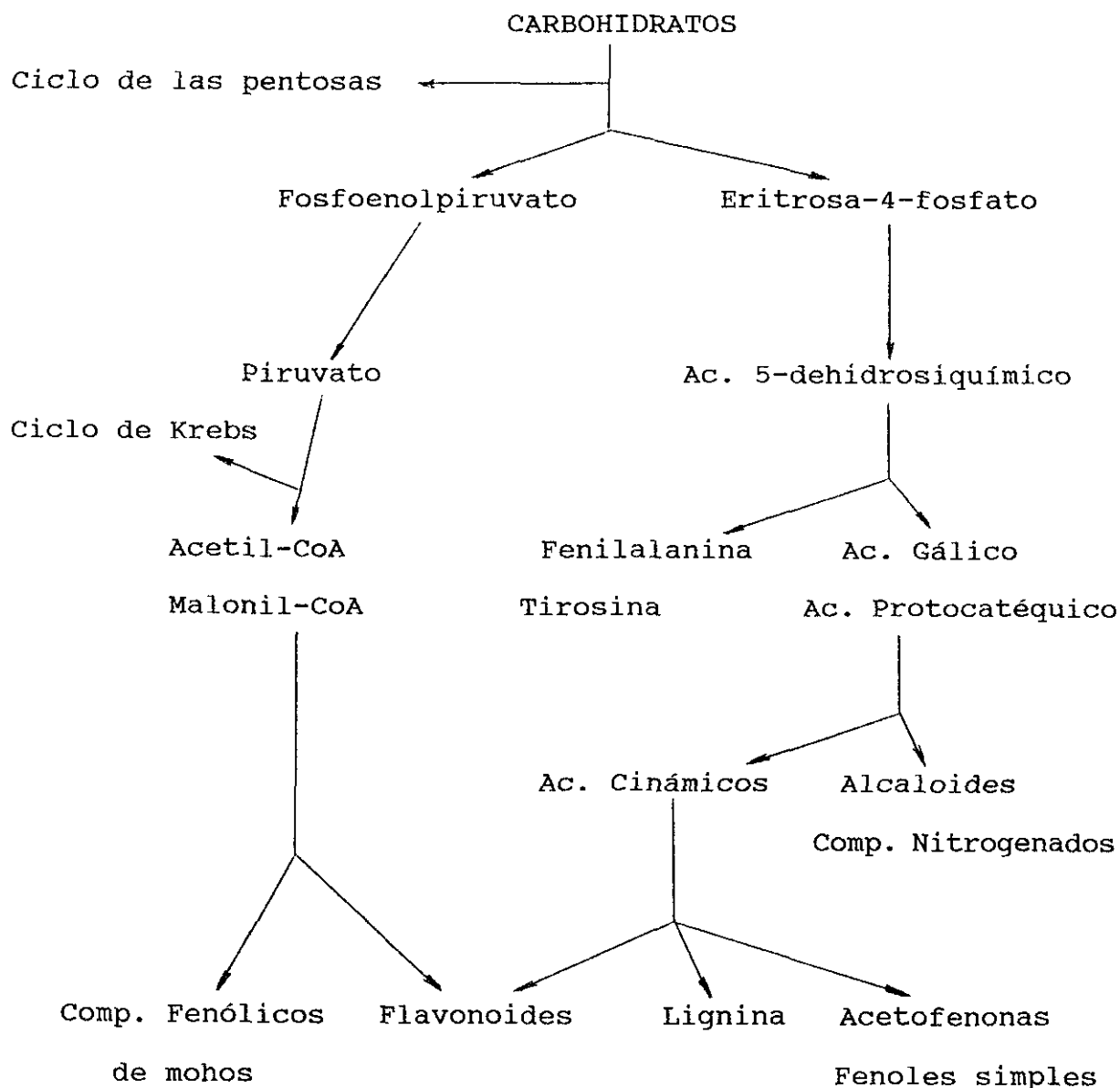
Según Klason (Joseph, Marche 1972) su estructura es aromática y procede de la condensación del alcohol coniferílico. Para Aulin-Erdtman y Sandin (1968) las unidades aromáticas de la lignina corresponden a radicales de tres tipos dependiendo de la naturaleza de la planta: Guayacil, Siringil y 4-hidroxifenil. Los dos primeros presentes en plantas leñosas y el tercero en plantas herbáceas.

#### **7.4.- Biosíntesis de compuestos fenólicos.**

Los compuestos fenólicos provienen del metabolismo secundario de los vegetales. Los hidratos de carbono fotosintetizados por las plantas, son posteriormente degradados para producir la energía que ella misma necesita, pero una pequeña parte es

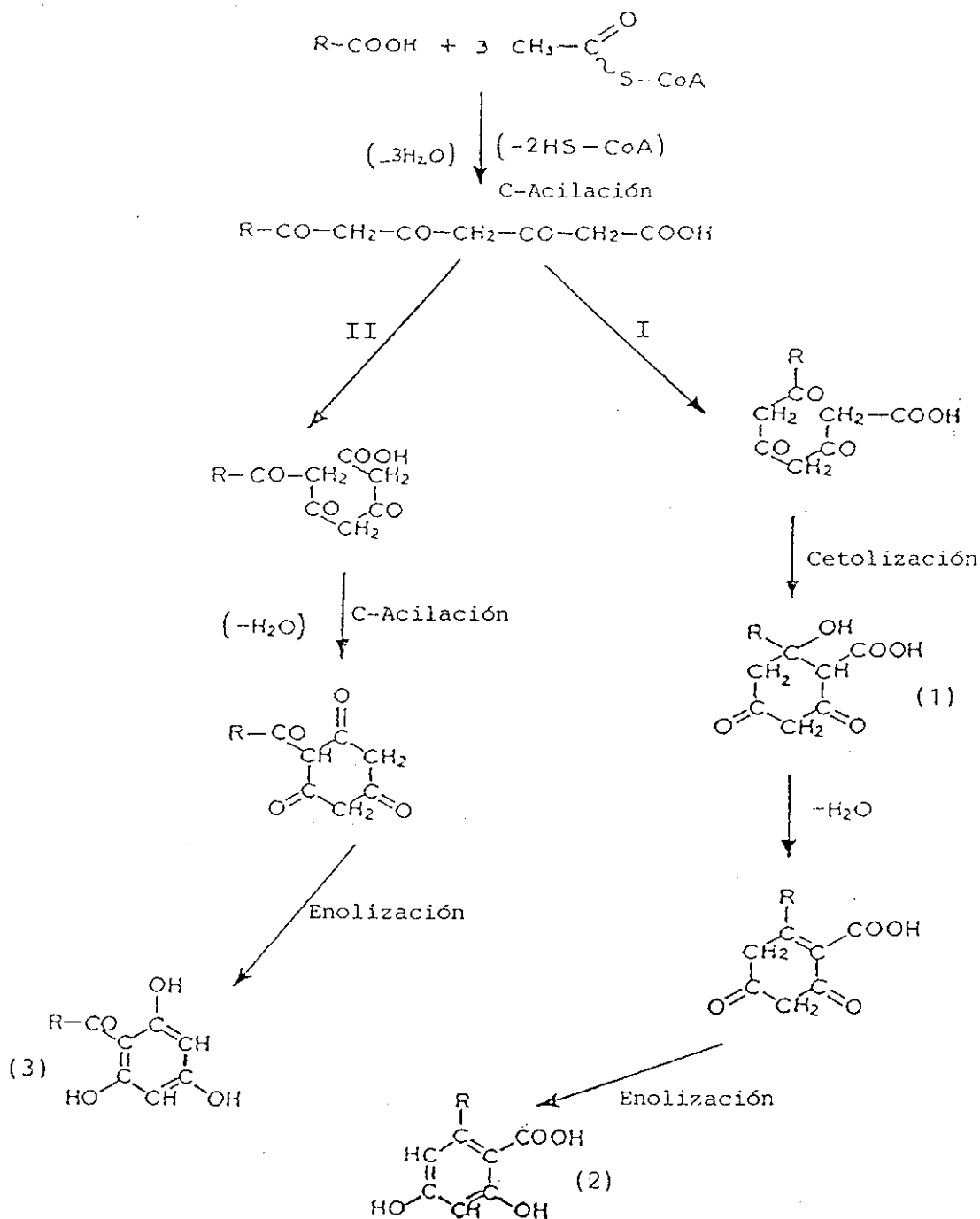
utilizada para sintetizar un considerable número de compuestos entre los que se encuentran los compuestos fenólicos. Estos tienen a los ácidos acético y siquímico como precursores principales (Ribereau-Gayon 1986).

Un esquema general de la biosíntesis de compuestos fenólicos es el siguiente:



### 7.4.1.- Vía del ácido acético.

Collie en 1893, estableció la hipótesis de la formación del anillo aromático a partir de tres unidades de ácido acético y Grisebach y Bopp (1959) la confirmaron, pudiéndose esquematizar esta vía según la representación siguiente.



En un primer paso, la reacción transcurre a partir del acetil-CoA, que es la forma biológicamente activa del ácido acético, la presencia de Coenzima A activa los hidrógenos del carbono en alfa, capacitándolos para producir un ión carbonio intermedio, que se condensará con el grupo activado de otra molécula; esta condensación también tiene lugar en la primera fase de la biosíntesis de ácidos grasos.

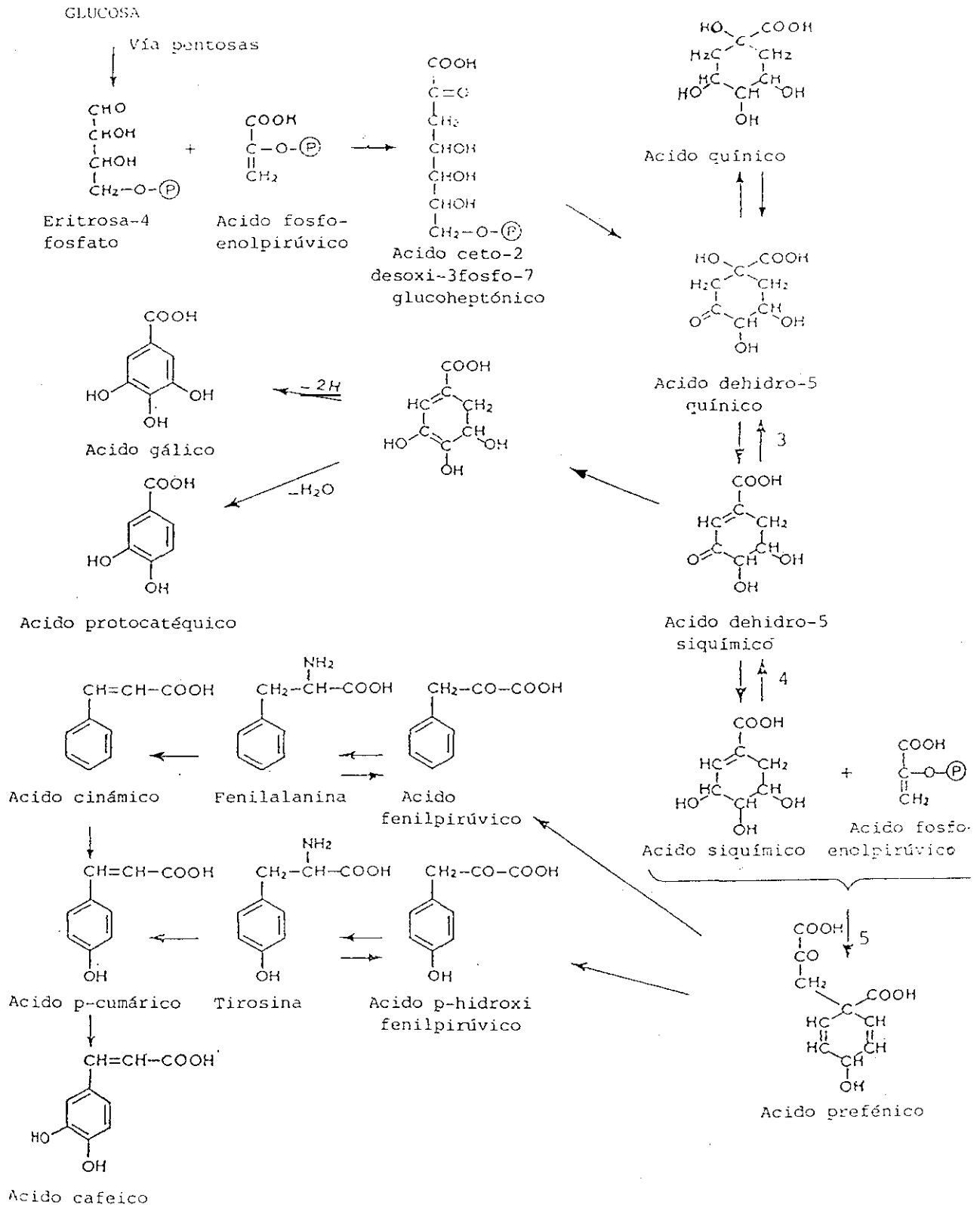
A partir del producto resultante de la condensación, puede formarse un ciclo bencénico por dos caminos diferentes. Según uno (I) primero hay una ciclación y posteriormente se forma una cetona etilénica que dará paso a un compuesto aromático con función fenólica; según el otro (II) tiene lugar primero una C-acilación, que da lugar a un derivado cíclico, que, como en el caso anterior, por enolización origina un compuesto aromático.

#### 7.4.2.- Vía del ácido siquímico.

Davies y Sprinson (1978) ponen de manifiesto la función del ácido siquímico en la formación del ciclo bencénico a partir de los azúcares. Esta vía ha sido estudiada principalmente en los microorganismos, y se supone que con los mismos mecanismos se desarrolla en los vegetales superiores.

Por esta ruta metabólica, esquematizada a continuación, se explica la formación de ácidos benzoicos, como gálico y protocatéquico, con el ácido 5-dehidrosiquímico como intermediario; y de ácidos cinámicos a partir del ácido prefénico. Otros ácidos

benzoicos provienen de la disminución parcial de la cadena lateral de los ácidos cinámicos por una  $\beta$ -oxidación.



El empleo de trazadores, ha permitido conocer tanto los intermediarios como la mayoría de los enzimas que actúan en las distintas etapas.

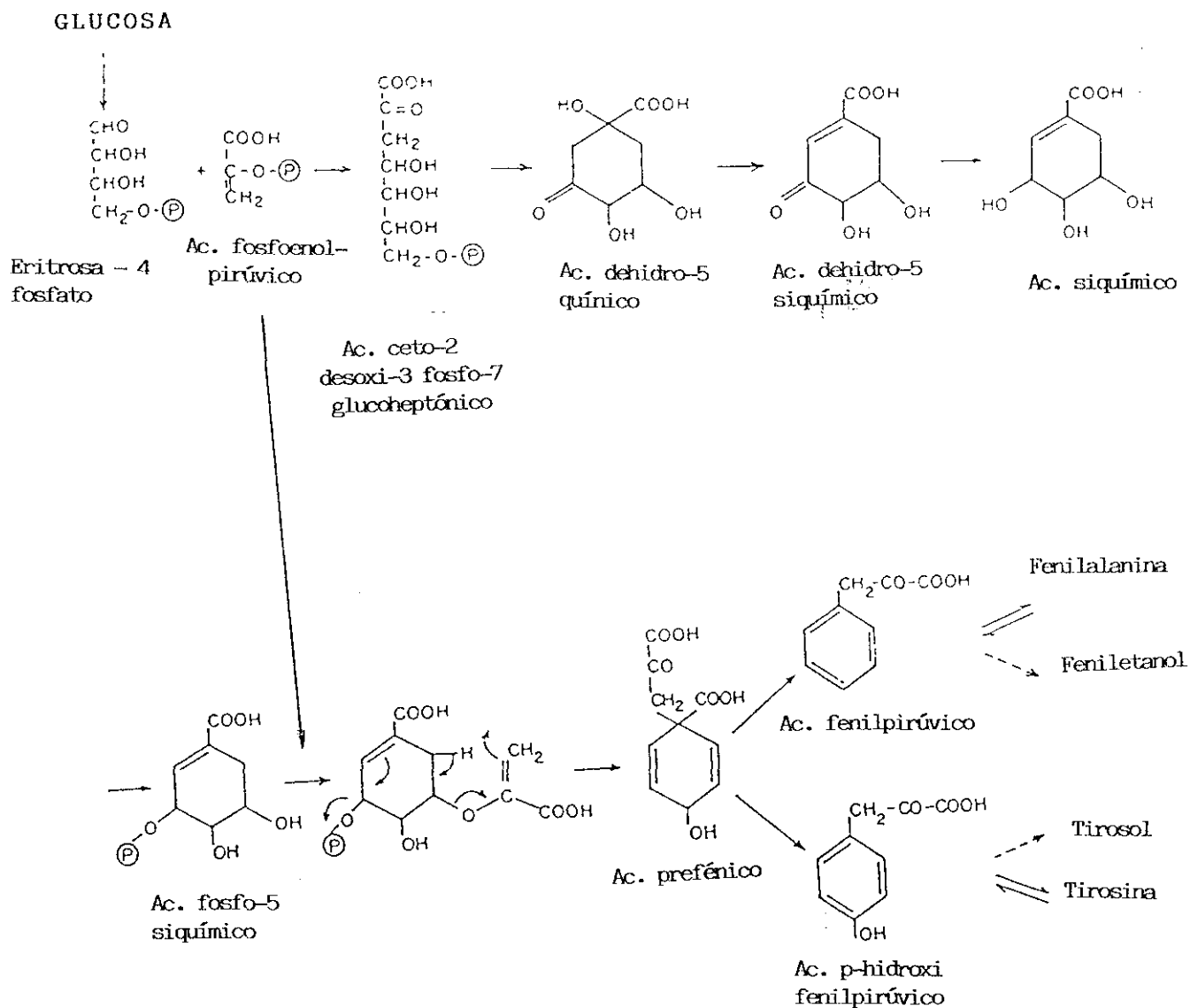
A partir del ácido fenilpirúvico se forma la fenilalanina, y a partir del ácido p-hidroxifenilpirúvico se forma la tirosina. La fenilalanina y la tirosina juegan un importante papel en la formación de fenoles en plantas, originando derivados del ácido cinámico, cumarinas, ligninas, flavonoides y algunos alcaloides.

#### 7.5.- Tirosol y Triptofol.

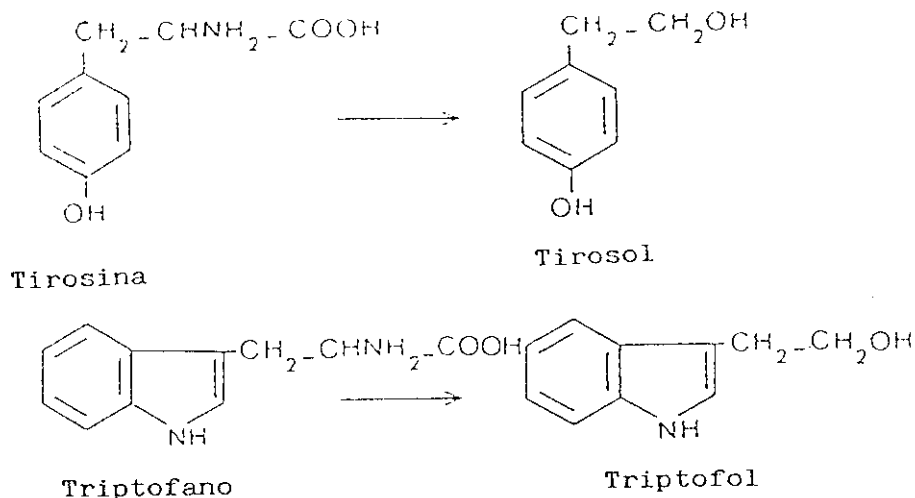
La presencia de tirosol y triptofol en los medios de fermentación es señalada por primera vez por Erhlich en 1907. El tirosol es sólido a temperatura ordinaria y posee un agradable olor a cera y miel; su sabor es amargo y algunos autores le incluyen entre los compuestos responsables del amargor de la cerveza. Discutiendo los trabajos de Erhlich, Genevois (1952) supone que el tirosol esta presente en vinos en concentración suficiente para intervenir en el aroma. El triptofol es un alcohol que no tiene olor característico y con un sabor ligeramente amargo.

Erhlich en 1906 describe el modo de formación de alcoholes superiores a partir de los aminoácidos correspondientes con n+1 átomos de carbono. Genevois en 1952 describe diferentes etapas y reacciones intermedias en los medios de fermentación, Moutounet

(1969) indica la siguiente secuencia de reacciones para la biosíntesis de tirosol a partir de glucosa.



Ehrlich señala que las levaduras forman tirosol y triptofol si se añaden al medio de fermentación los aminoácidos tirosina y triptófano respectivamente. La formación de estos alcoholes según Sapis y Ribereau-Gayon (1969) sería:



Ehrlich hace fermentar tirosina en presencia de azúcar y levadura prensada y obtiene tirosol. Genevois (1952) confirma este resultado al observar que la levadura de cerveza origina tirosol en las mismas condiciones.

Sapis y Ribereau-Gayon (1969 a, b), detectan en el vino estos dos compuestos haciendo resaltar que son productos secundarios de la fermentación alcohólica, que su formación es paralela a la desaparición del azúcar y que el género de la especie de levadura que interviene tiene influencia sobre su formación. Anteriormente se pensaba que el triptofol únicamente estaba presente en vinos tintos, pero estos autores indican que en los blancos puede aparecer en cantidades variables, pero siempre menores a las de aquellos.

Szlavko (1973) estudia la influencia de las condiciones de fermentación y la levadura utilizada, sobre la formación y concentración de tirosol y triptofol.

Rosazza y col. (1973) estudian la formación de triptofol a partir de L-triptófano fermentando con *Zygosaccharomyces prioranus*.

Okamura y Watanabe (1981) estudian la formación de tirosol y triptofol por varias cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en medios sintéticos ausentes de aminoácidos aromáticos y con sacarosa, glucosa o fructosa como única fuente de carbono. Indican que si el medio contenía glucosa o fructosa la cantidad de tirosol formada era mayor que si se trataba de sacarosa. Sugieren que el tirosol puede formarse a partir de tirosina que es biosintetizada a partir de azúcares por las levaduras.

Salagoity-Auguste y Bertrand (1984) cuantifican triptofol por cromatografía líquida de alta resolución en vinos tintos.

Gomez-Cordovés y col. (1984) estudian el contenido en triptofol en distintas variedades de *Vitis vinifera*. Al fermentar con *Saccharomyces ellipsoideus* mostos de variedades blancas y tintas observan que el menor contenido en triptofol corresponde al mosto de la variedad Viura.

Gil y Gomez-Cordovés (1986) investigan el contenido en triptofol en vinos jóvenes univarietales por medio de cromatogra-

fía en capa fina y de lata resolución comprobando su presencia en tintos y blancos, aunque en concentración apreciablemente más alta para los primeros.

#### 7.6.- Propiedades e influencia de los compuestos fenólicos en los caracteres sensoriales.

Los compuestos fenólicos presentan ciertas propiedades, que son debidas, de una parte a las propias del grupo hidroxilo, influenciadas por la presencia del anillo bencénico, y de otra, a las propiedades del ciclo bencénico, activado por la presencia de los grupos hidroxilo o de otros sustituyentes. Además el anillo bencénico, con tres dobles enlaces conjugados, tiene una gran estabilidad, y raramente se rompe en una reacción química o biológica.

- El carácter ácido es una de las propiedades más características de los fenoles. Este carácter ácido, puede modificarse profundamente por los sustituyentes del anillo bencénico. La variación de la acidez de los fenoles en función de la estructura de la molécula, se utiliza para su separación; así, en el caso de fenoles ácidos, se utilizan soluciones ligeramente alcalinas para su extracción, mientras que en el caso de los fenoles neutros basta recurrir a disolventes orgánicos como eter etílico para su extracción.

- Es característico también de estos compuestos la facilidad para formar puentes de hidrógeno, lo que puede modificar diversas propiedades físicas. De igual modo, estos puentes de hidrógeno hacen que, en general, disminuya la reactividad de los grupos fenólicos.

- La formación de complejos de estos compuestos con los metales es utilizada para su cuantificación, identificación y modificación de sus características espectrales. Además estos complejos participan en la coloración de las plantas (Jurd y Geissman 1956) y por tanto también en la de sus derivados primarios.

- La oxidación de los compuestos fenólicos es una característica importante, ya que las transformaciones oxidativas de los mismos, ya sea por vía química o enzimática, implican un oscurecimiento que puede originar problemas tecnológicos en industrias alimentarias, entre las que se encuentra la enológica.

La facilidad de oxidación de algunos fenoles, permite su utilización como antioxidantes. Además las propiedades redox de estos compuestos les hacen actuar en el vino como tampón frente a oxidantes y reductores, de tal forma que, si la elaboración se lleva con cuidado, un moderado nivel de oxidación, lejos de ser perjudicial, puede aportar al vino caracteres de envejecimiento muy apreciables.

- La copulación de estos compuestos con sales de diazonio es utilizada para su detección por técnicas cromatográficas debido a las diversas coloraciones a que dan lugar.

- La solubilidad de los compuestos fenólicos varia para cada uno de ellos, y depende de su estructura. La presencia de grupos -OH no sustituidos o de azúcares aumenta la polaridad de la molécula, y, por tanto la solubilidad en agua, mientras que la metoxilación la disminuye.

- Las propiedades tánicas se basan en la capacidad de los taninos para combinarse con las proteínas, péptidos, etc. Estas propiedades están ligadas al grado de polimerización y a la forma de la cadena originada por esta agregación molecular.

Cuando los taninos precipitan las proteínas y mucopolisacáridos de la saliva provocan sensación de astringencia; la astringencia es el efecto más significativo de estos compuestos fenólicos sobre el sabor. Es una propiedad sensorial percibida por una sensación táctil y no gustativa.

Esta sensación puede ser detectada a partir de 20 mg/l, pero la interacción con otros compuestos hace que, en un medio complejo como el vino, sea necesaria mayor concentración para una detección positiva. Así, es necesaria una concentración de 100 mg/l en vinos blancos, y de 150 mg/l en vinos tintos, para

experimentar la sensación de astringencia (Fernandez de Simon 1990).

Cuando hay una polimerización excesiva se pierden las propiedades tánicas y se producen insolubilizaciones que dan lugar a enturbiamientos y precipitaciones.

En los vinos los taninos crean muchos problemas, por producirse enturbiamientos, que no solo proceden de polimerizaciones, sino de la formación de complejos insolubles con metales, originando quiebras "tano-férrica" y "tano-cúprica". También se produce coprecipitación en las cristalizaciones de los bitartratos.

- Los compuestos flavonoideos, especialmente los antocianos, son responsables en gran parte del color de hojas, flores y frutos ; también los compuestos fenólicos de bajo peso molecular, generalmente incoloros, pueden influir en el color de los vegetales por efectos sinérgicos. Tienen por tanto gran importancia en la tonalidad e intensidad del color de uvas, mostos y vinos en función del pH al que se encuentran.

En el curso del envejecimiento de los vinos, los antocianos libres se van degradando, al tiempo que los taninos se van condensando, con aparición de tonalidades características de los vinos viejos.

Los compuestos fenólicos participan en el pardeamiento de vinos blancos, especialmente por la oxidación enzimática que se produce por acción de polifenoloxidasas o de peroxidasa, con formación de intermedios quinónicos.

Las catequinas son moléculas que pueden polimerizarse dando compuestos menos oscuros que los de partida.

En vinos que han permanecido tiempo en barricas de madera, puede aparecer formación de cromóforos, por combinación de catequinas y aldehídos fenólicos en presencia de luz. Este parece ser el origen de pardeamientos que se presentan en algunos vinos pálidos andaluces (Estrella y col. 1978).

- Desde hace años se conoce la existencia de fenoles volátiles como componentes del aroma, especialmente en bebidas mantenidas en recipientes de madera, sobre todo de roble. En la crianza de vinos finos y olorosos de Andalucía Occidental es de gran importancia la p-vainillina, (Estrella y col. 1983, Gomez-Cordovés y col. 1984).

### 7.7.- Presencia de compuestos fenólicos en mostos y vinos.

Los polifenoles del vino proceden casi exclusivamente de la uva, por lo que la composición polifenólica del vino es un reflejo de la de aquella; pero en la fracción polifenólica del vino influyen de forma importante otros factores como son:

- Las técnicas de vinificación que pueden hacer variar notablemente la presencia de este grupo de sustancias en el vino en relación a la uva.

- La fermentación alcohólica y por tanto las levaduras que intervienen en ella.

- El envejecimiento en madera como consecuencia de los procesos de degradación de la lignina.

En general los compuestos polifenólicos de bajo peso molecular no se encuentran libres en los organismos vegetales (Ribereau-Gayon 1968), al menos en cantidad apreciable, por tanto en el mosto no se encontraran en proporciones fácilmente detectables.

Singleton y Esau (1969) estiman que para vinos blancos el contenido polifenólico debe oscilar entre 250 y 800 mg/l, concentraciones superiores indicarían, cuanto menos, exceso de prensado.

La contribución de cada grupo de polifenoles al contenido total de los vinos no es fácil de determinar, puesto que existe gran dificultad para conseguir la separación entre unos y otros grupos y por los distintos procedimientos utilizados en la determinación cuantitativa; además en el caso de los compuestos polifenólicos de bajo peso molecular ( $C_6-C_1$  y  $C_6-C_3$ ) estos aparecen en los vinos en pequeñas cantidades. Estrella y col.

(1983) indican que en vinos de Jerez su contenido no supera los 100  $\mu\text{g}/\text{l}$ .

Es necesario tener en cuenta la labilidad de los fenoles y los peligros de oxidación, polimerización, hidrólisis etc que llevan aparejadas las operaciones de extracción y concentración necesarias para la evaluación de estos compuestos que en la mayor parte de los casos se encuentran presentes en concentraciones del orden de ppm.

En muchas ocasiones el contenido de polifenoles de los vinos se efectúa en forma fraccionada, determinando grupos que dan idea del tipo de polifenoles predominantes (Alonso 1985).

Singleton y Rossi (1965) determinan por una parte el contenido de polifenoles totales y por otra las siguientes fracciones:

- Polifenoles no flavonoideos (Kramling y Singleton 1969) que incluyen todos los polifenoles que no tengan estructura  $\text{C}_6-\text{C}_3-\text{C}_6$
- Catequinas (Swain y Hillis 1959)
- Ortodifenoles (Flanzy y Aubert 1969)
- Polifenoles poco polimerizados (Peri y col 1971)
- Leucoantocianos (Masquelier y col 1965)

## 7.8.- Factores que afectan a la composición polifenólica de la uva y el vino.

La composición polifenólica del vino como producto de fermentación de la uva, esta influenciada por las condiciones en que se realiza el cultivo de la vid, el grado de maduración de la uva, los procesos tecnológicos empleados en la vinificación y los procesos de envejecimiento del vino.

### 7.8.1.- Condiciones de cultivo.

- Singleton y Esau (1969) y Ribereau-Gayon (1971) afirman que vinos procedentes de distintas variedades de uva presentan diferencias cualitativas y cuantitativas en su composición polifenólica.

- El suelo es un factor fundamental en la obtención de vendimias abundantes y de calidad. Fregoni (1977) indica que dependiendo del tipo de suelo pueden conseguirse vinos de diferente calidad y con características organolépticas muy dispares aún tratándose de la misma variedad de uva. Scienza y col (1981) han estudiado la influencia de las características del suelo en la composición polifenólica del vino.

- Entre las condiciones climáticas la luz es el factor cuyo efecto sobre la biosíntesis de polifenoles ha sido más estudiado, aunque existen discrepancias sobre el tipo de

luz que regula dichos procesos (Ribereau-Gayon 1958). La influencia de la temperatura sobre la composición polifenólica ha sido estudiada por Kliewer (1970 - 1977). El efecto de la pluviosidad sobre la composición polifenólica de la vid y el vino apenas se ha estudiado, aunque se sabe que esta desciende en años lluviosos.

- Son escasos los estudios realizados sobre la influencia de enfermedades parasitarias de la uva sobre el contenido polifenólico del vino. Uno de los pocos trabajos desarrollados se debe a Zironi y col (1982), en él se indica que la "podredumbre ácida" de la uva, causada por la proliferación de levaduras de las especies *Kloeckera apiculata*, *Torulopsis stellata* y *Saccharomyces vini*, modifica la dotación de polifenoles en la uva, de tal forma que el contenido polifenólico en los vinos es menor que en vinos elaborados con uvas no atacadas por dicha enfermedad. No se conoce como pueda afectar la "podredumbre noble", originada por *Botritis cinerea*, sobre la composición polifenólica.

#### 7.8.2.- Grado de madurez de la uva.

El contenido de compuestos fenólicos de la uva sufre modificaciones durante la maduración, de forma que el momento de la vendimia afectara de forma muy importante la composición polifenólica del mosto y por tanto del vino resultante (Gonzalez 1989. Fernandez de Simón 1990. Junquera 1990)

### 7.8.3.- Vinificación.

- Procesos enológicos. En la uva madura dispuesta para la vinificación, la mayor parte de los compuestos fenólicos se encuentran localizados en las partes sólidas, fundamentalmente en hollejo y pepitas, también en el raspón, pero en la actualidad previamente al estrujado se realiza el despalillado, consistente en eliminar el raspón que contiene una elevada cantidad de polifenoles, por lo que estos fenoles no pasan al mosto.

Durante la vinificación los polifenoles pasan, de las células que los contienen, al mosto en los procesos de estrujado, prensado y maceración, de forma que la intensidad y duración de cada uno de ellos incide sobre la composición polifenólica del vino.

- Acción de los organismos fermentativos. Las levaduras que llevan a cabo la fermentación afectan a la composición polifenólica del vino. Milisayljevic (1967) indica que los vinos elaborados con Pinot-noir y Prokupac presentan mayor intensidad colorante y menor contenido en taninos si la fermentación se lleva a cabo con *Saccharomyces oviformis* que si el proceso se realiza con *Saccharomyces ellipsoideus*. Estas variaciones son debidas, probablemente, a la fijación de materia colorante en las levaduras y se manifiesta tras la fermentación, durante la clarificación espontánea del mosto.

Los compuestos fenólicos no son sustratos fermentativos, pero en el caso de fenoles glicosilados estos sufren procesos de hidrólisis que pueden ser consecuencia de la acidez del mosto en fermentación, aunque no debe descartarse la hidrólisis catalizada por sistemas enzimáticos procedentes de la uva o de los microorganismos presentes en el mosto. Estos procesos no son bien conocidos, pero en el mosto pueden existir sistemas enzimáticos del tipo  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa o antocianasa que se emplean para la hidrólisis de glicósidos de flavonoides (Markhan 1982). Además se encuentran en los mostos levaduras que contienen el enzima  $\beta$ -glucosidasa, estas levaduras pueden encontrarse durante toda la fermentación puesto que pertenecen a especies de primera, segunda y tercera fase fermentativa.

#### 7.9.- Acción de los compuestos fenólicos sobre los microorganismos.

Prácticamente todos los derivados de los fenoles poseen la facultad de inhibir a los microorganismos (Jenkins y col 1957), siendo antiguos los procedimientos en que para impedir la fermentación o los cambios microbiológicos en zumos de fruta y vinos se adicionan conservantes, entre los que se incluyen los fenoles.

Estos compuestos parecen inhibir generalmente por mecanismos similares a la adsorción superficial, lo que hace que las levaduras puedan ser causa de precipitación de polifenoles

(Masschelein y Haboucha 1965), (Singleton 1967 a,b), sin embargo Bosund (1962) indica que pueden actuar por desacoplamiento de la fosforización oxidativa en la oxidación terminal del piruvato vía acetato.

Los compuestos fenólicos naturalmente presentes en uvas y vino actúan como inhibidores del crecimiento de levaduras, ya en 1897 Carles y Niviére (Singleton) mencionan que con variedades de uva altamente coloreadas, las fermentaciones son difíciles de llevar hasta el final para obtener vinos secos, solo se conseguirá si están asociadas con otras condiciones supresivas, tales como niveles bajos de nutrientes o alto nivel de alcohol. Esta idea es reforzada por experiencias de fermentación de vinos espumosos; los espumosos son producidos por una segunda fermentación de vino, por ello se tienen bajos niveles de nutrientes, alrededor de 10% de alcohol y presión de CO<sub>2</sub> próxima al límite que detiene la fermentación completamente. Se observa que esta segunda fermentación es lenta y más difícil de realizar en vinos tintos que en blancos. Goldman (1963) encuentra que un vino base tinto necesita 38 días para fermentar, mientras que uno blanco requiere tan solo 16.

Schanderl(1962) estudia la acción de algunos ácidos fenólicos sobre las levaduras desde el punto de vista de la inhibición del desarrollo de estas, observa que el ácido gálico y el ácido caféico a concentraciones de 100 µg/l estimulan débilmente la fermentación por levaduras de vino en cultivos

sintéticos sin alcohol, pero la detienen en el caso de existir 6% de etanol.

Sikovec (1966 a,b) investiga el efecto de los ácidos fenólicos aislados y en mezclas de ellos, sobre *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces ludwigii*. El ácido caféico presenta aparentemente mayor inhibición para ambas levaduras que el ácido clorogénico, esto explica la dificultad de refermentar vinos en los cuales las formas esterificadas originales pueden haber sido hidrolizadas a ácido cafeico libre. El crecimiento aeróbico de *Saccharomyces cerevisiae* es estimulado por los fenoles en ausencia de alcohol e inhibido en su presencia. Los efectos sobre *Saccharomyces ludwigii* dependen también de los niveles de fenoles y de alcohol presentes en el medio.

La fermentación hace disminuir el contenido fenólico y esto sugiere que las levaduras asimilan parcialmente polifenoles como fuente de carbono (Singleton 1969). El crecimiento en presencia de estos compuestos tiende a producir células deformes, menos vigorosas y que son eliminadas más fácilmente que las células normales.

Marcilla y col(1939) muestran que adicionando ácido tánico a un vino de Jerez que contenía 70 mg/l de fenoles totales se inhibía el desarrollo de levaduras aeróbicas. Si la adición era de 160 mg/l desaparecía totalmente el velo desarrollado. Florenzano (1952) afirma que las levaduras formadoras de velo toleran solo pequeñas cantidades de taninos. Los compuestos

fenólicos al reaccionar con el acetaldehído, producido en varios cientos de mg/l por las levaduras que forman los velos de los vinos tipo Jerez, precipitan, y como afirma Cantarelli (1955 y 1958) este hecho puede ser utilizado para disminuir la presencia de estos compuestos en vinos.

El elevado poder reductor de los polifenoles del vino le hace sensible a los efectos de una aireación o a la acción de las polifenoloxidasas, pero también actúa como una especie de tampón amortiguador de efectos redox, de gran repercusión tecnológica, ya que a lo largo de la elaboración del vino, se producen grandes variaciones.

Al comienzo de la vinificación los polifenoles compiten con la aireación producida en la trituración y la prensada. La fermentación crea un medio fuertemente reductor, mientras que después, los descubes, las filtraciones, clarificaciones, todas las manipulaciones en bodega y la misma crianza en madera o en botella (a través del corcho), siempre dan lugar a la disolución de oxígeno del aire por muy cuidadosamente que se opere.

La presencia de polifenoles mantiene el equilibrio necesario, de tal forma que, si la elaboración se lleva a cabo con cuidado, un moderado nivel de oxidación, lejos de ser perjudicial, puede aportar al vino caracteres muy apreciables.

## 8.- POLIALCOHOLES

Son compuestos que contienen en su molécula dos o más funciones alcohol y que en algunos casos presentan ciertas propiedades comunes con los glúcidos.

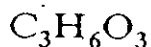
Los polialcoholes presentes en los vinos son compuestos que contribuyen al sabor dulce de los mismos, aunque están implicados en otras propiedades organolépticas, como la untuosidad, por otra parte, aumentan el extracto seco, y como consecuencia de ello, la sensación de "cuerpo" (Ribereau-Gayon y col. 1972).

Algunos proceden de la uva, pero los mayoritarios en el vino tienen su origen en el metabolismo de los microorganismos que intervienen en la fermentación del mosto (Peynaud 1971) (Triquet-Pissard 1981).

En los vinos se encuentran glicerina, 2-3 butanodiol (butilenglicol), inositol, manitol, arabitol, eritritol, sorbitol y xilitol; los seis últimos tienen naturaleza glucídica.

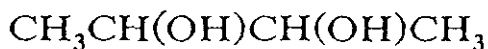
Glicerol y 2-3 butanodiol, que son los mayoritarios con gran diferencia, son productos secundarios de la fermentación alcohólica, las levaduras forman también pequeñas cantidades de eritritol y de arabitol; mesoinositol, manitol, sorbitol, xilitol y eritritol son constituyentes normales de las uvas y de los vinos (Villarroya y Gomez-Cordovés 1990).

GLICERINA



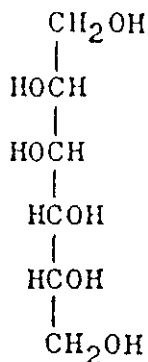
Glicerol  
Trihidroxipropano

BUTANODIOL



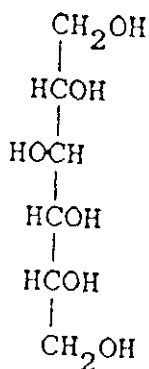
2,3, Butanodiol  
2,3 Butilenglicol

MANITOL



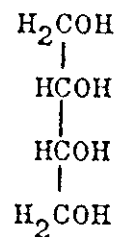
Manicol  
Diosmol

SORBITOL



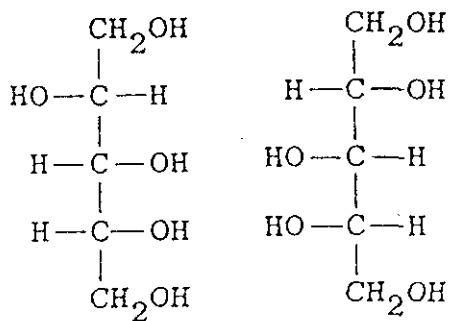
Glucitol  
Sorbol

ERITRITOL



Eritrol  
Ficita

ARABITOL

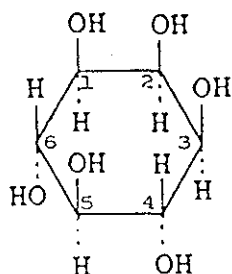


D

L

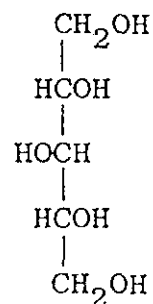
Arabinitol  
Arabita

INOSITOL



Mesoinosita  
Ciclohexitol

XILITOL



Xiliton  
Eutrita

### 8.1.- Glicerol.

El glicerol es, después del agua y el etanol, el constituyente más abundante en el vino. Por su sabor dulce, casi igual al de la glucosa, y por su untuosidad el glicerol contribuye de forma importante en las propiedades organolépticas del vino que se perciben con las primeras impresiones gustativas.

Se forma sobre todo al principio de la fermentación, su proporción depende de la cantidad inicial de azúcares, de las levaduras y de las condiciones en que tiene lugar el proceso fermentativo (Peynaud 1989).

Este polialcohol puede ser también originado en alto porcentaje en el caso de vinificaciones con uvas afectadas por la "podredumbre noble" originada por *Botrytis cinerea*, y en el caso de los vinos que sufren crianza biológica por levaduras de velo (Ribereau-Gayon y col 1972).

Las levaduras de primera fase como *Kloeckera apiculata* y *Candida pulcherrima* producen más glicerol que *Saccharomyces cerevisiae* (Sponholz 1988).

### 8.2.- 2-3 Butanodiol.

Henninger en 1882 señala la presencia de un glicol en un vino de Burdeos, años más tarde este glicol es identificado como butilenglicol o 2-3 butanodiol (Ribereau-Gayon y col 1972). Es

un importante constituyente de los vinos, posee sabor entre dulce y amargo.

Es un compuesto que aparece en la fermentación alcohólica del mosto, proviene de la reducción de la acetoina, obtenida por condensación de dos moléculas de etanal.

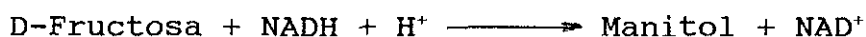
Es estable en los vinos y no es atacado por bacterias.

La influencia de la "podredumbre noble" sobre este polialcohol es importante en el caso de vinos tintos puesto que aumenta su concentración; sin embargo en los vinos blancos no se han encontrado diferencias entre los procedentes de uvas sanas y los de uvas afectadas por el hongo.

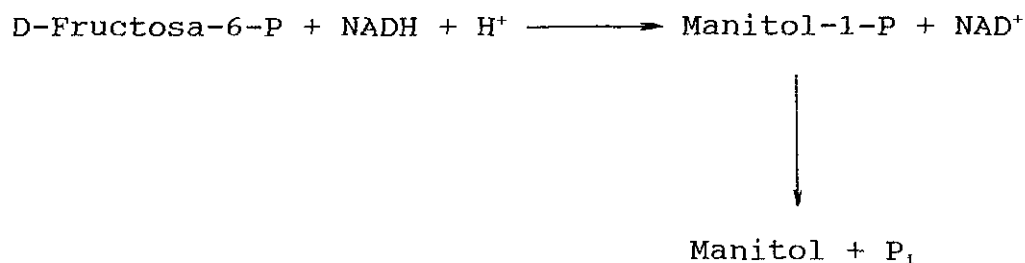
### 8.3.- Manitol.

Se pensaba que la presencia de este polialcohol en vinos era debida a contaminación bacteriana, pero Dubernet y col. (1974) demostraron que se encuentra siempre en los vinos sanos, las concentraciones oscilan entre 84 y 323 mg/l en vinos blancos.

El manitol es formado por mohos (Blumental 1976), levaduras (Spencer y Spencer 1980) y por bacterias lácticas (Wood 1961). La síntesis de manitol puede ser por reducción directa:



o por reducción de azúcares fosforilados seguido de una defosforilación:



La reducción directa de la D-Fructosa parece ser la vía más abundante (Spencer y Spencer 1980, Blumental 1976).

La producción de manitol no asociado a microorganismos contaminantes ni a sustancias formadas por ellos, se considera como índice de calidad del vino.

Las levaduras de vinificación forman en todos los casos escasa cantidad de manitol lo cual no explica los relativamente elevados niveles que se encuentran en los vinos. Castino admite su presencia pero piensa que las concentraciones altas se deben a alteración láctica. El contenido alto de manitol no es un parámetro suficiente para indicar que el vino está contaminado por bacterias lácticas heterofermentativas, tampoco el contenido en ácido acético confirma este hecho; pero si estos parámetros van acompañados de concentraciones altas de ácido D-láctico y bajas de sorbitol, se puede afirmar la presencia de bacterias lácticas heterofermentativas (Sponholz y col. 1982).

Las diferentes especies de levadura poseen distintos comportamientos en cuanto a su producción, así *Hanseniaspora uvarum* y *Candida pulcherrima* son las que forman mayor cantidad de polialcoholes (Sponholz 1988).

Como el glicerol y el resto de los polialcoholes, se forma al comienzo de la fermentación, sin embargo la formación de manitol en cantidad apreciable al final de la transformación mosto-vino, parece estar en relación con la fase de crecimiento de las bacterias lácticas que precede a la fermentación maloláctica.

En algunos casos se produce en el vino una "enfermedad" denominada fermentación manítica, debida al desarrollo de bacterias capaces de reducir las hexosas, sobre todo la fructosa, con formación de ácido láctico, ácido acético y manitol, los vinos afectados son defectuosos, con acidez volátil excesiva y gusto agridulce debido a la presencia simultanea de ácido láctico y manitol. Otra causa de aumento inusual de manitol es el "picado láctico" que se produce cuando se desarrollan bacterias lácticas en el mosto antes de que finalice la fermentación alcohólica, Ribereau-Gayon y col (1972) indican que el manitol se puede producir, en este caso, a partir de la glucosa.

Este polialcohol ha sido cuantificado en vinos por diversos autores: Dubernet (1974), Olano (1983), en vinos de Jerez, Santa-Maria y col. (1985) en vinagres. De Smedt (1981) en vinos blancos secos, anteriormente (1979) realizó el análisis de 124 vinos

encontrándolo en concentraciones próximas a 100 mg/l. Gomez-Cordovés y Hernandez (1987) encontraron, en vinos blancos de dos denominaciones de origen distintas, valores medios de 38-60 y 70-139 mg/l para cada una de las zonas estudiadas.

Hernandez y Gomez-Cordoves (1986) determinan su concentración en función del grado de prensada, observándose relación directa entre ambas; en el caso de podredumbre se aprecia también mayor concentración (Dubernet 1974. Bertrand y col. 1976).

Barcenilla y col. (1989) observaron que aunque las levaduras de las tres fases fermentativas aumentan el contenido de este polialcohol, las de segunda fase en pureza o asociadas, son las que producen una concentración más alta.

Según Gonzales (1990) las levaduras de primera y segunda fase son las de mayor aptitud en la formación de este polialcohol. Así mismo la sulfitación y la aireación prefermentativa intervienen en su biosíntesis obteniéndose reducciones de más del 25%.

#### **8.4.- Sorbitol.**

Su presencia en vinos era considerada indicativo de adulteración del mosto con zumos de otras frutas. El avance de los métodos analíticos ha permitido su identificación y cuantificación en vinos. Bertrand y Pissard (1976) encuentran que todos los vinos analizados contienen sorbitol, las concentraciones más

elevadas las encuentran en vinos licorosos y las menores en vinos blancos. Olano (1983) determina en vinos de Jerez concentraciones de 2 a 72 mg/l. Santa-Maria y col. (1986) analizando vinagres encuentran mayor concentración en los de sidra.

Triquet-Pissard (1981) pone de relieve que la presencia de sorbitol en vinos puede provenir de uvas atacadas por hongos y de la fermentación por levaduras, pero no de la intervención de bacterias.

Castino (1988) señala su formación por levaduras en concentraciones de 20 a 50 mg/l, siendo sintetizado en cantidades variables por la acción de hongos. Concentraciones superiores a los 200 mg/l indican asociación de *Botritis cinerea* y levaduras epifíticas de la uva; sin embargo no se forma cuando el moho se inocula sobre el mosto.

Barcenilla y col. (1989) encontraron concentraciones de hasta 270 mg/l originadas por levaduras de segunda fase, que son las que producen cantidades más altas ya sea en pureza o asociadas.

Sponholz y col (1986) señalan que *Candida stellata* y *Metschnikovia pulcherrima* sintetizan sorbitol en elevada cantidad, pero que *Kloeckera apiculata* también lo produce.

Es de señalar que Feduchi e Hidalgo en 1963 estudian el contenido de este polialcohol en vinos españoles con el fin de

establecer su límite de concentración para determinar el fraude por la adición de zumos de otras frutas en la elaboración de vino, ya que el sorbitol se encuentra en cantidades importantes en ciertos zumos de frutas, especialmente en manzanas.

La concentración de sorbitol en vinos que proceden de uvas con podredumbre noble, es un índice de calidad y no de adulteración como se creía al principio.

#### 8.5.- Eritritol.

Su formación tiene lugar al comienzo de la fermentación, por la reducción de los azúcares en el ciclo de las pentosas (Dubernet y col 1974). La eritrosa-4-fosfato mediante reacciones transaldolasa-transcetolasa, se transforma en eritruulosa-4-fosfato que por desfosforilación y reducción da eritritol.

Por otra parte Guimberteau (1969) señala que se forma eritritol por bacterias lácticas presentes en vino, la producción, en este caso, es mayor si se parte de hexosas que si se parte de pentosas.

Sponholz y col (1986) indican que las levaduras presentes en mosto de uva, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Kloeckera apiculata* y *Candida stellata*, son capaces de formar cantidades importantes de eritritol durante el proceso fermentativo.



El arabitól se describe como el principal polialcohol formado en el metabolismo de azúcares, vía manitol, en mohos (Blumental 1976) o levaduras (Spencer y Spencer 1980).

Algunos autores señalan que se encuentra en la uva y que su cantidad aumenta con las fermentaciones alcohólica y maloláctica.

Spencer y Sallans (1956) señalan que algunas especies de levaduras tienen facilidad para producir eritritol. Su formación proviene, probablemente, de la reducción de los azúcares en el ciclo de las pentosa-fosfatos (Dubernet y col 1974). Estos mismos autores señalan una producción de 0 a 200 mg/l de arabitól en cultivo puro de levaduras vínicas y, además, indican que la aireación favorece la producción.

Hernandez y Gomez-Cordovés (1986) no encontraron relación directa con la prensada, pero sí con respecto a vinos blancos de distinta denominación de origen Gomez-Cordovés y Hernandez (1987).

Bertrand y col. (1976) indican que el contenido en vinos tintos es superior al de los blancos.

Barcenilla y col. (1989) observan aumento en cultivos en pureza y asociados de levaduras de primera y segunda fase. Gonzales (1990) aprecia este mismo efecto en fermentaciones en pureza sobre mosto Airen, las especies de primera y segunda fase produjeron las concentraciones más altas.

### 8.7.- Inositol.

Es un alcohol cíclico de gusto azucarado que tiene propiedades vitamínicas.

La presencia de este polialcohol en el vino era conocida desde antiguo pero su análisis cuantitativo presentaba grandes dificultades que no podían ser resueltas utilizando métodos químicos (Ribereau-Gayon y col 1972), es factor de crecimiento para algunas levaduras y por esta razón Peynaud y Lafourcade (1955) proponen un método microbiológico para el análisis del mesoinositol.

El isómero del inositol más repartido en el mundo vegetal es el mesoinositol, por tanto en el vino este será también el isómero con mayor presencia (Triquet-Pissard 1981).

El mesoinositol se encuentra en el ácido fítico, y la sal de calcio y magnesio de este ácido que recibe el nombre de fitina, abunda en el material extracelular de sostén en los tejidos de las plantas superiores (Lehninger 1982).

Este polialcohol, considerado un contribuyente de la calidad, se encontró en vinos alemanes entre 55 y 553 mg/l (Sponholz y Dittrich 1985) y en vinos de Jerez (Olano 1983). De Smedt y col. (1979) lo encontraron en concentraciones entre 79 y 1044 mg/l en 124 vinos estudiados. Santa-Maria y col. (1986) investigaron su contenido en vinagres. Gomez-Cordovés y Hernandez

(1987) comprobaron que su concentración aumenta en vinos de mayor prensada, también encontraron diferencias entre vinos de distinta denominación de origen.

Bertrand y col. (1976) comprobaron el incremento en su concentración al aumentar el grado de podredumbre de la uva. Sponholz y col (1986) miden su consumo por *Botritis cinerea* en mosto.

Gonzales (1990) observó mayor contenido en vinos sulfitados debido a la inhibición de la acción de levaduras de primera y segunda fase.

#### 8.8.- Xilitol.

Es el menos estudiado de los polialcoholes presentes en vino, puede formarse a partir de la xilulosa por una vía semejante a la del eritritol (Sponholz 1988), según este autor la infección por *Botritis cinerea* no contribuye a su formación; sin embargo para Bertrand y col. (1976) su concentración aumenta con el grado de podredumbre.

Makinen y Söderling (1980) indican que se encuentra en frambuesas, fresas y otros productos naturales. Smedt y col. (1979) le detectan durante el análisis de los componentes no volátiles del vino por cromatografía de gases, pero no dan contenidos en este polialcohol.

Gomez-Cordovés y Hernandez (1987) encontraron, en vinos blancos procedentes de uvas sanas, diferencias en función de la prensada, siendo más abundante en los vinos yema en dos diferentes denominaciones de origen y variando las concentraciones entre 3,5 y 11 mg/l.

### 9.- AZÚCARES.

El mostos de uva contiene entre un 15 y un 25 por 100 de azúcares, glucosa y fructosa (llamadas también dextrosa y levulosa) constituyen el 99 % o más del total de carbohidratos; el porcentaje es completado con otras hexosas, pentosas, heptosas, pectinas y sacarosa.

En la uva el almacenamiento de azúcares comienza con la maduración, pasando en unas pocas semanas del 1 al 20 por 100 (Ribereau-Gayon 1989). Los azúcares son almacenados por el grano de uva en el curso de la maduración. Productos de la fotosíntesis en la hoja y sustancias de reserva emigran hacia la baya, en forma de sacarosa que es hidrolizada en glucosa y fructosa, una vez en ella. Las variaciones en la concentración de fructosa y glucosa, así como su localización en las uvas durante su maduración han sido objeto de muchos trabajos (Kliewer 1965, 1967, Possner y Kliewer 1985, Coombe 1987, Villarroja y col. 1988) en ellos se indica que antes de la maduración predomina la glucosa, en la madurez existe una cantidad similar de glucosa y fructosa (la relación glucosa-fructosa es aproximadamente 0,95), y que este último azúcar es mayoritario en uvas sobremaduras.

La glucosa y la fructosa son fácilmente fermentadas por las levaduras, aunque la mayoría de ellas fermentan más rápidamente la glucosa. En los vinos completamente fermentados siempre queda un resto de estos azúcares, pero los abocados contienen, normalmente, más fructosa que glucosa, lo que les confiere un dulzor más acentuado debido al mayor poder edulcorante de la fructosa. En los vinos tintos la glucosa puede proceder de la hidrólisis de ciertos glucósidos que tiene lugar durante la fermentación.

Las uvas apenas contienen sacarosa, y esta, desaparece durante la fermentación del mosto. Su presencia en el vino se ha tenido como índice de adulteración.

El vino (INDO 1984) se denomina seco, si contiene materias reductoras en cantidad menor de cinco gramos por litro; abocado, si esta comprendido entre 5 y 15 gramos por litro; semisecco, de 15 a 30; semidulce, de 30 a 50, y dulce, si es superior a 50 gramos.

El papel jugado por los azúcares en el gusto del vino es muy importante; en el caso de vinos secos, es posible detectar en una cata la adición de 2-3 g/l. La naturaleza de los azúcares de un vino también modifica la impresión azucarada, ya que no todos los azúcares presentan la misma intensidad de dulce. Si al dulzor de la sacarosa se le asigna la unidad, la fructosa tiene 1,73, la glucosa 0,74 y las pentosas 0,40; por consiguiente, para una

misma tasa de azúcares reductores, el sabor dulce de un vino dependerá de la relación glucosa/fructosa.

La glucosa y la fructosa pueden ser fermentadas por las bacterias lácticas heterofermentativas con formación de ácido láctico y ácido acético; la fructosa puede dar origen a manita; cuando las bacterias se desarrollan en el curso de una fermentación defectuosa pueden originarse, a partir de los azúcares, cantidades altas de ácidos, llegando incluso al avinagramiento del vino. En el curso de la fermentación maloláctica los valores de azúcares reductores en vinos secos disminuyen, principalmente la glucosa.

La presencia de polímeros de glucosa, representados por el dextrano, de fórmula  $(C_6H_{12}O_6)_n H_2O$ , hacen que aparezca la enfermedad del ahilado o de la grasa.

Polímeros de fructosa, fructosanos, o de otras aldosas constituyen las gomas de los vinos, y son responsables de la restitución de azúcares reductores tras una hidrólisis ácida.

## II. - OBJETIVOS



- 1.- Aislamiento y caracterización del esquema secuencial de las levaduras que realizan la fermentación de los mostos de uva de las variedades Verdejo y Jerez, mayoritarias en la zona.
- 2.- Estudio de la microflora residual de levaduras durante la conservación de vinos blancos obtenidos de uvas de tres variedades, Verdejo, Jerez y Viura sometidos a diversos tratamientos de estabilización.
- 3.- Estudio de compuestos fenólicos de bajo peso molecular, polialcoholes y azúcares en mostos de las variedades Verdejo y Jerez, en los fermentados obtenidos con distintos modelos fermentativos y confirmación de las variaciones debidas a estos. Así, como en vinos elaborados en bodega, tratados con anhídrido sulfuroso, o con enzimas pectolíticos o con los ácidos cítrico y ascórbico.
- 4.- Comprobar la influencia que la madera y el desarrollo de velos blastomicéticos ejerce sobre compuestos fenólicos de bajo peso molecular, polialcoholes y azúcares.



**III.- PLAN DE MUESTREO.**



Para el desarrollo de este trabajo se ha dispuesto de vinos de procedencia industrial, mostos vinificados en laboratorio y vinos sometidos a crianza biológica.

Las muestras industriales utilizadas en este trabajo corresponden a una bodega acogida a la Denominación de Origen Rueda, en el proceso de elaboración se aplica una técnica avanzada que comienza en la recolección de la uva y termina con el embotellado.

La vendimia se inicia en el punto óptimo de madurez de la uva. El transporte de la misma una vez cortada, se realiza en cajones contenedores de no mas de 20 Kg de capacidad, evitando así la rotura, estrujado y maceración antes de su procesamiento.

Una vez en el lagar se vacían los contenedores en la tolva de recepción. Dicha tolva esta construida con acero inoxidable para su mejor limpieza y desinfección, así como para evitar que la uva entre en contacto con productos no deseables como hierro, calcio, etc., los cuales influyen en la estabilidad y equilibrio del mosto.

De la tolva, la uva pasa a las prensas por medio de bombas, también en acero inoxidable, con la particularidad de que prácticamente no rompen el grano, evitando de este modo su posible oxidación.

El prensado se realiza en las llamadas "Prensas de Pulmón", donde se extrae el zumo, bajo una presión que como máximo llega a 2 Kg/cm<sup>2</sup>, obteniéndose así un mosto limpio y casi sin heces. Con este procedimiento de prensado el mosto, desde el comienzo del proceso hasta el final, puede considerarse yema, con un contenido en materias astringentes y oxidables muy bajo, debido a que el contenido en ácidos tánicos es menor que en el prensado tradicional.

### 1.- Muestras de procedencia industrial.

El mosto pasa a los depósitos de fermentación que son de acero al carbono revestidos interiormente de resina epoxi, con una capacidad de 35000 litros, provistos de un sistema de refrigeración externa con control automático de temperatura.

La bodega de fermentación dispone también de ocho depósitos de acero inoxidable de los cuales cuatro son de 500 litros y cuatro de 2000 litros, utilizados para la multiplicación de los pies de cuba que se precisaran en la elaboración del vino.

Las especies de levaduras que se utilizaron, se escogieron en base a criterios ecológicos, evolutivos y de predominio en la misma zona productora, y en su aplicación se ha seguido un criterio enológico perfectamente establecido en función de los resultados experimentales, donde estas especies actúan de forma interaccionada.

Las especies son:

*Kloeckera apiculata* (Reess emend. Klöcker)

*Torulasporea rosei* (Guilliermond)

*Saccharomyces ellipsoideus* (Hansen)

En los fermentadores de 500 litros con mosto yema esterilizado, se inoculan las cepas anteriormente mencionadas. Una vez alcanzada la fase logarítmica de multiplicación se hace el trasvase a los fermentadores de 2000 litros, donde alcanzada la población adecuada, se realiza la siembra de las tres especies (que hasta este momento se habían mantenido separadas) en los depósitos de fermentación sobre el mosto con toda su microflora epifítica.

Las muestras industriales y sus siglas son:

V ..... Uvas de la variedad Verdejo.

Vi ..... Uvas de la variedad Viura.

J ..... Uvas de la variedad Jerez.

M ..... Mezcla de las tres variedades en proporción de  
50% Verdejo, 25% Jerez y 25% Viura.

FV ..... Fangos de la variedad Verdejo obtenidos tras  
decantación estática a 18 °C.

FM ..... Fangos de la mezcla de variedades obtenidos tras  
decantación estática a 18 °C.

T ..... Vinos testigo. Servirán de patrón de comparación  
puesto que sobre ellos no se realiza ningún tratamiento.

- S ..... Vinos sulfitados. Son vinos adicionados con 50 ppm de metabisulfito potásico, equivalentes a 25 ppm de SO<sub>2</sub> libre.
- Vc ..... Vinos con vitamina C y ácido cítrico. Proceden de la adición de 100 ppm de vitamina C y 50 ppm de ácido cítrico a los vinos testigo.
- Ez ..... Vinos tratados con enzimas peptolíticas. Resultan de añadir 20 ppm de enzimas peptolíticas a los vinos patrón.
- VR1 .... Vino de la variedad Verdejo obtenido por fermentación inducida con levaduras de bodega de primera fase.
- VR2 .... Vino de la variedad Verdejo obtenido por fermentación inducida con levaduras de bodega de segunda fase.
- VR3 .... Vino de la variedad Verdejo obtenido por fermentación inducida con levaduras de bodega de tercera fase.
- MN86 .... Vino comercializado Mantel Nuevo del año 86 sin maderizar. Vino de mezcla de variedades Verdejo, Viura y Jerez con una proporción de la primera no inferior al 85 %. En la elaboración de este vino no interviene el anhídrido sulfuroso, y el vino es embotellado tan pronto han transcurrido las imprescindibles operaciones de estabilización y acondicionamiento del mismo después de acabada la fermentación.

MB86 .... Vino comercializado Mantel Blanco del año 86. Es idéntico al Mantel Nuevo, pero que pasa un tiempo en madera antes del embotellado (como mínimo seis meses).

MD ..... Vino comercializado Mantel Dorado que ha sufrido crianza biológica en barrica. Este es un vino con largo tiempo de permanencia en madera y de crianza biológica, antes de su embotellado se le agrega licor de expedición para favorecer su consumo, que de otra forma sería difícil, debido al elevado añejamiento del mismo.

Así pues se tienen las siguientes muestras:

Vinos testigo ..... VT, ViT, JT, MT, FVT, FMT

Vinos sulfitados ..... VS, ViS, JS, MS, FVS, FMS

Vinos con enzimas pectolíticos .. VEz, ViEz, JEz, MEz, FVEz, FMEz

Vinos con vitamina C ..... VVc, ViVc, JVc, MVc, FVVc, FMVc

Vinos con fermentación inducida VR1, VR2, VR3

Vinos comercializados ..... MN86, MB86, MD

Todas las muestras permanecen almacenadas a 3 °C y en oscuridad hasta el momento de su estudio.

## 2.- Muestras vinificadas en laboratorio.

Mosto de las variedades Jerez y Verdejo, este último también filtrado por filtro en profundidad marca Seitz nº 10. Estos

mostos se hacen fermentar con cepas de levaduras de la colección del Instituto de Fermentaciones Industriales, y con cepas procedentes del mosto Verdejo que son utilizadas para la fermentación en las bodegas de Nava del Rey. Los tratamientos y las siglas con las que se denominan son las siguientes:

Ve ..... Mosto de la variedad Verdejo.

Veesp ... Fermentación espontánea del mosto Verdejo.

VeK1 ... Fermentación inducida con *Kloeckera apiculata*.

VeTsp ... Fermentación inducida con *Torulaspora rosei*.

VeSacch . Fermentación inducida con *Saccharomyces ellipsoideus*.

Ve3 ..... Fermentación inducida con las tres levaduras de la colección del Instituto de Fermentaciones Industriales.

Cuando tras Ve figura "f" las fermentaciones tienen lugar sobre mosto filtrado.

Ve+R1 ... Fermentación inducida con levaduras de bodega de la primera etapa fermentativa.

Ve+R2 ... Fermentación inducida con levaduras de bodega de la segunda etapa fermentativa.

Ve+R3 ... Fermentación inducida con levaduras de bodega de la tercera fase fermentativa.

Ve+R .... Fermentación inducida con las tres levaduras de bodega.

- Je ..... Mosto de la variedad Jerez.
- Je ..... Fermentación espontánea del mosto Jerez.
- Je3 ..... Fermentación inducida con las tres levaduras del laboratorio.
- Je+R .... Fermentación inducida con las tres levaduras de bodega.
- 
- CM ..... Vino del año 86 que se mantuvo durante 6 meses en madera.
- SM ..... Vino del año 86 mantenido durante 6 meses en atmósfera inerte, con sobrepresión de nitrógeno.
- CM1663 .. Vino CM sobre el que se siembra la levadura *Saccharomyces beticus*.
- CM1685 .. Vino CM sobre el que se siembra la levadura *Saccharomyces montuliensis*.
- SM1663 .. Vino SM sobre el que se siembra la levadura *Saccharomyces beticus*.
- SM1685 .. Vino SM sobre el que se siembra la levadura *Saccharomyces montuliensis*.



#### IV. - ESTUDIO MICROBIOLÓGICO



Se realizan dos tipos de experiencias:

a.- Utilizando mostos recogidos en bodega inmediatamente después del estrujado. Estas muestras se utilizarán para realizar aislamientos de la microflora epifítica encaminados no solo a determinar las levaduras presentes en los mostos, sino también para conocer cuáles de ellas son las más apropiadas para llevar a cabo la fermentación de dichos mostos potenciando su presencia, pero manteniendo y respetando la microflora normalmente presente en ellos. Tomando como punto de partida esos mostos, se llevaron a cabo fermentaciones naturales, en pureza y escalares utilizando las levaduras seleccionadas en el mosto y levaduras de la colección del Instituto de Fermentaciones Industriales.

b.- Utilizando vinos industriales terminados a los que se ha sometido a diversos tratamientos enotécnicos. Se estudió la influencia de los diversos tratamientos y el tiempo de conservación de los vinos sobre la microflora residual.

#### 1.- TOMA DE MUESTRAS Y AISLAMIENTO.

Se toma mosto de las variedades Verdejo y Jerez en las condiciones más asépticas posible, inmediatamente de la recepción de la uva en la bodega, de tal manera que el mosto obtenido tras el estrujado no ha sufrido ningún otro tipo de manipulación o tratamiento.

Las muestras se recogen en botellas estériles de 1 litro de capacidad, tapados con algodón, se llenan con mosto hasta aproximadamente tres cuartos de su capacidad trasladándose al laboratorio en nevera.

Se realizan cuatro aislamientos, el primero inmediatamente después de la toma de muestra (corresponde a la primera fase), el segundo (momento en el que la fermentación es tumultuosa) a los cinco días, el tercero (cuando la fermentación se hace lenta) a los diecisiete y el cuarto, a los cuarenta; este último corresponde al velo blastomicético que aparece en los vinos.

Una vez que se hace el primer aislamiento, las botellas se mantienen a 20°C, para que el proceso de fermentación tenga condiciones similares a las existentes en bodega.

Se realiza la siembra de cada muestra de mosto en placas Petri previo banco de diluciones; como medio nutritivo se utiliza agar-malta. Las placas se incuban 48 horas a 25°C; pasado este tiempo, de aquella placa que contenga entre 50 y 200 colonias, se procede a tomar 10 cultivos puros de levadura.

Las cepas aisladas se pasan a un tubo con agar-malta del que posteriormente se hace un duplicado. Con uno de ellos, se hacen las pruebas de clasificación necesarias y el otro se conserva en cámara refrigerada a 8°C.

Para los aislamientos de levaduras residuales el procedimiento seguido es el mismo pero en este caso se parte de vinos a los que se les ha realizado diversos tratamientos.

## 2.- MÉTODOS Y MEDIOS DE IDENTIFICACIÓN.

Una vez realizados los aislamientos se procede a la identificación de las cepas según el sistema de clasificación propuesto por Lodder (1970) y Kreger-van Rij (1984), utilizando los métodos y medios descritos por ellos, aunque con algunas modificaciones debidas a la Escuela Enológica de Perugia (Italia).

Las pruebas realizadas son las siguientes:

### 2.1.- Pruebas morfológicas

#### 2.1.1.- Examen microscópico.

El método a seguir se ha realizado según describen Barnett y col. (1983).

Método: A partir de los cultivos jóvenes (de un día en agar-malta) se siembra en matraces con mosto de malta. Después de 2 ó 3 días de incubación a 25°C de temperatura, se realizan preparaciones en fresco de los cultivos seguidas de observación al microscopio. Se estudia forma, tamaño y reproducción asexual de las células.

Preparación del mosto de malta: Se parte de 1 Kg de malta molida que se mezcla con 2,6 litros de agua, se calienta al Baño María durante 3 horas a 45°C agitando frecuentemente. Pasado este tiempo la temperatura se eleva a 65°C y se mantiene durante una hora. Se comprueba entonces si la mezcla contiene almidón, con yodo, en el caso de que se haya hidrolizado todo el almidón no se presentara cambio de color, pero si aún queda almidón aparecerá color azul, en este caso se continua el proceso hasta la hidrólisis total. Posteriormente se filtra y se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 3-5 minutos. El pH se ajusta a 5. Finalmente se diluye con agua hasta 3° Beaumé. Se reparte en los erlenmeyer y se esteriliza en autoclave a 100°C durante 30 minutos.

#### 2.1.2.- Formación de ramificaciones pseudomiceliales.

Método: En una placa Petri se coloca un papel absorbente y encima una varilla de vidrio acodada sobre la cual se coloca un portaobjetos. El conjunto se esteriliza en estufa a 120°C de temperatura durante 3 horas. Una vez estéril y trabajando en condiciones asépticas, sobre el porta se aplican unas gotas de agar-malta fundido y estéril, para formar una fina película. Cuando el medio está sólido, se siembra a partir de cultivo joven (de 48 horas en agar-malta) con hilo de platino, haciendo una estría longitudinal y varias transversales muy ligeras. Sobre el papel se vierte agua estéril con el fin de mantener un alto grado de humedad dentro de la placa.

Las posibles ramificaciones se pueden detectar por observación directa al microscopio tras la incubación a 25°C de temperatura durante 5 días en estufa. Si transcurrido este tiempo no aparecen, vuelven a hacerse observaciones a los 15 y 30 días a partir de la siembra. Pueden observarse formaciones como clamidosporas, blastosporas y artrosporas. La importancia de esta prueba es mayor en el caso de cepas que no presentan esporas.

### 2.1.3.- Esporificación

La posible capacidad de esporulación de las levaduras objeto de estudio se ha determinado según el método descrito por Fink en 1970 (Tabor y Tabor 1970).

Método: La esporulación se ha provocado por cultivo de las levaduras en un medio favorable, rico en glucosa, en el que permanecen un período de 48 horas a 28°C de temperatura. Transcurrido este tiempo, se siembran en un medio de esporulación pobre en glucosa, con el fin de reducir en lo posible la reproducción vegetativa, y está complementado con una sustancia inductora de la esporulación como es el acetato. En este último medio se mantendrán por espacio de 3 a 5 días a una temperatura de 25°C. Pasado este período de incubación, se hacen preparaciones en fresco seguidas de observación microscópica, anotándose la presencia o ausencia de esporas así como su tamaño. Para facilitar dicha observación puede hacerse tinción de esporas en los casos dudosos por el método de Bartholimew y Mittwer (1976).

En los casos de esporulación negativa los cultivos se mantendrán a temperatura ambiente examinándose semanalmente durante un mínimo de 4 a 6 semanas.

Composición de los medios:

Medio de preesporulación

Glucosa .....	50 g
Extracto de levadura .....	10 g
Nutrient-Broth (Difco) .....	30 g
Agar .....	20 g
Agua .....	1000 ml

Medio de esporificación

Acetato potásico .....	9,8 g
Glucosa .....	1 g
Extracto de levadura .....	2,5 g
Agar .....	20 g
Agua .....	1000 ml

**2.2.- Pruebas fisiológicas.**

**2.2.1.- Fermentación de azúcares**

La capacidad de las levaduras para fermentar azúcares, se ha observado por cultivo de las cepas en estudio en soluciones líquidas de los azúcares a ensayar, según método descrito por Lodder (1970) y Kreger-van Rij (1984).

La composición de los medios utilizados es la siguiente:

Bacto-Yeast-Nitrogen-Base (Difco) .... 6,7 g  
Azúcar a examen ..... 20 g  
Agua destilada .....1000 ml

Método: Preparados los medios se distribuyen en tubos de ensayo a razón de 10 ml por tubo, provistos de campana Durham; y se esterilizan en autoclave a 121°C durante 15 minutos. La siembra se realiza a partir de cultivos jóvenes (de 48 horas en agar-malta), se incuban en estufa a 28°C durante 15 días. La prueba se considera positiva si aparece gas en la campana, después de la incubación.

Los azúcares ensayados son: glucosa, galactosa, maltosa, sacarosa, lactosa y rafinosa.

Merece atención especial el caso de la rafinosa. Los medios correspondientes a cepas que dan resultado positivo en la fermentación de este azúcar, se someten a cromatografía de papel con el fin de averiguar cual es el compuesto que, tras la ruptura de la rafinosa queda libre en el medio.

Tras la cromatografía se pueden dar tres casos:

- Queda libre melibiosa o sacarosa ..... Fermentación 1/3
- Queda libre galactosa ..... Fermentación 2/3
- No aparecen restos de ningún azúcar.... Fermentación 3/3

## Cromatografía de azúcares (Hefmann 1967)

Se realiza sobre papel "Whatman nº 1". Como patrones se utilizan: Sacarosa, Melibiosa, Galactosa y Fructosa. El eluyente es n-butanol/piridina/agua 6/4/3. El revelador constituido por 1 g de p-anisidina disuelta en 10 ml de metanol absoluto, se agregan 8 ml de ácido clorhídrico 1 N, se lleva hasta 100 ml con n-butanol y se adiciona 0,1 g de hidrosulfito sódico (ditiocionato sódico).

### 2.2.2.- Asimilación de azúcares

La asimilación de azúcares consiste en determinar los azúcares que pueden metabolizar por vía oxidativa las cepas de levadura en estudio. Dado que todo azúcar fermentado es también asimilado, esta prueba solo se realiza con aquellos azúcares a los que la cepa no ha fermentado.

Se ha realizado siguiendo el método descrito por Lodder (1970) y Kreger-van Rij (1984). La composición de los medios utilizados es la siguiente:

Bacto-Yeast-Nitrogen-Base (Difco) ...	6,7 g
Azúcar a examen .....	5 g
Agar .....	20 g
Agua destilada .....	1000 ml

La siembra se realiza partiendo de cultivo joven (de 48 horas en agar-malta), suspendido en suero fisiológico. El contenido de esta suspensión se vierte sobre los tubos con los medios inclinados de los azúcares en estudio, de tal forma que toda la superficie del medio quede impregnada del inóculo, para después desechar la suspensión sobrante. Sembrados así los tubos, se incuban a 28°C durante 15 días, al cabo de los cuales, la existencia de crecimiento sobre la superficie del medio indica respuesta positiva, mientras que su ausencia se considera negativa.

Otra forma de realizar esta prueba consiste en utilizar el método auxonográfico. Este método se realiza en placas y en cada una de ellas pueden hacerse a la vez las pruebas de varios azúcares.

El medio utilizado es:

Bacto-Yeast-Nitrogen-Base (Difco) ...	6,7 g
Agar .....	20 g
Agua destilada .....	1000 ml

Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos, después se deja enfriar hasta 45°C y se reparte en las placas, en las cuales previamente se ha puesto una suspensión en solución fisiológica de las cepas a estudiar, se agita para homogeneizar y se deja solidificar. Sobre el medio inoculado se colocan discos de papel absorbente impregnados en soluciones estériles

de los azúcares a examinar al 2% en agua destilada. Las placas se incuban a 28°C durante 3-4 días, observándose entonces si se han producido halos de crecimiento, en cuyo caso la prueba se considera positiva.

### 2.2.3.- Asimilación de nitratos.

La prueba de utilización de nitratos de forma aerobia como fuente de nitrógeno por parte de las levaduras, se ha realizado según método descrito por Lodder (1970) y Kreger-van Rij (1984).

Los dos medios utilizados en esta prueba tienen la siguiente composición:

#### Medio 1

Yeast-Carbon-Base (Difco) .....	11,7 g
Nitrato potásico .....	0,78 g
Agar .....	20 g
Agua destilada .....	1000 ml

#### Medio 2

Yeast-Carbon-Base (Difco) .....	11,7 g
Agar .....	20 g
Agua destilada .....	1000 ml

Método: La siembra en ambos casos se realiza por el método indirecto, es decir de la misma forma en que se procedió en la asimilación de azúcares, descrito anteriormente. Una vez sembrados, los tubos se incuban durante 15 días a 28°C. Transcurrido este tiempo se compara cada uno de los cultivos pertenecientes al mismo microorganismo, observándose si la presencia de nitrato potásico ha facilitado o no el crecimiento de la cepa sembrada. En el caso de que el crecimiento sea mayor en el medio que contiene nitrato que en el que carece de él, se considera positivo el resultado. Cuando no se aprecia diferencia se anota como negativo, pues se considera nula la influencia del nitrato.

#### 2.2.4.- Escisión de la arbutina

La rotura de la arbutina es una prueba de confirmación de la actividad de  $\beta$ -glucosidasa en las cepas de levadura.

Esta prueba se ha realizado según Lodder (1970) y Kreger-van Rij (1984).

El medio utilizado tiene la siguiente composición:

Arbutina .....	5 g
Extracto de levadura .....	1 g
Agar .....	20 g
Agua destilada .....	1000 ml

Método: Una vez disuelto el medio al Baño María, se distribuye en tubos de ensayo a los que previamente se les ha añadido unas gotas de sal férrica soluble (cloruro férrico al 1% en agua destilada). Se esterilizan en autoclave a 121°C durante 15 minutos y después se inclinan para su solidificación.

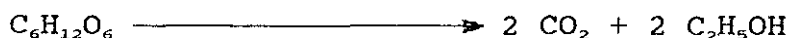
La siembra se realiza por estría a partir de cultivos jóvenes, incubándose en estufa a 28°C durante 15 días. Es conveniente dejar un tubo sin sembrar en las mismas condiciones para que actúe como testigo.

La prueba se considera positiva cuando se aprecia un cambio de color con respecto al tubo testigo tras el crecimiento de la levadura, ya que en los casos en que se hidroliza la arbutina se produce una quinona libre que al reaccionar con la sal férrica soluble presente en el medio da una coloración pardo-oscura.

#### 2.2.5.- Poder fermentativo.

El poder fermentativo es la medida del porcentaje (V/V) de etanol, que una cepa de levadura es capaz de producir.

Esta prueba fue originalmente ideada por Hayduck y descrita por Hericstoth y Osztrovsky en 1927. Se basa en la determinación, por pérdida de peso, del anhídrido carbónico que se desprende durante la fermentación alcohólica, según la ecuación estequiométrica:



Método: Para la determinación del poder fermentativo, se prepara mosto de uva de 14° Beaumé a partir de mosto concentrado ajustando el pH a 5. Se reparte en erlenmeyer de 100 ml de capacidad, poniendo 50 ml de medio en cada uno. Se esterilizan en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

La siembra se realiza a partir de cultivos jóvenes. Una vez sembrado el mosto, los matraces se cierran con tapones de goma provistos de válvulas Müller con ácido sulfúrico concentrado. Estas válvulas permiten la salida del anhídrido carbónico e impiden la entrada de aire.

Finalizada la siembra se pesan los matraces y se llevan a incubar a 25°C hasta peso constante. La diferencia de peso resultante al final del proceso indicará el anhídrido carbónico desprendido, que multiplicado por un factor establecido, da directamente el valor de etanol formado expresado en tanto por ciento (V/V).

Cálculo del factor:

Al fermentar 180 g de glucosa se producen 88 g de anhídrido carbónico y 92 g de etanol; por tanto a un gramo de CO<sub>2</sub> le corresponde 1,04 g de etanol. Siendo la densidad del etanol de 0,79 a los 1,04 g le corresponde un volumen de 1,3 ml de etanol. La diferencia de peso en gramos multiplicada por 1,3 da el volumen de etanol producido.

Volumen de mosto ————— 1.3 x Pérdida de peso = ml de etanol

100 ————— Poder fermentativo (P.F.)

El volumen de mosto era de 50 ml, luego:

$$\text{P.F.} = \frac{100 \times 1,3 \times \text{Pérdida de peso en gramos}}{50}$$

50

$$\text{P.F.} = 2,6 \times \text{pérdida de peso en gramos.}$$

En la práctica se multiplica por 2,5 ya que el rendimiento no es del cien por cien.

Los taxónomos no consideran esta prueba, sin embargo, se ha observado que con ella se determina rápidamente el género y dentro de él, en algunos casos del género *Saccharomyces*, permite distinguir entre especies distintas. Constituye pues un importante criterio de selección para muchos autores desde el punto de vista de la industria enológica.

#### 2.2.6.- Formación de velo

Método: Se siembra la levadura en mosto de uva de 8° Beaumé. Este mosto previamente se calienta a ebullición y se filtra en caliente con filtro de jarabe, ajustándose después el pH a 5. Se distribuye en tubos de ensayo a razón de unos 10 ml por tubo, y

se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. La siembra se realiza a partir de cultivo joven (de 48 horas en agar-malta), incubándose en estufa a 28°C durante un mes. Transcurrido este tiempo se observan los tubos y se anota:

- Formación de velo
- Formación de anillo
- Formación de islotes
- Ausencia de islotes

### 3.- DIAGNÓSTICO Y NOMENCLATURA

Los sistemas de clasificación de levaduras se han basado en la observación de los caracteres morfológicos primero y teniendo en cuenta los caracteres fisiológicos después, en la actualidad existen sistemas basados únicamente en pruebas fisiológicas, que permiten incluso la utilización de ordenadores.

Al ser las levaduras un grupo heterogéneo de hongos y existir grandes dificultades en encontrar un sistema de clasificación fiable, se ha llegado a una gran confusión a la hora de darles denominaciones adecuadas, ya que diferentes autores al basarse en criterios distintos pueden nombrar las levaduras de diferente forma.

Ante todo esto se ha optado por mantener las denominaciones con que se ha trabajado desde el principio en los estudios enológicos, para poder relacionar los diferentes trabajos publicados

hasta la fecha, pero recopilando en el cuadro siguiente, el nombre original y el actual con los cambios que ha sufrido según los distintos autores.

Antes de 1952	Lodder 1952-1967	Lodder 1970	Barnett 1983	Kreger-van Rij 1984
<i>T. pulcherrima</i>	<i>C. pulcherrima</i>	<i>M. pulcherrima</i>	<i>M. pulcherrima</i>	<i>M. pulcherrima</i>
<i>C. solani</i>	<i>C. solani</i>	<i>C. solani</i>	<i>C. solani</i>	
<i>T. stellata</i>	<i>T. stellata</i>	<i>C. stellata</i>	<i>C. stellata</i>	
<i>Kl. africana</i>	<i>Kl. africana</i>	<i>H'spora. vineae</i>	<i>Kl. africana</i>	
<i>Kl. apiculata</i>	<i>Kl. apiculata</i>	<i>H'spora uvarum</i>	<i>Kl. apiculata</i>	
<i>T'spora rosei</i>	<i>Sacch. rosei</i>	<i>Sacch. rosei</i>	<i>T'spora. delbrueckii</i>	<i>T'spora. delbrueckii</i>
<i>Zygosacch. veronae</i>	<i>Sacch. veronae</i>	<i>K. veronae</i>	<i>K. thermotolerans</i>	<i>K. thermotolerans</i>
<i>Sacch. carlsbergensis</i>	<i>Sacch. carlsbergensis</i>	<i>Sacch. uvarum</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
<i>Sacch. mangini</i>	<i>Sacch. chevalieri</i>	<i>Sacch. chevalieri</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
<i>Sacch. ellipsoideus</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
<i>Sacch. cheresiensis</i>	<i>Sacch. oviformis</i>	<i>Sacch. bayanus</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
<i>Sacch. fructuum</i>	<i>Sacch. chevalieri</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
<i>Sacch. exiguus</i>	<i>Sacch. exiguus</i>			

Como primer criterio aproximado para la clasificación de las cepas estudiadas se ha utilizado la clave bioquímica propuesta por Beech, Davenport, Goswell y Burnett (Gibbs y Shapton 1968). Se ha utilizado básicamente el sistema de clasificación propuesto por Lodder y Kreger-van Rij (1952 y 1967), para mantener la coherencia con los estudios anteriores, aunque siguiendo los métodos y medios descritos por Lodder (1970) y Kreger-van Rij (1984).

## 4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1.- Agentes fermentativos de los mostos Verdejo y Jerez.

#### 4.1.1.- Cepas identificadas.

Se aíslan e identifican cepas 60 cepas pertenecientes a los géneros y especies de levaduras que se indican a continuación:

<i>Kloeckera</i>	<i>Kloeckera apiculata</i> <i>Kloeckera africana</i>
<i>Candida</i>	<i>Candida pulcherrima</i> <i>Candida solani</i>
<i>Torulopsis</i>	<i>Torulopsis stellata</i>
<i>Torulaspora</i>	<i>Torulaspora rosei</i>
<i>Zygosaccharomyces</i>	<i>Zygosaccharomyces veronae</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> <i>Saccharomyces chevalieri</i> <i>Saccharomyces ellipsoideus</i> <i>Saccharomyces oviformis</i>

La tabla IV.1 muestra el número de cepas de cada especie presente en cada mosto y fase fermentativa.

En los mostos la mayor diversidad de especies aparece en la primera fase fermentativa. En Verdejo cinco de las ocho identificadas, en Jerez cinco de las nueve y en el conjunto de los dos mostos ocho de las once identificadas se encuentran en la primera fase, cinco en la segunda y únicamente tres en la tercera. Esta

mayor diversidad en los primeros momentos de la fermentación puede ser debida a que el mosto haya variado poco en su composición original, y por tanto, las levaduras dominantes serán aquellas que se encuentran en mayor número en el hollejo de la uva antes del estrujado, al avanzar el proceso fermentativo y variar notablemente su composición, tanto por agotamiento de nutrientes como por la presencia de nuevos compuestos debidos al metabolismo, o por competencias interespecie se producirá una selección natural y las levaduras que mejor se adecuen desplazaran a las primeras y conseguirán el predominio.

Tabla IV.1

ESPECIES IDENTIFICADAS EN LAS DISTINTAS FASES FERMENTATIVAS

ESPECIES	VERDEJO				JEREZ			
	Nº de cepas				Nº de cepas			
	FASE				FASE			
	1ª	2ª	3ª	Velo	1ª	2ª	3ª	Velo
<i>Kl. africana</i>	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kl. apiculata</i>	4	1	-	-	4	-	-	-
<i>C. pulcherrima</i>	2	-	-	-	1	-	-	-
<i>C. solani</i>	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. stellata</i>	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>T'spora rosei</i>	2	4	-	-	-	3	-	-
<i>Zygosacch. veronae</i>	-	-	-	-	2	-	-	-
<i>Sacch. carlsbergensis</i>	-	2	2	-	-	2	3	-
<i>Sacch. chevalieri</i>	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>Sacch. ellipsoideus</i>	-	3	6	4	2	4	4	5
<i>Sacch. oviformis</i>	-	-	2	6	-	-	3	5

*Kloeckera apiculata* es la especie dominante en la primera etapa fermentativa de ambos mostos, estos resultados son concordantes con otros estudios, ya que está presente en esta fase con

frecuencia superior al 80 % en las denominaciones de Origen Navarra, Yecla, Rioja y Mancha. En Navarra se presentan los máximos intervalos de frecuencia teórica de aparición de esta especie (0.58 - 0.93) con un coeficiente de confianza del 95 % (Colomo 1987).

*Kloeckera africana* y *Candida pulcherrima* también son especies habituales en el inicio de la fermentación de los mostos de uva españoles.

*Torulasporea rosei* es una típica especie representativa de la segunda fase, caracterizada por su pureza fermentativa, de gran transcendencia enológica en fermentaciones escalares.

Aunque *Saccharomyces ellipsoideus* aparece en todos los estadios de la fermentación, constituye la microflora final junto a *Saccharomyces carlsbergensis* y *Saccharomyces oviformis*, especies altamente alcoholígenas que concluirán la metabolización de los azúcares de los mostos.

El número de cepas no esporuladas identificadas en los dos mostos durante la etapa fermentativa es de 15, que representa el 25% sobre el total; las levaduras no esporuladas, aparecen únicamente en la primera fase fermentativa, con excepción de una cepa de *Kloeckera apiculata* aislada en la segunda fase del mosto Verdejo, lo que prueba una vez más que no se trata de una especie tan poco resistente al etanol como se ha venido indicando reiteradamente en la bibliografía (Suarez 1990); el número de

cepas esporógenas es de 45 lo cual representa el 75%, sin tener en cuenta las cepas filmógenas, ya que estas levaduras se desarrollan cuando la transformación mosto-vino a finalizado.

Las especies de levaduras mas representativas de la fermentación de los mostos de esta zona serán aquellas que se encuentren en las dos variedades con mayores porcentajes de frecuencia, teniendo mayor peso específico, las que se presenten en la variedad Verdejo que es la mayoritaria en los mostos que se van a fermentar, aunque el resto de las identificadas también puedan jugar un papel importante en la fermentación, y por tanto, en las características organolépticas de los vinos obtenidos. Las especies comunes a los dos mostos son *Kloeckera apiculata* y *Candida pulcherrima*, que pertenecen a géneros no esporulados, y *Torulaspóra rosei*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces ellipsoideus* y *Saccharomyces oviformis* dentro de los géneros esporulados.

Tabla IV.2 ESPECIES COMUNES A LOS DOS MOSTOS

Especies	Verdejo	Jerez	Total	Porcentaje
<i>K. apiculata</i>	5	4	9	16.7
<i>C. pulcherrima</i>	2	1	3	5.6
<i>T'spora rosei</i>	6	3	9	16.7
<i>Sacch. carlsbergensis</i>	4	5	9	16.7
<i>Sacch. ellipsoideus</i>	9	10	19	35.2
<i>Sacch. oviformis</i>	2	3	5	9.1

En total se han aislado en los dos mostos sesenta cepas de levadura que pertenecen a once especies encuadradas en seis géneros; las comunes son cincuenta y cuatro cepas que, como se observa en la tabla IV.2, pertenecen a seis especies. Por lo tanto el noventa por ciento de las cepas corresponden a cuatro géneros y el resto esta distribuido en cinco.

#### 4.1.2.- Poder fermentativo de las levaduras identificadas en los mostos.

Atendiendo a los poderes fermentativos podemos dividir las levaduras identificadas en tres grupos, de bajo, medio y alto poder fermentativo.

Las especies de bajo poder fermentativo son aquellas que se encuentran al principio de todas las fermentaciones. En las regiones españolas estudiadas anteriormente, corresponden a este grupo las especies no esporuladas, que dejan de actuar cuando en el mosto se alcanza una graduación alcohólica de aproximadamente 4° (V/V); esta circunstancia dió origen al nacimiento de la fermentación supercuatro basada en la eliminación de las levaduras de primera fase (Suarez e Iñigo 1990), entre las que se encuentran las apiculadas, ya que si se admite que la acción de estas es perjudicial, resulta evidente la conveniencia de iniciar la fermentación con mostos de riqueza alcohólica superior a los 4 grados, con lo que el crecimiento y multiplicación de estas levaduras quedan ralentizadas; Marcilla (1947) señala las imperfecciones enológicas de este tipo de fermentación al decir

que no es rigurosamente cierto que las levaduras que acaparan el protagonismo fermentativo sean siempre, y con seguridad, las especies mas convenientes. A partir de este momento, como las condiciones del medio les son desfavorables, desaparecen y en su lugar encontramos levaduras de poder fermentativo medio, que también estaban presentes en el inicio de la fermentación. Estas son levaduras que tienen como forma vegetativa predominante la fase haploide, aun cuando tienen la capacidad de esporular; el grado alcohólico conseguido por ellas suele estar comprendido entre 4 y 10. También están presentes algunas de poder fermentativo alto, levaduras claramente diploides, que alcanzan mas de 10 grados alcohólicos y son capaces de desarrollarse en estas condiciones hasta conseguir llevar a termino la fermentación obteniéndose como producto final, el vino.

En la figura IV.1 puede observarse el número de cepas (en abcisas) que en cada fase (en ordenadas) alcanzan los distintos poderes fermentativos en los mostos varietales (las tramas indican los distintos poderes fermentativos que se muestran a la derecha); esto nos permite ver como al avanzar la fermentación el grado alcohólico aumenta debido al predominio de cepas de levadura con alto poder fermentativo, de igual manera es posible advertir el cambio en el número de cepas con bajos, medios y altos poderes fermentativos que corresponden a distintas especies, y también la sucesión e intercambio de unas levaduras por otras durante el proceso de vinificación.

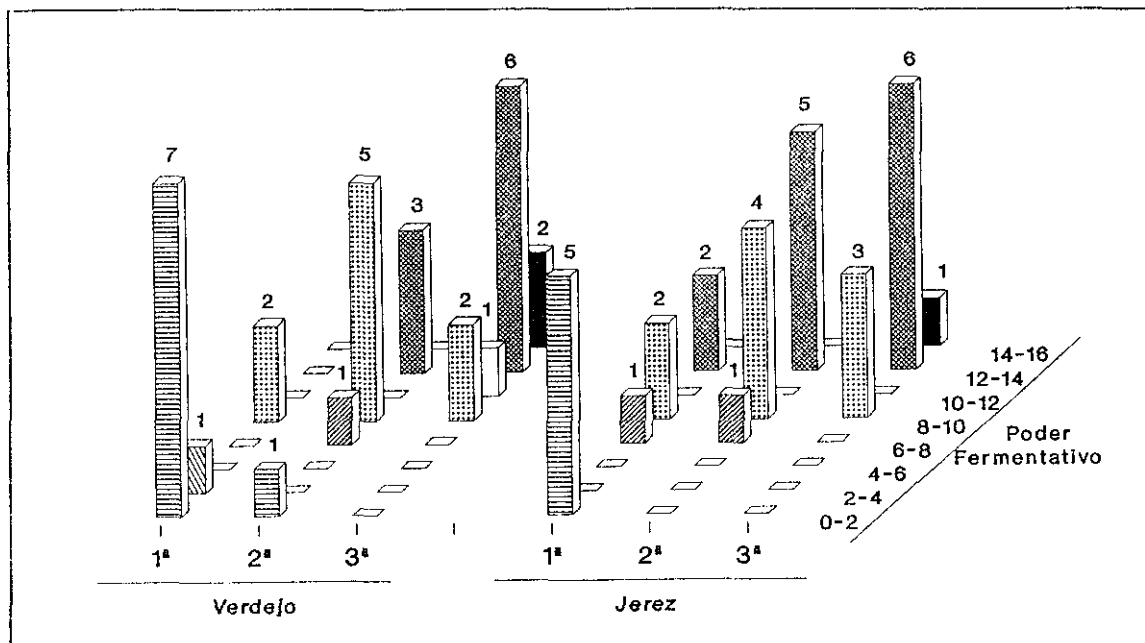


Figura IV.1 Número de cepas que alcanzan cada grado alcohólico en función del mosto y fase fermentativa.

**4.2.- Estudio de la fermentación de mostos de Verdejo y de Jerez con diferentes cepas de levadura.**

En mostos de las variedades Jerez y Verdejo se realiza el seguimiento de la fermentación espontánea y de la fermentación inducida con tres cepas seleccionadas de levaduras de la zona. En este último caso la siembra se hace con cepas autóctonas utilizadas en bodega, o con cepas correspondientes a la colección del I.F.I..

Las experiencias se desarrollaron en laboratorio utilizando para la fermentación erlenmeyer de 250 ml de capacidad con 150

ml de mosto, una vez sembrados se mantuvieron a 18° C, hasta conseguir peso constante.

#### 4.2.1.- Variedad Verdejo.

##### 4.2.1.1.- Levaduras de la colección I.F.I.

Cuando la fermentación se induce con una sola especie los poderes fermentativos son semejantes; alcanzándose con mas rapidez el final si la levadura que interviene es *Torulaspóra rosei* (ocho días) figuras IV.2 y IV.4, observándose el máximo desprendimiento de anhídrido carbónico (figura IV.3) entre el segundo y quinto día. Con *Saccharomyces ellipsoideus* el final de la fermentación se logra a los catorce días y las pérdidas de peso son menos bruscas aunque se mantienen durante un período mas largo. Por otro lado *Kloeckera apiculata* presenta el proceso fermentativo más lento; en cuanto a las pérdidas de peso. el mayor desprendimiento de CO<sub>2</sub> tiene lugar entre los días quinto y décimo.

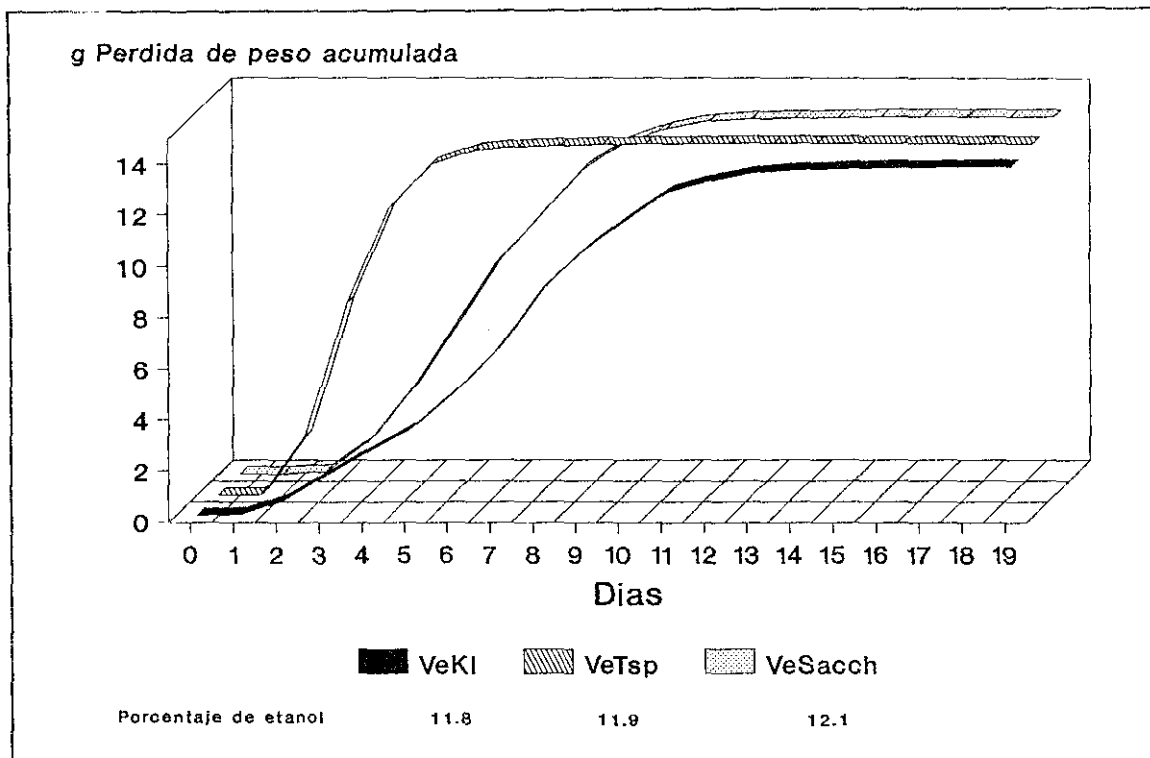


Figura IV.2 Velocidad de fermentación de las levaduras de la colección del I.F.I.

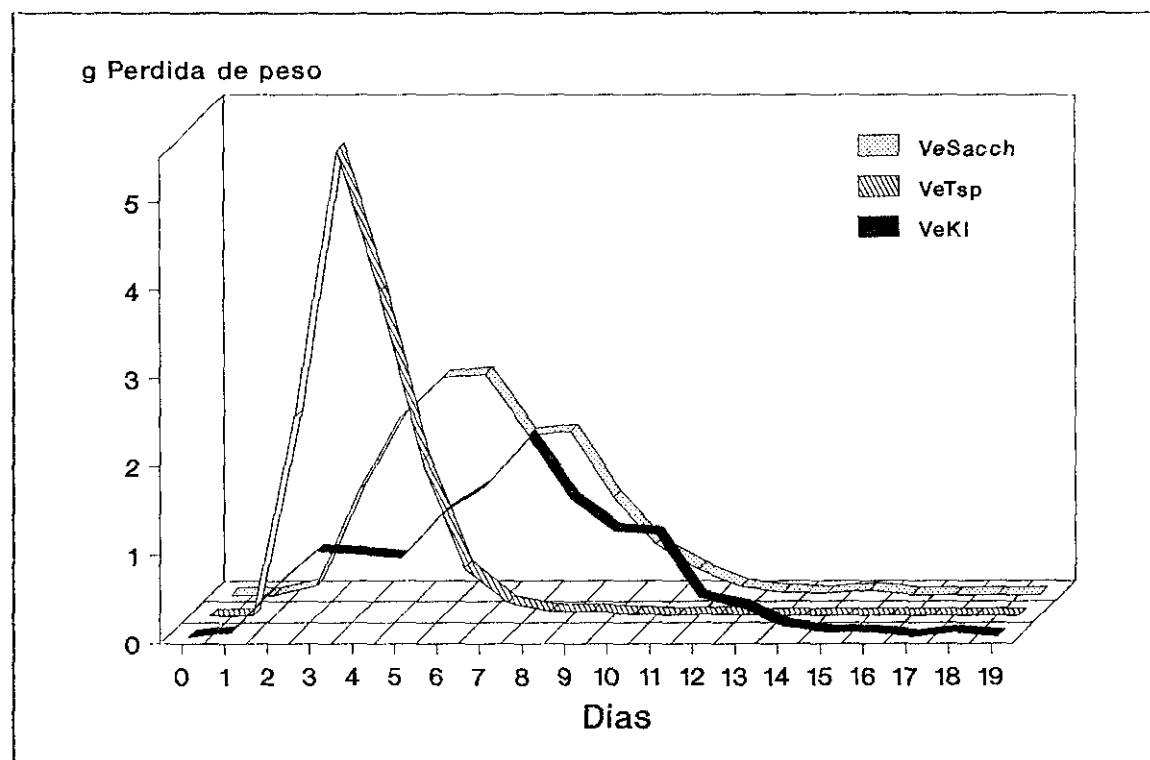


Figura IV.3 Curva termodinámica en función de la pérdida de peso diaria de las levaduras de la colección del I.F.I.

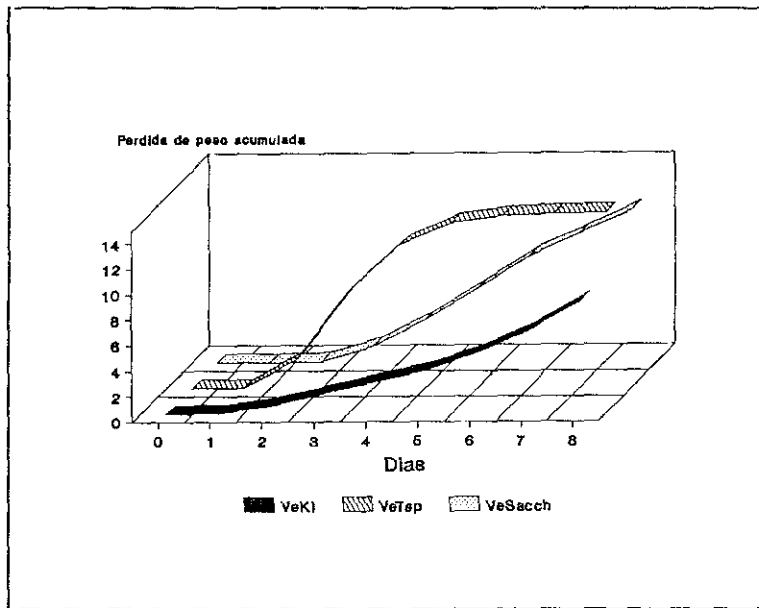


Figura IV.4

Velocidad de fermentación en los ocho primeros días de las levaduras de la colección del I.F.I.

#### 4.2.1.2.- Levaduras de bodega.

El grado alcohólico conseguido mediante la prueba del poder fermentativo es similar en los tres casos, pero la velocidad con que se alcanza es distinta (figura IV.5). R2 es la especie que más rápidamente alcanza el final de la fermentación en ocho días, seguida por R3 en nueve y R1 en doce. Los desprendimientos de anhídrido carbónico y por tanto las pérdidas de peso más acusadas aparecen en el caso de R2, seguido por R3 y R1, este último es en el que se da una fermentación más uniforme aunque necesita cuatro días mas para alcanzar el final.

Como se observa en la figura IV.6, que representa los ocho primeros días de fermentación, la presencia de R3 implica una

fase de latencia de tan solo 24 horas, mientras que en el caso de R1 esta fase se amplia casi hasta las 72, esto lleva unido el que la fase logarítmica de crecimiento sea también más rápidamente alcanzada por la cepa R3.

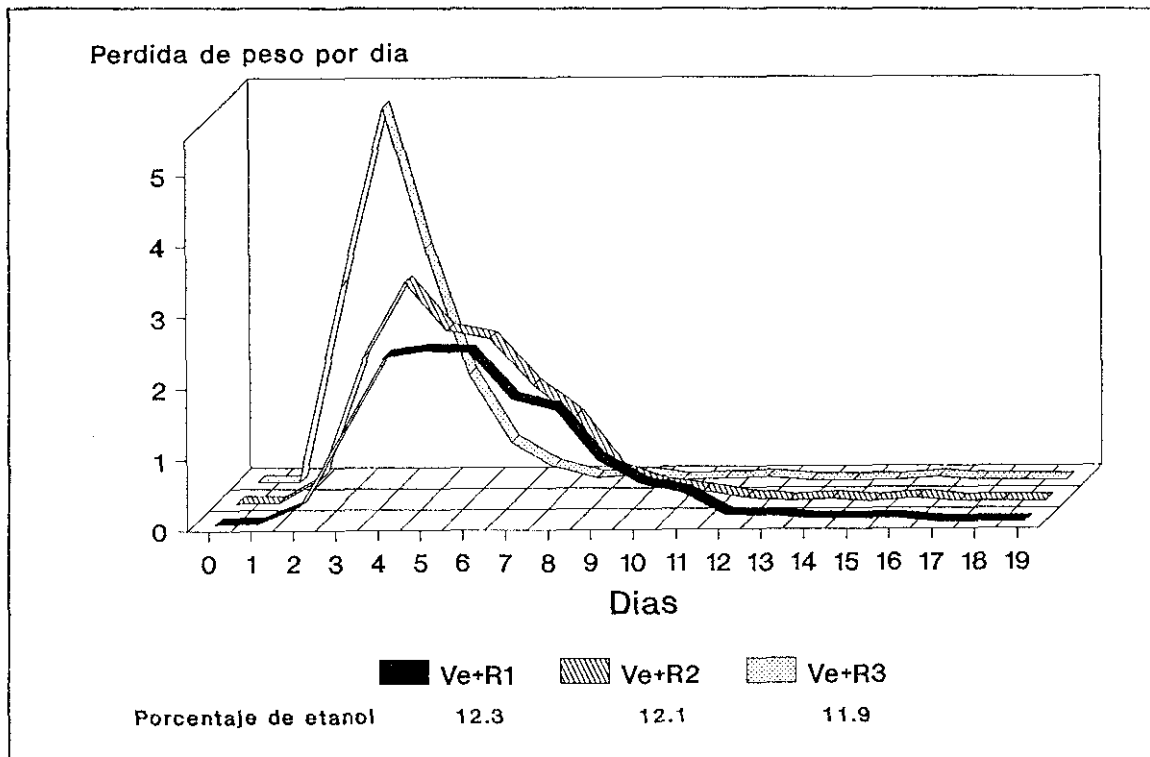


Figura IV.5 Curva termodinámica de las levaduras de bodega.

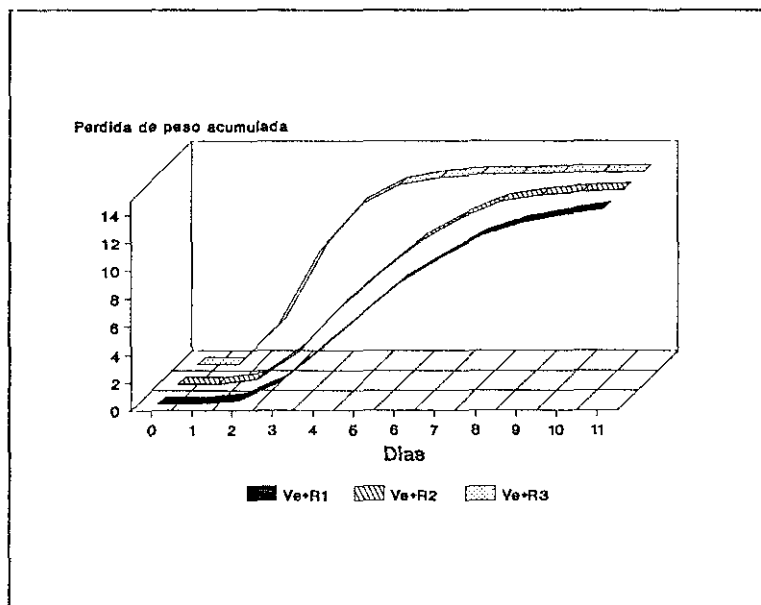


Figura IV.6 Velocidad de fermentación de las levaduras de bodega los ocho primeros días.

#### 4.2.1.3.- Mosto Verdejo filtrado con levaduras de la colección del I.F.I..

El mosto de la variedad Verdejo se filtró con una placa Seitz K-3 para conseguir una limpieza del mismo, de esta forma no se consigue filtración esterilizante, aunque junto a las partículas en suspensión, son retenidas gran parte de las levaduras presentes; por ello en el caso de la siembra con la cepa de *Kloeckera*, el poder fermentativo alcanzado no es el que corresponde a una fermentación en pureza de esta especie, sino mucho mas alto, semejante al obtenido con levaduras de tercera etapa, aunque el tiempo necesario para lograr esa graduación alcohólica (10,7) es muy superior al que se precisa cuando la fermentación es llevada a cabo desde el comienzo con levaduras de segunda y tercera fase; aun más, puesto que se realiza siembra masiva de *Kloeckera* esta levadura dominará el proceso durante más tiempo, dificultando la acción del resto de las escasas levaduras presentes.

Como se observa en la figura IV.7 el grado alcohólico obtenido varia desde 10,7 en el caso de la intervención de *Kloeckera* hasta los 12,6 en el caso de *Torulaspóra*, pasando por los 12,2 alcanzados por *Saccharomyces*.

*Torulaspóra rosei* comienza el proceso fermentativo a las 48 horas (figura IV.8) y los mayores desprendimientos de anhídrido carbónico tienen lugar durante los tres días siguientes, al séptimo día la fermentación ha concluido y el peso se mantiene

constante. *Saccharomyces ellipsoideus* comienza la fermentación también a las 48 horas pero las mayores pérdidas de peso tienen lugar entre los días cuarto y octavo, el desprendimiento de CO<sub>2</sub> se prolonga hasta el decimosexto día. En el caso de realizar la fermentación con *Kloeckera apiculata* a las 48 horas se aprecia una pequeña pérdida de peso pero rápidamente el proceso de fermentación se ralentiza y no vuelve a producirse un desprendimiento importante de CO<sub>2</sub> hasta el duodécimo día, a los 19 días la fermentación aunque lenta aún era perceptible. La larga fase de latencia correspondiente a VefKl lógicamente puede ser debida al lento arranque de la microflora indígena que se encuentra en el mosto después del filtrado, y al posible empobrecimiento del mismo en elementos nutritivos.

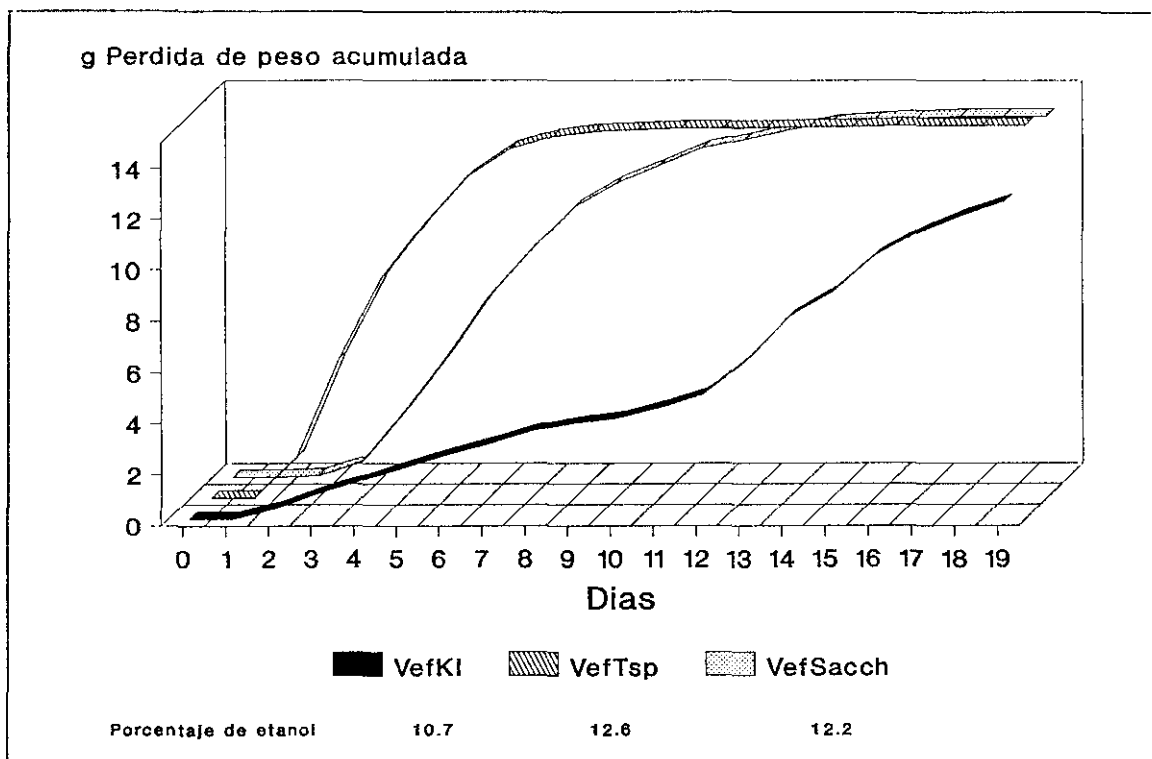


Figura IV.7 Velocidad de fermentación de las levaduras de la colección del I.F.I. sobre mosto filtrado.

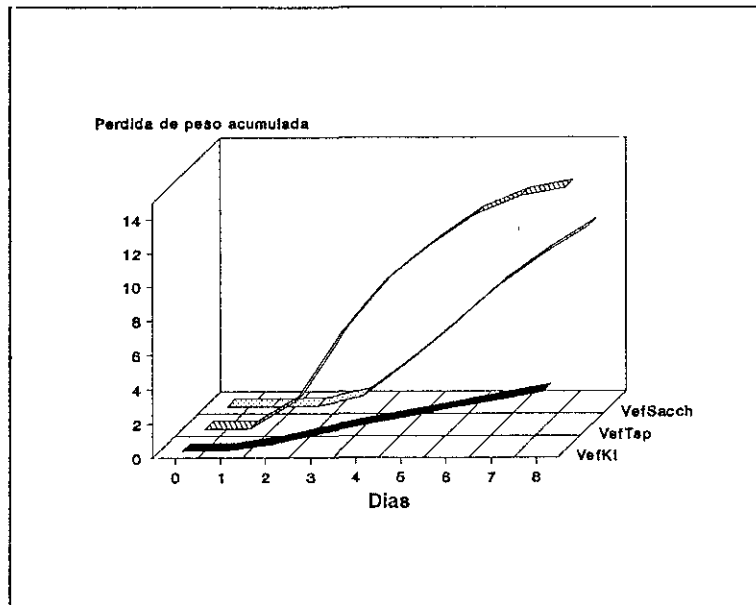


Figura IV.8 Velocidad de fermentación sobre mosto filtrado en los ocho primeros días de las levaduras del I.F.I.

4.2.1.4.- Comparación entre fermentaciones espontánea e inducidas con las ternas de la colección del I.F.I. y de bodega.

Los porcentajes de etanol alcanzados van desde 11,7 (el mas bajo) en caso de la fermentación espontánea hasta 12,4 (el mas alto) que corresponde a la fermentación inducida con la terna de bodega, los valores intermedios son los proporcionados por las fermentaciones con las levaduras de la colección del I.F.I., 11,9 en el caso de mosto sin filtrar y 12,2 cuando el mosto ha sido filtrado.

Las velocidades de fermentación (figura IV.9), así como el inicio y fin del proceso son paralelas tanto para el trío de la colección como para las levaduras de bodega, en ambos casos a partir del noveno día el peso se mantiene constante. La regulari-

dad en la actividad fermentativa representa una importante característica de orden tecnológico en cuanto a que facilita notablemente el control de la temperatura de fermentación. En el caso de fermentación espontánea son necesarios quince días para conseguir peso constante, mientras que en mosto filtrado se deja de producir desprendimiento de  $\text{CO}_2$  a partir del día doce.

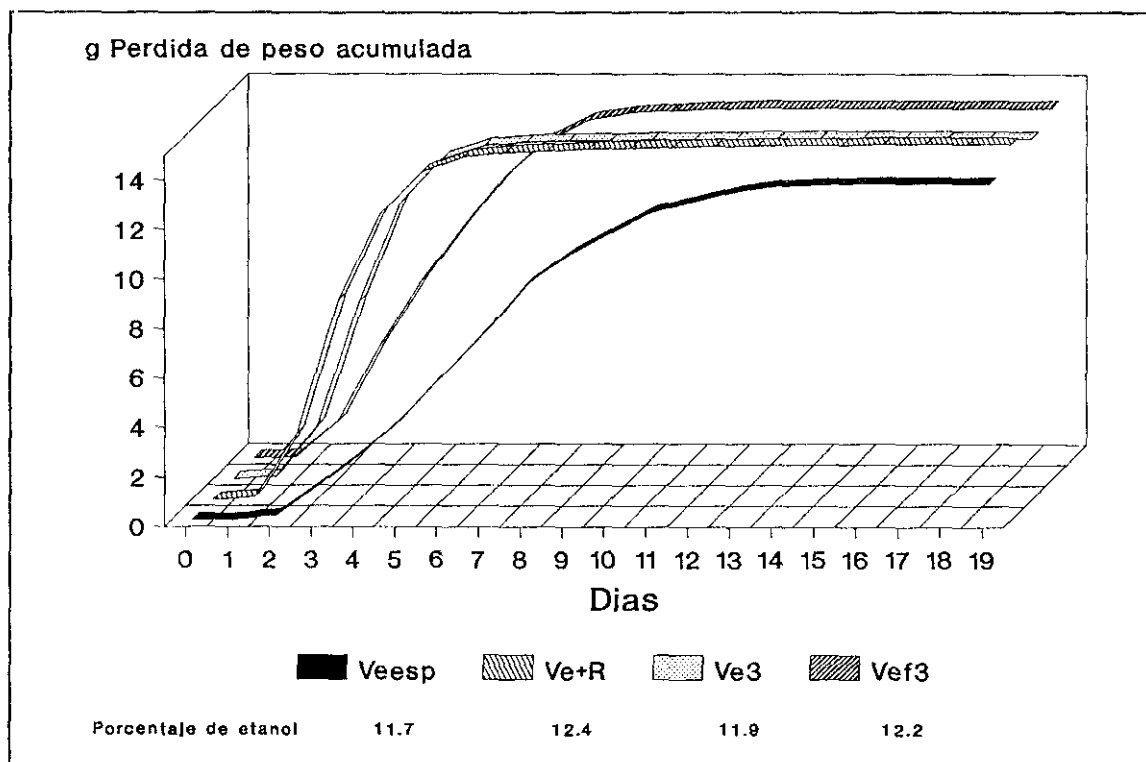


Figura IV.9 Comparación de las velocidades de fermentación.

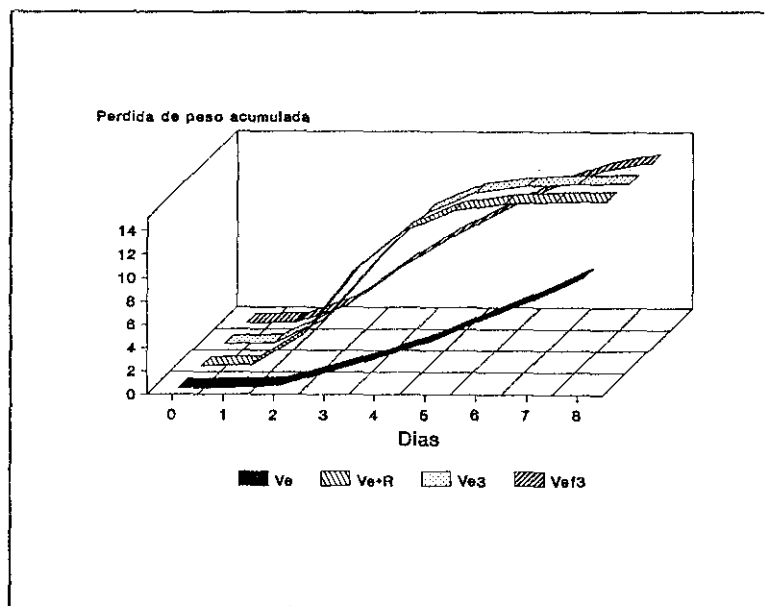


Figura IV.10 Comparación de velocidades de fermentación en los ocho primeros días.

La fase de latencia y logarítmica que presentan las fermentaciones realizadas con las levaduras de la colección del I.F.I. (Ve3) o con las cepas de bodega (Ve+R) son prácticamente iguales y el proceso fermentativo transcurre de forma paralela, como se aprecia en la figura IV.10 correspondiente a los ocho primeros días. Si la fermentación se desarrolla espontáneamente son necesarias 24 horas más para que tenga lugar el comienzo de la fermentación del mosto, y además, la fase logarítmica de crecimiento es mucho mas suave, con lo que la gradación de etapas se distancia. Cuando se parte de mosto filtrado, sembrado con las tres levaduras de la colección, la fase logarítmica se alcanza antes que en la fermentación espontánea, y presenta una pendiente mayor que se asemeja a la observada cuando se parte de mosto sin filtrar y con presencia de las cepas de bodega o de la colección.

#### 4.2.2.- Variedad Jerez.

Se han llevado a cabo fermentaciones con las ternas de levaduras de la colección del I.F.I. y de bodega comparándose con los resultados obtenidos en la fermentación espontánea del mosto de esta variedad.

El grado alcohólico mas bajo es el correspondiente a la fermentación espontánea, en ella se alcanzan únicamente 10,8° esta fermentación es la mas lenta desde el comienzo del proceso, siendo las perdidas de peso diarias pequeñas.

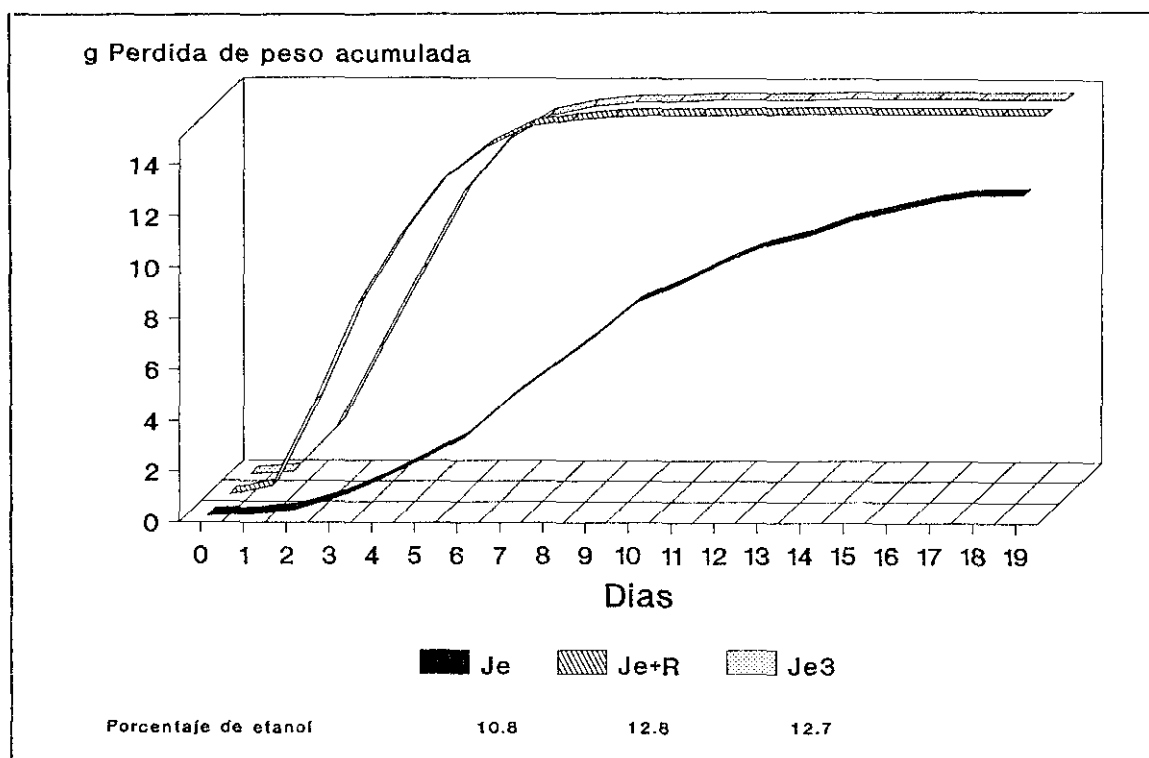


Figura IV.11 Comparación de las velocidades de fermentación sobre mosto Jerez.

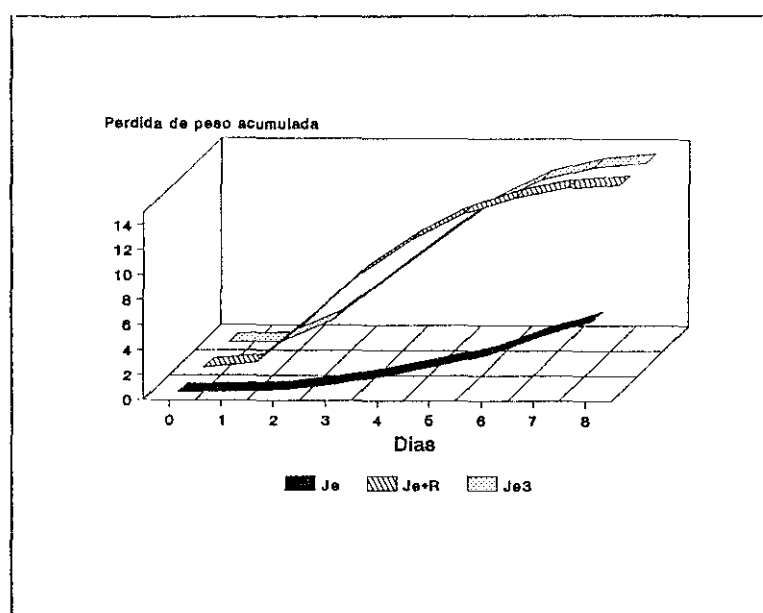


Figura IV.12 Comparación de la velocidad de fermentación del mosto Jerez los ocho primeros días.

Las fermentaciones llevadas a cabo mediante inducción con levaduras de bodega o de la colección son mas rápidas y casi

paralelas (figura IV.11). El grado alcohólico es similar, 12,8 y 12,7; el comienzo es más rápido en el caso de levaduras de bodega, siendo en las primeras 48 horas cuando mayor despreñamiento de CO<sub>2</sub> se produce. En el caso de levaduras de la colección son necesarias 24 horas mas para conseguir la misma pérdida de peso. El final del proceso fermentativo tiene lugar (figura IV.12) en el primer caso 24 horas antes que en el segundo, octavo y noveno día respectivamente.

#### 4.2.3.- Diferencias del poder fermentativo y grado alcohólico en función de las levaduras y mostos utilizados.

A partir de lo expuesto en las páginas anteriores, se puede concluir que los mostos fermentados espontáneamente, son los que alcanzan menor poder fermentativo, siendo además los que tardan más en arrancar y en finalizar la fermentación.

En la figura IV.13 se observa que en la variedad Jerez el menor grado alcohólico corresponde a la fermentación que tiene lugar de manera espontanea (Je), con una diferencia de 2º de etanol en relación a los otros dos fermentados, originados por la actuación de las levaduras de bodega o de la colección; esto era de esperar, puesto que además de la microflora natural presente en el mosto, se realizó siembra con levaduras seleccionadas. No se aprecia diferencia en cuanto a que las levaduras utilizadas sean las utilizadas en bodega o las de la colección.

En el mosto de la variedad Verdejo, de nuevo es la fermentación espontánea la que presenta el menor grado alcohólico, a continuación se encuentra la realizada por las levaduras de la colección, aunque con un grado alcohólico similar al obtenido en la que tiene lugar de forma espontánea, por delante de ellas se encuentran las realizadas con las tres levaduras de bodega y con las de colección sobre mosto filtrado, la diferencia con las primeras es de medio grado, siendo las levaduras de bodega las que alcanzan mayor grado.

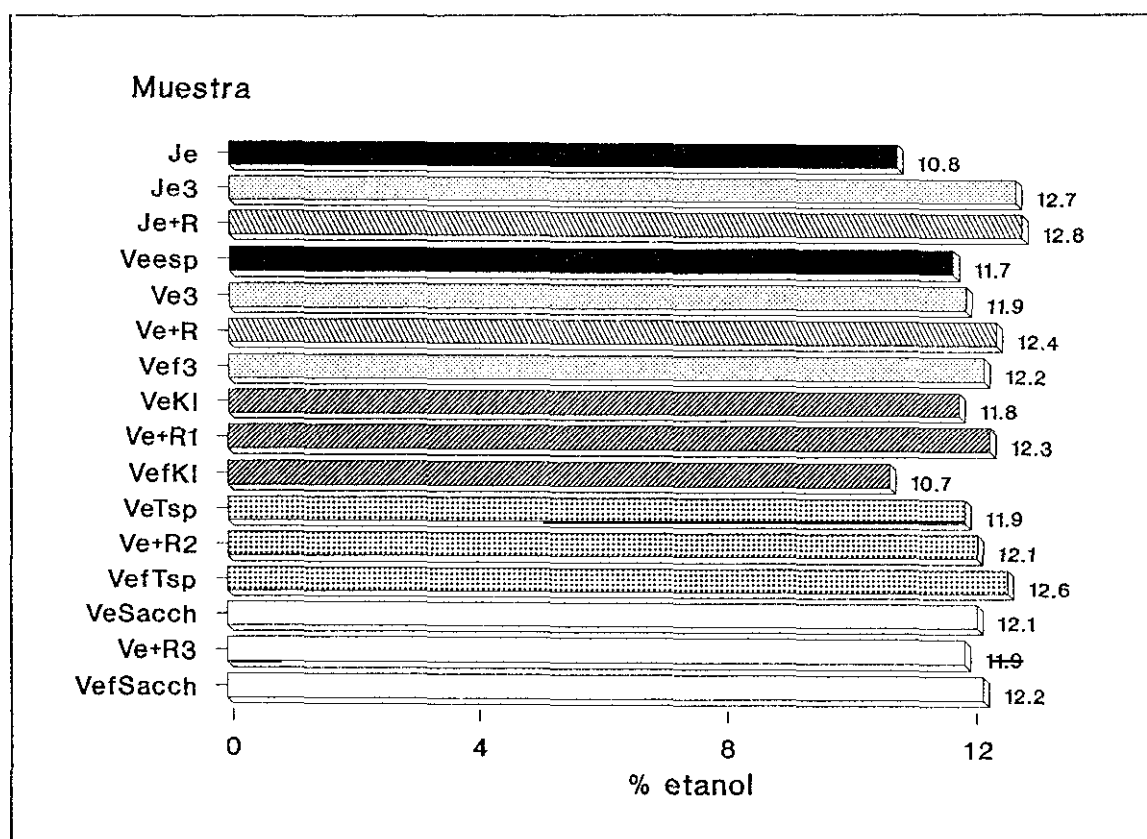


Figura IV.13

Comparación del grado alcohólico obtenido con las distintas fermentaciones sobre los mostos Verdejo y Jerez.

Cuando el mosto Verdejo, con su microflora natural, se hace fermentar tras la siembra de las cepas de forma individual, las

menores graduaciones se encuentran en los productos obtenidos por actuación de las cepas de primera etapa, siendo sobre el mosto filtrado donde el etanol se encuentra en menor cantidad; respecto a las levaduras de segunda y tercera fase no se observan diferencias notables entre las cepas de bodega y las de la colección del I.F.I.; con relación a las fermentaciones que tienen lugar sobre el mosto filtrado, el grado alcanzado por *Torulaspota* y por *Saccharomyces* es prácticamente igual.

Los resultados obtenidos en otras zonas vitivinícolas españolas (Iñigo y col. 1968, Khayyat y col. 1982, Barcenilla y Arroyo 1989 y 1990) permiten afirmar que las levaduras *Kloeckera apiculata*, *Torulaspota rosei* y *Saccharomyces ellipsoideus* son las que presentan mayor porcentaje de frecuencia, y por tanto, las mas ampliamente identificadas en las fermentaciones de los mostos de uva en la primera, segunda y tercera fase respectivamente. En el caso de los mostos de Nava del Rey estos resultados se repiten de nuevo, por lo que estas tres especies son las mas representativas, del total de especies aisladas e identificadas. A la hora de llevar a cabo una fermentación dirigida de los mismos, respetando la microflora epifítica propia, se utilizarían tales especies para potenciar el elemento biológico responsable de la vinificación.

#### 4.3.- Estudio de las levaduras residuales en vinos con distintos tratamientos.

Concluida la fermentación y seguido el proceso de elaboración, los vinos obtenidos fueron embotellados y en este momento se procedió a un análisis microbiológico previo en los vinos testigo en el que se obtuvieron los siguientes resultados:

Vinos	Levaduras/ml	Especies identificadas
VT	$1,2 \cdot 10^6$	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>
ViT	$1,3 \cdot 10^6$	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>
JT	$1,5 \cdot 10^7$	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>

Una vez embotellado y tratado el vino, durante el período de conservación, se realiza el estudio cuali y cuantitativo de la población residual a los seis y doce meses.

En las figuras IV.14 y IV.15 están representados los resultados cuantitativos y en las tablas IV.3 y IV.4 los cualitativos del análisis de levaduras residuales.

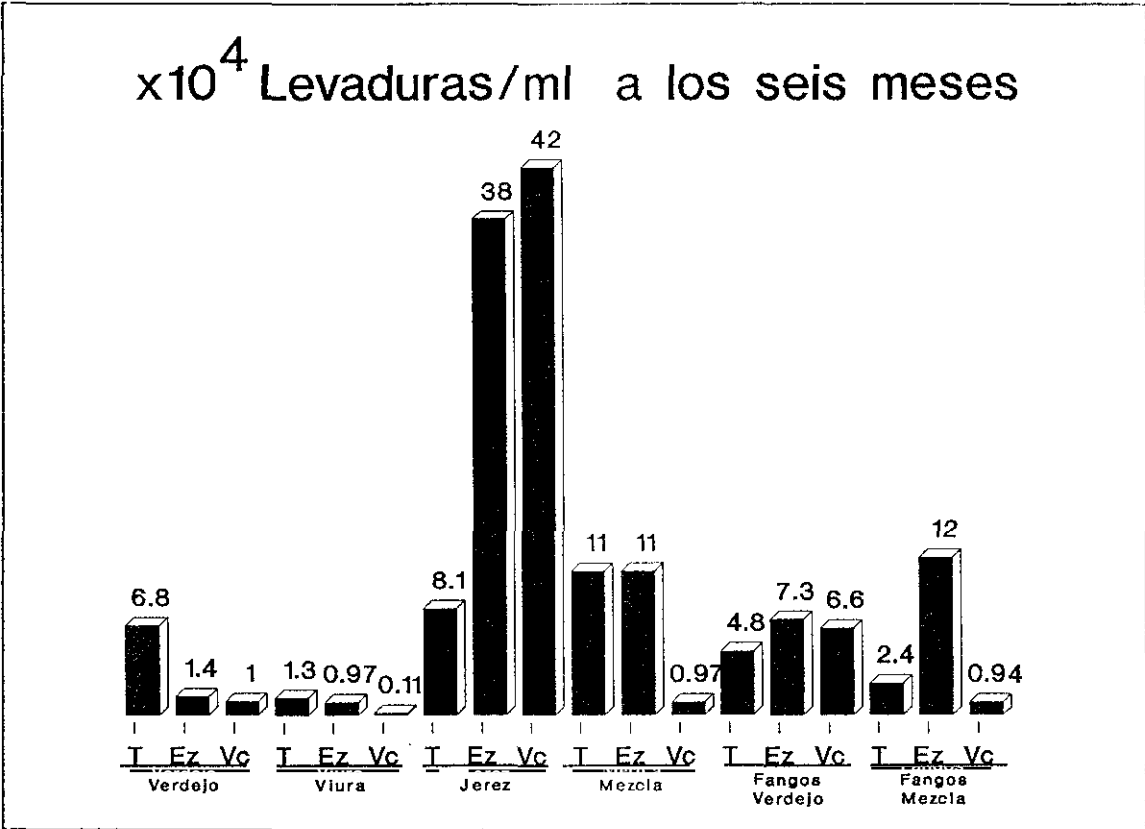


Figura IV.14 Recuento de levaduras residuales a los seis meses.

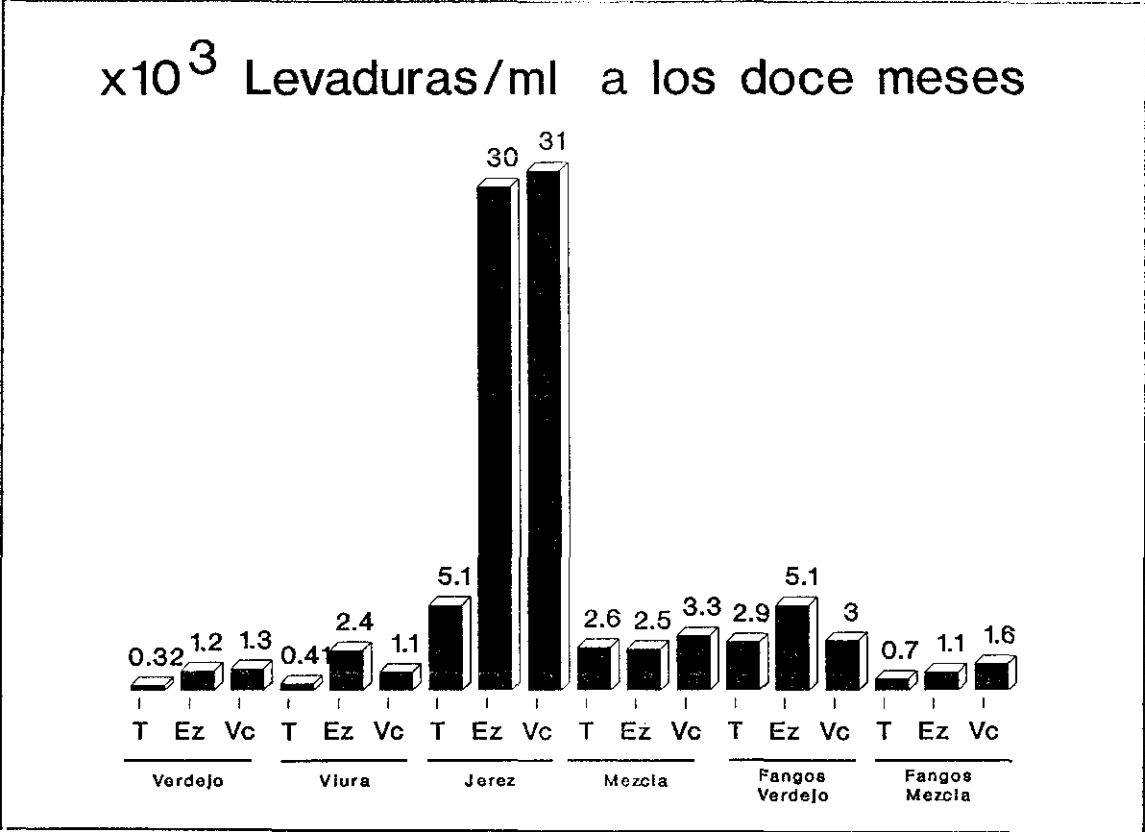


Figura IV.15 Recuento de levaduras residuales a los doce meses.

SEIS MESES		
Vino	Especie	Cepas
VT	<i>Sacch. oviformis</i>	5
VEz	<i>Sacch. oviformis</i>	5
VVc	<i>Sacch. oviformis</i> <i>Sacch. ellipsoideus</i>	4 1
ViT	<i>Sacch. oviformis</i> <i>Sacch. ellipsoideus</i> <i>Sacch. cheresiensis</i>	3 1 1
ViEz	<i>Sacch. oviformis</i>	5
ViVc	<i>Sacch. oviformis</i>	5
JT	<i>Sacch. oviformis</i> <i>Sacch. ellipsoideus</i>	2 3
JEz	<i>Sacch. oviformis</i> <i>Sacch. ellipsoideus</i>	4 1
JVc	<i>Sacch. oviformis</i> <i>Sacch. carlsbergensis</i>	1 4
MT	<i>Sacch. oviformis</i> <i>Sacch. ellipsoideus</i>	4 1
MEz	<i>Sacch. oviformis</i>	5
MVc	<i>Sacch. oviformis</i> <i>Sacch. ellipsoideus</i>	4 1
VR1	<i>Sacch. ellipsoideus</i> <i>Sacch. carlsbergensis</i>	4 1
VR2	<i>Sacch. oviformis</i> <i>Sacch. ellipsoideus</i> <i>Sacch. fructuum</i>	2 1 2
VR3	<i>Sacch. oviformis</i> <i>Sacch. ellipsoideus</i>	3 2
FVT	<i>Sacch. oviformis</i> <i>Sacch. ellipsoideus</i>	2 3
FVEz	<i>Sacch. ellipsoideus</i>	5
FVc	<i>Sacch. oviformis</i> <i>Sacch. ellipsoideus</i> <i>Sacch. carlsbergensis</i>	2 1 2
FMT	<i>Sacch. oviformis</i> <i>Sacch. ellipsoideus</i>	2 3
FMEz	<i>Sacch. oviformis</i> <i>Sacch. ellipsoideus</i>	4 1
FMVc	<i>Sacch. oviformis</i> <i>Sacch. ellipsoideus</i> <i>Sacch. carlsbergensis</i> <i>Sacch. exiguus</i>	2 1 1 1

Tabla IV.3 Especies identificadas a los seis meses.

DOCE MESES		
Vino	Especie	Cepas
VT	<i>Sacch. cheresiensis</i>	5
VEz	<i>Sacch. cheresiensis</i>	5
VVc	<i>Sacch. cheresiensis</i>	5
ViT	<i>Sacch. cheresiensis</i>	5
ViEz	<i>Sacch. cheresiensis</i>	5
ViVc	<i>Sacch. cheresiensis</i>	5
JT	<i>Sacch. cheresiensis</i>	5
JEz	<i>Sacch. cheresiensis</i>	3
	<i>Sacch. sp.</i>	1
	<i>sin clasificar</i>	1
JVC	<i>Sacch. cheresiensis</i>	3
	<i>Sacch. carlsbergensis</i>	2
MT	<i>Sacch. cheresiensis</i>	2
	<i>Sacch. rouxii</i>	1
	<i>Sacch. ellipsoideus</i>	2
MEz	<i>Sacch. cheresiensis</i>	3
	<i>Sacch. ellipsoideus</i>	1
	<i>Sacch. sp.</i>	1
MVC	<i>Sacch. cheresiensis</i>	3
	<i>Sacch. ellipsoideus</i>	2
VR1	<i>Sacch. cheresiensis</i>	1
	<i>Sacch. ellipsoideus</i>	3
	<i>sin clasificar</i>	1
VR2	<i>Sacch. cheresiensis</i>	4
	<i>Sacch. sp.</i>	1
VR3	<i>Sacch. ellipsoideus</i>	5
FVT	<i>Sacch. cheresiensis</i>	3
	<i>Sacch. ellipsoideus</i>	2
FVEz	<i>Sacch. cheresiensis</i>	2
	<i>Sacch. ellipsoideus</i>	2
	<i>Sacch. sp.</i>	1
FVVC	<i>Sacch. cheresiensis</i>	1
	<i>Sacch. ellipsoideus</i>	1
	<i>Sacch. carlsbergensis</i>	1
	<i>Sacch. sp.</i>	2
FMT	<i>Sacch. ellipsoideus</i>	3
	<i>Sacch. sp.</i>	1
	<i>sin clasificar</i>	1
FMEz	<i>Sacch. cheresiensis</i>	3
	<i>Sacch. ellipsoideus</i>	1
	<i>Sacch. chevalieri</i>	1
FMVC	<i>Sacch. cheresiensis</i>	3
	<i>Sacch. ellipsoideus</i>	2

Tabla IV.4 Especies identificadas a los doce meses.

A la vista de las figuras IV.14 y IV.15 y las tablas IV.3 y IV.4 se observa:

La población de levaduras disminuye con el tiempo en todas las muestras como es lógico, debido tanto a las características de los vinos como a la pérdida de nutrientes de este ecosistema con el paso del tiempo, ya que las levaduras presentes los van utilizando de forma continua, si no para su reproducción, si para mantener su capacidad vital, aun cuando esta sea mínima y no permita su viabilidad en todos los casos. Además las sustancias de reserva, como glucógeno, proteínas y grasa que se fueron acumulando durante la fermentación son consumidas y no repuestas, por lo que puede llegar la muerte. A todos estos factores limitantes debe añadirse la ralentización metabólica que implica el mantenimiento de los vinos a 3 °C que es una temperatura alejada de la correspondiente al crecimiento óptimo de estos microorganismos.

Todas las levaduras identificadas pertenecen al género *Saccharomyces*, lo cual está de acuerdo con la resistencia natural que estas levaduras presentan a elevadas concentraciones de etanol y bajo pH.

En ninguna de las muestras tratadas con anhídrido sulfuroso (25 ppm) se aíslan levaduras viables, aunque se aprecien por observación microscópica en fresco, lo que pone de manifiesto una vez mas el poder desinfectante que presenta este compuesto frente a estos microorganismos.

Al cabo de doce meses, tanto en las muestras varietales tratadas con enzimas pectolíticos como en las adicionadas con vitamina C y ácido cítrico, se observa mayor población que en los vinos testigo. El stock vitamínico del vino, además de contribuir a definirlo como alimento, representa un importante capítulo de factores de crecimiento, que además de activar la fermentación, puede alargar en casos como este, la fase estacionaria. En el caso de vinos obtenidos de mezclas y de fangos, la población residual es similar a la encontrada en el testigo.

Se identifican nueve especies pertenecientes todas al género *Saccharomyces*; a los seis meses se observan *Sacch. oviformis*, *Sacch. fructuum* y *Sacch. exiguus* que no se encuentran a los doce meses, mientras que en este período se aprecian *Sacch. rouxii*, *Sacch. chevalieri* y *Sacch. sp.* que no aparecen en el primero. Las especies comunes a los dos muestreos son *Sacch. ellipsoideus*, *Sacch. carlsbergensis* y *Sacch. cheresiensis*.

En las muestras tomadas a los seis meses no se detecta la presencia de ninguna cepa de levadura formadora de velo en vinos, aunque todas las identificadas son altamente alcoholígenas; a los doce meses aunque también se identifican levaduras no filmógenas la mayoría de las cepas presentes pertenecen a levaduras formadoras de velo, tenemos pues que de las seis especies presentes a los doce meses, cuatro (75 cepas de un total de 105) son claramente formadoras de velos en la superficie de los vinos *Sacch. cheresiensis*, *Sacch. rouxii*, *Sacch. chevalieri* y *Sacch. sp.*, esta última es una especie formadora de velo pero que no

concuerta en sus aspectos fisiológicos con las conocidas, esto nos induce a pensar que puede tratarse de una especie filmógena propia de la zona de Rueda.

Es de destacar que a los seis meses la especie predominante es *Sacch. oviformis* con 64 cepas, que corresponden al 61%, seguida por *Sacch. ellipsoideus* con 29 cepas, que es el 27,6%. A los doce meses no se observa la presencia de ninguna cepa de *Sacch. oviformis*, que ha sido reemplazada por *Sacch. cheresiensis*, mayoritaria en este período, con 66 cepas que representan el 62,9%. Sin embargo *Sacch. ellipsoideus* si esta presente a los doce meses, con 24 cepas que corresponden al 22,9%. Si tenemos en cuenta el número total de cepas aisladas en los dos muestreos tenemos que *Sacch. cheresiensis* representa el 31,9%, *Sacch. oviformis* un 30,5% y *Sacch. ellipsoideus* el 24,2%, aún cuando como se ha comentado anteriormente, esta última, está presente en los dos momentos de conservación estudiados.

La versatilidad de los equipos enzimáticos de las especies filmógenas (*Saccharomyces cheresiensis*) debe contribuir también a una mejor resistencia a condiciones fisicoquímicas adversas, que lógicamente aumentan en el vino con el paso del tiempo.

En la tabla IV.5 se presentan número de cepas y porcentajes de las levaduras residuales identificadas.

Tabla IV.5

## LEVADURAS RESIDUALES

ESPECIES	Seis meses		Doce meses		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>Sacch. oviformis</i>	64	61			64	30,5
<i>Sacch. ellipsoideus</i>	29	27,6	24	22,9	53	25,2
<i>Sacch. carlsbergensis</i>	8	7,6	3	2,85	11	5,2
<i>Sacch. fructuum</i>	2	1,9			1	0,5
<i>Sacch. exiguus</i>	1	0,95			1	0,5
<i>Sacch. cheresiensis</i>	1	0,95	66	62,9	67	31,9
<i>Sacch. sp</i>			7	6,6	7	3,3
<i>Sacch. rouxi</i>			1	0,95	1	0,5
<i>Sacch. chevalieri</i>			1	0,95	1	0,5
Sin clasificar			3	2,85	3	1,45

5.- CONCLUSIONES

- 1.- En los mostos se han identificado once especies de levaduras que pertenecen a seis géneros; tres de ellos esporulados. En la variedad Jerez se encuentran los seis géneros, mientras que en Verdejo se aíslan únicamente cuatro.
- 2.- Se comprueba que los agentes de fermentación de las vinificaciones varietales de Verdejo y Jerez presentan un esquema secuencial de levaduras en fases bien definidas en las que son especies dominantes:  
*Kloeckera apiculata*, *Torulaspóra rosei* y *Saccharomyces ellipsoideus*

- 3.- Al comparar las fermentaciones, también se comprueba que la duración de la fermentación es menor y el poder fermentativo superior cuando se induce por acción de la secuenciación de levaduras seleccionadas.
- 4.- Se aísla una especie de *Saccharomyces* formadora de velo, que tras la realización de las pruebas de clasificación no se corresponde con ninguna de las conocidas.
- 5.- La evolución de la población de levaduras sigue en el tiempo una pauta descendente, siendo *Saccharomyces oviformis* y *Saccharomyces ellipsoideus* las especies más resistentes a factores limitantes.
- 6.- La población de levaduras residuales presente en vinos de la variedad Jerez es muy superior a la encontrada en el resto de los vinos.
- 7.- A los seis meses de conservación no se identifican levaduras filmógenas, mientras que a los doce son mayoritarias.
- 8.- De acuerdo con los resultados experimentales obtenidos, dosis de 25 ppm de anhídrido sulfuroso ejercen un marcado efecto antiséptico aunque no microbicida.

9.- La acción de enzimas pectolíticos y de ácido ascórbico y ácido cítrico induce una mayor población en los vinos adicionados con estos compuestos que en los vinos testigo, ello podría ser debido a una variación de la pendiente de la fase estacionaria como consecuencia de la utilización de esas moléculas.

V. -

ESTUDIO DE COMPUESTOS FENÓLICOS



## 1.- CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.

### 1.1.- Introducción.

Para la separación e identificación de los distintos compuestos fenólicos se utilizan diferentes soportes, eluyentes y reveladores, pudiéndose realizar separaciones mono y bidimensionales. La visualización de las manchas que aparecen en las cromatoplasmas se lleva a cabo por observación directa a la luz solar o ultravioleta de 254 y 360 nm y utilizando los reveladores adecuados para poner de manifiesto los compuestos a identificar.

Hernandez (1980) desarrolla un método bidimensional para catequinas que consiste en eluir primeramente con ácido acético al 2% y posteriormente, en la segunda dimensión, con cloruro potásico al 20% sobre placas de celulosa MN 300, el revelado es con vainillina clorhídrica.

Gomez-Cordovés y col. (1978) ponen a punto un método de cromatografía bidimensional con el que consiguen separar dieciocho compuestos fenólicos de bajo peso molecular en holandas envejecidas. Utilizan como eluyentes ácido fórmico al 2% en la primera dimensión, e isopropanol/amoníaco/agua (8:1:1) en la segunda, el revelado se consigue por observación a la luz UV a 254 y 360 nm tras pulverizar con acetato básico de plomo (aldehidos y ácidos cinámicos), posteriormente se pulveriza con p-nitroanilina diazotada y se pueden apreciar ácidos fenol carboxílicos, fenoles y compuestos heterocíclicos.

## 1.2.- Materiales y métodos.

La preparación de las cromatoplasmas es la siguiente: una suspensión acuosa que contiene 15% de polvo de celulosa MN 300, se homogeneiza 30-60 segundos con un mezclador eléctrico, posteriormente se coloca esta suspensión en el extendedor y con el se cubren las placas de cristal (tamaño 20x20) de forma que sobre ellas se deposite la celulosa con un grosor de 0,5 mm. Las placas de celulosa pueden secarse al aire. No es necesario activarlas a alta temperatura.

### 1.2.1.- Eluyentes.

Se utilizaron dos sistemas en doble dimensión, A y B eluyendo 15 cm, con 1 en la primera dimensión y tras secado de la cromatoplasma, con 2 en la segunda.

#### Sistema A:

1 - Acido fórmico al 2%.

2 - Isopropanol/Hidróxido amónico/agua 8/1/1. (V/V/V)

#### Sistema B:

1 - Acido acético al 2%.

2 - Cloruro potásico al 20%.

En el sistema B se reseñan únicamente los R<sub>f</sub> de los compuestos que en el sistema A pueden resultar dudosos en el análisis de muestras muy complejas. Tablas V.1 y V.2.

Rfx100 de las sustancias patrón en los distintos eluyentes		
Patrones	A1	A2
Ac. cafeico	24	17
Esculetina	32	35
Ac. ferúlico trans	28	37
Ac. p-cumárico trans	33	45
Ac. gálico	40	1
Ac. protocatéquico	48	1
Ac. vainillínico	54	32
Ac. p-OH benzoico	58	42
Ac. clorogénico	50	7
Ac. ferúlico cis	58	45
Ac. p-cumárico cis	68	48
Siringaldehido	58	53
Ald. p-vainillina	65	64
p-OH benzaldehido	70	76
Ac. $\alpha$ -resorcílico	51	28
Tirosol	89	88
Triptofol	59	90
Ac. salicílico	63	75
Ac. p-OH fenilacético	86	54
Ac. gentísico	52	62
Ac. p-OH fenilpropionico	81	60

Tabla V.1 Rf de patrones en el sistema A

Rfx100 de las sustancias patrón en los distintos eluyentes		
Patrones	B1	B2
Ac. gálico	45	42
Catequina	51	32
Epicatequina	40	27
Triptofol	60	41

Tabla V.2 Rf de patrones en el sistema B

### 1.2.2.- Reveladores. (Tabla V.3)

- Observación de la fluorescencia a la luz ultravioleta a 254 y 360 nm. Materias tanoides y ácidos fenólicos.
- Fluorescencia a la luz ultravioleta tras la impregnación con vapores de amoníaco. Ácidos cinámicos, cumarinas, flavonoles y esteres cinámicos.
- Acetato básico de plomo al 25%. Aldehidos, ácidos cinámicos y glicosidos de ácidos.
- p-nitroanilina diazotada. Ácidos fenol-carboxílicos, fenoles, aminas y compuestos heterocíclicos. La preparación es: 2 ml de p-nitroanilina al 0,5% en ácido clorhídrico 2N + 8 ml de acetato sódico al 5%, más 2-3 gotas de nitrito sódico al 2%, se deja diazotar y se pulveriza. Las reacciones que tienen lugar en el revelado están basadas en la copulación de los ácidos fenólicos con las sales de diazonio, con formación de colorantes azoicos. Para mantener y exaltar el color se pulveriza con carbonato sódico al 15%.
- p-vainillina clorhídrica. Catequinas. p-vainillina al 0,1% en ácido clorhídrico al 70%. Para conseguir la coloración es necesario calentar la placa después de pulverizar.
- Catequina. Aldehidos fenólicos y algunos indoles. D-catequina 0,4 g + 50 ml de acetona + 50 ml de ácido sulfúrico 1/3 (V/V). Después de pulverizar se calienta la placa. El revelado se basa en la reacción de los grupos carbonilo de los aldehidos aromáticos con sustituyentes orto y para con el anillo A de la D-catequina.

Tabla V.3  
Coloración de las sustancias patrón con los reveladores.

Patrones	A	B
Ac. cafeico	amarillo	pardo azulado
Esculetina	amarillo verdoso	-
Ac. ferúlico trans	azul claro	azul claro
Ac. p-cumárico trans	azul malva	azul oscuro
Ac. gálico	naranja	amarillo
Ac. protocatéquico	oscuro	morado
Ac. vainillínico	azul claro	morado
Ac. p-OH benzoico	oscuro	rosa
Ac. clorogénico	amarillo	-
Ac. ferúlico cis	azul claro	azul claro
Ac. p-cumárico cis	azul malva	azul oscuro
Siringaldehido	amarillo naranja	(rosa) *
Ald. p-Vainillina	verde claro	(morado) *
p-OH benzaldehido	verde turquesa	(beige) *
Ac. $\alpha$ -resorcílico	-	amarillo naranja
Tirosol	oscuro	morado
Triptofol	oscuro	blanco
Ac. salicílico	violeta pálido	-
Ac. p-OH fenilacético	oscuro	morado
Ac. gentísico	azul	-
Ac. p-OHfenilpropionico	oscuro	morado
Feruroil tartrato	verde	-
p-cumaroil tartrato	morado	-
Malva	malva	-

A = Acetato básico de plomo    B = p-nitroanilina diazotada

\* = Catequina

La figura V.1 muestra una cromatoplaaca tipo con los compuestos más comúnmente presentes en vinos blancos.

- |                           |                                   |
|---------------------------|-----------------------------------|
| 1 Acido cafeico           | 13 Siringaldehido                 |
| 2 Esculetina              | 14 p-vainillina                   |
| 3 Acido trans-ferúlico    | 15 p-hidroxibenzaldehido          |
| 4 Acido trans-cumárico    | 16 Acido $\alpha$ -resorcílico    |
| 5 Acido gálico            | 17 Tirosol                        |
| 6 Acido protocatéquico    | 18 Triptofol                      |
| 7 Acido vainillínico      | 19 Acido salicílico               |
| 8 Acido p-hidroxibenzoico | 20 Acido p-fenilacético           |
| 9 Caferoil tartrato       | 21 Acido gentísico                |
| 10 Feruroil tartrato      | 22 Acido p-hidroxifenilpropionico |
| 11 Acido cis-ferúlico     | 23 Acido m-hidroxibenzoico        |
| 12 Acido cis-cumárico     | 24 p-cumaroil tartrato            |

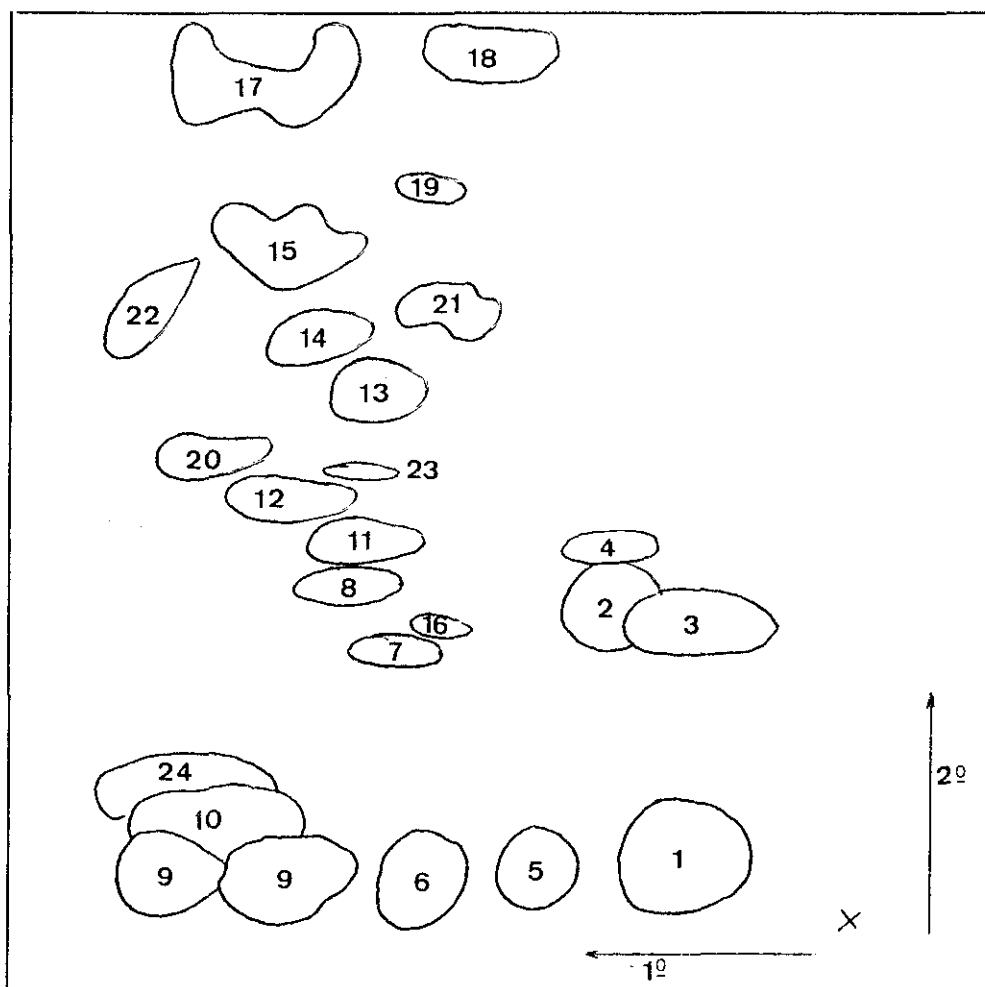


Figura V.1

Cromatoplaca tipo

### 1.3.- Preparación de las muestras para CCF y CLAE.

Se concentran 100 ml de muestra a presión reducida y a 35°C hasta un volumen de 25 ml utilizando un rotavapor.

La extracción de los compuestos fenólicos se realiza en ampolla de decantación utilizando éter etílico.

En el embudo de agitación se ponen 15 ml de éter etílico y los 25 ml del concentrado de la muestra, se agita durante un minuto, se deja decantar para conseguir la separación de las dos fases y se retira entonces la fase etérea, en la que se encuentran los compuestos fenólicos, la fase acuosa es tratada de nuevo con 15 ml de éter etílico, se procede de esta forma un total de cuatro veces.

A las fracciones etéreas reunidas en un erlenmeyer se le agregan unos gramos de sulfato sódico anhidro ( $\text{SO}_4\text{Na}_2$ ) para eliminar el agua que pueda existir, se deja reposar durante 30 minutos como máximo, para evitar salificaciones y se filtra.

El filtrado se concentra a sequedad a presión reducida y 35°C; se recoge con 2 ml de metanol/agua al 50%.

Las muestras así preparadas se colocan en viales, que pueden ser guardados en congelador, hasta el momento del procesamiento de las mismas.

Debe tenerse en cuenta que durante el proceso de concentración en rotavapor se están sometiendo sustancias inestables y muy reactivas a una temperatura de 35°C, por ello es importante que el rotavapor funcione de forma correcta para que el tiempo utilizado en la concentración de las muestras sea corto y aproximadamente el mismo en todos los casos. Por tanto la extracción en continuo, mediante el aparato de Soxhlet, dada la reactividad de los compuestos fenólicos provoca, durante la preparación de las muestras, reacciones de degradación, isomerización o polimerización fácilmente, debido a que la muestra se somete durante largo tiempo (2-3 horas) a una temperatura de 40-50°C (Diez 1989, Fernandez de Simon y col. 1990).

#### 1.4.- Resultados y discusión.

La observación visual de las cromatoplasmas a la luz ultravioleta a diferentes longitudes de onda, antes y después del revelado, permite apreciar, aunque de una manera subjetiva, la mayor o menor cantidad de los diferentes compuestos presentes en la muestra analizada, en todos los casos 30 µl, de esta manera se han confeccionado las tablas a las que nos remitiremos en los párrafos siguientes, en ellas figuran con + la cantidades apreciadas, con tr aquellos casos en que la cantidad es tan pequeña que solo se observa muy debilmente la presencia de la mancha correspondiente al compuesto en la cromatoplasma, y en blanco cuando no se observa el compuesto investigado.

#### 1.4.1.- Mostos

En la tabla V.4 están representados los compuestos presentes en las cromatoplasmas de estas muestras, las figuras V.2 y V.3 exponen las correspondientes a dos mostos.

Comparando con la variedad Jerez se comprueba que este último mosto tiene mayor porcentaje de siringaldehído y p-OH benzaldehído, así como p-cumárico trans, igualmente se observa la presencia de  $\alpha$ -resorcílico que no se observaba en Verdejo.

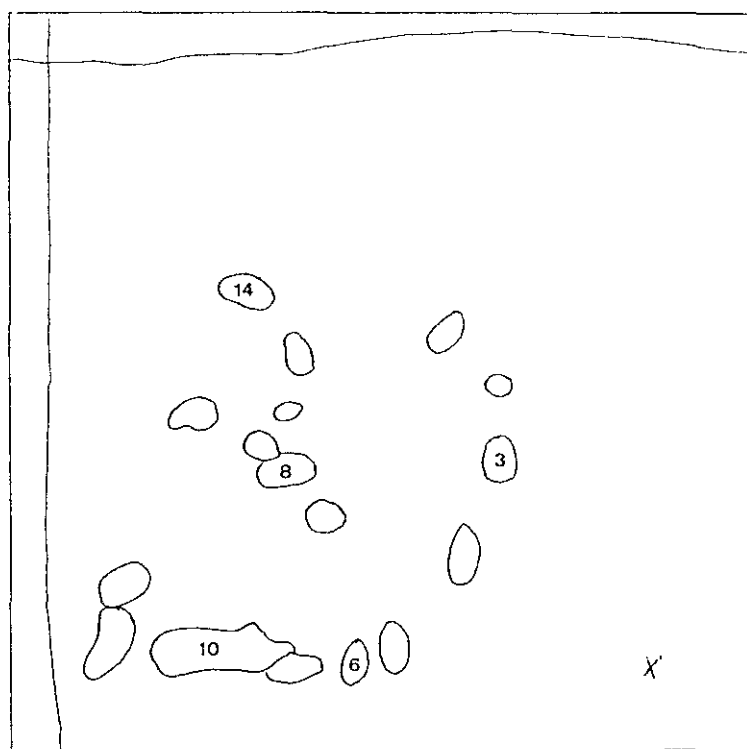


Figura V.2 Mosto de Verdejo

MOSTOS			
COMPUESTO	J	Ve	Vef
Ac. Cafeico	+		tr
Ac. Protocatéquico	++	+	+
Feruroil tartrato	+	+++	+++
p-cumaroil tartrato	+++		
Ac. Vainillínico	++	+	+
Ac. 4 OH benzoico	+++	++	++
Ferúlico cis			
Ferúlico trans	+	+	+
p-cumárico cis			
p-cumárico trans	++		
Malva	+	+	tr
Ac. p-OH fenilacético			
Siringaldehido	++		
p-OH benzaldehido	++		
p-vainillina	++	tr	tr
Tirosol			
Triptofol			
Esculetina			
Ac. $\alpha$ -resorcílico	++		
3,4 OH benzaldehido	+		
Gentísico			

Tabla V.4

Compuestos presentes en las cromatoplasmas de los mostos Jerez y Verdejo filtrado y sin filtrar.

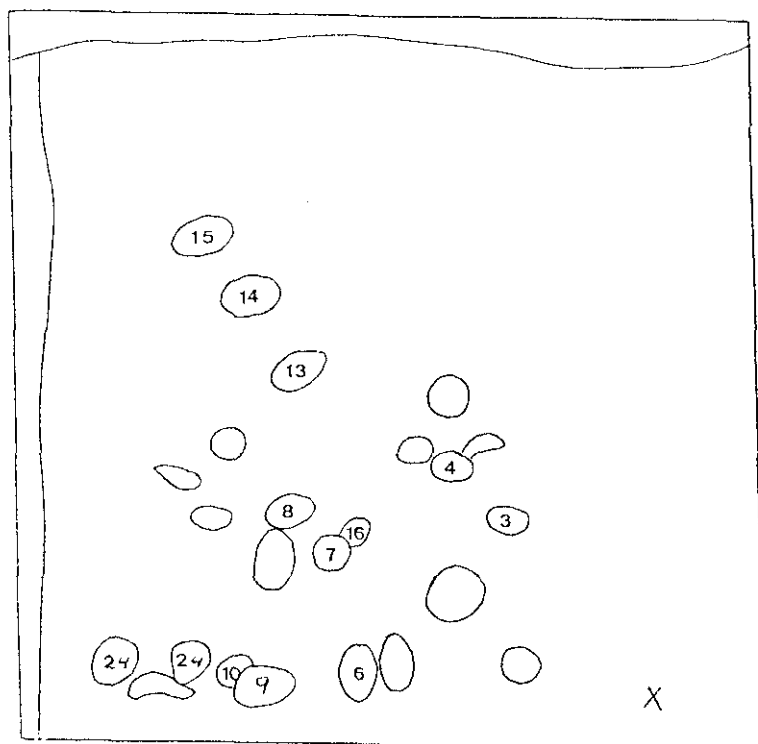


Figura V.3 Mosto de Jerez

#### 1.4.2.- Fermentados de los mostos de la variedad Jerez.

Como puede apreciarse en la tabla V.5 lo más notable es la disminución de siringaldehído en relación al mosto de partida, y la aparición del isómero cis del ácido p-cumárico, así mismo el aumento del ácido cafeico en diferente proporción en función de la fermentación realizada y la presencia de la esculetina, cumarina correspondiente a este mismo ácido.

En las fermentaciones efectuadas con levaduras seleccionadas quedan restos de siringaldehído, cosa que no sucede cuando la

FERMENTADOS DE MOSTO JEREZ			
COMPUESTO	Jeesp	J3	J+R
Ac. Cafeico	++	+	++++
Ac. Protocatéuico	++	+++	+++
Feruroil tartrato	++	++	++
p-cumaroil tartrato	+++	+++	+++
Ac. Vainillínico	++	++	++
Ac. 4OH benzoico	++	++	++
Ferúlico cis		+	+
Ferúlico trans	++	++	+
p-cumárico cis	++	++	++
p-cumárico trans	++	++	++
Malva	+	++	++
Ac. p-OH fenilacético	+	tr	tr
Siringaldehido		tr	tr
p-OH benzaldehido	+	+	+
p-vainillina	+	+	+
Tirosol	++	+	++
Triptofol	tr	+	++
Esculetina		++	
Ac. $\alpha$ -resorcílico	++	++	++
3,4 OH benzaldehido			+
Gentísico			+

Tabla V.5

Compuestos presentes en las cromatoplasmas de los fermentados de la variedad Jerez.

fermentación es espontánea (la figura V.4 es la cromatoplaaca correspondiente a esta última fermentación); y solo cuando se ha realizado con las levaduras utilizadas en bodega se detecta la presencia de ácido salicílico y gentísico.

Las fermentaciones espontánea y con levaduras de la colección del I.F.I. son más parecidas entre sí que si se compara la primera con la llevada a cabo con las levaduras seleccionadas utilizadas en bodega.

#### 1.4.3.- Fermentados de los mostos de la variedad Verdejo.

1.4.3.1.- Fermentación espontánea (Veesp), con tres levaduras de la colección del I.F.I. (Ve3), con tres levaduras autóctonas utilizadas en bodega (Ve+R), con tres levaduras de la colección del I.F.I. sobre mosto filtrado (Vef3).

Las diferencias entre los vinos obtenidos mediante las diferentes fermentaciones son más pronunciadas que en la variedad Jerez. En la tabla V.6 se observa el resultado del examen cualitativo de las cromatoplaacas correspondientes, y en las figuras V.5, V.6 y V.7, la representación de las mismas.

FERMENTADOS DE MOSTOS VERDEJO				
COMPUESTO	Veesp	Ve3	Ve+R	Vef3
Ac. Cafeico	++			+++
Ac. Protocatéquico	+		+	++
Feruroil tartrato	+++	+++	++	+
p-cumaroil tartrato				
Ac. Vainillínico	++	++	+	++
Ac. 4OH benzoico	++	++	++	+
Ferúlico cis				+++
Ferúlico trans	++	++	++	++++
p-cumárico cis	+		++	+++
p-cumárico trans	+	tr	+	++
Malva	+	+	++	+
Ac. p-OH fenilacético				
Siringaldehido				
p-OH benzaldehido	+			tr
p-vainillina	tr			tr
Tirosol	+++	+++	+++	+++
Triptofol	++	++	++	+
Esculetina	+	+	tr	++
Ac. $\alpha$ -resorcílico				
3,4 OH benzaldehido				
Gentísico			+	+

Tabla V.6

Compuestos presentes en las cromatoplasmas de los fermentados de la variedad Verdejo de forma espontánea o por inducción con tres levaduras.

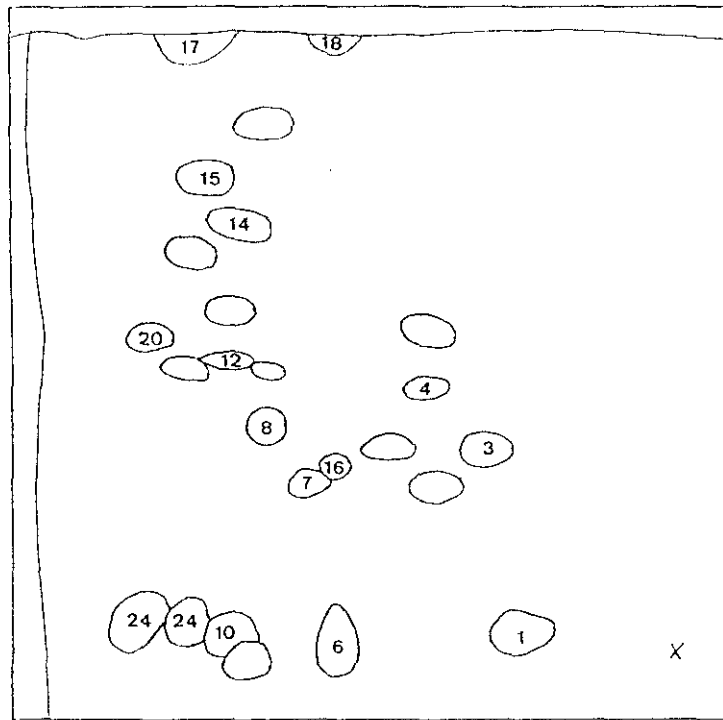


Figura V.4 Fermentación espontánea de Jerez

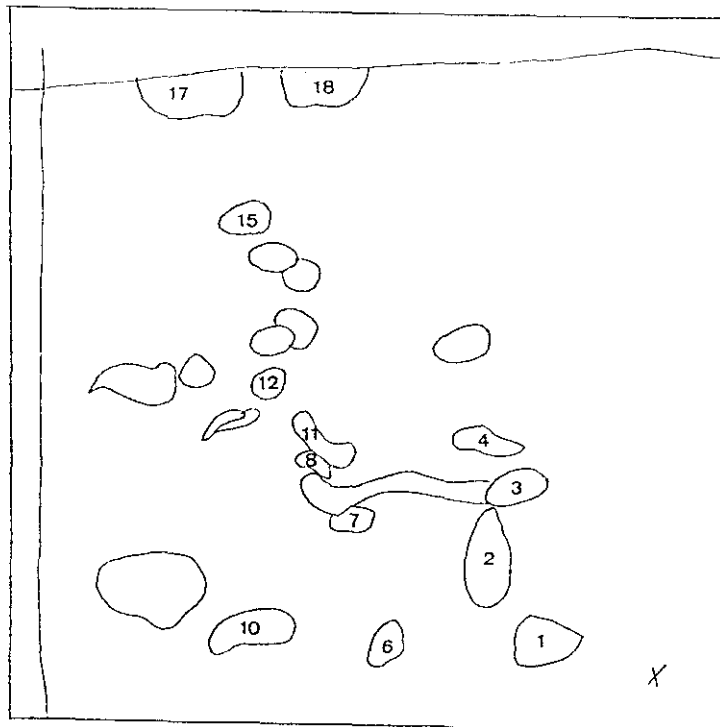


Figura V.5 Fermentación espontánea de Verdejo

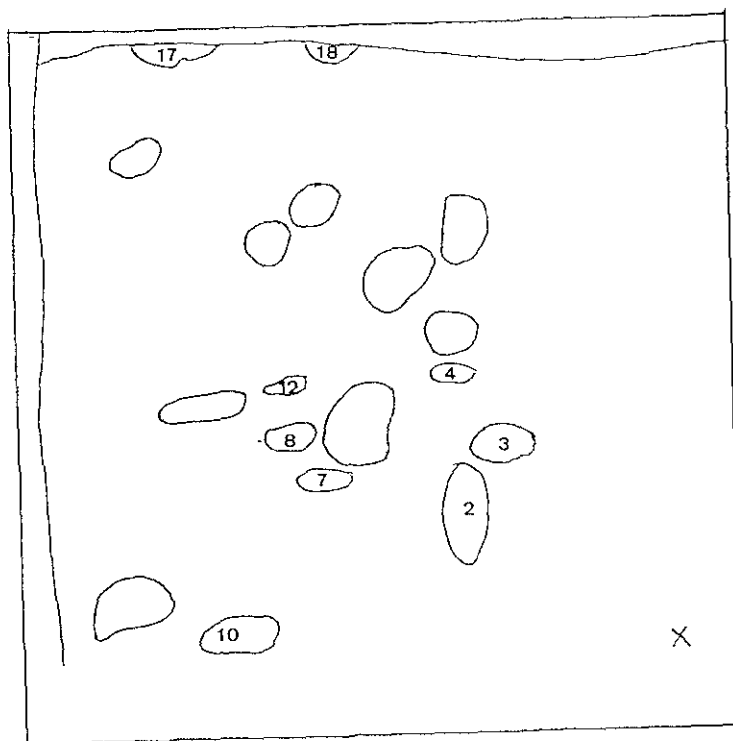


Figura V.6 Fermentación de Verdejo con levaduras de la colección del I.F.I.

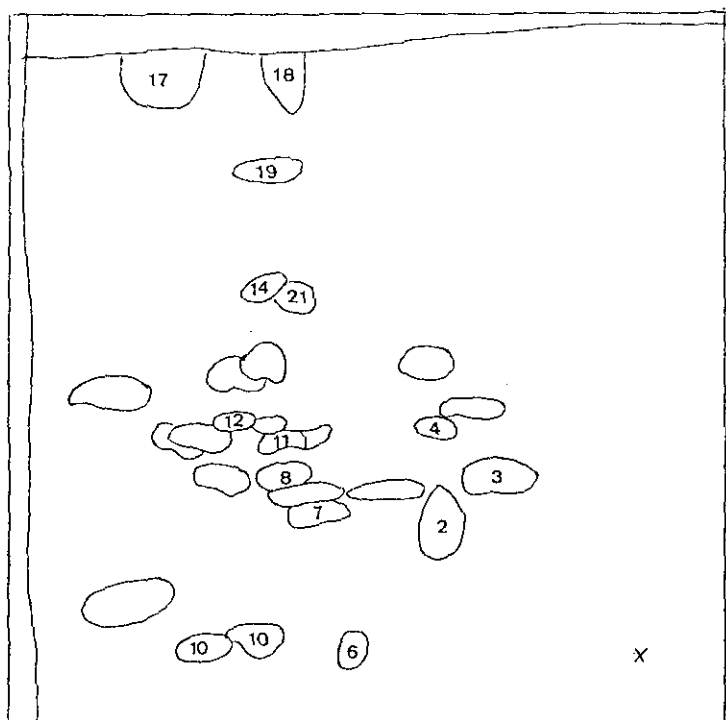


Figura V.7 Fermentación de Verdejo con levaduras de bodega

Una vez más, se observa la presencia de gentisico y salicílico en la fermentación realizada por las levaduras de bodega y no en las otras.

Cuando la fermentación se realiza sobre mosto filtrado, la semejanza con la espontánea es mayor que para el mosto sin filtrar, ya que se aprecia, como en la espontánea la presencia de compuestos hidroxilados que no se detectan en tan gran variedad en el fermentado debido a las levaduras de bodega.

1.4.3.2.- Fermentaciones con levaduras de la colección del I.F.I. sobre mosto filtrado y sin filtrar (VeKl, VeTsp, VeSacch, VefKl, VefTsp, VefSacch) y con levaduras de bodega sobre mosto sin filtrar.

En las tablas V.7a, V.7b y V.8 se muestran los resultados de estos fermentados, en las primeras figuran los datos correspondientes a levaduras de la colección del I.F.I. y en la tercera a las levaduras autóctonas empleadas en bodega.

En las figuras V.8 y V.9 están representadas dos cromatoplasmas de estos fermentados.

FERMENTADOS DE MOSTO VERDEJO SIN FILTRAR CON LEVADURAS DE LA COLECCION DEL I.F.I.			
COMPUESTO	VK1	VTsp	VSacch
Ac. Cafeico	+++	+++	++++
Ac. Protocatéuico	+	++	+
Feruroil tartrato	+++	+++	++
p-cumaroil tartrato	tr	tr	tr
Ac. Vainillínico	++	++	++
Ac. 4OH benzoico	+++	++	++
Ferúlico cis		++	
Ferúlico trans	++	+++	+++
p-cumárico cis	++	++	
p-cumárico trans	+	++	++
Malva	++	++	++
Ac. p-OH fenilacético			
Siringaldehido			
p-OH benzaldehido			
p-vainillina		tr	
Tirosol	++++	+++	++++
Triptofol	+++	+++	++
Esculetina	tr	tr	tr
Ac. $\alpha$ -resorcílico			
3,4 OH benzaldehido			
Gentísico		+	

Tabla V.7a

Compuestos presentes en las cromatoplasmas de los fermentados de Verdejo con levaduras de la colección del I.F.I.

FERMENTADOS DE MOSTO VERDEJO FILTRADO CON LEVADURAS DE LA COLECCION DEL I.F.I.			
COMPUESTO	VfK1	VfTsp	VfSacch
Ac. Cafeico	++	++	++
Ac. Protocatéuico	++	++	+++
Feruroil tartrato	++	++	++
p-cumaroil tartrato	tr	tr	tr
Ac. Vainillínico	+	++	+
Ac. 4OH benzoico	++	+	+
Ferúlico cis	tr	tr	tr
Ferúlico trans	+++	++++	++
p-cumárico cis	+	++	tr
p-cumárico trans	++	++	tr
Malva	+	+	+
Ac. p-OH fenilacético	+	+	
Siringaldehido			
p-OH benzaldehido			
p-vainillina			
Tirosol	+++	+++	+++
Triptofol		+++	
Esculetina	++	++	++
Ac. $\alpha$ -resorcílico			
3,4 OH benzaldehido			
Gentísico			

Tabla V.7b

Compuestos presentes en las cromatoplasmas de los fermentados de Verdejo filtrado con levaduras de la colección del I.F.I.

FERMENTADOS DE MOSTO VERDEJO CON LEVADURAS DE BODEGA			
COMPUESTO	Ve+R1	Ve+R2	Ve+R3
Ac. Cafeico	+++	++	
Ac. Protocatéquico	+	+	+
Feruroil tartrato	++	+++	++
p-cumaroil tartrato			
Ac. Vainillínico	+++	++	+
Ac. 4OH benzoico	++	+	+
Ferúlico cis	+		+
Ferúlico trans	++	+	+
p-cumárico cis	+	++	++
p-cumárico trans	+		+
Malva	+	+	++
Ac. p-OH fenilacético		+	+
Siringaldehido			
p-OH benzaldehido			
p-vainillina	+	+	+
Tirosol	+++	+++	+++
Triptofol	+++	+++	+++
Esculetina	tr	tr	tr
Ac. $\alpha$ -resorcílico			+
3,4 OH benzaldehido			
Gentísico			

Tabla V.8

Compuestos presentes en las cromatoplasmas de los fermentados de Verdejo con levaduras de bodega.

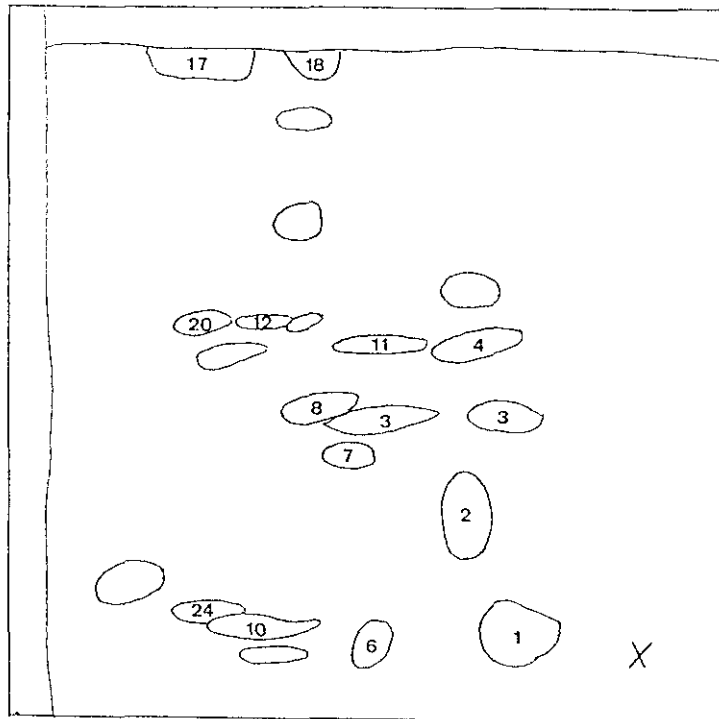


Figura V.8 Fermentación de Verdejo filtrado con *Kloeckera apiculata*

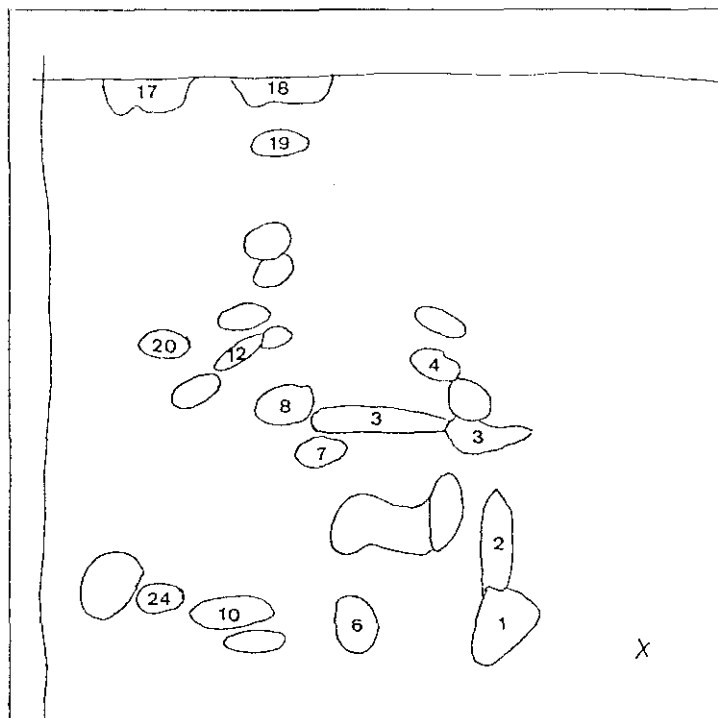


Figura V.9 Fermentación de Verdejo filtrado con *Torulaspora rosei*

*Kloeckera apiculata* produce una superior concentración de ácido p-OH benzoico, tanto cuando se partió de mosto filtrado como sin filtrar, que *Torulaspota rosei* y sobre todo que *Saccharomyces ellipsoideus*, esto mismo se aprecia, aunque menos evidentemente, cuando la fermentación se realiza con R1, levadura de primera fase utilizada en bodega.

Al comparar entre los mostos y los diversos fermentados observamos que en los mostos la presencia de compuestos de pequeño peso molecular es muy escasa, pues según se deduce de lo expuesto, la mayor parte de ellos son metabolitos secundarios de la fermentación.

#### 1.4.4.- Vinos elaborados en las bodegas de Nava del Rey.

##### 1.4.4.1.- Vinos varietales de Verdejo (VT, VS, VEz, VVc).

En la tabla V.9 se indica presencia y cantidad de compuestos apreciados en las cromatoplasmas correspondientes, tanto a los seis como a los doce meses de conservación de los vinos a 4 °C y en oscuridad.

Ejemplo de las cromatoplasmas de estos vinos son las figuras V.10 (vino Verdejo con enzimas a los seis meses), V.11 (vino Verdejo con enzimas a los doce meses) y V.12 (vino Verdejo testigo a los doce meses).

VINOS DE VERDEJO					
COMPUESTO	MESES	TRATAMIENTO			
		T	S	Ez	Vc
Ac. cafeico	6	++	tr	+++++	++
	12	+++	+++++	+++++	+++
Ac. protocatéuico	6	+	+	+++	++
	12	+++	+++	++++	++
Feruroil tartrato	6	+	+++	+++	+++
	12	++++	++++	+++	+++++
p-cumaroil tartrato	6	+	+	+	++
	12	+	+++	++	++++
Ac. vainillínico	6	+	+	+	+
	12	+++	++	++	+++
Ac. 4-OH benzoico	6	+		+	++
	12	+++	+++	+++	++++
Ac. ferúlico cis	6	+		+	+
	12				+
Ac. ferúlico trans	6	+	+	+++	+
	12	++	+	+++	++
Ac. p-cumárico cis	6	+	+	++	++
	12	++	+++	+++	++
Ac. p-cumárico trans	6	+	+	++	+
	12	++	++	++	++
Malva	6	+	+++	+	+
	12	+	+	+++	++
Ac. p-OH fenil acético	6	+	+	+	tr
	12	++	+	++	+
Siringaldehido	6				
	12				
p-OH benzaldehido	6	+	+	+	tr
	12	+	+		
p-vainillina	6	+	+	tr	tr
	12	+	++		
Tirosoi	6	++	+	+++++	++
	12	+++++	+++++	++++	+++++
Triptofol	6	+	+	+++	++++
	12	++++	++++	++++	++++
Esculetina	6	+	+		
	12	++	+++	+++	
Ac. $\alpha$ -resorcílico	6				tr
	12	++	++	++	tr
Gentísico	6			+	+
	12	+	+	+	+
Salicílico	6				
	12	+			

Tabla V.9  
Compuestos presentes en las cromatoplas de los vinos  
varietales de Verdejo.

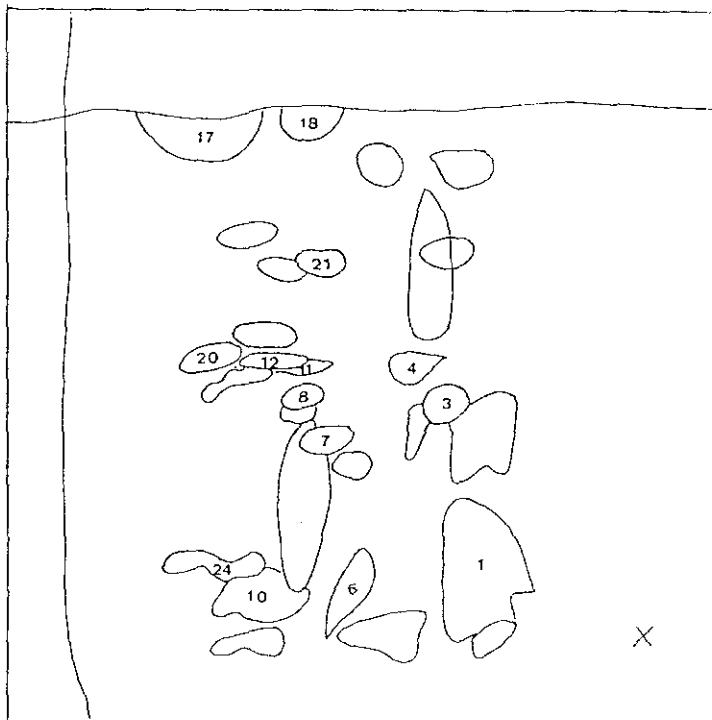


Figura V.10 Vino Verdejo con enzimas a los seis meses

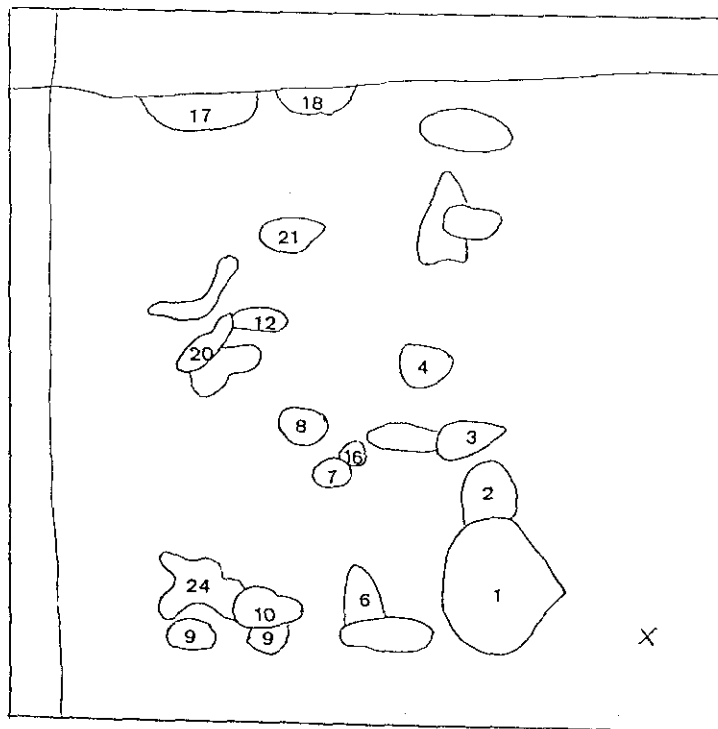


Figura V.11 Vino Verdejo con enzimas a los doce meses

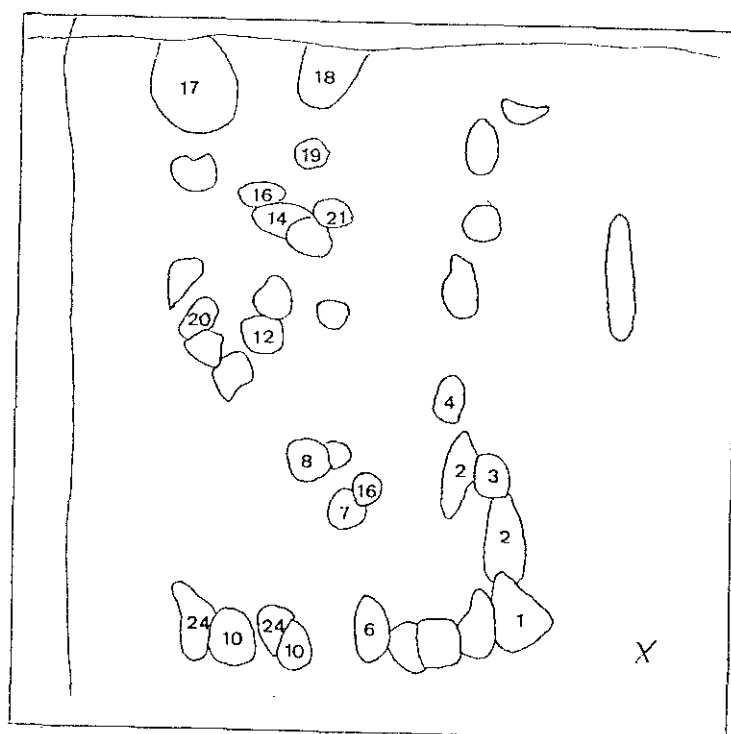


Figura V.12 Vino Verdejo testigo a los doce meses

A los seis meses de conservación solo en el vino testigo y en el adicionado con ácidos cítrico y ascórbico se observa la presencia de  $\alpha$ -resorcílico, mientras que a los doce meses está presente en los cuatro vinos.

El gentísico a los seis meses se detecta en el vino con enzimas y en el que contiene los ácidos, a los doce también se manifiesta su presencia en los otros dos.

La cantidad de ácido cafeico es muy superior en el vino tratado con enzimas pectolíticas tanto a los seis como a los doce meses.

Los vinos con enzimas y con ácidos presentan mayores proporciones de los isómeros cis - trans de los ácidos cinámicos, p-cumárico y ferúlico, a los seis meses, mientras que a los doce no se observa la forma cis del ácido ferúlico en el vino con enzimas. En el testigo y el que contiene sulfuroso las formas cis se encuentran en menor cantidad.

De la observación a los seis y doce meses, es destacable el aumento de los compuestos hidroxilados ( ácidos cafeico, gálico, protocatéquico, 4 OH benzoico, p-cumárico, p-OH fenilacético, tirosol y  $\alpha$ -resorcílico) durante la conservación; mientras que no se aprecia este aumento en los compuestos con grupos metoxilo.

#### 1.4.4.2.- Vinos varietales de Viura (ViT, ViS, ViEz, ViVc).

Los vinos de esta variedad presentan muy baja cantidad de ácido ferúlico, cuando se detecta, como se advierte en la tabla V.10.

Se observa la presencia de gentísico a los seis y doce meses en el vino con sulfuroso, así como trazas a los seis meses, en el que contiene cítrico y ascórbico.

VINOS DE VIURA					
COMPUESTO	MESES	TRATAMIENTO			
		T	S	Ez	Vc
Ac. cafeico	6		+		+++
	12		++++		
Ac. protocatéuico	6	+	+		++
	12		+++		
Feruroil tartrato	6	+	++	++	+++
	12	+++++	+++++	+++	++++
p-cumaroil tartrato	6		+		+
	12		++		tr
Ac. vainillínico	6		+	+	++
	12	++	++	++	+++
Ac. 4-OH benzoico	6	++	+	++	+++
	12	+++	++++	++++	++++
Ac. ferúlico cis	6				
	12		++	+	
Ac. ferúlico trans	6		tr		+
	12		+		
Ac. p-cumárico cis	6	+	+	++	++
	12	+	+	++++	++
Ac. p-cumárico trans	6	+	+	+++	+
	12	+	++	+++++	++
Malva	6	+	++	++	+
	12	++	+	+++	++
Ac. p-OH fenil acético	6	+	+	tr	+
	12	+	+	++	++
Siringaldehido	6				
	12				tr
p-OH benzaldehido	6	+	+	+	tr
	12	tr	tr	+	+
p-vainillina	6	+	+	+	tr
	12	++	+	+	+
Tirosol	6	++	++	+++++	++
	12	+++++	+++++	++++	+++++
Triptofol	6		+		+++
	12				
Esculetina	6	+	+		tr
	12		+++		
$\alpha$ -resorcílico	6	+	+	tr	+
	12	++	++	+++	+++
Gentísico	6				+
	12		+		
Salicílico	6				
	12				

Tabla V.10  
Compuestos presentes en las cromatoplas de los vinos univarietales de Viura.

El vino con enzimas presenta mayor contenido en ácido p-cumárico durante todo el período de conservación que los otros, aunque en todos se observa equilibrio entre las formas cis y trans de este ácido.

Los vinos de esta variedad muestran durante la conservación aumento en la cantidad de compuestos p-hidroxilados.

#### 1.4.4.3.- Vinos varietales de Jerez (JT, JS, JEz, JVC).

El número y cantidad de compuestos presentes en estos vinos y evidenciados mediante cromatografía en capa fina se muestra en la tabla V.11.

Las figuras V.13, V.14 y V.15 son cromatoplasmas de tres de los vinos de esta variedad.

En algún vino de esta variedad se observa la presencia de 3,4 OH benzaldehído, aunque no podemos relacionarlo con el período de conservación.

La concentración de ácidos cinámicos, en especial de p-cumárico y cafeico, es mayor que en los vinos de otras variedades, sobre todo en aquellos que contienen enzimas pectolíticos o ácidos cítrico y ascórbico.

El  $\alpha$ -resorcílico existe en todos los vinos de esta variedad.

## VINOS DE JEREZ

COMPUESTO	MESES	TRATAMIENTO			
		T	S	Ez	Vc
Ac. cafeico	6		++	+++++	++++
	12		++++		++++
Ac. protocatéquico	6	+	+		++
	12	+++	+++		+++
Feruroil tartrato	6	+	+	+++++	++++
	12	+++++	+++++	+++	++++
p-cumaroil tartrato	6	+	+	+++++	+++
	12	+	+	tr	++++
Ac. vainillínico	6		+	+	++
	12	+++	+++	++	++
Ac. 4-OH benzoico	6	+	+	+	+++
	12	+++	+++	++++	+++
Ac. ferúlico cis	6		+	+	tr
	12		++		+
Ac. ferúlico trans	6	+	+	+	+
	12		+		+
Ac. p-cumárico cis	6	++	+	+++	++
	12	++	+++	+++++	+++
Ac. p-cumárico trans	6	++	+	+++	+
	12	++	+	+++++	++
Malva	6	+	+	++	
	12	++	++	++	+
Ac. p-OH fenil acético	6	+	++	++	++
	12	++++	+	++	++
Siringaldehido	6				
	12			tr	
p-OH benzaldehido	6	+	+	tr	
	12	+	+	tr	
p-vainillina	6	+	+	tr	
	12	++	+	+	
Tirosoil	6	++	++	++	+++++
	12	+++++	+++++	++++	++
Triptofol	6		++	+++	+++++
	12		+++		+
Esculetina	6		+	tr	tr
	12		+++		++
Ac. $\alpha$ -resorcílico	6	+	+	+	tr
	12	++	++	+	++
Gentísico	6				
	12		+		
Salicílico	6	+			
	12	+	+	+	+

Tabla V.11  
Compuestos presentes en las cromatoplasmas de los vinos de la variedad Jerez.

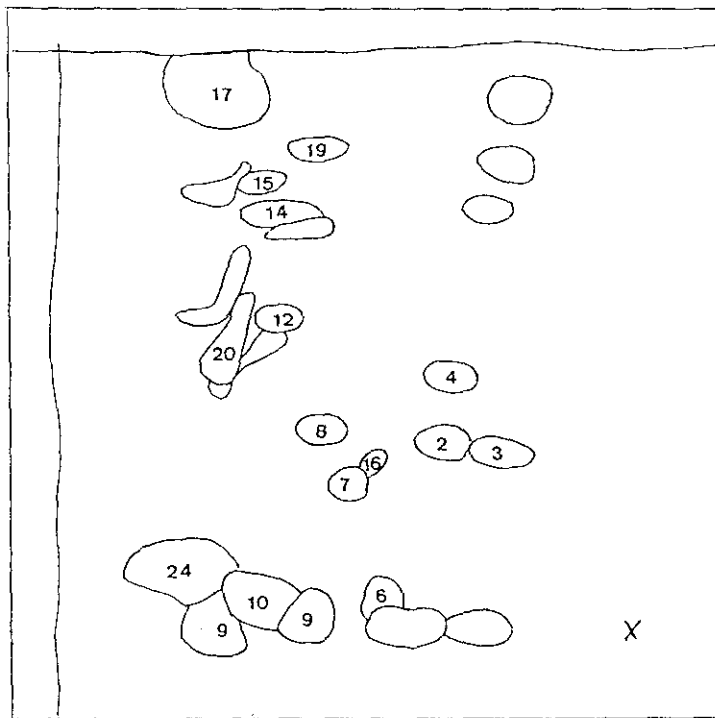


Figura V.13 Vino Jerez testigo a los doce meses

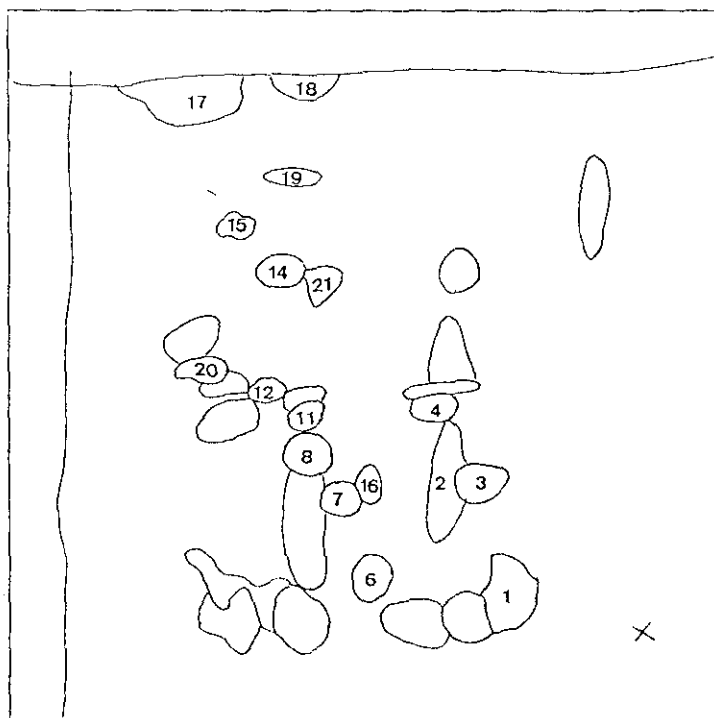


Figura V.14 Vino Jerez con sulfuroso a los doce meses

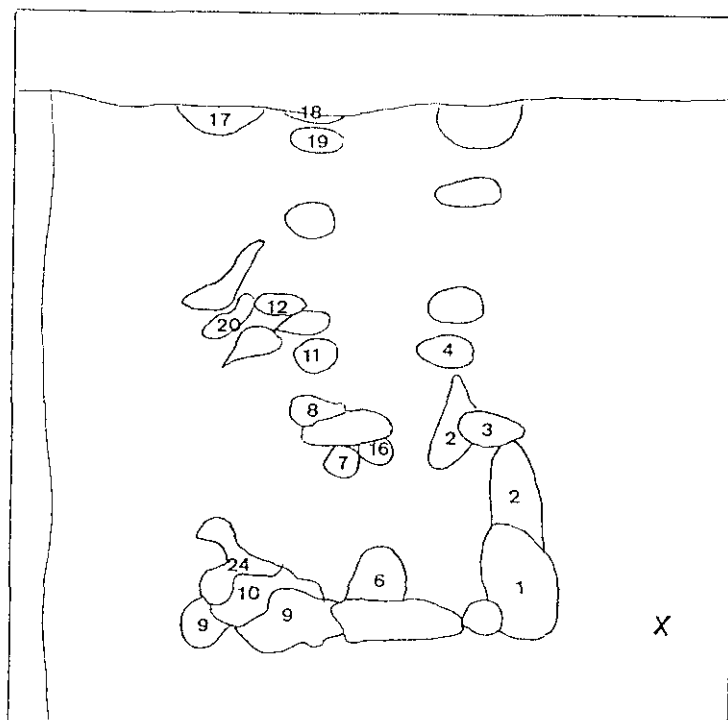


Figura V.15      Vino Jerez con cítrico y ascórbico a los doce meses

Es la variedad que presenta mayor diversidad de aldehidos (p-vainillina, p-OH benzaldehido y 3,4 OH benzaldehido).

Los compuestos p-hidroxilados aumentan con la conservación.

1.4.4.4.- Vinos de la mezcla de variedades (MT, MS, MEz, MVC).

La tabla V.12 indica los compuestos, así como la estimación visual de las cantidades de los mismos, presentes en estos vinos en los dos períodos de conservación estudiados.

En las figuras V.16, V.17, V.18 y V.19 están representadas las cromatoplasmas de cuatro de estos vinos.

Se aprecia gentísico en los vinos adicionados con anhídrido sulfuroso o con ácidos cítrico y ascórbico, y en menor cantidad en el testigo a los seis meses.

El  $\alpha$ -resorcílico se observa en todos los vinos a los doce meses, mientras que a los seis no se detecta en el que contiene enzimas.

En los vinos que contienen sulfuroso o los ácidos cítrico y ascórbico se aprecian todos los ácidos cinámicos, el ferúlico y p-cumárico presentan equilibrio entre sus dos formas isoméricas. Los otros vinos aumentan la concentración de p-cumárico y ferúlico, en especial este último (forma trans) ya que no se apreciaban a los seis meses.

A diferencia de lo observado para el cafeico, el protocaté- quico se encuentra presente en todos los vinos, aunque en mayor

VINOS DE LA MEZCLA DE VARIEDADES

COMPUESTO	MESES	TRATAMIENTO			
		T	S	Ez	Vc
Ac. cafeico	6		++		+++
	12		+++		++++
Ac. protocatéuico	6	+	++	+	++
	12	+++	++++	++	+++
Feruroil tartrato	6	++	+++	++++	+++
	12	+++++	+++++	++	++++
p-cumaroil tartrato	6	+++	++	+	++
	12	+	+	+	++
Ac. vainillínico	6	+	+	tr	+++
	12	++	++	++	++
Ac. 4-OH benzoico	6	+++	+	+	+++
	12	+++	+++	++++	+++
Ac. ferúlico cis	6		+		++
	12		+		++
Ac. ferúlico trans	6		+		++
	12	+	+++	+	+++
Ac. p-cumárico cis	6	++	++	+++	++
	12	++	++	++++	+++
Ac. p-cumárico trans	6	+	++	++	+
	12	++	+	+++	++
Malva	6	+++	++	+	+
	12	+	+	++	+
Ac. p-OH fenil acético	6	++	+	tr	++
	12	++	++		+
Siringaldehido	6			tr	
	12	tr	tr	tr	
p-OH benzaldehido	6	++	+	++	
	12	+	+	+	+
p-vainillina	6	++	++	++	+
	12	+	tr		
Tirosol	6	+++++	+	+++++	+++
	12	+++	++	+++++	+++
Triptofol	6		+++		+++
	12				++++
Esculetina	6		++		tr
	12		++		
Ac. $\alpha$ -resorcílico	6	+	++		+
	12	++	++	++	++
Gentísico	6		+		+
	12	+	+		+
Salicílico	6		+		
	12		+		

Tabla V.12  
Compuestos presentes en las cromatoplasmas de los vinos de la mezcla de variedades.

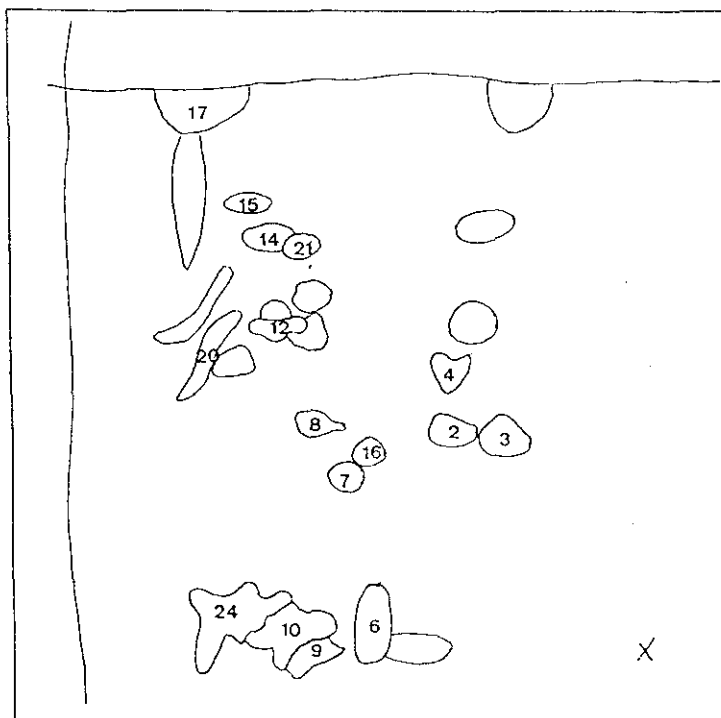


Figura V.16 Vino testigo de la mezcla a los doce meses

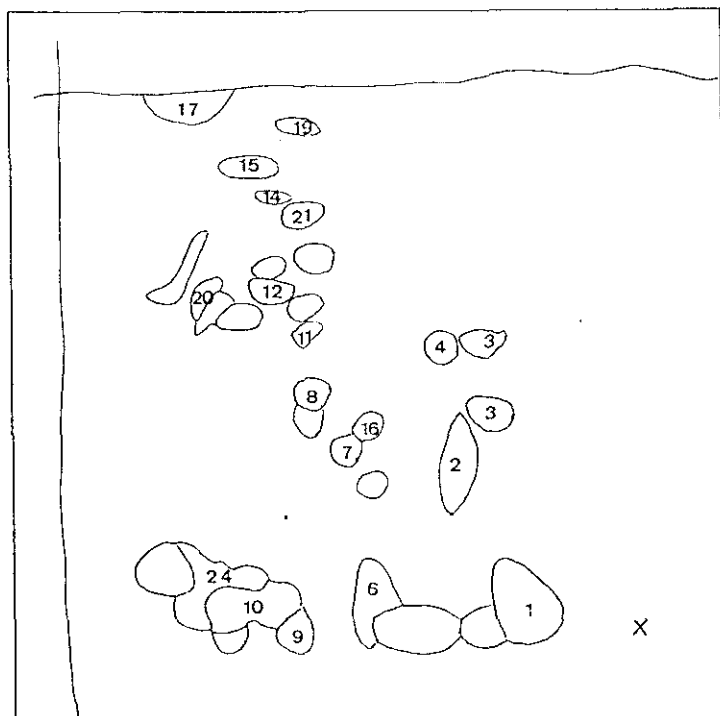


Figura V.17 Vino de la mezcla con sulfuroso a los doce meses

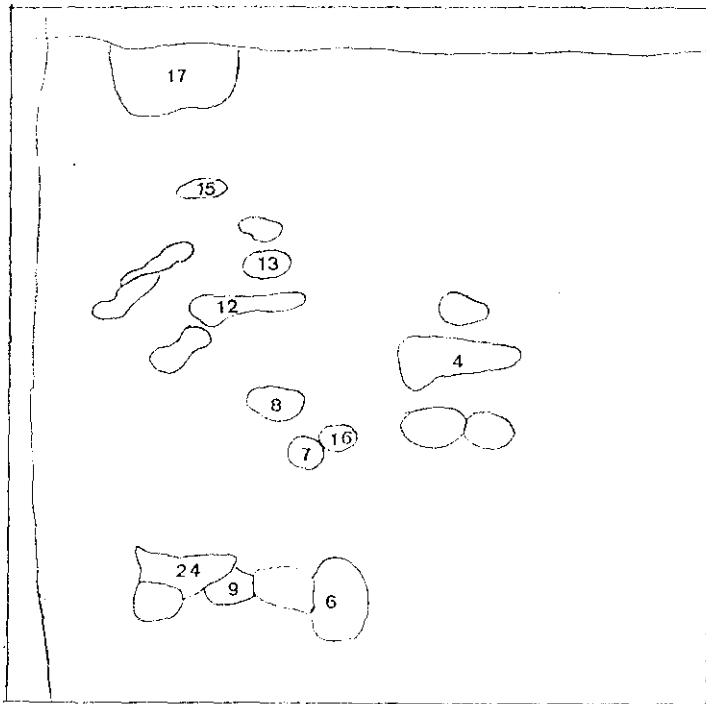


Figura V.18 Vino de la mezcla con enzimas a los doce meses

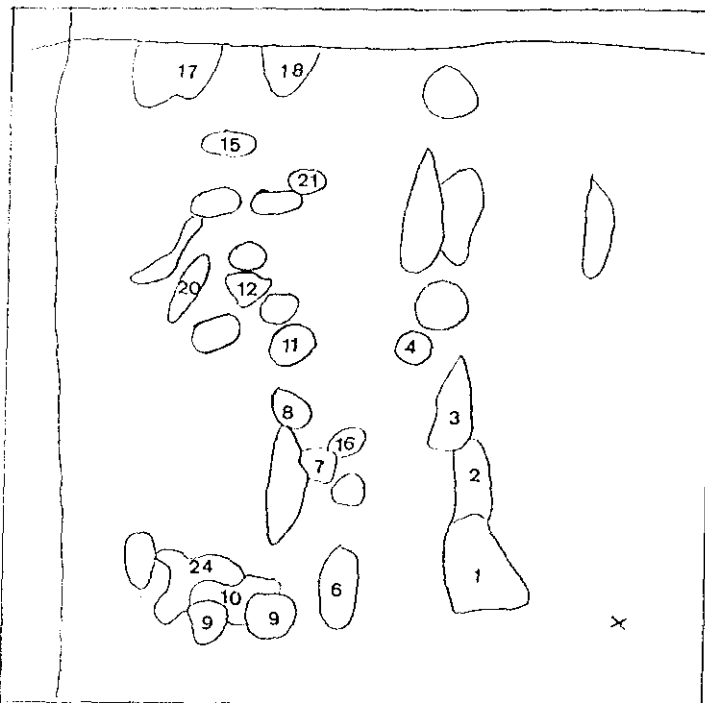


Figura V.19 Vino de la mezcla con cítrico y ascórbico a los doce meses

cantidad en el tratado con sulfuroso o con los ácidos cítrico y ascórbico, durante todo el período de conservación.

Es destacable en los vinos de mezcla el aumento moderado de los compuestos dihidroxilados con la conservación, que aunque no llegan a los apreciados en Verdejo, superan los correspondientes a las otras dos variedades, en donde como ya se ha comentado el mayor aumento en la conservación lo experimentan los compuestos p-hidroxilados. Esto era de esperar puesto que la mayor contribución al vino mezcla se realiza con la variedad Verdejo.

1.4.4.5.- Vinos de los fanqos de la variedad Verdejo (FVT, FVS, FVEz, FVVc).

La cantidad de  $\alpha$ -resorcílico aumenta moderadamente para todos los vinos durante el período de conservación, como se indica en la tabla V.13.

Los isómeros cis-trans del ácido p-cumárico se encuentran equilibrados, independientemente de los tratamientos, sin embargo para el ácido ferúlico la forma trans está presente en los vinos tratados y no en el testigo, tanto a los seis como a los doce meses, mientras que la forma cis únicamente se aprecia en el que contiene sulfuroso y en el tratado con los ácidos cítrico y ascórbico a los seis meses de conservación.

VINOS DE LOS FANGOS DE VERDEJO					
COMPUESTO	MESES	TRATAMIENTO			
		T	S	Ez	Vc
Ac. cafeico	6		++		
	12		+++++		
Ac. protocatéuico	6		++	++	+
	12		+++		
Feruroil tartrato	6	+++	+++	++	++++
	12	++	++++	+++	++++
p-cumaroil tartrato	6	++	++	+++	+++
	12	+	+		++
Ac. vainillínico	6	+	+	++	++
	12	++	+++	+	++
Ac. 4-OH benzoico	6	++		+++	+++
	12	++++	++++	+++	++++
Ac. ferúlico cis	6		++		+
	12		++		
Ac. ferúlico trans	6		+	+	++
	12		+	tr	+
Ac. p-cumárico cis	6	++	++	++	+++
	12	++	++	+++	++
Ac. p-cumárico trans	6	+	++	+	++
	12	+	++	++++	++
Malva	6	+++	++	++	+++
	12	+++	+	++	+++
Ac. p-OH fenil acético	6	+++	++	+++	+
	12		++	+	+
Siringaldehido	6				tr
	12			tr	tr
p-OH benzaldehido	6	++	++	tr	tr
	12	+	+	+	+
p-vainillina	6	++	+++	tr	+
	12	++	tr	+	+
Tirosol	6	+++++	++	+++	++
	12	++++	+++++	+++	++++
Triptofol	6		+++		
	12		+++++		
Esculetina	6		++		
	12		+++		
Ac. $\alpha$ -resorcílico	6	+	+	tr	tr
	12	++	++	++	++
Gentísico	6				
	12		+		
Salicílico	6				
	12		+		

Tabla V.13  
Compuestos presentes en las cromatoplasmas de los vinos de fangos de la variedad Verdejo.

El vino que contiene anhídrido sulfuroso es el único en que a los doce meses se aprecian ácido gentísico y ácido salicílico.

Los compuestos hidroxilados aumentan ligeramente durante el tiempo de conservación, en el vino con sulfuroso los dihidroxilados aumentan más que los monohidroxilados.

1.4.4.6.- Vinos de los fangos de la mezcla de variedades (FMT, FMS, FMEz, FMVc).

Estos vinos se comportan durante la conservación de forma muy parecida a los vinos de los fangos de la variedad Verdejo, como se aprecia al comparar la tabla V.14 correspondiente a estos vinos con la tabla V.13 de los fangos varietales, pero en los que contienen enzimas pectolíticas o los ácidos cítrico y ascórbico, las formas isómeras cis-trans del ácido p-cumárico, son más abundantes que en los vinos de los fangos de Verdejo antes citados, especialmente a los doce meses de conservación.

En todos los vinos de fangos se aprecian los aldehídos benzoicos en cantidades superiores a los otros vinos.

En el tratado con anhídrido sulfuroso los compuestos dihidroxilados superan a los monohidroxilados, mientras que con los otros tratamientos y en testigo sucede lo contrario.

VINOS DE LOS FANGOS DE LA MEZCLA DE VARIEDADES					
COMPUESTO	MESES	TRATAMIENTO			
		T	S	Ez	Vc
Ac. cafeico	6		++		
	12		+++++		
Ac. protocatéquico	6		++	+	+
	12		++		
Feruroil tartrato	6	+++++	+++	+	++
	12	+++++	+++++	++++	+++
p-cumaroil tartrato	6		++	+++	++
	12		+	tr	++
Ac. vainillínico	6	+	++	++	++
	12	++	++	++	+
Ac. 4-OH benzoico	6	++		+++	+++
	12	++++	+++	+++	++++
Ac. ferúlico cis	6		++		
	12				
Ac. ferúlico trans	6		++		
	12		+		
Ac. p-cumárico cis	6	++	++	+++	++
	12	++	+	+++++	++
Ac. p-cumárico trans	6	+	++	+++	+
	12	++	+	+++++	+
Malva	6	+++	+++	++	++
	12	++++	+	++	+++
Ac. p-OH fenil acético	6	+++	++	+++	++
	12	++++	+	++	+
Siringaldehido	6			tr	tr
	12				
p-OH benzaldehido	6	++	++	+	
	12	+		+	+
p-vainillina	6	++	+++	+	tr
	12	++		+	++
Tirosol	6	+++++	++++	+++++	++
	12	++++	+++++	+++	+++++
Triptofol	6		+++		
	12		++++		
Esculetina	6				
	12		++		
Ac. $\alpha$ -resorcílico	6	+	+	+	+
	12	+++	++	++	++
Gentísico	6		+		
	12		+		
Salicílico	6		+		
	12	+		+	+

Tabla V.14  
Compuestos presentes en las cromatoplasmas de los vinos procedentes de fangos de la mezcla de variedades.

1.4.4.7.- Vinos varietales de Verdejo con levaduras de bodega en pureza (VR1, VR2, VR3).

En la tabla V.15 se muestran los datos correspondientes a la cromatografía en capa fina para estas muestras.

El ácido ferúlico en su forma cis no se manifiesta en ninguno de los tres vinos, mientras que la forma trans se evidencia a los doce meses de conservación en los vinos VR1 y VR2, en este último en cantidad sensiblemente inferior. El ácido p-cumárico en sus dos formas isoméricas aumenta durante la conservación.

El ácido  $\alpha$ -resorcílico se detecta en los tres vinos a los doce meses en cantidades parecidas, a los seis no se observa cuando el vino era resultado de la fermentación con la levadura de segunda etapa (R2).

Los aldehidos disminuyen con la guarda a 4 °C y en oscuridad.

VINOS DE VERDEJO POR INDUCCION CON LEVADURAS				
COMPUESTO	MESES	LEVADURA		
		R1	R2	R3
Ac. cafeico	6			
	12			
Ac. protocatéquico	6			
	12			
Feruroil tartrato	6	+	++++	+++
	12	++	+++	++
p-cumaroil tartrato	6	++	++	
	12	+	+	+
Ac. vainillínico	6	+	tr	tr
	12	++	++	++
Ac. 4-OH benzoico	6	+	+	+
	12	+++	+++	++++
Ac. ferúlico cis	6			
	12			
Ac. ferúlico trans	6			
	12	+	tr	
Ac. p-cumárico cis	6	+	tr	tr
	12	++	++	++
Ac. p-cumárico trans	6	tr	tr	tr
	12	++	++	++
Malva	6	++	+++	+
	12	+++	++	+++
Ac. p-OH fenil acético	6	++	+	+
	12	++	++	+
Siringaldehido	6			
	12		tr	
p-OH benzaldehido	6	+	+	+
	12	tr	+	tr
p-vainillina	6	++	++	+
	12	+	+	+
Tirosol	6	++++	+++	+++
	12	+++	++++	+++
Triptofol	6			
	12			
Esculetina	6			
	12			
Ac. $\alpha$ -resorcílico	6	+		tr
	12	+++	+++	+++
Gentísico	6			
	12			
Salicílico	6			
	12			

Tabla V.15  
Compuestos presentes en las cromatoplacas de los vinos obtenidos por inducción de levaduras sobre Verdejo.

#### 1.4.5.- Actuación de especies filmógenas.

Las figuras V.20 a V.25 son las cromatoplasmas correspondientes a las muestras que se comentan en este apartado.

##### 1.4.5.1.- Vinos para desarrollar velos (SM, CM).

Además de las características propias de los vinos de la zona conviene resaltar la presencia de 4 OH 3 metoxi fenilpropionico, siringaldehido y las diferencias en la concentración del resto de compuestos que aumentan con el tiempo de permanencia en madera (Tabla V.16).

Tabla V.16 Compuestos presentes en las cromatoplasmas de los vinos utilizados para desarrollar velos.

COMPUESTO	CM	SM
Ac. cafeico	+++	+++
Ac. protocatéquico	+	
Feruloil tartrato	++	++
p-cumaroil tartrato	++	++
Ac. vainillínico	++	+
Ac. 4-OH benzoico	++	+
Ac. ferúlico cis	+	+
Ac. ferúlico trans	++	+
Ac. p-cumárico cis	++	++
Ac. p-cumárico trans	+++	++
Malva	+	+
Ac. p-OH fenil acético	++	+
Siringaldehido	+	
p-OH benzaldehido	+	+
p-vainillina	tr	tr
Tirosol	++++	+++
Triptofol		
Esculetina		
Ac. $\alpha$ -resorcílico	+	+
Gentísico		
Salicílico	+	+

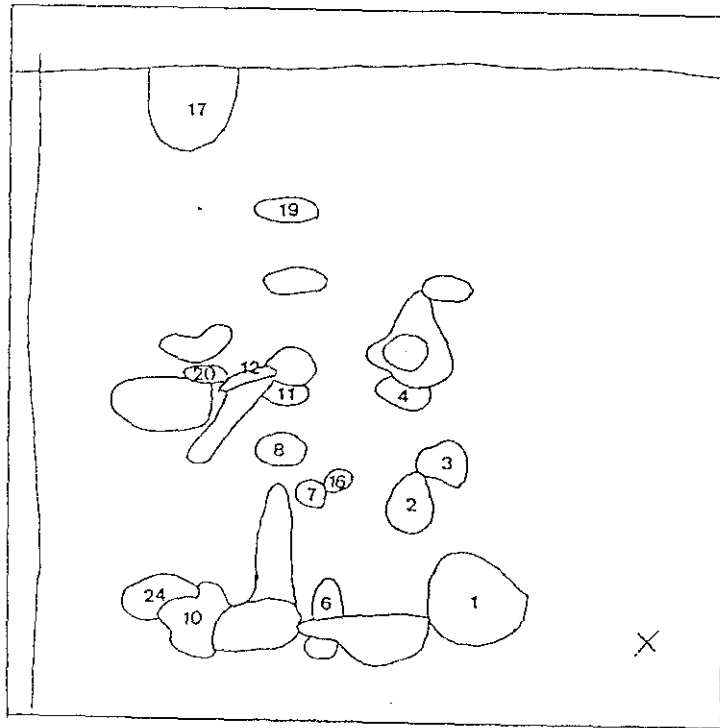


Figura V.20      Vino sin madera sin sembrar

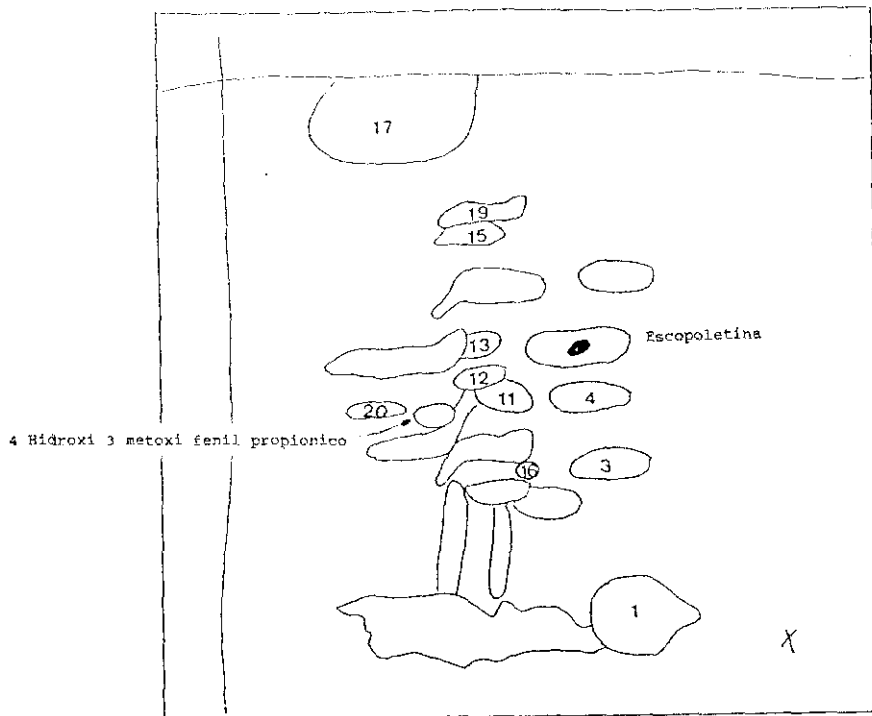


Figura V.21      Vino con madera sin sembrar

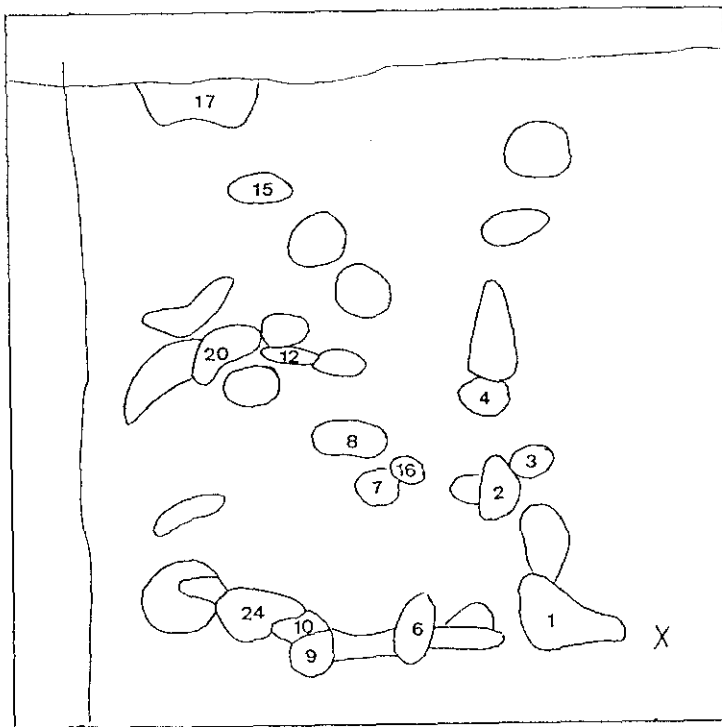


Figura V.22 Vino sin madera con velo de la cepa 1663

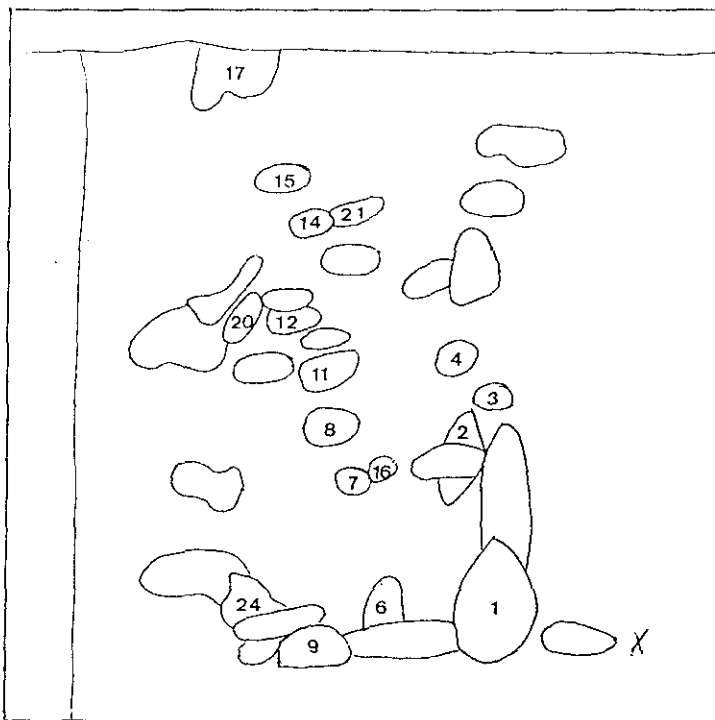


Figura V.23 Vino sin madera con velo de la cepa 1685

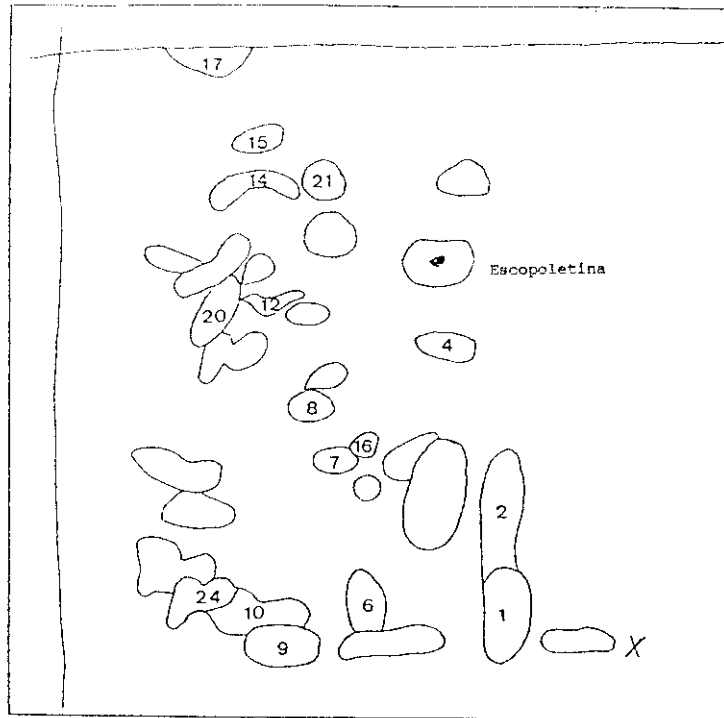


Figura V.24 Vino con madera con velo de la cepa 1663

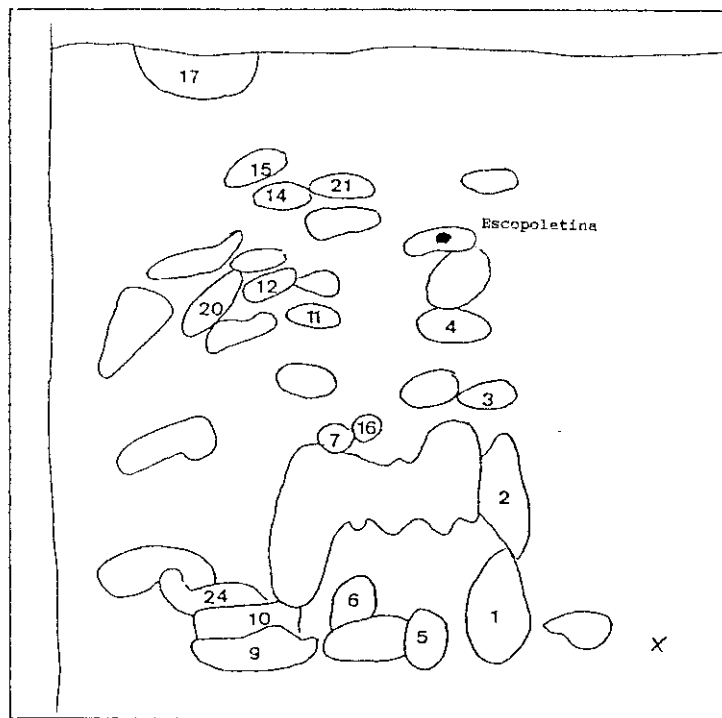


Figura V.25 Vino con madera con velo de la cepa 1685

VINOS DESPUES DE PERMANENCIA BAJO VELO				
COMPUESTO	SM1663	CM1663	SM1685	CM1685
Ac. cafeico	+++	+++	+++	+++
Ac. protocatéuico	++	++	++	++
Feruroil tartrato	+	+	+	+
p-cumaroil tartrato	++	++	+	++
Ac. vainillínico	++	++	+	++
Ac. 4 OH benzoico	+	++	+	++
Ac. ferúlico cis	+		+	+++
Ac. ferúlico trans	+		+	+++
Ac. p-cumárico cis	+	+	+	++
Ac. p-cumárico trans	+	+	+	+
Malva	+	+	+	+
Ac. p-OH fenil acético	+	++	+	++
Siringaldehido				tr
p-OH benzaldehido	+	++	+	+
p-vainillina		+	+	tr
Tirosol	++	+++	+++	++++
Triptofol				
Esculetina	+	++	+	++
Ac. $\alpha$ -resorcílico	tr	+	+	+
Gentísico	+	+	tr	+
Salicílico	+			

Tabla V.17  
Compuestos observados en las cromatoplacas despues de dos meses de permanencia de los vinos bajo velo.

1.4.5.2.- Vinos tras permanencia bajo velo (SM1663, SM1685, CM1663, CM1685).

La tabla V.17 indica los compuestos y cantidades subjetivas de los mismos después de que los vinos permanecieron bajo velo durante dos meses.

Actuación de la cepa 1663 (*Saccharomyces beticus*): cuando el vino de partida era con madera, aparece mayor cantidad de ácido siríngico y de 4 OH benzoico, el siringaldehído por el contrario ha desaparecido.

Actuación de la cepa 1685 (*Saccharomyces montuliensis*): No aparece ácido siríngico, y el siringaldehído únicamente se observa en cantidades traza.

**1.4.6.- Vinos comerciales (MN, MB, MD).**

Estos vinos proceden la mezcla de uvas de tres variedades, Verdejo, Viura y Jerez con una proporción mínima de la primera del 85 %.

En la elaboración del Mantel Nuevo (MN86) no interviene el anhídrido sulfuroso, y el vino es embotellado tan pronto han transcurrido las imprescindibles operaciones de estabilización y acondicionamiento del mismo después de acabada la fermentación, es por ello vino del año.

El Mantel Blanco (MB86) es el idéntico al Mantel Nuevo, pero que pasa un tiempo en madera antes del embotellado (como mínimo seis meses).

El Mantel Dorado es un vino con largo tiempo de permanencia en madera y de crianza biológica, antes de su embotellado se le agrega licor de expedición para favorecer su consumo, que de otra forma sería difícil, debido al elevado añejamiento del mismo.

Estos resultados se pueden relacionar con los obtenidos para los vinos utilizados para desarrollar velo, comentados en el apartado anterior, ya que aquellos, Sin Madera (SM) y con madera (CM) son exactamente los mismos que los comerciales Mantel Nuevo (MN86) y Mantel Blanco (MN86), pero teniendo en cuenta que los menores valores presentes en los últimos se deben, a que antes del embotellado, los vinos sufren toda una serie de procesos tendentes a conseguir la mejor estabilización y presentación, y estas manipulaciones originan una disminución en las concentraciones de los compuestos que estamos comentando.

En cuanto a la comparación de Mantel Dorado con los otros vinos, esta no es totalmente posible, puesto que se trata, como se dijo en la introducción, de reliquias en la elaboración, y no se conoce con exactitud la composición de partida, además de la gran importancia que el largo tiempo de permanencia en madera y con velo conlleva.

Como vinos propios de la zona, la relación entre los isómeros cis-trans de los ácidos cinámicos es equilibrada, aunque con ligera preponderancia de la forma trans. En la tabla V.18 se presentan los resultados de la cromatografía en capa fina realizada a estos vinos, y las figuras V.26 y V.27 muestran: la primera la placa cromatográfica de Mantel Nuevo y la segunda la del vino Mantel Blanco.

En Mantel Dorado debemos resaltar la presencia de aldehído siríngico en mayor proporción que en Mantel Blanco, puesto que se trata de un vino con mayor permanencia en madera, razón por la cual se aprecia también ácido siríngico, que no es propio de vinos blancos. La presencia del 4 OH 3 metoxi fenilpropionico, característico de los vinos finos, se aprecia únicamente en Mantel Dorado; este último presenta lógicamente mayor número y cantidad de determinados compuestos propios de la actuación de levaduras filmógenas y de su estancia más prolongada en madera que los otros dos vinos.

VINOS COMERCIALES			
COMPUESTO	MN	MB	MD
Ac. cafeico	++++	++++	+++++
Ac. protocatéquico	+++	+++	++++
Feruroil tartrato	++	++	+++
p-cumaroil tartrato	++	+++	++
Ac. vainillínico	++	++	++++
Ac. 4 OH benzoico	+++	+++	++++
Ac. ferúlico cis	++	+	
Ac. ferúlico trans	+++	++	+++++
Ac. p-cumárico cis	+++	+	+++
Ac. p-cumárico trans	++	++	+++
Malva	++	+	+
Ac. p-OH fenil acético	++	+++	++
Siringaldehido		+++	++++
p-OH benzaldehido		+	++
p-vainillina		++	++
Tirosol	++++	+++++	+++
Triptofol			
Esculetina	++	+	+++
Ac. $\alpha$ -resorcílico	tr	tr	+
Gentísico			+
Salicílico			

Tabla V.18  
Compuestos polifenólicos presentes en las cromatoplacas correspondientes a vinos comerciales (Mantel Nuevo, Mantel Blanco y Mantel Dorado).

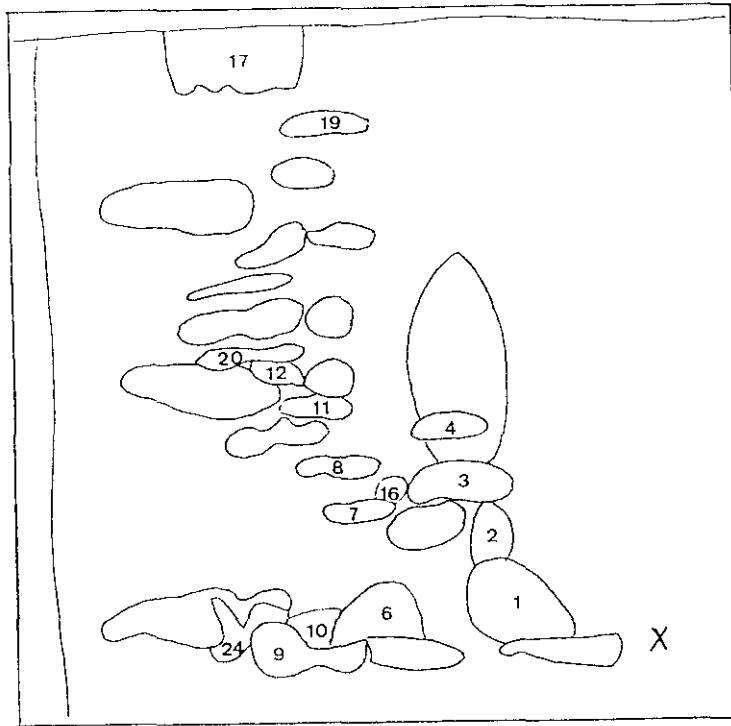


Figura V.26 Vino comercial Mantel Nuevo

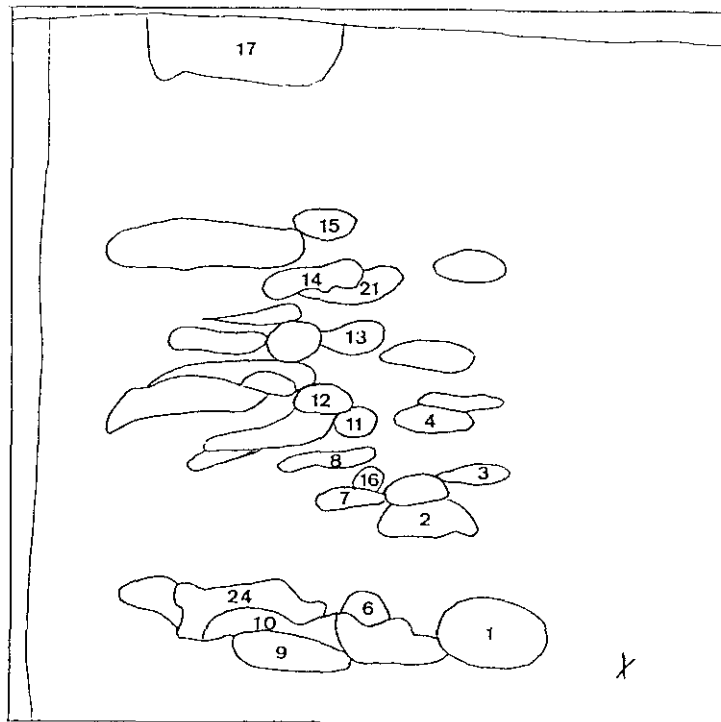


Figura V.27 Vino comercial Mantel Blanco



## 2.- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA.

### 2.1.- Introducción.

La Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE) se emplea fundamentalmente como técnica de análisis cuali y cuantitativo. Numerosos laboratorios han incorporado CLAE al análisis de estos compuestos, existiendo en la bibliografía numerosos artículos al respecto.

Para la separación de polifenoles por CLAE suelen emplearse columnas cuyo relleno es una fase ligada, que se prepara uniendo moléculas de diferentes organosilanos, como octadeciltriclorosilano, octiltriclorosilano o feniltriclorosilano a los grupos hidroxilo de un gel de sílice. Wehrli y col. (1978) estimaron que el 80% de las separaciones en CLAE se realizan con columnas con fase octadecilsilil ligadas, conocidas comúnmente con columnas  $C_{18}$ .

Cuando se emplean este tipo de materiales, la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil, y el proceso se denomina en fase inversa. En estas condiciones el tiempo de retención de un compuesto está inversamente relacionado con su polaridad, de forma que al eluir una mezcla compleja, sus componentes se separan en orden decreciente de polaridad.

Los eluyentes mas empleados para la separación de polifenoles con este tipo de columnas suelen ser mezclas acetonitrilo/agua o metanol/agua en proporciones variables que contienen pequeñas cantidades de ácido acético, ácido fórmico o ácido fosfórico con objeto de rebajar el pH del eluyente y facilitar la separación, si bien no se debe trabajar a pH inferior a 2 para evitar la ruptura de la fase inversa. Los detectores mas adecuados para este tipo de compuestos son los de espectrometría ultravioleta y los fluorimétricos.

El análisis de polifenoles por CLAE puede realizarse con gradiente de elución, pues de esta forma es posible separar mezclas complejas en breve tiempo y con mejor resolución.

El orden de elución de los compuestos fenólicos dependerá de varios factores, como:

- Tamaño de la cadena lateral para una misma sustitución del anillo benzoico. El orden de elución será:  $C_6$ ,  $C_6-C_1$ ,  $C_6-C_2$ , etc. (Wulf y Nagel 1976).
- Grupo funcional para una misma cadena lateral. La elución será: alcohol, ácido, aldehido. (Hernandez y col. 1980).
- Grado de sustitución del anillo benzoico. El orden será: trihidroxi, dihidroxi, hidroximetoxi, hidroxidimetoxi, etc. (Wulf y Nagel 1976).

Son numerosos los autores que han desarrollado métodos para la separación y análisis de estos compuestos, así Wulf y Nagel

(1976) separan varios ácidos benzoicos y cinámicos presentes en uvas.

Hernandez y col. (1980) estudian la separación de fenoles no flavonoideos por CLAE utilizando un sistema de compresión radial con una columna Radial Pak A y precolumna rellena de Bondapak C<sub>18</sub>/Corasil.

Wuf y Nagel (1980) realizan la separación de diversos compuestos fenólicos del vino en extractos de acetato de etilo purificados en una columna Partisil ODS. Emplean para el análisis una columna de fase reversa Zorbax ODS, eluyendo con mezclas acetonitrilo/agua/ácido acético y detector ultravioleta a 280 nm.

Salagoity-Auguste y Bertrand (1984) realizan la separación de diversos compuestos fenólicos de bajo peso molecular en vinos tintos de Burdeos, utilizan una columna Micropak rellena con MCH 10 (fase inversa de tipo octadecilsilano), como eluyente utilizan un gradiente de dos disolventes, siendo uno metanol y el otro agua destilada a pH 2,5 mediante adición de ácido perclórico.

## 2.2.- Materiales y métodos.

En este trabajo los fenoles no flavonoideos han sido analizados modificando el método de Hernandez y Dorronsoro (1984). El equipo utilizado consta de un cromatógrafo Waters Associates, equipado con: inyector M-U6K, dos bombas M-660, un

programador de gradiente 720, un detector ultravioleta M-440, una precolumna rellena de Bondapak C<sub>18</sub>/Corasil y una columna de acero inoxidable Ultrasphere-ODS de 250 x 3,9 mm de 5  $\mu$ . La elución es mediante gradiente (tabla V.19), el solvente A esta formado por agua/ácido acético (98/2) y el solvente B esta formado por agua/metanol/ácido acético (68/30/2). La detección se realiza a 280 y 340 nm. La sensibilidad es de 0,05 U.A.. El análisis se realiza a temperatura ambiente y la duración del cromatograma es de 55 minutos.

#### Gradiente de elución

t(min)	Flujo(ml/min)	%A	%B	Curva
0	1,0	100	0	5
3	1,0	100	0	5
5	1,0	60	40	5
10	1,1	50	50	5
15	1,1	45	55	5
20	1,1	40	60	5
25	1,1	35	65	5
28	1,2	33	67	5
30	1,2	20	80	5
40	1,2	15	85	5
50	1,2	15	85	5
55	1,0	100	0	5

Tabla V.19

Para la cuantificación de los picos obtenidos, se realizaron las curvas de regresión para cada una de las sustancias patrón, inyectando en el cromatógrafo distintas soluciones de las mismas a diferentes concentraciones. En la tabla V.20 se expresan las ecuaciones de las rectas de regresión obtenidas para cada sustancia patrón, para la cuantificación de los ésteres tartáricos de los ácidos cafeico, cumárico y ferúlico, por no existir

patrones, se utilizan las rectas de calibrado obtenidas para los ácidos cinámicos correspondientes obtenidos a 340 nm.

Compuesto	Recta de regresión ( y = )	Coef. Reg.
Ac. Protocatéquico	$1,753921E^{-6}x - 6,022288E^{-6}$	0,9916108
Vainillínico	$1,369903E^{-6}x + 1,945926E^{-6}$	0,9993238
p-Vainillina (*)	$5,283671E^{-6}x - 4,579197E^{-6}$	0,9995067
p-OH Benzaldehido	$9,190307E^{-4}x + 1,186050E^{-3}$	0,9890599
Ac. Cafeico	$2,394436E^{-3}x + 1,094609E^{-3}$	0,9996959
Ac. p-Cumárico	$1,664242E^{-3}x + 1,027645E^{-2}$	0,9927790
Ac. Ferúlico	$2,851482E^{-3}x + 3,152490E^{-4}$	0,9950059
p-OH Benzoico	$4,111887E^{-6}x - 1,544875E^{-6}$	0,9993005
Tirosol	$4,693029E^{-3}x - 6,159544E^{-4}$	0,9317588
Triptofol	$8,117568E^{-3}x + 8,602232E^{-3}$	0,8092645
Caferoil tartrato (*)	$6,934925E^{-4}x + 9,907732E^{-2}$	0,9946986
p-Cumaroil tartrato (*)	$1,660624E^{-3}x + 6,532227E^{-2}$	0,9628190
Feruroil tartrato (*)	$1,091856E^{-3}x + 7,102054E^{-2}$	0,9288334

Tabla V.20 Ecuaciones de las rectas de regresión.

y =  $\mu$ g de sustancia en la inyección.

x = altura del pico a 280 nm.

(\*) x = altura del pico a 340 nm.

La numeración asignada a cada compuesto en los cromatogramas que se representaran en este capítulo corresponde a:

- 1 ..... Acido p-hidroxibenzoico.
- 2 ..... Acido protocatéquico.
- 3 ..... Acido vainillínico.
- 4 ..... p-vainillina.
- 5 ..... Acido cafeico.
- 6 ..... Acido p-cumárico.
- 7 ..... Acido ferúlico.
- 8 ..... Caferoil tartrato.
- 9 ..... p-Cumaroil tartrato.
- 10 ..... Feruroil tartrato.
- 11 ..... Tirosol.
- 12 ..... Triptofol.
- 13 ..... Acido clorogénico.
- 14 ..... Acido siríngico.
- 15 ..... Aldehido siríngico.
- 16 ..... Acido  $\alpha$ -resorcílico.
- 17 ..... Aldehido p-hidroxi benzoico.

La figura V.28 muestra un cromatograma con los patrones y sus tiempos de retención.

Todos los cromatogramas en que no se indique específicamente proceden de inyecciones de 5  $\mu$ l.

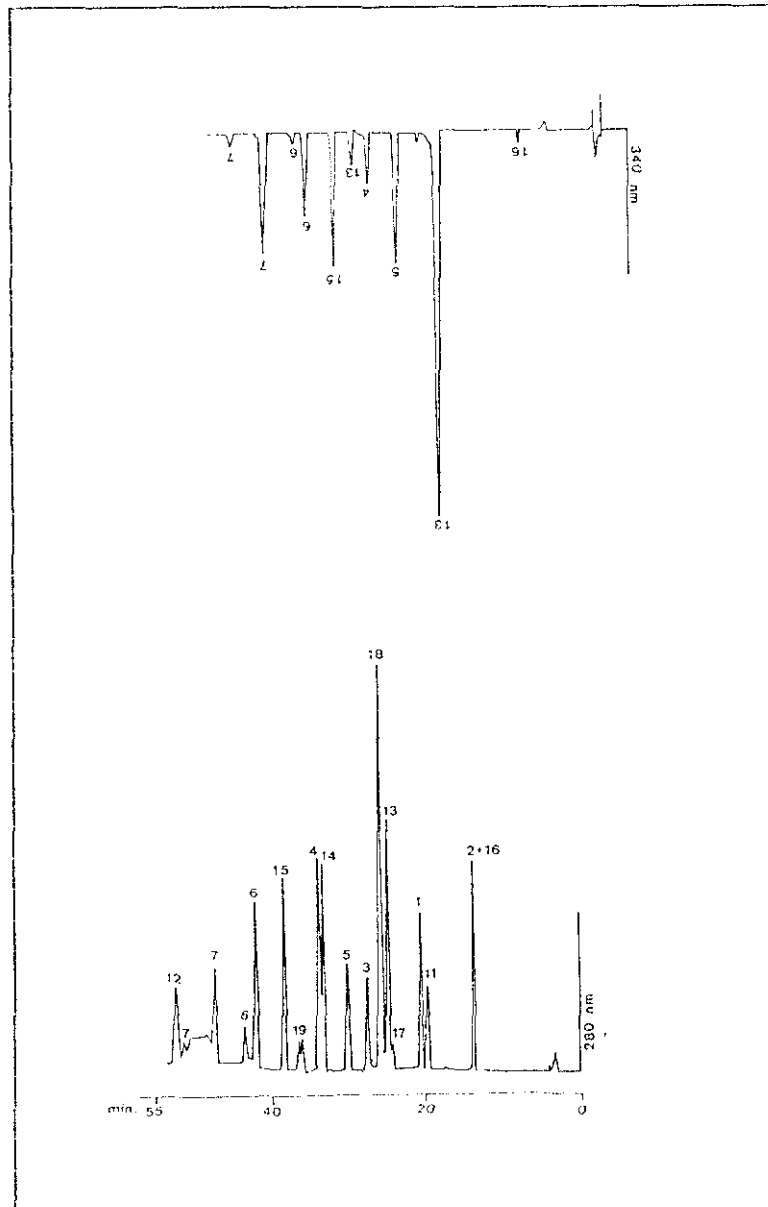


Figura V.28 Cromatograma de patrones

## 2.3.- Resultados y discusión.

Se han cuantificado ácidos y aldehidos benzoicos y cinámicos, tirosol, triptofol y ésteres tartáricos de los ácidos cinámicos en todas las muestras descritas en el capítulo III.

### 2.3.1.- Mostos

En las figuras V.29 y V.30 se presentan los cromatogramas correspondientes a las variedades Jerez y Verdejo, así como al mosto Verdejo filtrado. En este último se encuentran concentraciones superiores, de todos los compuestos, a las detectadas en el mosto sin filtrar, esto puede ser debido a que se retienen en la filtración sustancias capaces de interferir con los compuestos analizados. En la tabla V.21 se muestran las concentraciones de los compuestos expresadas en mg/l.

**Acidos benzoicos.** La variedad Jerez contiene mayores cantidades de estos ácidos, destacando las concentraciones de protocatéquico y p-OHbenzoico, para el primero, en relación a la otra variedad, se observa una cantidad cuatro veces superior, mientras que para el segundo la concentración es doble; en cuanto al ácido vainillínico la diferencia no es tan importante, aunque la Jerez presenta la mayor.

**Acidos cinámicos.** La variedad Jerez muestra mayor concentración para el cafeico y el p-cumárico, mientras que es significativamente menor para el ácido ferúlico. En cuanto al mosto

filtrado la cantidad cuantificada es mayor para los ácidos cafeico y p-cumárico y ligeramente menor para el ferúlico.

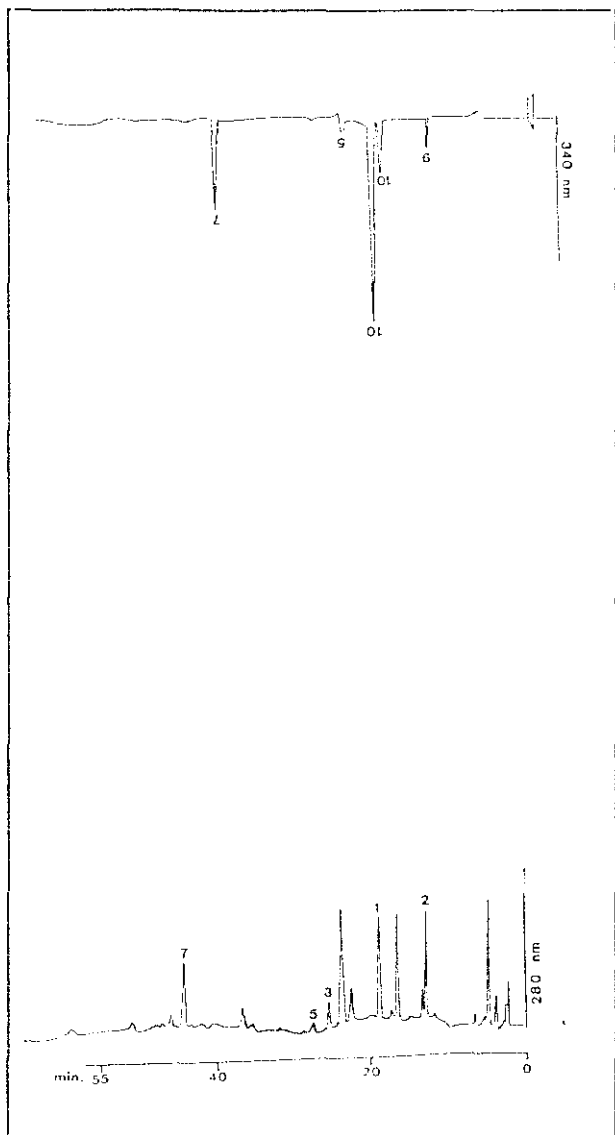


Figura V.29  
Mosto Verdejo (10  $\mu$ l)

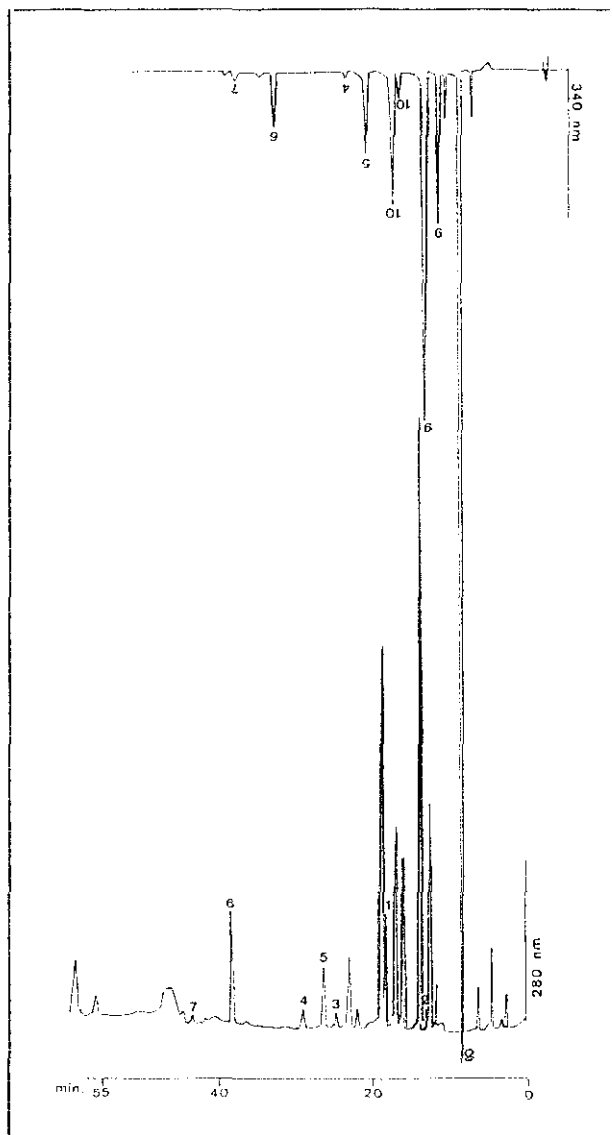


Figura V.30 Mosto Jerez

Esteres tartáricos de los ácidos cinámicos. En la variedad Jerez se encuentran los tres ésteres, caferoil, p-cumaroil y feruroil, mientras que en Verdejo el caferoil tartrato unicamente se detecta en cantidades traza. Los porcentajes de ácido libre frente a su ester son mayores en la variedad Jerez que en Verdejo para el cafeico - caferoil y p-cumárico - p-cumaroil, mientras que para el ferúlico y su ester sucede lo contrario.

p-Vainillina. La presencia de este aldehido solo se observa en el mosto de la variedad Jerez.

MOSTOS			
Compuesto	Jerez	Verdejo	Verdejo F
p-OHbenzoico	5.04 E-4	2.19 E-4	2.52 E-4
Protocatequico	3.83 E-4	0.862 E-4	2.05 E-4
Vainillínico	0.35 E-4	0.26 E-4	0.34 E-4
p-vainillina	0.40 E-4	tr	tr
Cafeico	1.57 E-1	0.17 E-1	0.74 E-1
p-cumárico	2.47 E-1	0.21 E-1	0.51 E-1
Ferúlico	0.36 E-1	1.03 E-1	0.92 E-1
Caferoil	1.08 E-1	tr	tr
Cumaroil	11.4 E-1	1.57 E-1	1.77 E-1
Feruroil	4.67 E-1	2.93 E-1	3.01 E-1

Tabla V.21 Compuestos polifenólicos cuantificados en mostos.

### 2.3.2.- Fermentados de los mostos de la variedad Jerez.

Fermentación espontánea (Jeesp), fermentación inducida con las tres levaduras de bodega (Je+R), fermentación inducida con las tres levaduras de la colección (Je3).

Los cromatogramas correspondientes a la variedad Jerez están representados en las figuras V.31, V.32 y V.33, en la tabla V.22 se expresan las concentraciones en mg/l.

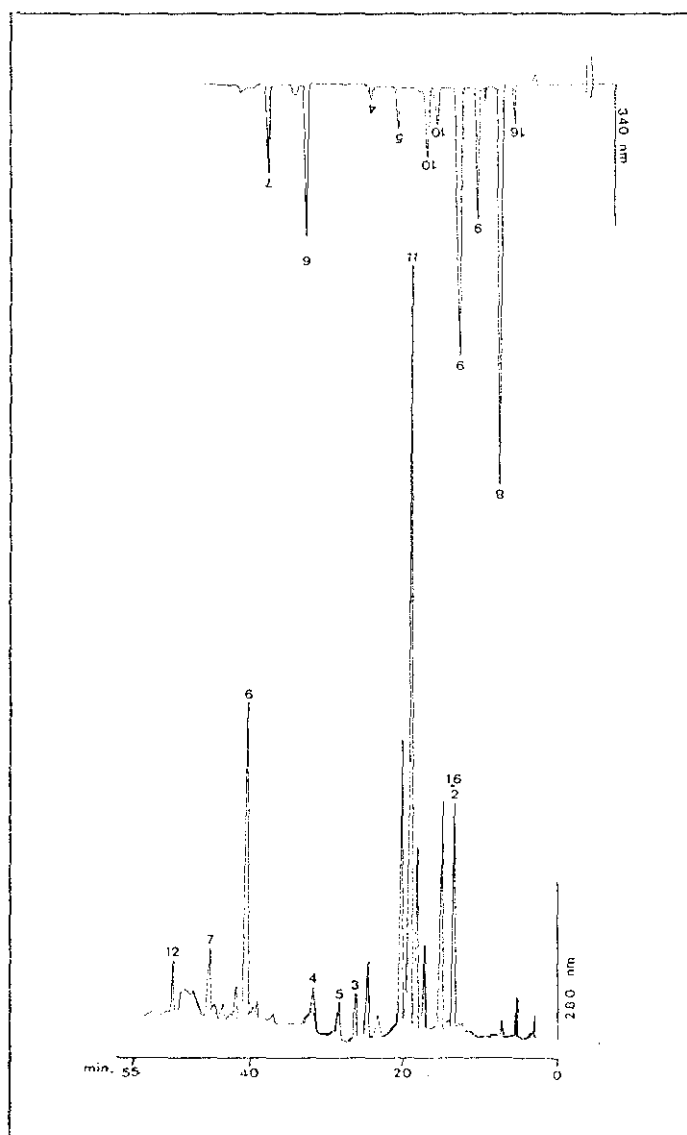


Figura V.31 Jerez espontánea

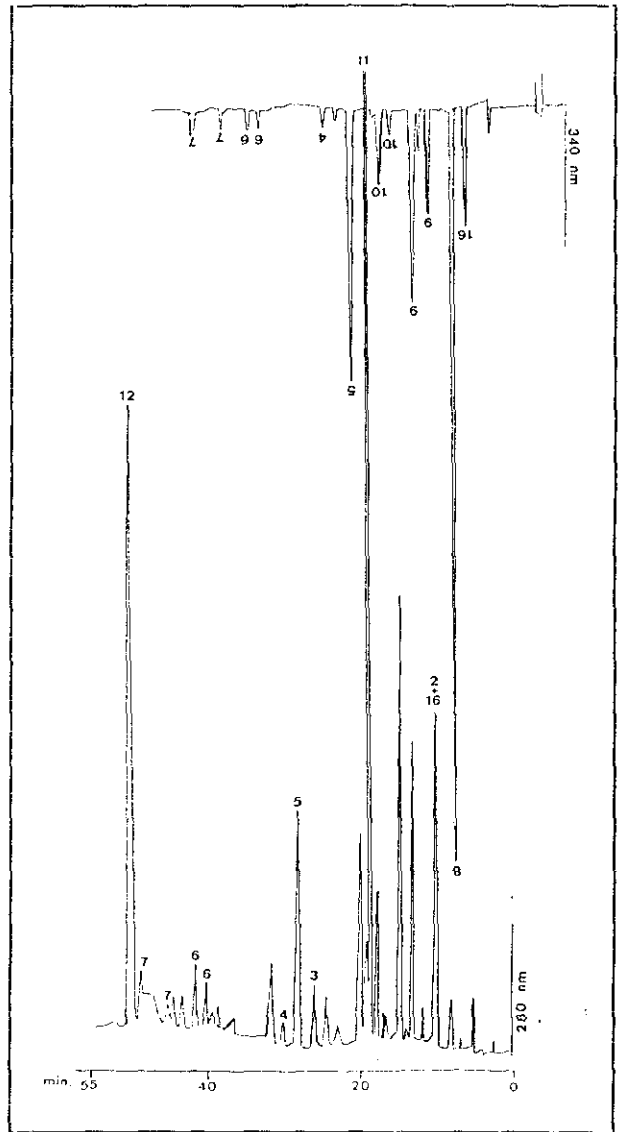
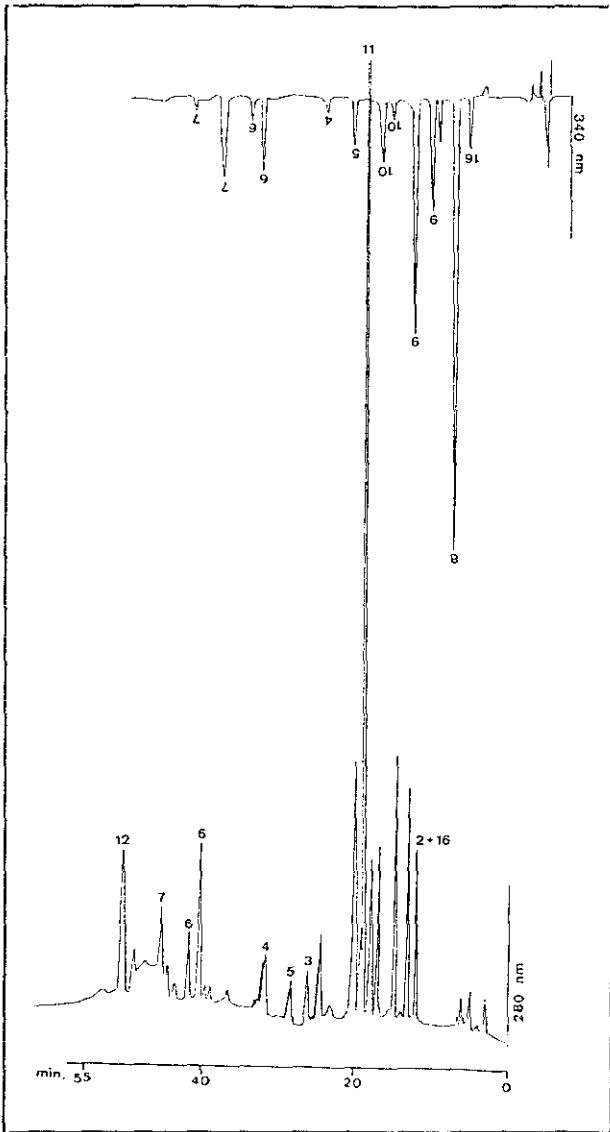


Figura V.32

Jerez con levaduras de colección

Figura V.33

Jerez con levaduras de bodega

La fermentación realizada de manera espontánea presenta las concentraciones mas bajas para todos los compuestos salvo en el ácido p-cumárico y su correspondiente ester tartárico, donde se encuentran las mayores; para el ácido ferúlico se cuantifica una cantidad intermedia entre la fermentación que realizan las levaduras de la colección y las de bodega. Los resultados obtenidos en la fermentación espontánea, son mas parecidos a los encontrados cuando la fermentación tiene lugar con las levaduras de la colección que en el caso de que esta tenga lugar mediante las levaduras de bodega.

FERMENTADOS DE MOSTO JEREZ			
Compuesto	Jeesp.	Je+R	Je3
p-OHbenzoico	3.72 E-4	4.05 E-4	3.89 E-4
Protocatequico	3.90 E-4	5.30 E-4	4.04 E-4
Vainillínico	0.73 E-4	0.96 E-4	0.84 E-4
p-vainillina	0.83 E-4	1.25 E-4	1.04 E-4
Cafeico	1.10 E-1	5.98 E-1	1.19 E-1
p-cumárico	6.47 E-1	2.48 E-1	4.34 E-1
Ferúlico	2.86 E-1	2.07 E-1	2.98 E-1
Caferoil	6.45 E-1	9.03 E-1	6.84 E-1
Cumaroil	9.65 E-1	7.93 E-1	8.72 E-1
Feruroil	3.63 E-1	4.02 E-1	3.80 E-1
Tirosol	37.1 E-1	5.22 E-1	4.92 E-1
Triptofol	0.52 E-1	5.26 E-1	1.27 E-1

Tabla V.22 Polifenoles cuantificados en fermentados de mosto Jerez

Los alcoholes tirosol y triptofol se producen durante la fermentación, la mayor cantidad del primero se mide cuando el proceso fermentativo ha tenido lugar de manera espontanea, para

las otras dos fermentaciones las cantidades son parecidas aún cuando la debida a las levaduras de bodega es superior. En el caso del triptofol, por el contrario, se detecta la menor concentración en el caso de fermentación espontánea, y la mayor en el fermentado originado por de las levaduras de bodega.

### 2.3.3.- Fermentados de los mostos de la variedad Verdejo.

2.3.3.1.- Fermentación espontanea (Veesp), con tres levaduras de la colección del I.F.I. (Ve3), con tres levaduras autóctonas utilizadas en bodega (Ve+R), con tres levaduras de la colección del I.F.I. sobre mosto filtrado (Vef3).

La tabla V.23 muestra las concentraciones de los compuestos estudiados en mg/l, y las figuras V.34 a V.V.37 los cromatogramas de estos fermentados.

Tabla V.23

POLIFENOLES CUANTIFICADOS EN FERMENTADOS DE MOSTO VERDEJO				
Compuesto	Veesp	Ve3	Ve+R	Vef3
p-OHbenzoico	tr	0.27 E-4	tr	0.43 E-4
Protocatequico	1.65 E-4	1.44 E-4	2.42 E-4	2.99 E-4
Vainillínico	0.73 E-4	0.57 E-4	0.46 E-4	0.73 E-4
p-vainillina	0.62 E-4	tr	1.04 E-4	0.40 E-4
Cafeico	2.92 E-1	tr	0.24 E-1	5.12 E-1
p-cumárico	2.34 E-1	2.14 E-1	2.41 E-1	7.73 E-1
Ferúlico	10.02E-1	9.36 E-1	3.21 E-1	13.02E-1
Caferoil	tr	tr	tr	tr
Cumaroil	3.14 E-1	3.34 E-1	3.54 E-1	2.94 E-1
Feruroil	4.28 E-1	4.50 E-1	4.19 E-1	4.19 E-1
Tirosol	4.88	5.31	4.77	5.07
Triptofol	15.4	16.6	14.3	12.7

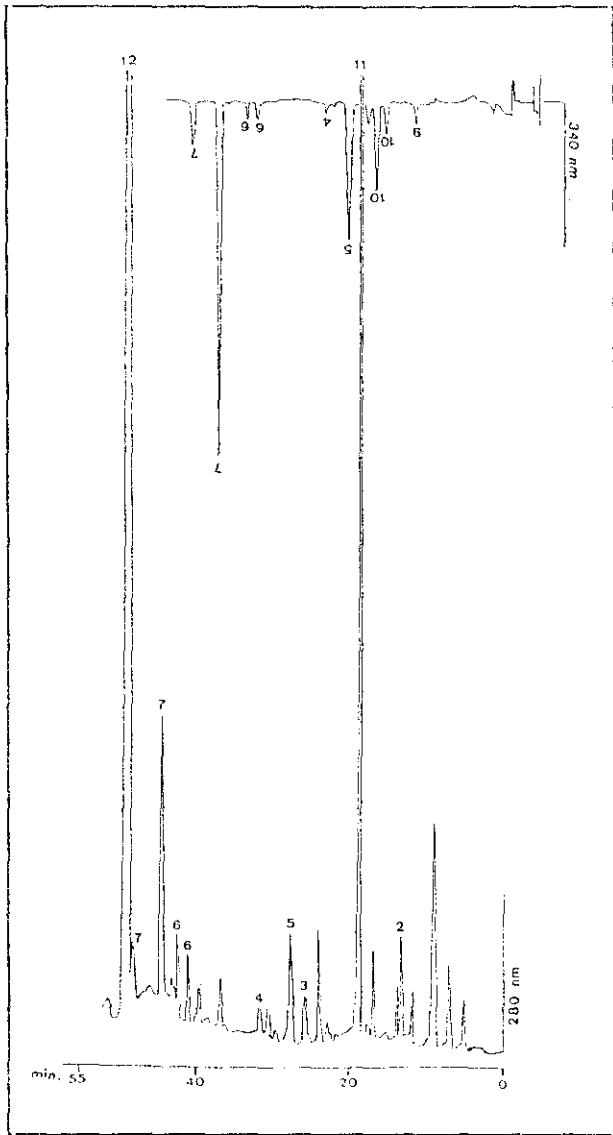


Figura V.34  
Verdejo espontánea

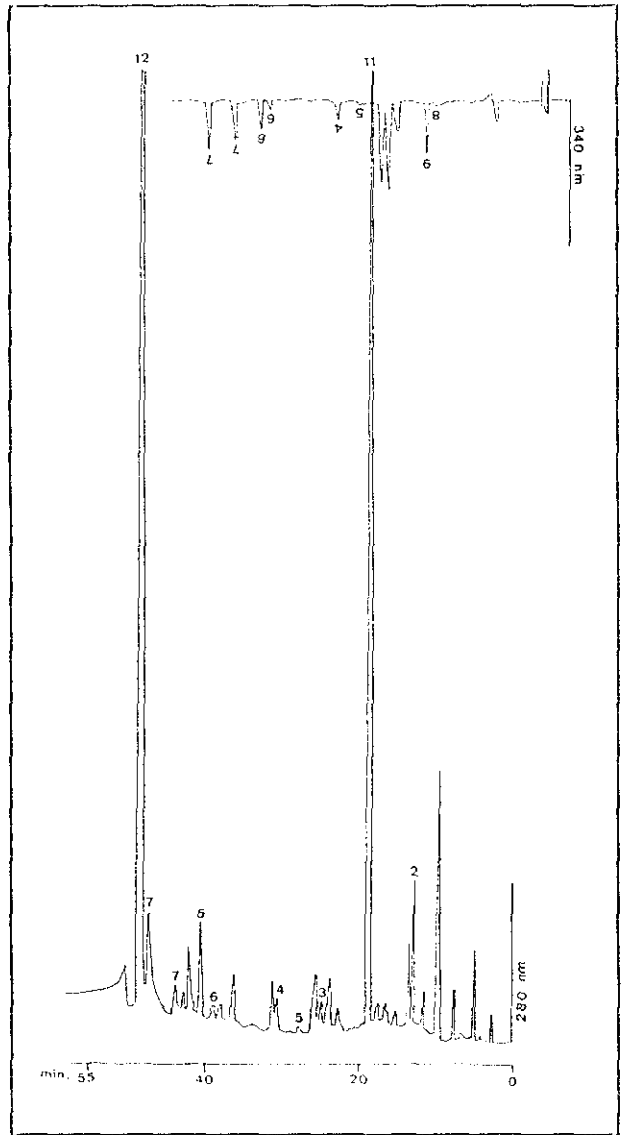


Figura V.35  
Verdejo con levaduras de bodega

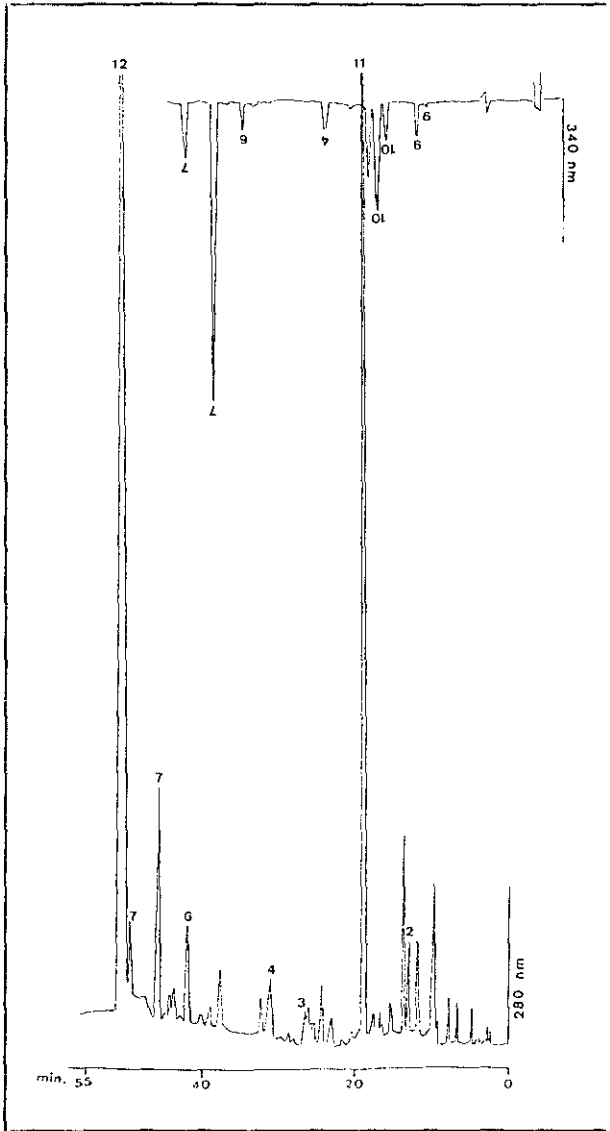


Figura V.36

Verdejo con levaduras de colección

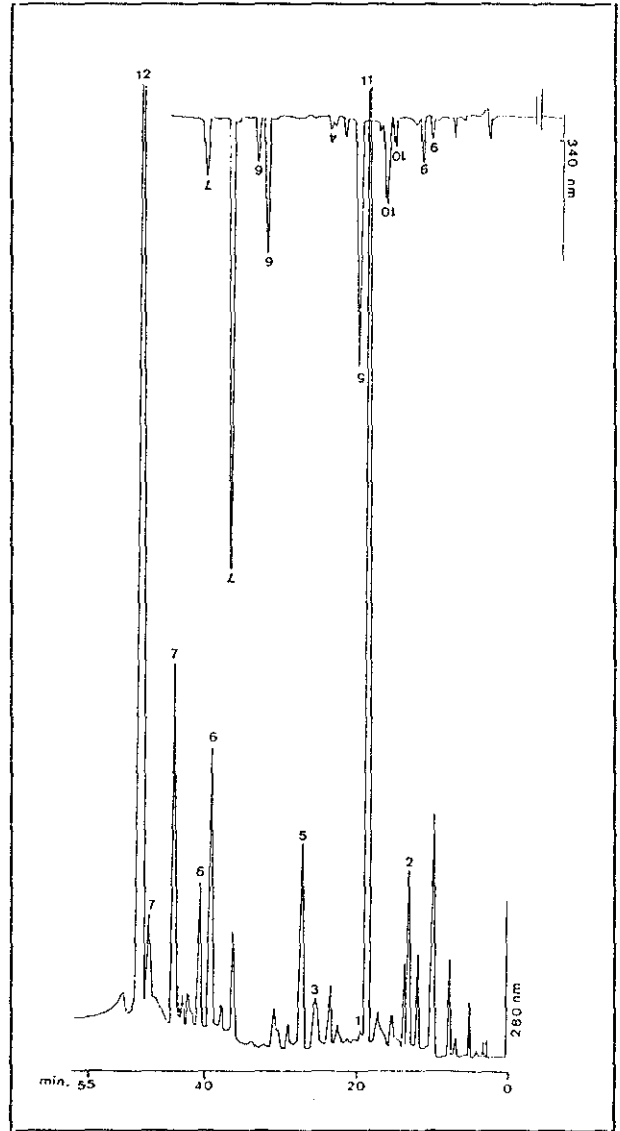


Figura V.37

Verdejo filtrado con levaduras de colección

**Acidos benzoicos.** El ácido p-OHbenzoico únicamente se aprecia cuando la fermentación tiene lugar mediante las levaduras de la colección, tanto sobre mosto filtrado como sin filtrar, sobre el primero la concentración que se observa es doble que cuando se partió de mosto sin filtrar, aún cuando en los mostos la diferencia no era tan importante. La mayor concentración de ácido protocatéquico se encuentra en la fermentación realizada con las levaduras de la colección sobre mosto filtrado, a continuación se sitúa el producto obtenido por actuación de las levaduras de bodega, y con una cantidad, que es prácticamente la mitad de esa concentración, se encuentran las otras dos muestras. Vesp y Vef3 tienen igual concentración de ácido vainillínico, y esta es la mas alta de los cuatro fermentados; con las levaduras de la colección, la cantidad es superior a la que se encuentra si intervienen las de bodega.

**Acidos cinámicos.** El ácido cafeico, en el fermentado obtenido con las levaduras de la colección solo se aprecia en cantidades traza, mientras que si estas levaduras fermentan el mosto filtrado, la concentración obtenida es la mayor de las cuatro; para la fermentación espontanea se tiene un valor intermedio entre el cuantificado en Ve+R y Vef3. Respecto al ácido p-cumárico, la cantidad mas alta se encuentra en el producto obtenido a partir del mosto filtrado, siendo semejantes entre si y mucho menores las encontradas en los otros fermentados. En la muestra Vef3 se mide la cantidad mas alta de ácido cafeico, cuando la fermentación tiene lugar de forma espontánea o con levaduras de la colección, las cantidades son menores,

aunque parecidas entre ellas, pero cuando son las levaduras de bodega las que la realizan la concentración detectada es sensiblemente inferior.

**p-Vainillina.** Cuando la fermentación tiene lugar de forma espontánea, este aldehído solo se aprecia en cantidades traza; de los otros tres fermentados la mayor presencia se observa en la muestra Ve+R.

**Esteres tartáricos de los ácidos cinámicos.** No se encuentran los correspondientes al ácido cafeico. Las concentraciones de p-cumaroil tartrato son parecidas, aun cuando es en Vef3 donde se aprecia la menor. El ester tartárico del ácido ferúlico también muestra concentraciones muy parecidas en los cuatro fermentados.

**Tirosol y triptofol.** Para los dos alcoholes la mas alta concentración se encuentra en la fermentación con levaduras de la colección, a continuación, y en orden decreciente, está la que sucede espontáneamente y la realizada con las levaduras de bodega. En el producto obtenido a partir de mosto filtrado, la cantidad de triptofol es menor que cuando se partió de mosto sin filtrar, pero para el tirosol la concentración cuantificada se encuentra en segundo lugar, tras la medida en Ve3.

### Comparación entre las dos variedades.

Se pone de manifiesto que las cantidades de tirosol y triptofol son mucho mas importantes en la variedad Verdejo que en la Jerez, con independencia de las levaduras que realizan la fermentación, por lo que esta variación debe ser achacada a la composición de los mostos que se fermentan.

De los esteres tartáricos y sus ácidos cinámicos libres, el feruroil no presenta grandes variaciones entre las dos variedades, a pesar de que la cantidad en mosto Jerez era superior, el ácido libre se encontraba en mayor cantidad en el mosto Verdejo. En los fermentados de Jerez podria decirse que el incremento de este ácido puede proceder de su liberación por la hidrólisis del ester feruroil tartárico. El p-cumaroil y su ácido libre se comportan de manera similar al feruroil y su ácido comentados anteriormente. En la variedad Verdejo p-cumaroil y feruroil asi como sus ácidos libres aumentan en las tres fermentaciones que se estan comparando, el comportamiento (formación o consumo) no parece seguir el mismo camino para las dos variedades. En la variedad Jerez hay formación de caferoil tartrato, manteniendose las concentraciones de ácido libre presentes en mosto, por lo que el ester parece proceder no de esos ácidos libres, sino de algún otro compuesto relacionado. En la variedad Verdejo, el ester se del ácido cafeico se encuentra (como en el mosto) en cantidades traza; sin embargo hay formación de ácido libre en las fermentaciones espontánea y con las levaduras de bodega.

El ácido protocatéquico aumenta ligeramente con relación a los mostos en todos los casos, aunque de manera distinta dependiendo de la modalidad fermentativa.

Con la fermentación, el p-OH benzoico disminuye mientras que el ácido vainillínico y su aldehído aumentan en las dos variedades.

La variedad parece tener mas importancia en la formación de tirosol y triptofol, así como en la mayor o menor presencia de los esterés tartáricos de los ácidos cinámicos y sus correspondientes ácidos libres.

#### 2.3.3.2.- Fermentaciones con inducción por levaduras de bodega (Ve+R1), (Ve+R2), (Ve+R3)

Los cromatogramas correspondientes a estas fermentaciones están representados en la figura V.38, y la tabla V.24 muestra los valores de los compuestos cuantificados en mg/l.

**Acidos benzoicos.** Unicamente se observa presencia de ácido p-OHbenzoico cuando la fermentación es dirigida por R1. Para el ácido protocatéquico las cantidades son parecidas en los tres casos, aunque la menor corresponde a Ve+R1 y la mayor a Ve+R3. En el ácido vainillínico se aprecian diferencias notables en función de la levadura que induce la fermentación, con R1 se tiene una cantidad casi tres veces mayor a la obtenida por intervención de R3.

**Acidos Cinámicos.** Cuando se fermenta con R3 no se detecta el ácido cafeico, para los otros dos casos se tiene la mayor cantidad en el caso de intervención de R1. Respecto al ácido p-cumárico, la mayor concentración existe en Ve+R3, los otros dos fermentados contienen cantidades similares. Para el ácido ferúlico la mayor concentración se produce cuando la fermentación es llevada a cabo por R1, seguido por la debida a R2 y por R3 en este orden.

**p-Vainillina.** No se detecta cuando la fermentación la realiza R3, con R2 aparece una pequeña cantidad que es mayor si quien interviene es R1.

Tabla V.24

POLIFENOLES CUANTIFICADOS EN FERMENTADOS DE VERDEJO CON LEVADURAS DE BODEGA			
Compuesto	Ve+R1	Ve+R2	Ve+R3
p-OHbenzoico	2.57 E-4	tr	tr
Protocatequico	1.93 E-4	2.07 E-4	2.21 E-4
Vainillínico	1.17 E-4	0.79 E-4	0.46 E-4
p-vainillina	1.46 E-4	0.83 E-4	tr
Cafeico	3.59 E-1	1.48 E-1	tr
p-cumárico	1.54 E-1	1.66 E-1	2.87 E-1
Ferúlico	3.21 E-1	2.64 E-1	2.18 E-1
Caferoil	tr	tr	tr
Cumaroil	2.94 E-1	2.94 E-1	3.68 E-1
Feruroil	3.89 E-1	3.98 E-1	4.06 E-1
Tirosol	4.73	4.93	4.80
Triptofol	13.6	15.3	14.4

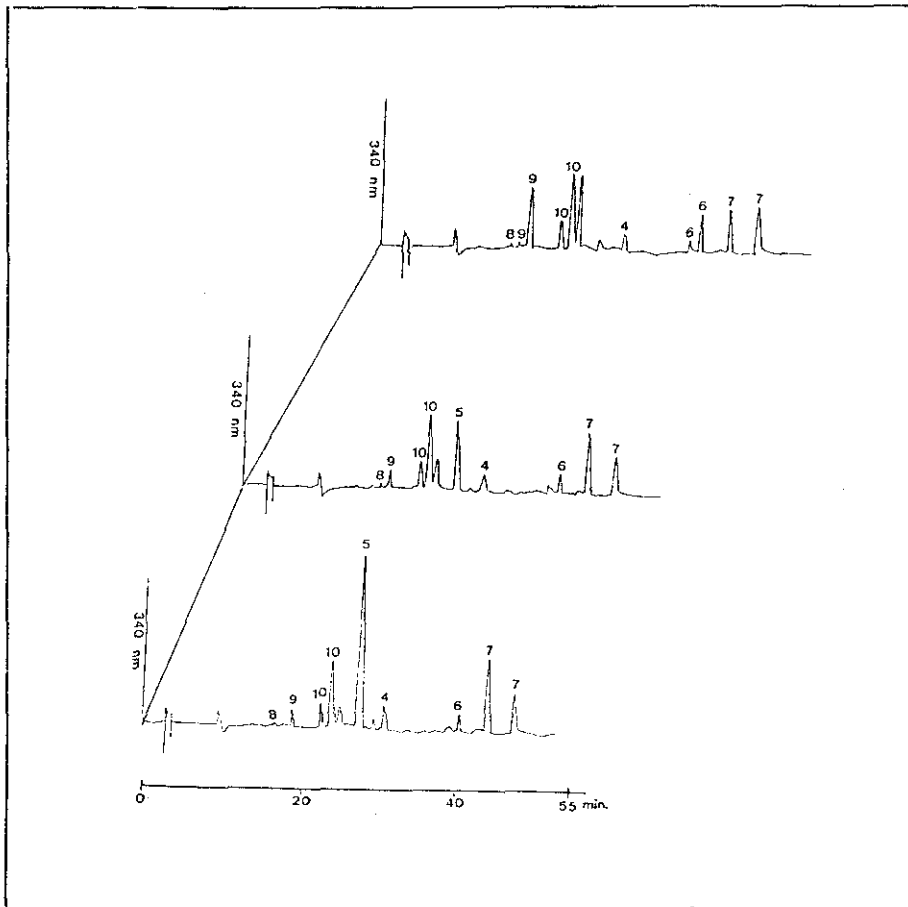


Figura V.38

Comparación de las fermentaciones de las tres levaduras de bodega.

Esteres tartáricos de los ácidos cinámicos. No se aprecian los correspondientes al ácido cafeico. El p-cumaroil tartrato se mide en igual concentración en Ve+R1 y Ve+R2, mientras que el valor obtenido en Ve+R3 es superior. Para el feruroil no hay variación importante de concentración en función de la levadura responsable.

Tirosol y Triptofol. El tirosol presenta cantidades similares en los tres fermentados, al igual que sucede para el triptofol. Para ambos alcoholes la mayor concentración aparece en Ve+R2, después se sitúa Ve+R3 y por fin Ve+R1.

#### Comparación entre fermentaciones.

Tirosol y triptofol, como se ha comentado, son producidos en mayor cantidad por la levadura de segunda fase, aunque si comparamos con las fermentaciones llevadas a cabo por las tres levaduras de forma conjunta, el resultado es más parecido al que se obtiene por la actuación de las de tercera fase (R3), mientras que para las de segunda (R2), las concentraciones son más parecidas a las obtenidas en la fermentación espontánea.

#### 2.3.3.3.- Fermentaciones con levaduras de la colección del I.F.I. sobre mosto filtrado y sin filtrar (VeK1), (VeTsp) (VeSacch), (VefK1), (VefTsp), (VefSacch)

Las figuras V.39, V.40 y V.41 muestran algunos cromatogramas de estas muestras, así como la representación mediante histogra-

mas de las cantidades en mg/l de los ácidos benzoicos, cinámicos y esteres tartáricos de estos últimos, figuras V.42 y V.43.

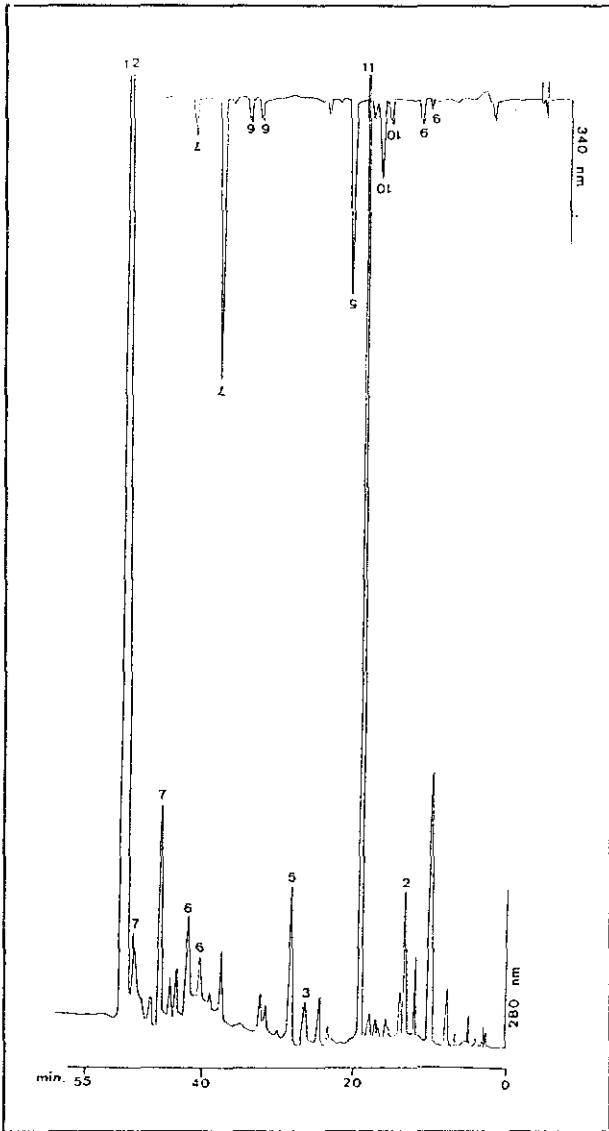


Figura V.39  
Verdejo con *Kloeckera apiculata*

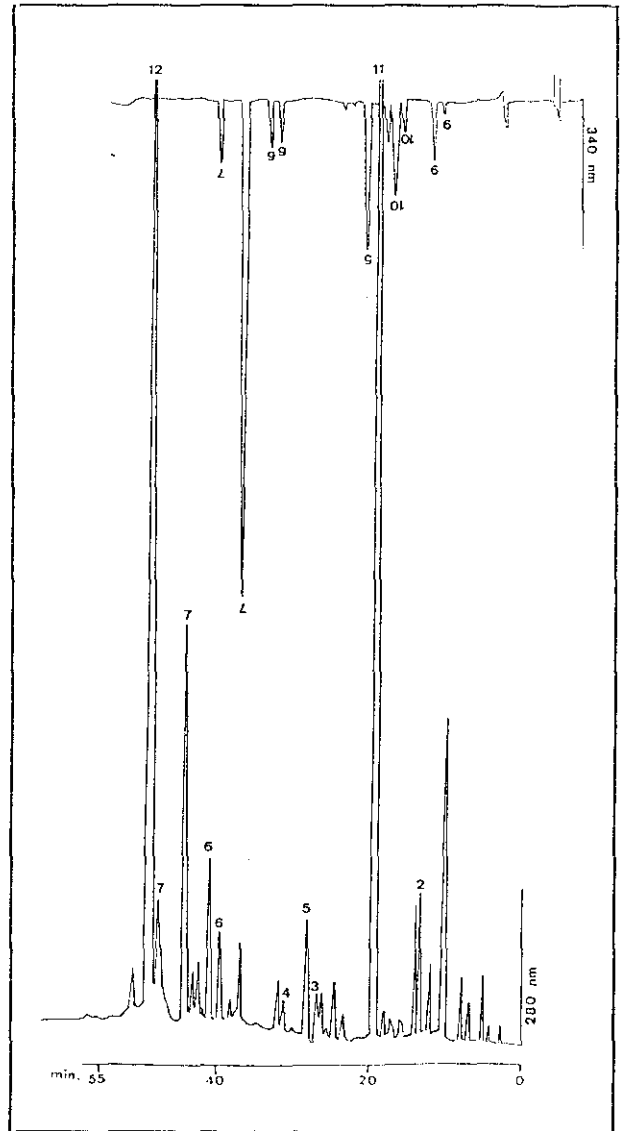


Figura V.40  
Verdejo con *Torulaspora rosei*

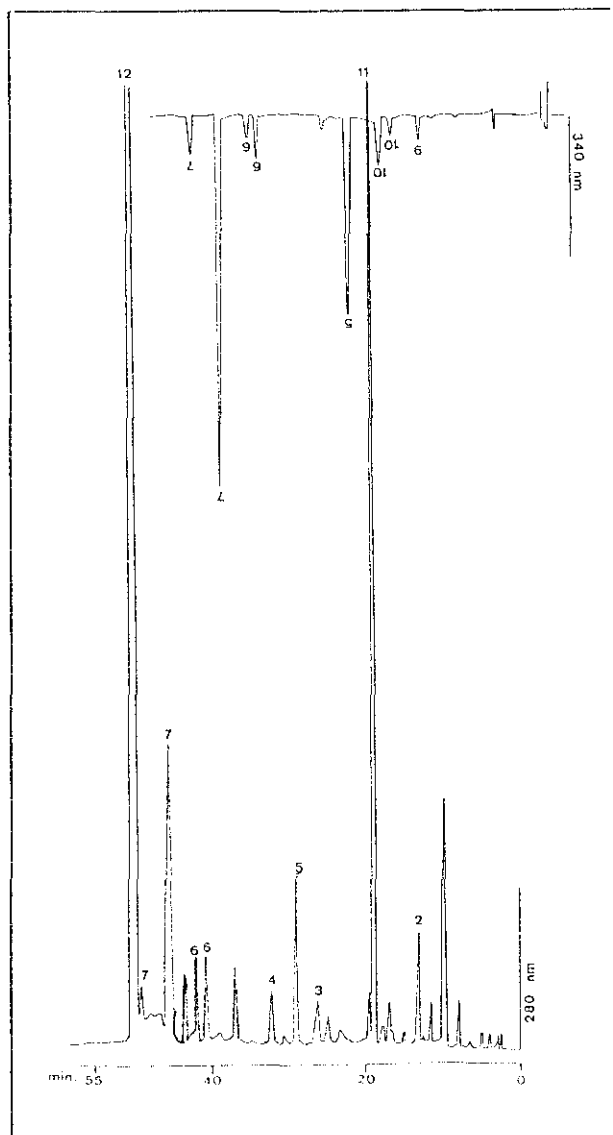


Figura V.41

Verdejo con *Saccharomyces ellipsoideus*

Figura V.42

### Acidos benzoicos

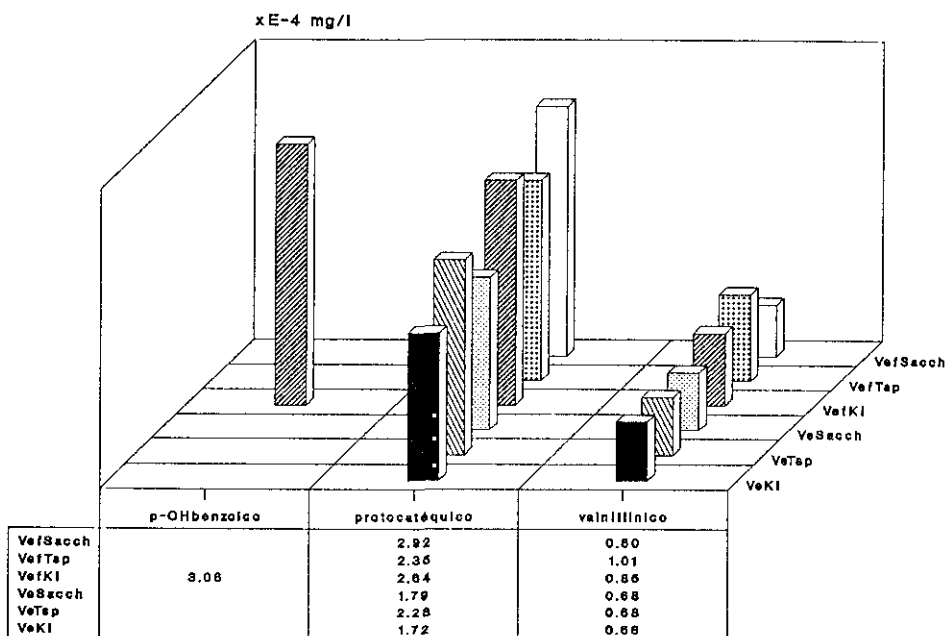
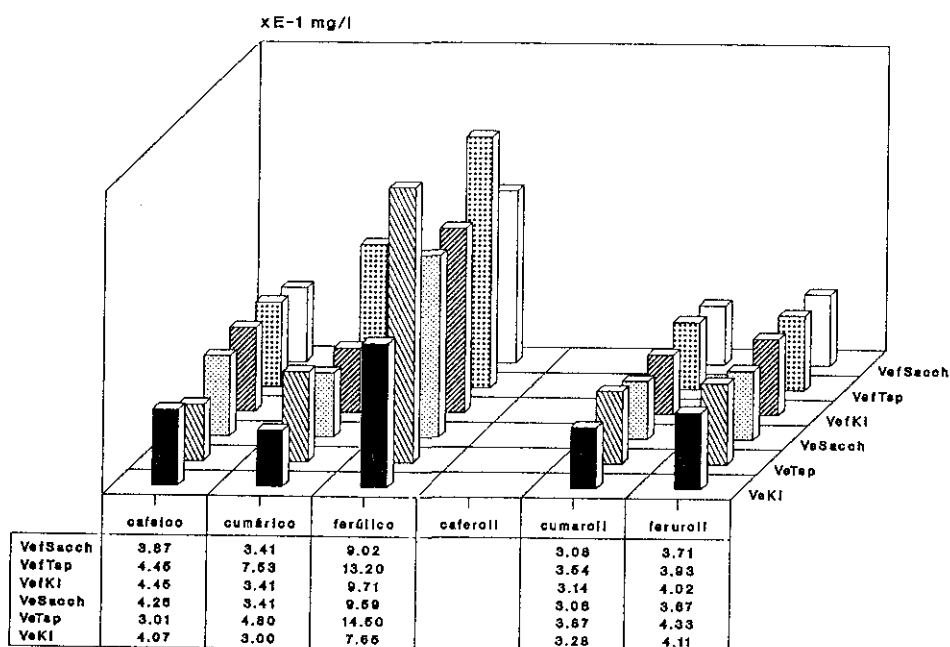


Figura V.43

### Acidos y esteres cinámicos



### Acidos benzoicos.

La cuantificación del ácido p-hidroxi benzoico solo es posible en la muestra VefK1, en los otros casos se aprecian cantidades traza. Respecto al ácido protocatéuico, partiendo de mosto sin filtrar la cantidad mayor se encuentra cuando está presente *Torulaspóra rosei*, mientras que en la fermentación que tiene lugar sobre mosto filtrado esta levadura es la que da origen a la menor concentración; siendo sobre este mosto *Saccharomyces ellipsoideus* la especie que origina la mayor abundancia. Con relación al ácido vainillínico cuando la fermentación es sobre mosto sin filtrar, la concentración es la misma para las tres levaduras; cuando se produce sobre mosto filtrado, la cantidad mas alta aparece con *Torulaspóra* y la menor con *Saccharomyces*.

### Acidos cinámicos.

Acido cafeico. La mayor concentración se alcanza con las cepas de primera y segunda fase cuando se fermenta el mosto filtrado (VefK1 y VefTsp), tras esta cantidad se encuentra la presente en la muestra VeSacch.

Acido p-cumárico. En los fermentados originados por actuación de *Torulaspóra* se detecta la mayor cantidad de este compuesto; los producidos por *Saccharomyces* presentan una concentración menor.

Acido ferúlico. Para este ácido la cantidad mas alta se observa en los fermentados debidos a *Torulaspóra*, encontrándose en el producto originado a partir de mosto sin filtrar la mayor abundancia.

### Esteres tartáricos de los ácidos cinámicos.

No se detecta en ninguno de los fermentados caferoil tartrato. La concentración mas alta de p-cumaroil tartrato se encuentra en los fermentados obtenidos con la levadura de segunda fase, seguida de los originados por las de primera. Respecto al feruroil tartrato, con los dos mostos utilizados filtrado y sin filtrar, la menor cantidad de este compuesto se encuentra cuando la fermentación se realiza por inducción con *Saccharomyces*.

### Alcoholes. (tabla V.25)

Tirosol. Tanto sobre mosto filtrado como sin filtrar, la mayor producción de este alcohol se debe a la intervención de la cepa de segunda fase *Torulaspóra rosei*, concentraciones menores se encuentran en los fermentados originados por *Kloeckera apiculata* y *Saccharomyces ellipsoideus*.

Triptofol. Este compuesto se encuentra en mayor cantidad cuando la fermentación ha tenido lugar sobre mosto sin filtrar, la concentración mas alta corresponde a VeKl.

Tabla V.25

ALCOHOLES		
FERMENTADOS	TIROSOL	TRIPTOFOL
VeKl	4.93	15.5
VeTsp	5.33	15.1
VeSacch	4.82	14.8
VefKl	4.82	5.6
VefTsp	4.92	14.1
VefSacch	4.65	4.2

#### 2.3.4.- Vinos elaborados en las bodegas de Nava del Rey.

##### 2.3.4.1.- Vinos varietales de Verdejo (VT, VS, VEz, VVc)

En las tablas V.26a y V.26b se muestran los resultados en mg/l de estos vinos a los seis y doce meses después de los tratamientos y del embotellado. En las figuras V.44 y V.45 se aprecian dos cromatogramas de estos vinos.

#### Acidos Benzoicos.

- p-OHBenzoico. A los seis meses en el vino con anhídrido sulfuroso es en donde se cuantifica la menor cantidad. En el segundo muestreo las cantidades disminuyen en el vino tratado con cítrico y ascórbico mientras que aumentan en los otros tres; la concentración en el que contiene sulfuroso prácticamente se triplica y en el tratado con enzimas se duplica.

- Protocatéquico. A los doce meses las cantidades son mayores que a los seis excepto para VVc en el que se observa una disminución importante, prácticamente cuatro veces menor. Para VS y VEz las concentraciones se duplican con el paso del tiempo, el incremento en el testigo es mucho menor.

- Vainillínico. La mayor concentración, a los seis meses, corresponde al vino testigo, mientras que la menor cantidad se encuentra en el que contiene enzimas. A los doce meses la diferencia de concentraciones entre los vinos disminuye, se observa que ha habido incremento en el adicionado con enzimas mientras que en el resto hay disminución.

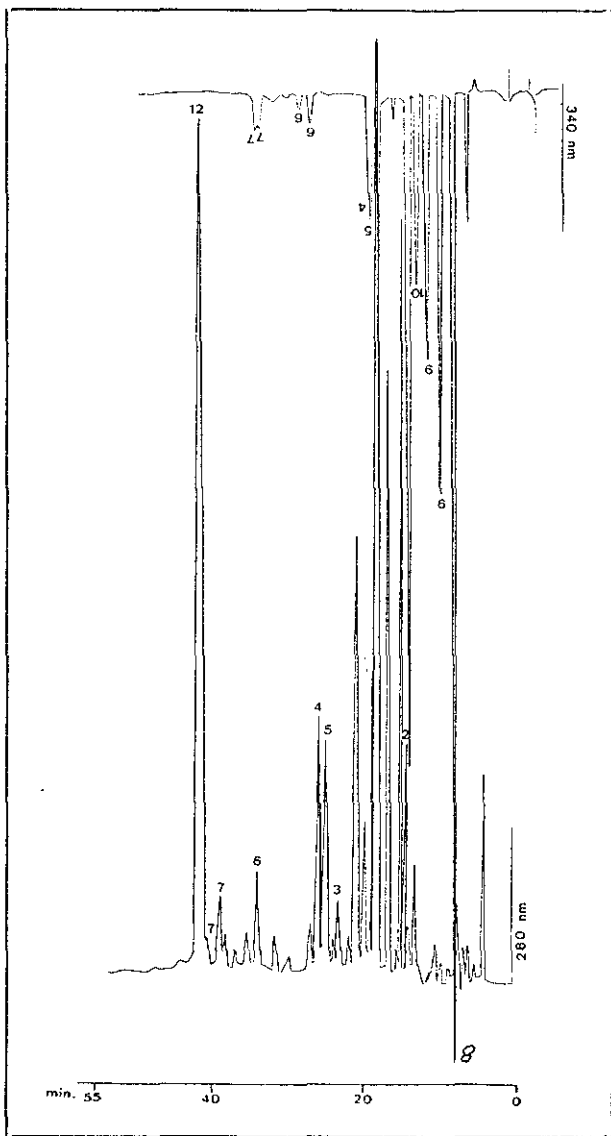


Figura V.44

Vino testigo de Verdejo a los seis meses

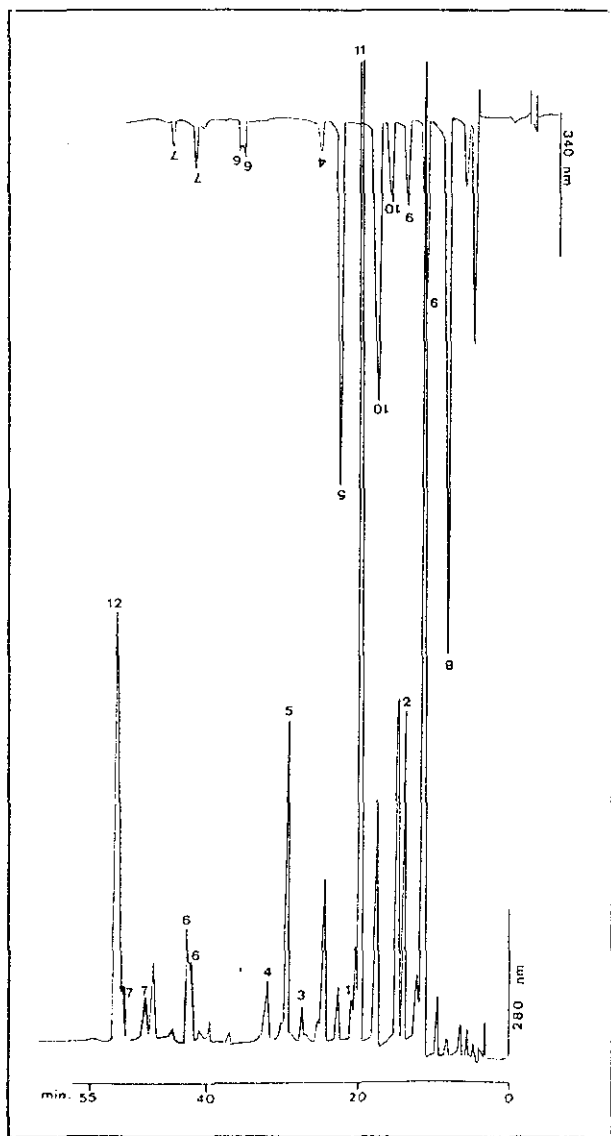


Figura V.45

Vino testigo de Verdejo a los doce meses

POLIFENOLES CUANTIFICADOS EN VINOS DE VERDEJO (6 meses)				
Compuesto	Tratamiento			
	T	S	Ez	Vc
p-OHbenzoico	1.42 E-4	0.67 E-4	1.09 E-4	1.25 E-4
Protocatéquico	4.04 E-4	3.61 E-4	3.34 E-4	5.02 E-4
Vainillínico	1.01 E-4	0.88 E-4	0.68 E-4	0.74 E-4
p-vainillina	6.96 E-4	3.12 E-4	2.94 E-4	2.31 E-4
Cafeico	5.50 E-1	8.73 E-1	52.79 E-1	10.10 E-1
p-cumárico	2.07 E-1	2.52 E-1	10.53 E-1	2.67 E-1
Ferúlico	0.24 E-1	0.89 E-1	5.49 E-1	2.18 E-1
Caferoil	1.12	1.93	tr	2.86
Cumaroil	1.42	1.47	0.65	0.99
Feruroil	0.51	0.86	0.58	1.07
Tirosol	5.6	12.0	13.4	13.2
Triptofol	7.18	6.97	4.45	6.07

Tabla V.26a

POLIFENOLES CUANTIFICADOS EN VINOS DE VERDEJO (12 meses)				
Compuesto	Tratamiento			
	T	S	Ez	Vc
p-OHbenzoico	1.75 E-4	1.91 E-4	2.24 E-4	0.92 E-4
Protocatéquico	5.86 E-4	6.21 E-4	6.70 E-4	1.09 E-4
Vainillínico	0.63 E-4	0.68 E-4	0.74 E-4	0.63 E-4
p-vainillina	1.67 E-4	1.46 E-4	2.52 E-4	1.67 E-4
Cafeico	7.99 E-1	12.02 E-1	69.31 E-1	12.11 E-1
p-cumárico	3.81 E-1	4.07 E-1	19.65 E-1	4.34 E-1
Ferúlico	3.55 E-1	4.12 E-1	11.30 E-1	4.46 E-1
Caferoil	0.75	1.66	tr	0.95
Cumaroil	0.73	0.88	0.60	0.69
Feruroil	0.69	0.73	0.45	0.67
Tirosol	20.9	14.0	13.0	11.9
Triptofol	3.70	5.13	5.88	5.68

Tabla V.26b

## Acidos Cinámicos.

Las concentraciones de los tres ácidos cinámicos aumentan durante el tiempo transcurrido entre los dos muestreos en todos los vinos. El que contiene enzimas pectolíticos es el que mayor cantidad presenta, siendo además es en el que se aprecia mayor incremento.

- Cafeico. La concentración mas alta se encuentra en VEz y la mas baja en el testigo, con una diferencia de mas de nueve veces; entre estas, de mayor a menor cantidad, VVc y VS. Después de doce meses las concentraciones han aumentado, pero el orden de presencia en las muestras no ha variado.

- p-Cumárico. La concentración mas alta la presenta el vino con enzimas, asi como el mayor incremento entre los dos muestreos. Los otros tres vinos contienen cantidades parecidas y el incremento, para ellos es del mismo orden.

- Ferúlico. De nuevo para este compuesto corresponde al vino tratado con enzimas la mayor concentración, mientras que la menor se encuentra en el testigo; aunque para este vino es para el que se produce, porcentualmente, el incremento mas pronunciado entre los dos periodos analizados.

## Aldehido.

- p-Vainillina. La concentración de este aldehido disminuye con el tiempo, es el vino con enzimas el que menor descenso experimenta, mientras que el mas importante se da en el testigo que es además la muestra con mayor concentración a los seis meses.

### **Esteres tartáricos de los ácidos cinámicos.**

Estos compuestos disminuyen a lo largo de los doce meses de almacenamiento, excepto el feruroil tartrato para el que se observa un ligero aumento en el vino testigo.

- Caferoil tartrato. En el vino que contiene enzimas pectolíticos no se cuantifican ni en el primero ni en el segundo período, y en el adicionado con los ácidos cítrico y ascórbico es donde se aprecia el mayor descenso.

- p-cumaroil tartrato. En el vino con enzimas la disminución es menor, mientras que corresponde al testigo la mas acusada.

- Feruroil tartrato. En el vino testigo este compuesto aumenta durante el periodo de conservación. Las otras muestras siguen la tendencia vista para los otros esterés, siendo mayor el descenso cuando el vino contiene cítrico y ascórbico.

### **Alcoholes.**

- Tirosol. En el primer muestreo se observa en el testigo la menor concentración de este alcohol, sin embargo tras doce meses, la cantidad cuantificada es la mayor de los cuatro vinos con gran diferencia. Con sulfuroso aumenta ligeramente entre los dos períodos, por el contrario los otros dos vinos disminuyen.

- Triptofol. El vino con enzimas es el que presenta menor concentración a los seis meses, y el único en la que se observa incremento a los doce meses.

### Diferencias en función del tratamiento.

A los seis meses: el tirosol aumenta ligeramente con todos los tratamientos, mientras que el triptofol disminuye. Con adición de anhídrido sulfuroso, tanto los ácidos cinámicos como sus correspondientes esteres tartáricos aumentan, pero los ácidos benzoicos disminuyen. La presencia de enzimas pectolíticos sobre estos vinos implica actuación sobre los esteres tartáricos de los ácidos cinámicos, originando mas ácidos libres que los encontrados en el testigo. La presencia de los ácidos cítrico y ascórbico en el vino, produce aumento tanto de los ácidos cinámicos como de sus esteres tartáricos, por lo que es posible suponer una actuación de este tratamiento sobre otros compuestos cinámicos glicosilados.

A los doce meses: El tirosol ha aumentado durante estos seis meses de conservación en el testigo, sin embargo en los vinos tratados prácticamente no hay variación, esto se puede relacionar con el número de levaduras residuales en los vinos, que en el testigo es muy superior al resto. El triptofol como era de esperar ha disminuido a los doce meses excepto en el vino que contiene enzimas pectolíticos; en este vino de los tres esteres solo disminuye el feruloil tartrato, aunque los ácidos cinámicos libres aumentan los tres, esto puede indicar que el enzima actua primero sobre caferoil y p-cumaroil tartrato, haciendolo posteriormente sobre el ester tartárico del ácido ferulico. El tratamiento con los ácidos cítrico y ascórbico no es tan drástico con los esteres como el enzimático, por ello a los doce meses

continua la escisión de los mismos, parece que comienza actuando este tratamiento sobre unos sustratos glicosilados, y más tarde inicia su acción sobre los esterés.

#### 2.3.4.2.- Vinos varietales de Viura (ViT, ViS, ViEz, ViVc)

Las figuras V.46 y V.47 corresponden a los cromatogramas y las tablas V.27a y V.27b con los resultados en mg/l, muestran su cuantificación.

##### **Acidos Benzoicos.**

- p-OHBenzoico. Para este compuesto el vino con anhídrido sulfuroso presenta la mayor concentración a los seis meses, mientras que al cabo de los doce es el que tiene la menor. No se aprecia variación en el vino testigo, mientras que ViEz y ViVc aumentan durante el periodo de conservación.

- Protocatéquico. La mayor concentración en los dos muestreos se observa en presencia de sulfuroso, también hay incremento, aunque ligero, en el vino con enzimas. Por el contrario, la concentración disminuye en los otros dos.

- Vainillínico. El vino testigo y el que contiene anhídrido sulfuroso, son los que tienen la cantidad mas elevada en los dos periodos analizados, pero en el segundo se aprecia un descenso notable, mas acusado en el testigo. Los otros dos vinos, que presentan valores mas bajos, no sufren variación.

## Acidos Cinámicos.

- Cafeico. Unicamente se cuantifica en ViS y ViVc a los seis meses, las cantidades son parecidas, aunque algo mayor en el caso del vino con anhídrido sulfuroso, además es en este en el único en que se advierte la presencia del ácido cafeico a los doce meses.

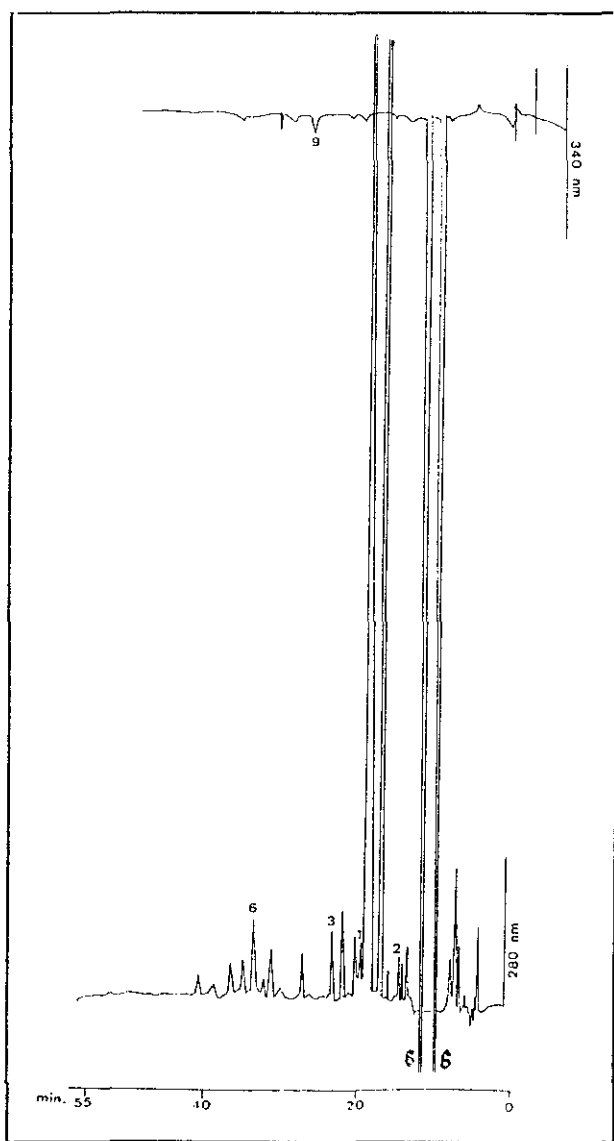


Figura V.46

Vino testigo de Viura a los seis meses

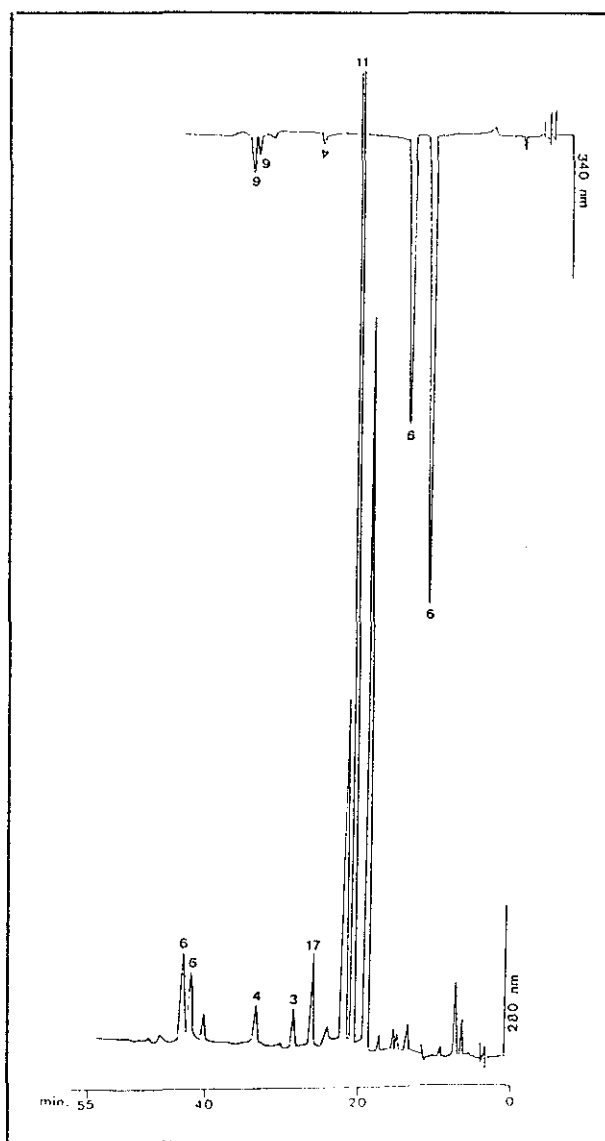


Figura V.47

Vino testigo de Viura a los doce meses

POLIFENOLES CUANTIFICADOS EN VINOS DE VIURA (6 meses)				
Compuesto	Tratamiento			
	T	S	Ez	Vc
p-OHbenzoico	2.24 E-4	3.13 E-4	1.75 E-4	1.58 E-4
Protocatéquico	0.53 E-4	5.88 E-4	1.02 E-4	5.02 E-4
Vainillínico	1.06 E-4	1.02 E-4	0.57 E-4	0.79 E-4
p-vainillina	0.62 E-4	3.12 E-4	0.41 E-4	0.19 E-4
Cafeico	tr	8.01 E-1	tr	7.80 E-1
p-cumárico	1.74 E-1	2.36 E-1	10.98 E-1	2.67 E-1
Ferúlico	tr	tr	2.07 E-1	1.49 E-1
Caferoil	tr	1.98	tr	1.42
Cumaroil	3.58	3.21	1.40	2.01
Feruroil	tr	0.96	tr	0.58
Tirosol	tr	11.6	5.6	7.4
Triptofol	tr	4.87	tr	3.35

Tabla V.27a

POLIFENOLES CUANTIFICADOS EN VINOS DE VIURA (12 meses)				
Compuesto	Tratamiento			
	T	S	Ez	Vc
p-OHbenzoico	2.24 E-4	1.25 E-4	2.07 E-4	2.08 E-4
Protocatéquico	0.43 E-4	8.18 E-4	1.43 E-4	3.48 E-4
Vainillínico	0.63 E-4	0.79 E-4	0.56 E-4	0.79 E-4
p-vainillina	0.62 E-4	1.46 E-4	tr	tr
Cafeico	tr	9.43 E-1	tr	tr
p-cumárico	1.87 E-1	4.27 E-1	12.17 E-1	5.00 E-1
Ferúlico	tr	1.84 E-1	tr	tr
Caferoil	tr	0.79	tr	tr
Cumaroil	1.58	1.70	1.36	2.32
Feruroil	tr	0.55	tr	0.45
Tirosol	10.6	12.8	10.1	11.2
Triptofol	tr	2.83	tr	tr

Tabla V.27b

- p-Cumárico. Se observa en todos los casos aumento en las concentraciones tras el período de almacenamiento. La muestra testigo prácticamente no varía, mientras que ViS y ViVc doblan la cantidad medida en el primer análisis; las cantidades más altas se miden en el vino adicionado con enzimas pectolíticos.

- Ferúlico. A los seis meses se encuentra este ácido en el vino con enzimas y en el que contiene cítrico y ascórbico, y no es cuantificado en ViT y ViS. Después de otros seis meses únicamente se mide en el vino con anhídrido sulfuroso.

#### **Aldehido.**

p-Vainillina. En el primer muestreo este aldehído se cuantifica en todos los casos, la mayor cantidad aparece en el vino con sulfuroso, más de siete veces superior a la siguiente concentración; en el segundo, únicamente se detecta en ViT y ViS, en el testigo no se aprecia variación, mientras que en presencia de sulfuroso la cantidad medida es la mitad que en el primero.

#### **Esteres tartáricos de los ácidos cinámicos.**

Los valores más elevados de estos compuestos se dan para los derivados del ácido p-cumárico, siendo además estos los únicos que se cuantifican en todos los casos.

- Caferoil tartrato. Este compuesto se detecta solo en ViS y ViVc a los seis meses, y en menor cantidad, en el vino con sulfuroso a los doce.

- p-cumaroil tartrato. En el primer muestreo las concentraciones para los vinos testigo y con sulfuroso son mayores que en

el segundo; en el tratado con los ácidos ascórbico y cítrico se aprecia incremento, mientras que en el que contiene enzimas no hay prácticamente cambio.

- Feruroil tartrato. No se observa en el testigo ni en aquel que contiene enzimas, con sulfuroso aparece mayor cantidad que con cítrico y ascórbico. El vino adicionado con sulfuroso disminuye su concentración a la mitad durante el tiempo de conservación, en ViVc el descenso no es tan importante.

#### **Alcoholes.**

- Tirosol. Para este alcohol es destacable lo que sucede en la muestra testigo, ya que en el primer análisis no se cuantifica, mientras que en el segundo aparece una cantidad semejante a la encontrada en el resto de las muestras. La cantidad mas elevada en los dos muestreos corresponde al vino con sulfuroso, que es sin embargo la que menos incremento sufre.

- Triptofol. En los vinos en que se puede cuantificar este alcohol, ViS y ViVc, se aprecia descenso entre los dos muestreos.

#### **Diferencias en función del tratamiento.**

En esta variedad los vinos tienen menores cantidades de tirosol y tripofol; en presencia de sulfuroso o de los ácidos cítrico y ascórbico ambos aumentan, respecto al testigo; con adición de enzima pectolítico la cantidad cuantificada es la menor. Esta variedad es pobre en esteres, el testigo solo muestra la presencia de p-cumaroil tartrato, con adición de sulfuroso o de cítrico y ascórbico se evidencian además los otros dos.

En cuanto a los ácidos cinámicos libres, el cafeico se incrementa en los vinos con sulfuroso o con los ácidos ascórbico y cítrico; el p-cumárico se observa en mayor cantidad cuando el vino se trató con enzimas; el ferúlico, que no se detectaba en el vino testigo, se encuentra cuando los vinos contienen enzimas o los ácidos cítrico y ascórbico. El descenso en la concentración del p-cumaroil tartrato implica en los tres vinos tratados el aumento en la cantidad del ácido p-cumárico, en mayor cantidad en el que contiene enzimas que es el que sufre la bajada de concentración mas significativa. El ácido vainillínico (al contrario que en los vinos de Verdejo) disminuye excepto cuando en el vino existe anhídrido sulfuroso, los otros benzoicos y la p-vainillina aumentan con los tratamientos. A los doce meses los dos alcoholes siguen el mismo comportamiento observado en la variedad Verdejo.

#### 2.3.4.3.- Vinos varietales de Jerez (JT, JS, JEz, JVc)

Las tablas V.28a y V.28b muestran los resultados en mg/l, y las figuras V.48 y V.49 los cromatogramas de estos vinos.

##### **Acidos Benzoicos.**

- p-OHBenzoico. Para el testigo y el adicionado con sulfuroso se advierte incremento en la concentración con el paso del tiempo, mientras que los otros dos no varían.

- Protocatéquico. Se aprecia incremento de concentración en JT, JS y JVc, es importante en el testigo, y notable en los otros dos vinos, siendo el tratado con sulfuroso el que lo sufre en

menor grado. En la muestra que contiene enzimas pectolíticos sucede lo contrario y el valor desciende a la mitad.

- Vainillínico. En el vino adicionado con los ácidos cítrico y ascórbico hay aumento ligero con la conservación, en los otros tres disminuye. A los seis meses la cantidad mas alta se encuentra en el testigo, mientras que a los doce es en JVc donde se mide la mayor.

#### Acidos Cinámicos.

- Cafeico. No se encuentra en el testigo. En el vino JVc no hay variación notable entre los dos muestreos, mientras que en presencia de sulfuroso la cantidad disminuye de forma apreciable. En el vino con enzimas se cuantifica en el primer análisis la mayor cantidad, sin embargo no se detecta en el segundo.

- p-Cumárico. Las concentraciones para este ácido se incrementan en todos los casos durante el período de conservación. Las cantidades mas elevadas corresponden a JEz. El aumento mayor tiene lugar en el vino testigo.

- Ferúlico. Esta presente en todos los vinos en el primer análisis, pero en el segundo solo se observa en JS y JVc, en el vino con anhídrido sulfuroso hay descenso, y en el adicionado con los ácidos cítrico y ascórbico aumento de concentración; la cantidad mas alta pertenece a este último.

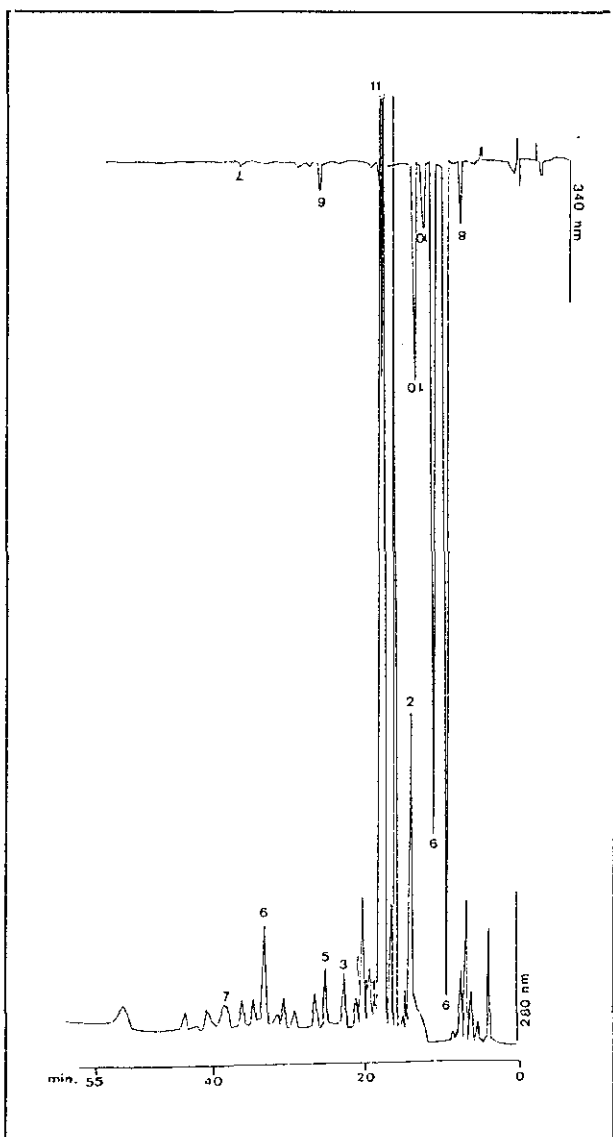


Figura V.48

Vino testigo de Jerez a los seis meses

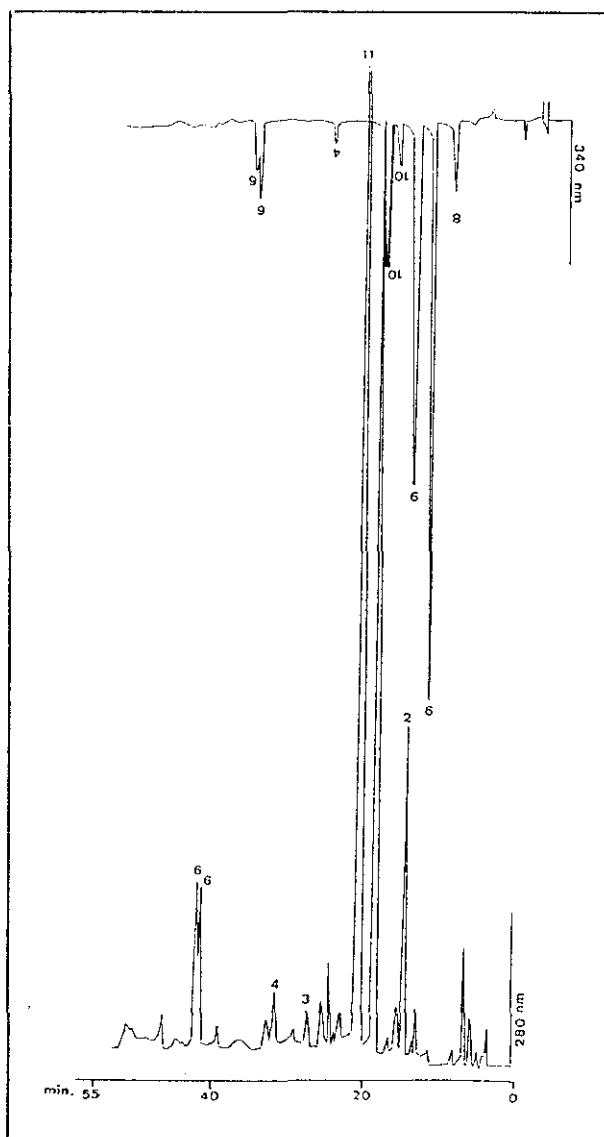


Figura V.49

Vino testigo de Jerez a los doce meses

POLIFENOLES CUANTIFICADOS EN VINOS DE JEREZ (6 meses)				
Compuesto	Tratamiento			
	T	S	Ez	Vc
p-OHbenzoico	1.09 E-4	1.25 E-4	1.58 E-4	1.09 E-4
Protocatéquico	0.32 E-4	2.91 E-4	4.32 E-4	1.09 E-4
Vainillínico	0.90 E-4	0.88 E-4	0.63 E-4	0.63 E-4
p-vainillina	tr	tr	7.80 E-4	tr
Cafeico	tr	21.18 E-1	53.85 E-1	14.79 E-1
p-cumárico	2.14 E-1	4.02 E-1	19.03 E-1	3.67 E-1
Ferúlico	0.59 E-1	2.88 E-1	2.52 E-1	2.98 E-1
Caferoil	0.40	2.70	0.41	1.09
Cumaroil	2.93	3.13	1.21	2.04
Feruroil	0.61	1.32	0.64	0.76
Tirosol	7.2	11.7	14.0	7.6
Triptofol	tr	12.1	6.33	11.01

Tabla V.28a

POLIFENOLES CUANTIFICADOS EN VINOS DE JEREZ (12 meses)				
Compuesto	Tratamiento			
	T	S	Ez	Vc
p-OHbenzoico	2.08 E-4	2.40 E-4	1.58 E-4	1.08 E-4
Protocatéquico	5.72 E-4	8.60 E-4	2.92 E-4	5.93 E-4
Vainillínico	0.63 E-4	0.57 E-4	0.52 E-4	0.68 E-4
p-vainillina	1.46 E-4	1.67 E-4	tr	tr
Cafeico	tr	13.74 E-1	tr	14.12 E-1
p-cumárico	6.14 E-1	5.47 E-1	29.15 E-1	6.14 E-1
Ferúlico	tr	1.61 E-1	tr	3.43 E-1
Caferoil	0.41	2.55	tr	2.49
Cumaroil	1.90	1.63	0.83	2.19
Feruroil	0.51	0.67	0.34	0.55
Tirosol	12.0	11.9	11.9	8.1
Triptofol	tr	5.98	tr	6.72

Tabla V.28b

### **Aldehido.**

- p-Vainillina. En el primer análisis solo se detecta en el vino con enzimas pectolíticos, en el segundo está presente en el vino testigo y en el que contiene anhídrido sulfuroso, en este último en mayor concentración.

### **Esteres tartáricos de los ácidos cinámicos.**

- Caferoil tartrato. En la muestra testigo no hay variación perceptible entre las dos tomas, en JS y JEz disminuye, de forma más importante en el vino con enzimas pectolíticos, puesto que en la segunda solo se detecta en cantidades traza. En JVc la cantidad cuantificada a los doce meses es doble que a los seis.

- p-cumaroil tartrato. La menor concentración se encuentra en JEz. La presencia de este compuesto disminuye entre los dos análisis excepto en el vino tratado con cítrico y ascórbico en el que se manifiesta un ligero incremento.

- Feruroil tartrato. En todos los casos se advierte descenso en los valores mostrados para este derivado del ácido ferúlico. La cantidad más elevada corresponde a la muestra con sulfuroso.

### **Alcoholes.**

- Tirosoil. En JT y JVc hay aumento de este alcohol tras los doce meses de conservación, en JS la cantidad no sufre variación, y en JEz, donde se cuantifica el mayor valor, hay descenso. El incremento más notable tiene lugar en el testigo.

- Triptofol. No se observa su presencia en el testigo, en los otros tres casos los valores descienden, a la mitad en JS y JVc y no se aprecian en el segundo análisis en JEz.

### Diferencias en función del tratamiento.

A los seis meses el comportamiento de tirosol y triptofol es igual que en los vinos de las variedades comentadas anteriormente, de nuevo la mayor cantidad aparece en el tratamiento con enzimas; a los doce meses hay más tirosol sobre todo en el testigo, con los tratamientos las variaciones son menores. El triptofol, que no se observa en el vino testigo, aumenta con los tratamientos, pero a los doce meses hay menos que a los seis.

Con anhídrido sulfuroso se aprecia mayor cantidad de los tres esteres que en el testigo, y como siempre, caferoil y feruroil tartrato sufren modificaciones más importantes que el ester tartárico del ácido p-cumárico. Respecto a los ácidos cinámicos libres se comprueba de nuevo que el cafeico es el que sufre el mayor incremento. De los otros compuestos que aparecen en la tabla, únicamente disminuye el ácido vainillínico.

La adición de enzimas pectolíticos parece implicar una fuerte actuación sobre el p-cumaroil tartrato, de forma que queda en libertad el correspondiente ácido cinámico libre; el aumento de cafeico y ferúlico no guarda relación con los esteres, y debe explicarse por alguna hidrólisis enzimática de otros fenoles relacionados (compuestos glicosilados). El ácido vainillínico disminuye también con este tratamiento.

El tratamiento con ácidos cítrico y ascórbico hace que tanto caferoil como feruroil tartrato aumenten mientras que el p-

cumaroil disminuye. Los ácidos cinámicos libres aumentan, sobre todo cafeico y ferúlico, quizá debido a que los ácidos cítrico y ascórbico adicionados actuen sobre algún compuesto que libere ácidos cinámicos, que originen a su vez tanto el aumento de estos compuestos como de sus esteres en el vino.

2.3.4.4.- Vinos de la mezcla de variedades (MT, MS, MEz, MvC)

Las tablas V.29a y V.29b muestran los valores cuantificados en estos vinos expresados en mg/l, y las figuras V.50 y V.51 algunos de los cromatogramas.

**Acidos Benzoicos.**

- p-OHBenzoico. La mayor concentración a los seis meses se encuentra en el vino con anhídrido sulfuroso, y a los doce en el testigo. En el testigo y el que contiene enzimas se observa igual incremento, el tratado con sulfuroso no muestra variación, y en el que se adiciona con cítrico y ascórbico disminuye de cantidad.

- Protocatéquico. En el testigo y el que contiene sulfuroso disminuye muy ligeramente, mientras que en los otros dos hay ligero incremento de concentración. En cualquier caso la concentración más importante se encuentra en el vino con sulfuroso.

- Vainillínico. Para este ácido los vinos testigo, con sulfuroso, y con ácidos ascórbico y cítrico muestran descenso en la concentración entre los seis y doce meses, mientras que en la muestra que contiene enzimas pectolíticos hay ligero aumento.

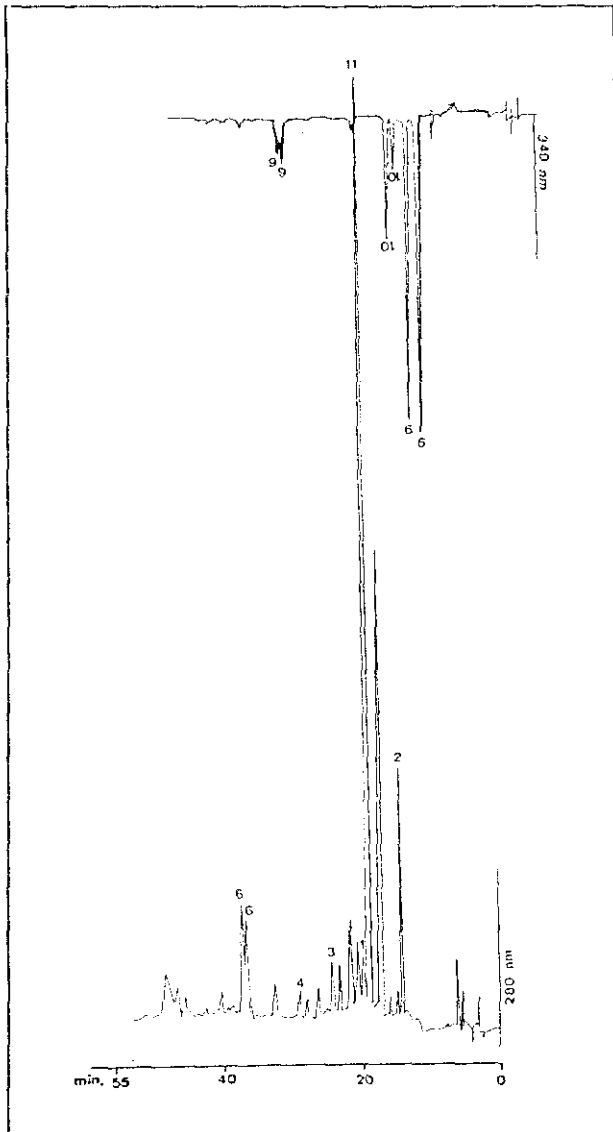


Figura V.50

Vino testigo de la mezcla de variedades a los seis meses

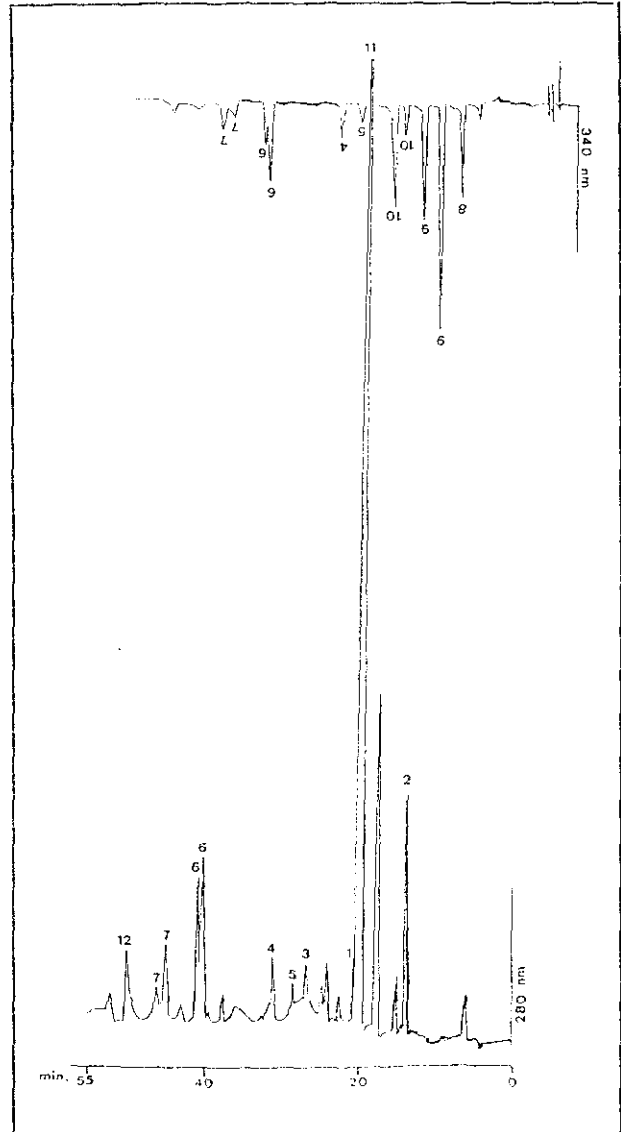


Figura V.51

Vino testigo de la mezcla de variedades a los doce meses

### **Acidos Cinámicos.**

- Cafeico. En los vinos en que se puede cuantificar este ácido, MS y MVc, el comportamiento es distinto según este presente el sulfuroso, en cuyo caso hay disminución, o los ácidos ascórbico y cítrico donde se observa incremento.

- p-Cumárico. Para este compuesto la cantidad más alta aparece en MEz. Con el paso del tiempo se advierte descenso en las concentraciones de los vinos MT, MS y MEz, mientras que en MVc, por el contrario, hay aumento.

- Ferúlico. En el primer análisis en el vino testigo, y en el segundo en el que contiene enzimas pectolíticos se detecta solo en cantidades traza. En el vino con sulfuroso la cantidad de este compuesto no varía entre las dos determinaciones.

### **Aldehido.**

- p-Vainillina. La mayor cantidad de este compuesto aparece en el segundo análisis, en los vinos MT y MS. En el primer análisis la concentración más alta la presenta MVc; mientras que en el tratado con anhídrido sulfuroso no se observa.

### **Esteres tartáricos de los ácidos cinámicos.**

- Caferoil tartrato. En el vino con enzimas no se observa la presencia de este compuesto, la concentración más alta se mide en MVc. Entre los seis y doce meses se aprecia en el vino con sulfuroso o con ácidos ascórbico y cítrico un descenso importante, mientras que en el testigo hay aumento.

- p-cumaroil tartrato. Las cantidades más altas de este compuesto se encuentran en el primer análisis, siendo en el vino

testigo donde se mide la mayor. En todos los casos la concentración es menor una vez transcurridos los doce meses de conservación.

- Feruroil tartrato. La mayor cantidad se aprecia, en el primer muestreo, en el vino con ácidos cítrico y ascórbico, en el segundo es en el vino con anhídrido sulfuroso donde aparece la más alta; entre los dos muestreos hay descenso en la concentración.

POLIFENOLES CUANTIFICADOS EN VINOS DE LA MEZCLA DE VARIEDADES (6 meses)				
Compuesto	Tratamiento			
	T	S	Ez	Vc
p-OHbenzoico	1.91 E-4	2.24 E-4	1.91 E-4	2.08 E-4
Protocatéquico	4.32 E-4	9.02 E-4	2.71 E-4	5.44 E-4
Vainillínico	0.79 E-4	0.90 E-4	0.42 E-4	0.95 E-4
p-vainillina	0.19 E-4	tr	0.62 E-4	1.88 E-4
Cafeico	tr	11.15 E-1	tr	14.41 E-1
p-cumárico	4.01 E-1	3.87 E-1	11.26 E-1	5.74 E-1
Ferúlico	tr	3.32 E-1	1.38 E-1	3.78 E-1
Caferoil	0.38	1.07	tr	2.22
Cumaroil	1.34	1.24	0.98	1.37
Feruroil	0.49	0.64	0.38	0.72
Tirosol	5.9	5.8	5.5	12.8
Triptofol	tr	5.07	0.36	5.16

Tabla V.29a

**Alcoholes.**

- Tirosol. El vino MVC es en el que se detecta la mayor cantidad en los dos análisis, sin embargo es el único en que se aprecia descenso.

- Triptofol. Este alcohol ve incrementada su concentración en la muestra testigo, en el resto disminuye.

POLIFENOLES CUANTIFICADOS EN VINOS DE LA MEZCLA DE VARIEDADES (12 meses)				
Compuesto	Tratamiento			
	T	S	Ez	Vc
p-OHbenzoico	2.73 E-4	2.24 E-4	2.08 E-4	1.75 E-4
Protocatéquico	4.11 E-4	8.67 E-4	3.90 E-4	5.58 E-4
Vainillínico	0.63 E-4	0.73 E-4	0.68 E-4	0.63 E-4
p-vainillina	1.88 E-4	2.09 E-4	tr	tr
Cafeico	tr	4.83 E-1	tr	17.67 E-1
p-cumárico	2.94 E-1	3.54 E-1	10.81 E-1	6.53 E-1
Ferúlico	3.32 E-1	3.32 E-1	tr	6.40 E-1
Caferoil	0.42	0.50	tr	0.82
Cumaroil	0.85	0.70	0.55	0.79
Feruroil	0.44	0.50	0.33	0.45
Tirosol	10.7	10.2	8.0	11.2
Triptofol	0.65	2.53	tr	4.38

Tabla V.29b

Influencia de las variedades en los vinos de mezcla.

Tirosol. En el testigo y en el vino adicionado con los ácidos cítrico y ascórbico la cantidad de este compuesto es más parecida a la medida en la variedad Verdejo que es la mayoritaria. El vino tratado con enzimas muestra mayor similitud con el de variedad Viura, y en el que contiene anhídrido sulfuroso no se observa relación, presentando un valor menor que el observado en los vinos univarietales. A los doce meses este alcohol tiene un valor más parecido al que se encuentra en los vinos de Viura y Jerez. En cuanto a los tratamientos el comportamiento es semejante para las tres variedades, aumentando en los vinos con sulfuroso o con enzimas respecto al primer análisis y siguiendo un comportamiento análogo al de Verdejo.

Triptofol. El vino testigo parece seguir a los seis meses el comportamiento de las variedades minoritarias. A los doce meses todos los valores son menores excepto el del testigo, donde hay ligero aumento, lo cual implica mayor influencia de la variedad Verdejo que se comportaba de esta manera.

Esteres tartáricos de los ácidos cinámicos. Para el caferoil el dato que aparece en el testigo es más parecido al que se encuentra en Jerez; con relación a los tratamientos los vinos de la mezcla de variedades se comportan de forma parecida a la variedad mayoritaria, que como ya se ha dicho es la Verdejo.

#### 2.3.4.5.- Vinos de los fangos de la variedad Verdejo (FVT, FVS, FVEZ, FVVc)

Las tablas V.30a y V.30b reflejan los resultados de la cuantificación de los cromatogramas, expresados en mg/l.

#### **Acidos Benzoicos.**

- p-OHBenzoico. En el primer análisis la mayor cantidad se observa en el vino que contiene enzimas pectolíticos, los vinos testigo y con sulfuroso tienen igual concentración. A los doce meses se aprecia descenso en la cantidad presente en el vino con enzimas, mientras que en los otros tres hay aumento, el más destacado corresponde al vino con sulfuroso.

- Protocatéquico. El testigo tiene la menor concentración en el primer análisis, no se aprecia variación con el paso del tiempo en el que contiene sulfuroso, que muestra la mayor cantidad en los dos

muestreos; en los otros dos vinos se observa descenso, más importante en presencia de enzimas pectolíticas.

- Vainillínico. Para este ácido la concentración mayor está en el vino testigo, a continuación se encuentra el vino con anhídrido sulfuroso; en estos dos vinos, y en FVEz, la concentración decrece con el paso del tiempo, mientras que en el que contiene los ácidos ascórbico y cítrico aumenta.

#### **Acidos Cinámicos.**

- Cafeico. Únicamente se cuantifica en la muestra que contiene sulfuroso. Durante el período de conservación hay un incremento muy importante en la concentración.

- p-Cumárico. Para este compuesto es destacable el incremento que se aprecia en la muestra que contiene enzimas pectolíticos, también se observa aumento en la muestra testigo pero en una cantidad mucho menor; en FVVc sucede lo contrario, se aprecia descenso en la concentración; en la muestra con sulfuroso la variación es poco significativa.

- Ferúlico. Para los vinos FVT y FVS se advierte incremento de concentración entre los seis y doce meses, mayor en FVS donde en el segundo análisis aparece la cantidad más alta. En FVEz solo se aprecia a los seis meses.

#### **Aldehido.**

- p-Vainillina. En el vino con anhídrido sulfuroso se mide la cantidad más alta. Durante el período de conservación hay descenso en la concentración de este aldehido en todos los casos, excepto en FVT donde se observa un ligero aumento.

Tabla V.30a POLIFENOLES CUANTIFICADOS EN VINOS DE LOS FANGOS DE VERDEJO (6 meses)				
Compuesto	Tratamiento			
	T	S	Ez	Vc
p-OHbenzoico	1.58 E-4	1.58 E-4	1.91 E-4	1.42 E-4
Protocatéquico	1.51 E-4	5.16 E-4	3.62 E-4	2.07 E-4
Vainillínico	0.84 E-4	0.79 E-4	0.46 E-4	0.13 E-4
p-vainillina	0.40 E-4	5.05 E-4	1.88 E-4	0.19 E-4
Cafeico	tr	2.13 E-1	tr	tr
p-cumárico	4.14 E-1	3.74 E-1	3.54 E-1	6.93 E-1
Ferúlico	1.84 E-1	1.38 E-1	2.29 E-1	tr
Caferoil	tr	1.07	0.42	tr
Cumaroil	1.18	0.77	0.87	0.64
Feruroil	0.34	0.69	0.65	0.42
Tirosol	5.9	4.7	5.5	6.7
Triptofol	tr	6.85	1.95	6.84

Tabla V.30b POLIFENOLES CUANTIFICADOS EN VINOS DE LOS FANGOS DE VERDEJO (12 meses)				
Compuesto	Tratamiento			
	T	S	Ez	Vc
p-OHbenzoico	1.95 E-4	2.24 E-4	1.08 E-4	1.58 E-4
Protocatéquico	1.58 E-4	6.91 E-4	0.48 E-4	1.09 E-4
Vainillínico	0.80 E-4	0.68 E-4	0.56 E-4	0.63 E-4
p-vainillina	0.44 E-4	1.67 E-4	0.29 E-4	tr
Cafeico	tr	20.06 E-1	tr	tr
p-cumárico	5.05 E-1	3.67 E-1	11.14 E-1	4.34 E-1
Ferúlico	3.19 E-1	6.40 E-1	tr	tr
Caferoil	tr	1.43	tr	tr
Cumaroil	0.76	0.48	0.35	0.73
Feruroil	0.33	0.76	0.23	0.43
Tirosol	3.3	13.2	8.0	9.6
Triptofol	tr	5.49	tr	tr

### **Esteres tartáricos de los ácidos cinámicos.**

- Caferoil tartrato. Se cuantifica solo en los vinos FVS y FVEz, en el primero se evidencia aumento en la concentración mientras que en el segundo se advierte descenso.

- Cumaroil tartrato. En FVVc la cantidad se incrementa mientras que en el resto de los vinos se aprecia descenso, en igual proporción para el testigo y el que contiene anhídrido sulfuroso y algo menor cuando contiene enzimas pectolíticos.

- Feruroil tartrato. La cantidad más alta se encuentra en el vino con sulfuroso, que es además el único que la incrementa con el paso del tiempo en forma notable, ya que en el que contiene ácido ascórbico y ácido cítrico, el aumento es en una proporción mucho menor. Es destacable el descenso que se aprecia en el vino con enzimas pectolíticos.

### **Alcoholes.**

- Tirosol. En el vino que contiene anhídrido sulfuroso casi se triplica la concentración durante el tiempo de conservación, en el vino testigo hay descenso.

- Triptofol. No se advierte su presencia en el testigo, en los otros vinos hay descenso de concentración entre los dos análisis.

### **Comparación entre vinos de fangos y univarietales.**

Al comparar los vinos de los fangos de la variedad Verdejo con los vinos correspondientes, se observa que en el testigo de los primeros se encuentra, en general, menor concentración de todos los

compuestos analizados, excepto de los ácidos p-cumárico y ferúlico a los seis meses y p-vainillina a los doce.

En el tratamiento con enzimas se aprecia que, en estos vinos hay mayor cantidad de esteres tartáricos de los ácidos cinámicos a los seis meses que en el vino normal, disminuyendo a los doce hasta alcanzar una concentración menor que en el vino univarietal. Los ácidos libres se encuentran también en mucha menor cantidad en el vino de los fangos; siendo destacable la gran diferencia observada en el ácido cafeico, que solo se detecta en el vino con sulfuroso.

En los fangos tratados con los ácidos cítrico y ascórbico, hay menor cantidad de todos los compuestos excepto de ácido p-OH benzoico, ácido p-cumárico, triptofol y feruroil tartrato que los vinos de Verdejo. A los doce meses solo el p-cumaroil tartrato se encuentra en concentración superior.

La presencia de anhídrido sulfuroso implica las mayores diferencias entre tratamientos y testigo, así estos vinos de fangos presentan distinto comportamiento, tanto a los seis como a los doce meses, respecto al vino varietal normal.

2.3.4.6.- Vinos de los fanqos de la mezcla de variedades  
(FMT, FMS, FMEz, FMVc)

Las tablas V.31a y V.31b reflejan las cantidades presentes en estos vinos expresadas en mg/l.

**Acidos Benzoicos.**

- p-OHBenzoico. En el vino FMEz se observa en el primer análisis la mayor cantidad, sin embargo en el segundo, tras una notable disminución, la cantidad medida es la menor; por el contrario, en los vinos testigo y con anhídrido sulfuroso hay aumento de este compuesto, mayor en el vino testigo. En el que contiene ácidos ascórbico y cítrico esta en cantidades traza.

- Protocatéquico. No se mide en el testigo, para FMEz y FMVc la cuantificación es solo posible en el primer análisis; en el vino que contiene sulfuroso se obtienen las mayores cantidades, además durante el período de conservación hay un ligero aumento.

- Vainillínico. Las mayores cantidades se encuentran, en el primer análisis, en los vinos testigo y con enzimas pectolíticos, estos son además, los que porcentualmente experimentan un descenso más importante en sus concentraciones, durante el tiempo de permanencia a 3 °C.

**Acidos Cinámicos.**

- Cafeico. Su presencia se manifiesta únicamente en el vino con anhídrido sulfuroso, y la menor cantidad se observa en el segundo análisis.

- p-Cumárico. Este ácido esta presente en los cuatro vinos. En el primer análisis la cantidad es la misma en el testigo y en el que contiene sulfuroso, y algo inferior en FMVc, mientras que en FMEz se aprecia una concentración tres veces superior. En el segundo análisis la cantidad cuantificada para el vino con enzimas, es de nuevo la más alta y la que muestra mayor incremento con el paso del tiempo; en el vino testigo y en el que contiene los ácidos ascórbico y cítrico, los valores son ligeramente superiores a los primeros, en el vino tratado con sulfuroso se observa prácticamente igual cantidad.

- Ferúlico. En el primer análisis no se observa su presencia en FMVc, la cantidad en el testigo es la menor de las medidas y la encontrada en FMS la mayor con una gran diferencia entre ambas. En el segundo análisis únicamente se cuantifica en el vino con sulfuroso, aunque la cantidad es ahora la tercera parte de la encontrada en el primero.

#### **Aldehido.**

- p-Vainillina. La mayor concentración se mide, en el primer análisis, en el vino testigo, en el no se encuentra variación entre las dos determinaciones; en los vinos con enzimas o con cítrico y ascórbico solo se pueden cuantificar a los seis meses. En el vino con sulfuroso se observa el mayor incremento.

Tabla V.31a POLIFENOLES CUANTIFICADOS EN VINOS DE LOS FANGOS DE LA MEZCLA (6 meses)				
Compuesto	Tratamiento			
	T	S	Ez	Vc
p-OHbenzoico	1.58 E-4	1.75 E-4	4.21 E-4	tr
Protocatéquico	tr	5.51 E-4	2.49 E-4	3.27 E-4
Vainillínico	0.95 E-4	0.79 E-4	0.95 E-4	0.68 E-4
p-vainillina	0.62 E-4	0.57 E-4	0.40 E-4	0.40 E-4
Cafeico	tr	20.83 E-1	tr	tr
p-cumárico	3.54 E-1	3.54 E-1	11.55 E-1	3.07 E-1
Ferúlico	0.70 E-1	10.05 E-1	1.15 E-1	tr
Caferoil	tr	1.15	tr	0.39
Cumaroil	2.37	2.77	1.46	2.25
Feruroil	0.32	0.7	0.37	tr
Tirosol	6.2	6.8	6.4	7.3
Triptofol	tr	8.31	tr	0.42

Tabla V.31b POLIFENOLES CUANTIFICADOS EN VINOS DE LOS FANGOS DE LA MEZCLA (12 meses)				
Compuesto	Tratamiento			
	T	S	Ez	Vc
p-OHbenzoico	2.24 E-4	1.91 E-4	1.48 E-4	tr
Protocatéquico	tr	5.72 E-4	tr	tr
Vainillínico	0.79 E-4	0.73 E-4	0.68 E-4	0.63 E-4
p-vainillina	0.62 E-4	1.04 E-4	tr	tr
Cafeico	tr	15.2 E-1	tr	tr
p-cumárico	4.60 E-1	3.47 E-1	34.15 E-1	3.94 E-1
Ferúlico	tr	3.71 E-1	tr	tr
Caferoil	tr	1.88	tr	tr
Cumaroil	1.82	1.55	0.99	1.57
Feruroil	tr	0.52	tr	tr
Tirosol	11.5	11.7	10.1	11.1
Triptofol	tr	4.42	tr	tr

### **Esteres tartáricos de los ácidos cinámicos.**

- Caferoil tartrato. Se detecta únicamente en FMS y FMVc en la primera determinación; en la segunda solo en el vino con sulfuroso.

- p-cumaroil tartrato. El ester disminuye notablemente durante el tiempo en que los vinos permanecen almacenados. Porcentualmente el vino que contiene anhídrido sulfuroso es el que experimenta el descenso más importante.

- Feruroil tartrato. No se puede cuantificar en el vino tratado con cítrico y ascórbico, la concentración más alta se encuentra en el vino FMS, después de la conservación a 3 °C durante doce meses, únicamente se puede medir en el vino con sulfuroso.

### **Alcoholes.**

- Tirosol. En todos los casos hay más cantidad a los seis que a los doce meses.

- Triptofol. Se detecta en FMS y FMVc, en ambos se observa disminución con el tiempo de almacenamiento, así tras este período, en FMS decrece a la mitad y en FMVc solo se aprecia en cantidades traza.

### **Comparación de vinos de mezcla y de los de los fangos.**

Al comparar los vinos de mezcla y los de sus fangos, observamos que a los seis meses las concentraciones de los ácidos

p-OHbenzoico, protocatéquico y p-cumárico, de los esteres caferoil tartrato y feruroil tartrato, asi como de triptofol son menores en los segundos, tanto para el testigo como para los vinos tratados. El p-cumaroil tartrato se encuentra en mayor cantidad en los vinos de mezcla en todos los casos a los seis y doce meses. Con la conservación disminuyen los ácidos p-OHbenzoico, protocatéquico y p-cumárico, p-vainillina y triptofol, asi como el feruroil tartrato.

En general puede decirse que los vinos de fangos muestran menores cantidades de estos compuestos fenólicos que los vinos de mezcla correspondientes.

#### 2.3.4.7.- Vinos varietales de Verdejo con levaduras de bodega en pureza (VR1, VR2, VR3)

Las tablas V.32a y V.32b muestran los valores, expresados en mg/l, de los compuestos cuantificados.

Tabla V.32a POLIFENOLES CUANTIFICADOS EN VINOS DE VERDEJO  
POR INDUCCION CON LEVADURAS (6 meses)

Compuesto	Levadura		
	R1	R2	R3
p-OHbenzoico	2.24 E-4	1.42 E-4	2.40 E-4
Protocatéquico	0.74 E-4	1.93 E-4	0.74 E-4
Vainillínico	0.68 E-4	0.57 E-4	tr
p-vainillina	0.19 E-4	tr	0.19 E-4
Cafeico	tr	tr	tr
p-cumárico	2.80 E-1	2.34 E-1	tr
Ferúlico	tr	0.24 E-1	0.24 E-1
Caferoil	tr	tr	tr
Cumaroil	0.63	0.48	0.48
Feruroil	0.40	0.38	0.31
Tirosol	4.6	4.6	3.2
Triptofol	tr	0.42	0.62

Tabla V.32b POLIFENOLES CUANTIFICADOS EN VINOS DE VERDEJO  
POR INDUCCION CON LEVADURAS (12 meses)

Compuesto	Levadura		
	R1	R2	R3
p-OHbenzoico	1.92 E-4	2.24 E-4	2.78 E-4
Protocatéquico	1.65 E-4	0.67 E-4	0.73 E-4
Vainillínico	0.57 E-4	0.63 E-4	0.64 E-4
p-vainillina	tr	tr	tr
Cafeico	tr	tr	tr
p-cumárico	4.67 E-1	3.87 E-1	5.81 E-1
Ferúlico	tr	tr	tr
Caferoil	tr	tr	tr
Cumaroil	0.58	0.47	0.36
Feruroil	0.48	0.35	tr
Tirosol	7.8	6.1	3.0
Triptofol	0.30	tr	tr

### **Acidos Benzoicos.**

- p-OHBenzoico. A los seis meses la concentración más alta corresponde al vino VR1, y a los doce a VR2. Comparando los dos análisis se aprecia que en VR1 hay descenso, mientras que VR2 y VR3 muestran más aumento.

- Protocatéutico. La mayor cantidad en el primer análisis se encuentra en VR2, sin embargo a los doce meses, es en este vino donde la cantidad cuantificada es menor. En VR3 no hay variación apreciable mientras que en VR1 hay incremento, de tal forma que este vino es el que presenta la concentración más elevada.

- Vainillínico. En VR3 se detecta en cantidades traza en el primer análisis, aunque es en este vino donde se aprecia la mayor cantidad en el segundo, también el vino VR2 sufre un ligero aumento. En el vino VR1 se observa disminución de concentración para este ácido.

### **Acidos Cinámicos.**

- Cafeico. En estos vinos no se encuentra este ácido.

- p-Cumárico. Hay aumento de concentración en los tres casos. Porcentualmente la cantidad incrementada es similar en los vino VR1 y VR2, pero mucho mayor en el caso de VR3.

- Ferúlico. En la primera determinación no se encuentra en VR1, las cantidades medidas en los otros dos vinos son iguales. A los doce meses no se advierte la presencia de este ácido en ninguno de los vinos.

### **Aldehidos.**

- p-Vainillina. Las cantidades encontradas en VR1 y VR3 en el primer análisis son iguales, no se observa su presencia en VR2. A los doce meses no se cuantifica este compuesto.

### **Esteres tartáricos de los ácidos cinámicos.**

- Caferoil tartrato. Se aprecia solo en cantidades traza.

- p-cumaroil tartrato. Hay disminución notable en la concentración del ester en VR3, para VR1 y VR2 la variación es pequeña.

- Feruroil tartrato. En VR3 este compuesto desaparece durante el período de conservación, en VR2 y en VR1 aumenta ligeramente.

### **Alcoholes.**

- Tirosol. Las cantidades para VR1 y VR2 son iguales a los seis meses; después de otros seis meses se observa aumento en VR1 y VR2, mientras que en VR3 no hay variación.

- Triptofol. En el primer análisis no se advierte la presencia de este alcohol en VR1, sin embargo en el segundo es en el único vino en el que se cuantifica.

### **Comparación entre los tres vinos.**

Los tres vinos presentan un comportamiento similar durante el primer período de conservación respecto a los ácidos p-OH benzoico y protocatéquico y para la p-vainillina, los inducidos con las levaduras de 1ª y 2ª fase frente a los ácidos vainillíni-

co y p-cumárico y tirosol, y las de 2ª y 3ª fase para el ácido ferúlico, p-cumaroil tartárico y triptofol.

A los doce meses, este comportamiento es distinto y puede destacarse el aumento del ácido p-cumárico y del tirosol para las fermentaciones inducidas con las tres levaduras, y un descenso de concentración de triptofol para las de 2ª y 3ª fase, así como aumento para las de primera.

#### 2.3.5.- Actuación de especies filmógenas.

La tabla V.33 muestra los resultados de la cuantificación de los vinos utilizados como base para esta experiencia. El ácido p-OHbenzoico se encuentra en mayor cantidad en el vino sin maderizar, mientras que para el ácido vainillínico su menor concentración está en el vino sin madera; en el ácido protocaté- quico no se aprecian diferencias. La p-vainillina solo se detecta en cantidades traza. Los ácidos cinámicos se encuentran en concentración más baja en el vino que estuvo sin madera. Los esterres tartáricos de estos ácidos no presentan grandes diferen- cias, siendo la concentración del p-cumaroil tartrato superior en el vino sin madera.

Compuesto	Antes de la siembra	
	Sin madera	Con madera
p-OHbenzoico	17.12 E-4	10.95 E-4
Protocatequico	9.39 E-4	9.39 E-4
Vainillínico	1.56 E-4	1.84 E-4
p-vainillina	tr	tr
Cafeico	35.55 E-1	54.46 E-1
p-cumárico	12.67 E-1	13.01 E-1
Ferúlico	16.86 E-1	24.84 E-1
Caferoil	1.45	1.49
Cumaroil	1.60	1.20
Feruroil	1.08	1.14
Tirosol	15.1	14.9
Triptofol	1.41	1.49

Sobre estos vinos se siembra una levadura filmógena, en unos casos la cepa 1663 que es *Saccharomyces beticus* y en otros la cepa 1685 que es *Saccharomyces montuliensis*. Los vinos se incuban a 18 °C; una vez que se ha desarrollado el velo, se mantienen con él durante dos meses, al cabo de los cuales se determinan las diferencias originadas por la actuación de estas levaduras. Los resultados se muestran en la tabla V.34.

Tabla V.34		POLIFENOLES CUANTIFICADOS EN VINOS DESPUES DE DOS MESES DE PERMANENCIA BAJO VELO			
Compuesto	Vino y levadura sembrada				
	CM 1663	SM 1663	CM 1685	SM 1685	
p-OHbenzoico	10.63 E-4	8.16 E-4	8.98 E-4	7.01 E-4	
Protocatequico	4.32 E-4	.8.04 E-4	6.49 E-4	8.88 E-4	
Vainillínico	1.01 E-4	1.21 E-4	0.74 E-4	1.67 E-5	
p-vainillina	tr	tr	tr	tr	
Cafeico	7.32 E-1	13.26 E-1	7.23 E-1	14.03 E-1	
p-cumárico	4.47 E-1	7.07 E-1	4.54 E-1	6.13 E-1	
Ferúlico	2.41 E-1	3.78 E-1	1.95 E-1	4.35 E-1	
Caferoil	0.78	0.76	0.71	0.69	
Cumaroil	0.71	0.46	0.63	0.45	
Feruroil	0.55	0.53	0.55	0.58	
Tirosol	6.2	5.9	6.1	6.2	
Triptofol	2.3	tr	tr	tr	

*Saccharomyces beticus* y *Saccharomyces montuliensis* producen descenso en la concentración de todos los compuestos cuantificados, tanto en los vinos con estancia en madera como sin ella. Este descenso es menor para los esteres tartárico.

#### 2.3.6.- Vinos comerciales (MN86, MB86, MD)

La tabla V.35 muestra los resultados obtenidos, expresados en mg/l, de los cromatogramas de estos vinos, que se representan en las figuras V.52 y V.53.

Compuesto	MN 86	MB 86	MD
p-OHbenzoico	4.71 E-4	1.14 E-4	13.41 E-4
Protocatéquico	4.31 E-4	5.30 E-4	26.93 E-4
Vainillínico	1.06 E-4	1.45 E-4	4.58 E-4
p-vainillina	tr	tr	tr
Cafeico	23.51 E-1	18.63 E-1	18.81 E-1
p-cumárico	7.93 E-1	9.66 E-1	15.34 E-1
Ferúlico	4.12 E-1	5.14 E-1	45.66 E-1
Caferoil	0.90	1.06	0.99
Cumaroil	0.73	1.21	0.95
Feruroil	0.57	0.65	tr
Tirosol	6.8	6.7	15.1
Triptofol	2.05	1.04	2.36

Mantel Blanco presenta mayores cantidades de los ácidos protocatéquico y vainillínico que Mantel Nuevo pero menor de ácido p-OHbenzoico. Respecto a los ácidos cinámicos, también es MB el que muestra mayores cantidades para dos de ellos. El vino MD es el que muestra las concentraciones más elevadas para todos los compuestos con excepción del ácido cafeico y de los esteres de los ácidos cinámicos.

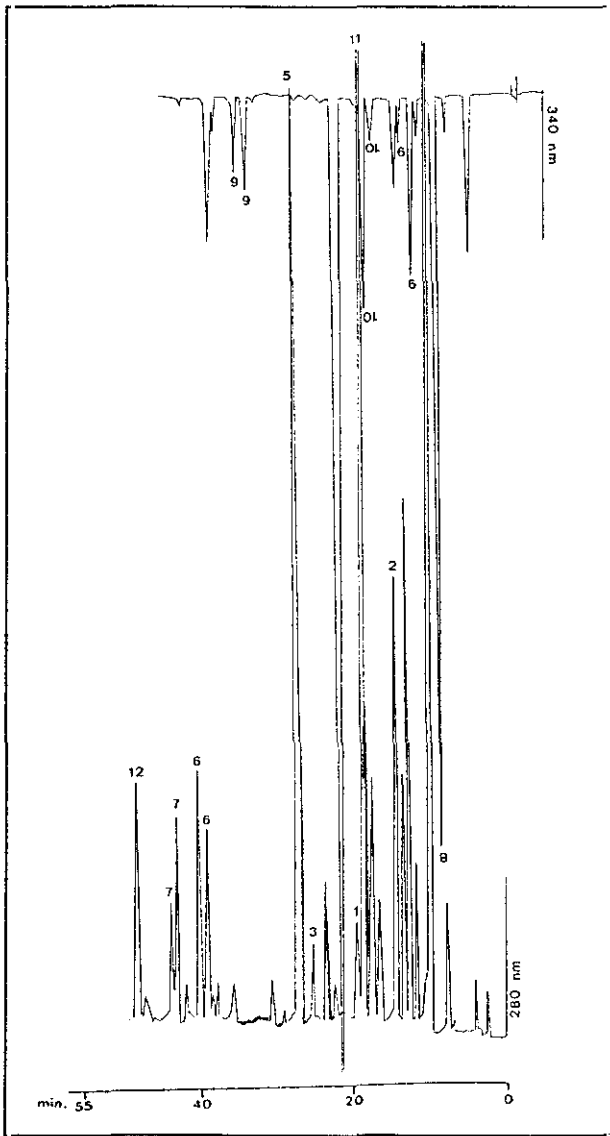


Figura V.52  
Mantel Nuevo del 86

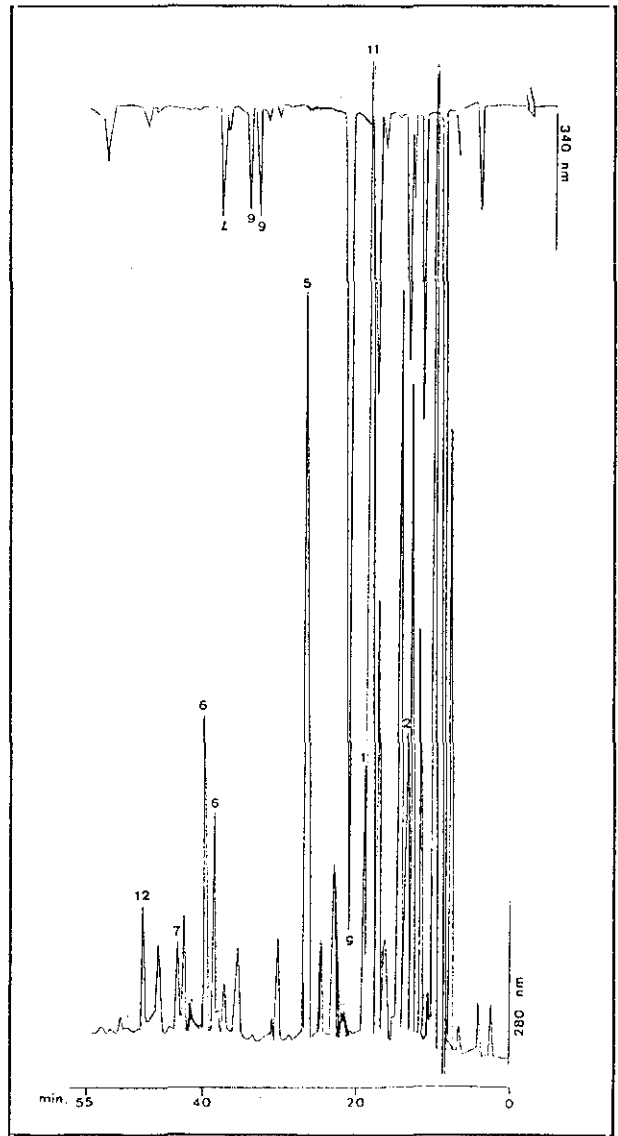


Figura V.53  
Mantel Blanco del 86

## 2.4.- Conclusiones.

- 2.4.1.- El mosto de la variedad Jerez es más rico en compuestos fenólicos de bajo peso molecular que la variedad Verdejo.
- 2.4.2.- Cuando la fermentación tiene lugar con su propia microflora epifítica se consiguen unos resultados mucho más parecidos a los obtenidos si se utilizan las levaduras de la colección del I.F.I. que si el proceso fermentativo se debe a las levaduras de bodega, tanto en mosto de la variedad Verdejo como en la variedad Jerez.
- 2.4.3.- La fermentación espontánea es la que menor concentración de aldehídos produce.
- 2.4.4.- Tirosol y triptofol se producen en cantidades muy superiores en todos los fermentados de la variedad Verdejo.
- 2.4.5.- Los esteres tartáricos de los ácidos ferúlico y p-cumárico aumentan con la fermentación en la variedad Verdejo, y disminuyen en la Jerez. El ester tartárico del ácido cafeico, que no se detecta en la variedad Verdejo, aumenta sin embargo, en la variedad Jerez.

- 2.4.6.- La fermentación inducida sobre Verdejo con R1 (levadura de bodega de primera fase) ofrece resultados parecidos a los conseguidos por inducción con R2 (levadura de bodega de segunda fase). La intervención de R3 (levadura de bodega de tercera fase) hace que el producto obtenido sea semejante al que se consigue por intervención de las tres levaduras de bodega juntas. Como es lógico puesto que las fermentaciones inducidas con levaduras aisladas tienen lugar sobre mosto sin esterilizar, que contiene de forma natural las tres levaduras de bodega.
- 2.4.7.- Las levaduras de la colección del I.F.I. cuando actúan de forma aislada producen concentraciones superiores de ácidos cinámicos y de sus ésteres tartáricos que las de bodega. Respecto a los compuestos benzoicos son las de bodega, actuando de manera independiente las que originan las mayores cantidades.
- 2.4.8.- El tirosol aumenta y el triptofol disminuye, entre los dos períodos de conservación estudiados, con independencia del tratamiento.
- 2.4.9.- El tratamiento con anhídrido sulfuroso hace que aparezca ácido gentísico y mayores concentraciones de ésteres tartáricos de los ácidos cinámicos, de sus ácidos libres y de ácido protocatéuico que los

existentes en los vinos testigo, tanto a los seis como a los doce meses de conservación.

2.4.10.- En todos los vinos el tratamiento con enzimas pectolíticos implica menor cantidad de esteres tartáricos de los ácidos cinámicos y mayor de esos ácidos libres.

2.4.11.- El vino univarietal de Viura es el más pobre de las tres variedades en estos compuestos, principalmente en ácidos cinámicos y sus esteres.

2.4.12.- Los ácidos cinámicos disustituidos, el siringaldehído y la escopoletina aumentan en los vinos tras seis meses de permanencia en madera.

2.4.13.- Después de dos meses bajo velo, en general, disminuye la concentración de todos los compuestos, tendiendo a unificarse los vinos con madera entre sí, e igualmente los sin madera, independientemente de la levadura que forma el velo.

2.4.14.- En el vino con madera se aprecia la presencia de 4 hidroxí 3 metoxi fenil propionico.



## VI.- ESTUDIO DE POLIALCOHOLES



## 1.- Materiales y métodos.

Se ha utilizado un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer modelo 8310, con detector de ionización de llama, columna capilar de sílice fundida de 25 m x 0,2 mm con OV 101 como fase estacionaria.

Las condiciones cromatográficas son:

Gas portador .....	Nitrógeno a 5 Kg/cm <sup>2</sup>
Temperatura inicial .....	200 °C
Isoterma durante .....	7,0 minutos
Gradiente de temperatura .....	30 °C/min.
Temperatura final .....	250 °C
Isoterma durante .....	2 minutos
Temperatura del detector .....	300 °C
Temperatura del inyector .....	300 °C
Volumen de inyección .....	1 µl
Tiempo de análisis .....	13 minutos

### 1.1.- Preparación y derivatización de la muestra para CG.

1 ml de muestra a la que se añaden 0,3 ml de perseitol, que es utilizado como patrón interno, se concentran a presión reducida y 45 °C hasta sequedad total.

La concentración del perseitol es de 1 mg/ml, apropiada para trabajar en vino.

Una vez preparada la muestra se procede a su derivatización, en condiciones totalmente anhidras, para lo cual es preciso adicionarle, una vez concentrada a sequedad, 1 ml de anhídrido acético y 0.2 ml de piridina anhidra. El matraz se tapa con tapón

esmerilado y se lleva a estufa a 100°C donde permanecerá 60 minutos. Transcurrido este tiempo, se concentra a sequedad en rotavapor a 60 °C y presión reducida. Se recoge con unas gotas de cloruro de metileno (diclorometano).

Los polialcoholes y azúcares así acetilados son estables a temperatura ambiente.

A continuación se presentan tres cromatogramas tipo, uno de patrones (figura VI.1), otro responde al mosto variedad Verdejo (figura VI.2), y el tercero es un vino de bodega de la variedad Verdejo a los seis meses del embotellado (figura VI.3).

Las inyecciones en el cromatógrafo son siempre de 1 µl.

La numeración en los cromatogramas corresponde a:

Eritritol .....	1	Arabitol .....	2
Xilitol .....	3	Inositol .....	4
Manitol .....	5	Sorbitol .....	6
Fructosa .....	7	Glucosa .....	8
Perseitol .....	P		

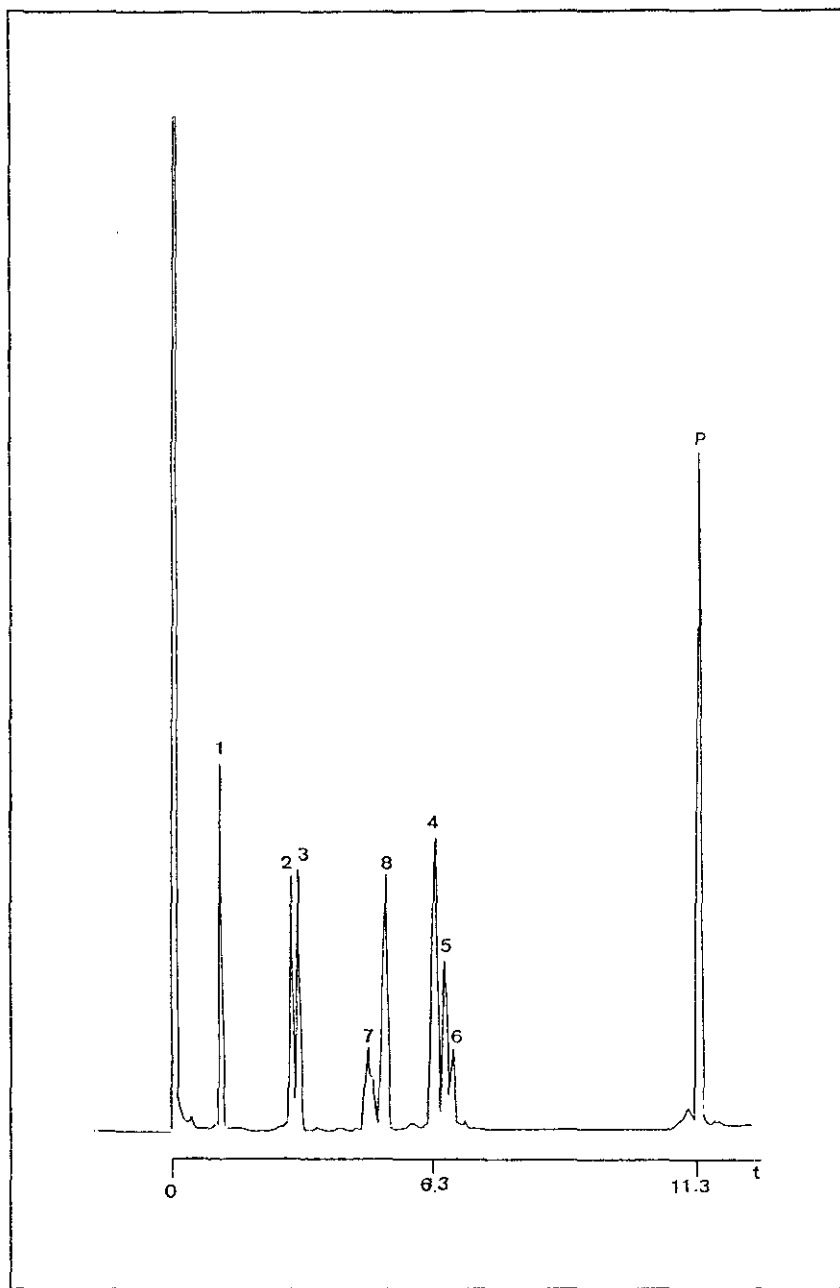


Figura VI.1

Patrones

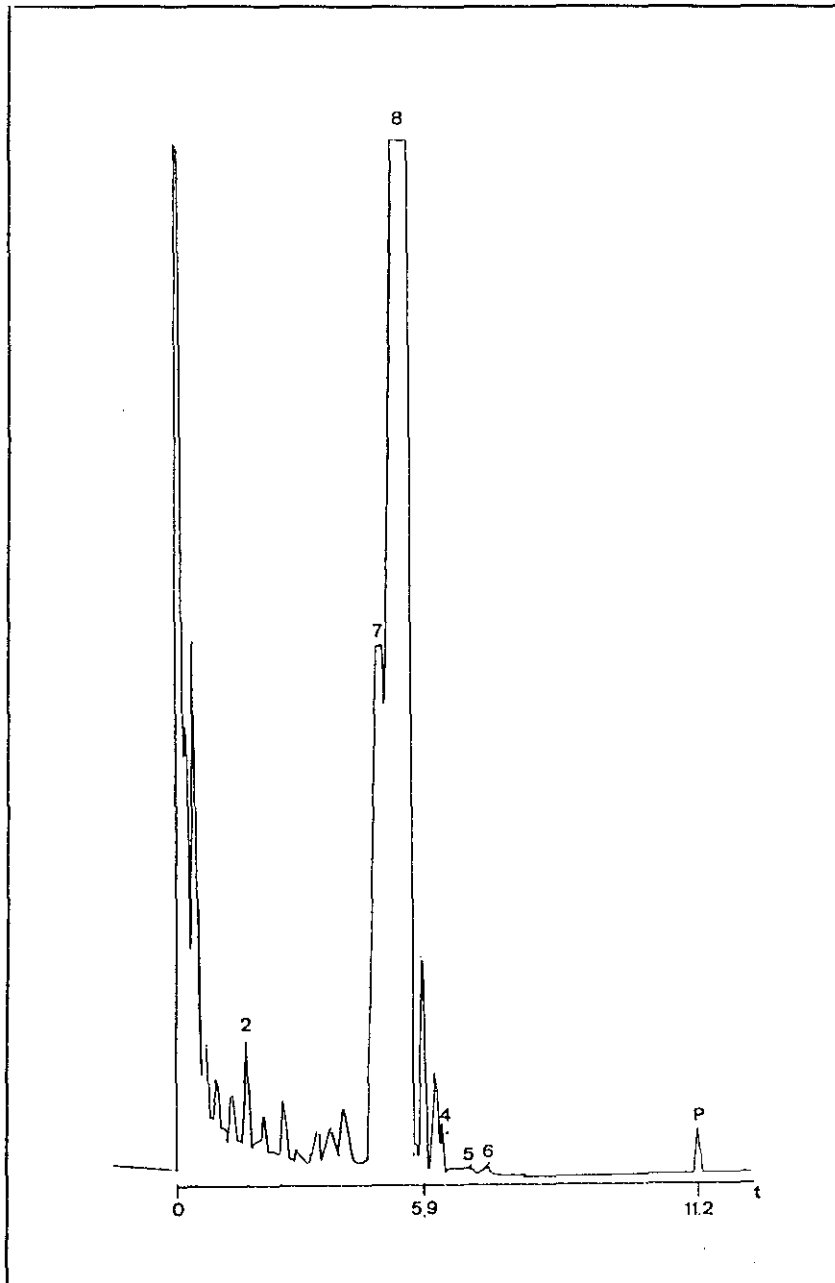


Figura VI.2

Mosto de la variedad Verdejo (sin diluir)

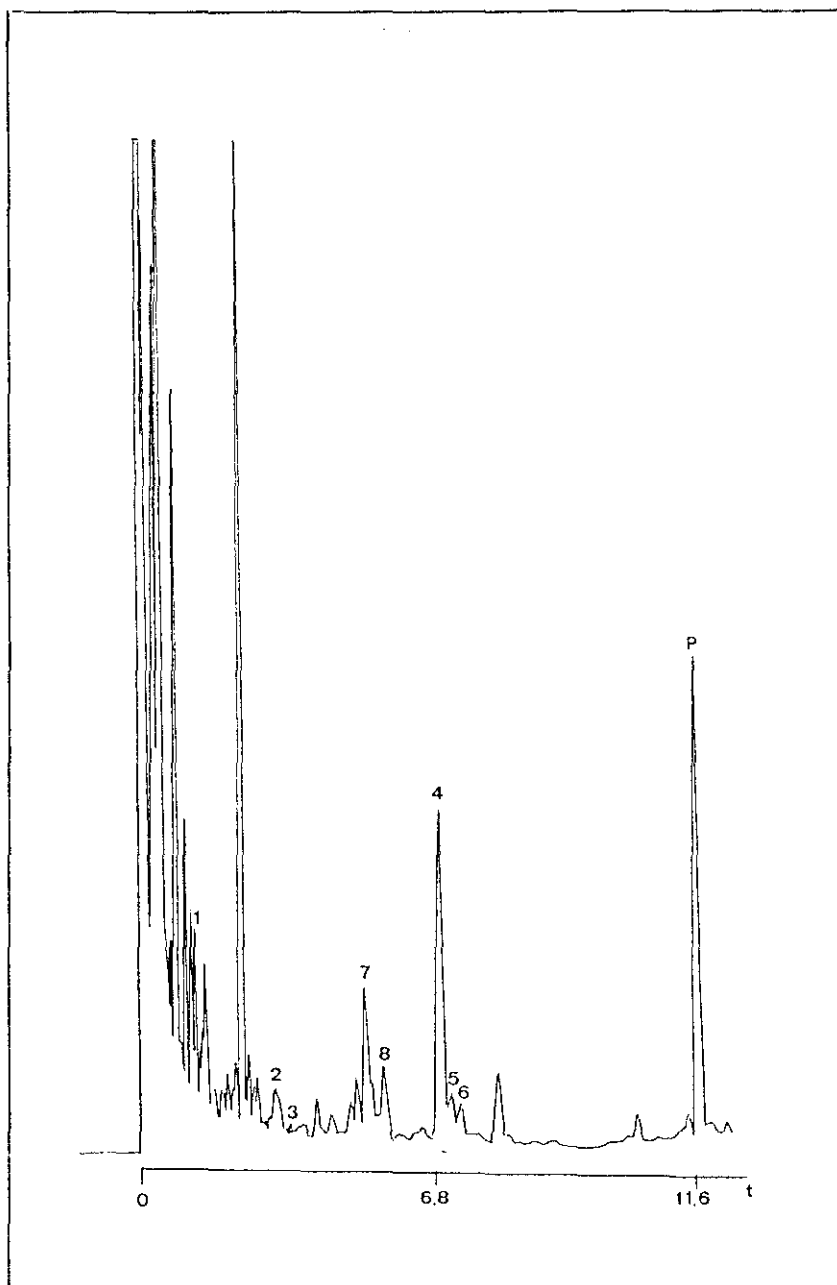


Figura VI.3

Vino Verdejo testigo a los seis meses de embotellar

## 2.- Resultados y discusión.

### 2.1 - Mostos.

A continuación en la tabla VI.1 se muestran los resultados de la cuantificación de los polialcoholes de los correspondientes cromatogramas.

Tabla VI.1

POLIALCOHOLES EN MOSTOS			
Compuesto	Ve	Je	Vef
Eritritol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	t	0.37	t
Arabitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	2.40	3.80	3.25
Inositol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	4.47	4.97	3.50
Manitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.49	0.61	0.61
Sorbitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.47	t	t
Polialcoholes totales ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	7.83	9.75	7.36

**Eritritol.** No puede cuantificarse en el mosto de la variedad Verdejo, mientras que en Jerez se aprecia una cantidad de 0.037.

**Arabitol.** La variedad Jerez es más rica que la Verdejo para este polialcohol, se aprecia un 58% mas que en el mosto Verdejo sin filtrar; en el filtrado se cuantifica una cantidad intermedia.

**Inositol.** La mayor concentración se encuentra en el mosto de Jerez y la menor en el mosto Verdejo filtrado; al comparar los mostos sin filtrar se observa un 11% menos en el correspondiente a la variedad Verdejo.

**Manitol.** La menor cantidad está presente en el mosto Verdejo sin filtrar, en el Verdejo filtrado y en el Jerez la cantidad es la misma.

**Sorbitol.** Unicamente se encuentra en cantidad computable en mosto Verdejo sin filtrar, en los otros dos solo se aprecian cantidades traza.

## 2.2.- Fermentados de los mostos de la variedad Jerez.

Fermentación espontánea (Jeesp), fermentación con tres levaduras de la colección del I.F.I. (Je3), fermentación con tres levaduras autóctonas utilizadas en bodega (Je+R).

En la tabla VI.2 están representados los valores de cada uno de los polialcoholes analizados en estos fermentados, así como el total de los mismos.

Compuesto	Jeesp	Je3	Je+R
Eritritol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	1.08	0.57	0.83
Arabitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	1.3	t	0.13
Inositol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	5.21	5.38	4.85
Manitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.55	0.54	0.54
Sorbitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.36	0.25	0.27
<b>Polialcoholes totales (<math>\times 10^{-1}</math> mg/l)</b>	<b>8.50</b>	<b>6.74</b>	<b>6.62</b>

**Eritritol.** Aumenta con la fermentación, de manera más importante en el caso de que esta tenga lugar de forma espontánea. En este caso la cantidad es de casi tres veces la presente

en el mosto, si la fermentación se realiza con las levaduras de bodega la concentración es doble a la de partida y si se debe a las levaduras de la colección se obtiene la menor concentración.

**Arabitol.** Disminuye con la fermentación. Al final de la misma solo se aprecian cantidades traza cuando han intervenido las levaduras de la colección, cuando la fermentación es espontánea la cantidad medida es mucho mayor, y por tanto el consumo menor, respecto al mosto, que si se ha llevado a cabo con levaduras de bodega.

**Inositol.** Aumenta ligeramente cuando la fermentación es espontánea o por intervención de levaduras de laboratorio, en caso de levaduras de bodega prácticamente no hay variación. Para este polialcohol las concentraciones obtenidas en la fermentación espontánea y con levaduras de la colección son más parecidas que si se compara la primera con la llevada a cabo con la levaduras de bodega.

**Manitol.** Disminuye con la fermentación de igual forma en los tres casos.

**Sorbitol.** En mosto no se cuantifica, al final de la fermentación aparecen cantidades apreciables en los tres casos, la mayor corresponde a la espontánea.

Variaciones del 8 y 12 por ciento respecto al mosto como las experimentadas por inositol y manitol son muy pequeñas, por lo que se podrían considerar poco significativas. Juzgando los polialcoholes en su conjunto, la fermentación espontánea es la que provoca menor disminución (12.8 %), siendo esta del mismo orden en los otros dos casos (31.51 %)

### 2.3.- Fermentados de los mostos de la variedad Verdejo.

2.3.1.- Fermentación espontánea (Veesp), con tres levaduras de la colección del I.F.I. (Ve3), con tres levaduras autóctonas utilizadas en bodega (Ve+R), con tres levaduras de la colección del I.F.I. sobre mosto filtrado (Vef3).

En la tabla VI.3 se indican los resultados obtenidos en la cuantificación de los polialcoholes de estos fermentados.

Compuesto	Veesp	Ve3	Ve+R	Vef3
Eritritol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.78	0.31	0.47	0.14
Arabitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.46	0.12	0.15	0.09
Inositol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	3.18	3.74	4.13	4.31
Manitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.30	0.23	0.38	0.09
Sorbitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.24	0.14	0.25	0.07
Polialcoholes totales ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	4.96	4.54	5.38	4.70

**Eritritol.** Se forma durante el proceso fermentativo, puesto que este compuesto se aprecia únicamente en cantidades traza en los mostos filtrado y sin filtrar.

Al final de la fermentación se observa mayor cantidad cuando tiene lugar de forma espontánea, por detrás se sitúa el vino obtenido si se fermenta por inducción con las tres levaduras de

bodega. Cuando intervienen las tres levaduras de la colección se obtiene menor cantidad que es aún menor en caso de haber partido del mosto filtrado.

**Arabitol.** Hay en todos los casos un importante descenso en la cantidad presente, mayor si se partió de mosto filtrado. Las concentraciones presentes en los fermentados debidos a la actuación de levaduras de colección o de bodega son iguales prácticamente; si la fermentación fué espontánea la cantidad detectada es la más alta de las cuatro.

**Inositol.** Si nos referimos a los fermentados que proceden de mosto sin filtrar se aprecia reducción, mientras que si nos fijamos en el originado a partir del mosto filtrado se observa incremento. La mayor concentración, y por tanto la menor mengua, corresponde a  $Ve+R$ , a continuación se encuentra  $Ve3$  y por fin la menor cantidad se encuentra cuando la fermentación tiene lugar de manera espontánea.

**Manitol.** Este polialcohol también atenúa su concentración tras el proceso fermentativo. El mayor descenso se advierte en  $Ve3$ , y el menor en  $Ve+R$ . Respecto a lo que sucede en el fermentado que procede de mosto filtrado se observa que la cantidad es la menor de todas, aún cuando en este mosto la cantidad cuantificada era la mayor.

**Sorbitol.** En  $Vef3$  se aprecia incremento puesto que en el mosto de partida solo se detectaban cantidades traza. En los otros fermentados hay consumo, el descenso mayor tiene lugar en  $Ve3$ , cuando la fermentación es espontánea o con las levaduras de bodega la cantidad final es la misma.

Considerando las variaciones en las concentraciones globales de los polialcoholes con la fermentación, a partir de su contenido en los mostos respectivos, se observa que estas cantidades son del mismo orden (63.34 % y 63.85 % en mostos sin filtrar y filtrado) con lo que la disminución durante el proceso sería para ambos tipos de mosto inicial del 37 %.

2.3.2.- Fermentaciones con inducción por levaduras de bodega (Ve+R1), (Ve+R2), (Ve+R3).

Las cantidades de polialcoholes totales y pormenorizados de estas muestras se encuentran en la tabla VI.4.

Tabla VI.4 POLIALCOHOLES EN FERMENTADOS DE VERDEJO CON LEVADURAS DE BODEGA			
Compuesto	Ve+R1	Ve+R2	Ve+R3
Eritritol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.71	0.66	0.52
Arabitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.18	0.14	0.08
Inositol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	3.93	4.55	4.29
Manitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.42	0.46	0.16
Sorbitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.27	0.21	0.13
<b>Polialcoholes totales (<math>\times 10^{-1}</math> mg/l)</b>	<b>5.51</b>	<b>6.02</b>	<b>5.18</b>

**Eritritol.** La levadura que produce mayor cantidad es la de primera fase (R1), seguida de la correspondiente a la segunda fase (R2), siendo la de menor producción la de tercera fase fermentativa R3.

**Arabitol.** La concentración de este polialcohol desciende en relación a la encontrada en el mosto, en la fermentación realizada con la levadura de tercera fase se aprecia la mayor pérdida.

**Inositol.** Con la levadura de segunda fase se observa un ligero incremento tras la fermentación, con las otras dos levaduras se percibe disminución, más importante con las de primera fase.

**Manitol.** Solo la levadura de tercera fase hace decrecer la concentración dos terceras partes, respecto al contenido del mosto.

**Sorbitol.** La concentración de este polialcohol se reduce a la cuarta parte de la concentración inicial por acción de R3, mientras que las otras dos levaduras la dejan cerca de la mitad.

Como era de esperar por lo observado cuando las tres levaduras actúan conjuntamente, todas ejercen el mismo tipo de efecto sobre cada uno de los polialcoholes, aunque con distinta intensidad, es decir, se produce siempre descenso en la concentración salvo en el caso del eritritol. El efecto más pronunciado se encuentra en las fermentaciones realizadas con la levadura de tercera fase (disminución del 33.8 % respecto al contenido total de polialcoholes), y el menor con la levadura de segunda fase (descenso del 23%).

2.3.3.- Fermentaciones con levaduras de la colección del I.F.I. sobre mosto filtrado y sin filtrar (VeKl), (VeTsp), (VeSacch), (VefKl), (VefTsp), (VefSacch).

Las cantidades de polialcoholes presentes en las muestras se indican en las tablas VI.5 y VI.6.

Tabla VI.6

POLIALCOHOLES EN FERMENTADOS CON LEVADURAS DE COLECCIÓN SOBRE MOSTO VERDEJO SIN FILTRAR			
Compuesto	VeKl	VeTsp	VeSacch
Eritritol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	1.51	0.35	t
Arabitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.10	0.12	0.12
Inositol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	4.41	4.69	4.27
Manitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.41	0.11	0.49
Sorbitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.40	0.09	0.28
<b>Polialcoholes totales (<math>\times 10^{-1}</math> mg/l)</b>	<b>6.83</b>	<b>5.36</b>	<b>5.16</b>

Tabla VI.6

POLIALCOHOLES EN FERMENTADOS CON LEVADURAS DE COLECCIÓN SOBRE MOSTO VERDEJO FILTRADO			
Compuesto	VefKl	VefTsp	VefSacch
Eritritol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.21	0.09	0.10
Arabitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	t	0.09	0.09
Inositol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	3.77	3.85	3.63
Manitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.09	0.07	0.44
Sorbitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.48	0.06	0.23
<b>Polialcoholes totales (<math>\times 10^{-1}</math> mg/l)</b>	<b>4.55</b>	<b>4.16</b>	<b>4.49</b>

Eritritol. Cuando se parte de mosto sin filtrar, las concentraciones alcanzadas por intervención de *Kloeckera apiculata* y *Torulaspota rosei*, son mayores que cuando se parte de mosto filtrado. En el caso de que la fermentación sea realizada por *Saccharomyces ellipsoideus*, cuando se parte de mosto sin filtrar únicamente se aprecian cantidades traza, mientras que a partir de mosto filtrado la cantidad encontrada es cuantificable. En cualquier caso la mayor producción de este polialcohol se debe a la actuación de la levadura de primera fase fermentativa, mientras que la de tercera no parece influir sobre la concentración final.

Arabitol. La concentración de este compuesto es menor tras el proceso fermentativo, *Torulaspota rosei* y *Saccharomyces ellipsoideus* hacen descender la concentración en igual porcentaje, la actuación de *Kloeckera apiculata* implica una mayor disminución, e incluso si se parte de mosto filtrado únicamente se aprecian cantidades traza tras la intervención de esta especie.

Inositol. Las variaciones que experimenta este compuesto son poco importantes en relación a las concentraciones de partida. Con relación al mosto sin filtrar, se observa que en presencia de la levadura de segunda fase hay un ligero incremento, mientras que para las otras dos levaduras hay ligera disminución, mas significativa si interviene *Saccharomyces ellipsoideus*. Cuando se parte de mosto filtrado se advierte en todos los casos incremento, este es mayor cuando interviene *Torulaspota rosei* y menor en el caso de actuación de *Saccharomyces ellipsoideus*, aunque estos cambios no parecen significativos.

**Manitol.** La levadura de tercera fase es la que provoca menor cambio en la concentración, incluso si se partió de mosto sin filtrar no se aprecia cambio. Las levaduras de primera y segunda fase producen mayor descenso en la concentración, *Torulaspore rosei* es la que manifiesta el más importante, tanto sobre mosto filtrado como sin filtrar.

**Sorbitol.** Las cantidades finales de este compuesto tras la fermentación son prácticamente iguales cuando se partió de mosto filtrado o sin filtrar, aún cuando en mosto filtrado solo se detectaron cantidades traza, teniendo en cuenta que las tres levaduras se comportan de distinta manera. La menor concentración se encuentra si interviene *Torulaspore rosei*, y la mayor en presencia de *Kloeckera apiculata*.

Al comparar la actuación de las distintas levaduras sobre los mostos Jerez y Verdejo, se observa que:

- El eritritol aumenta con la fermentación.
- El arabitol, manitol y sorbitol disminuyen, especialmente el primero.
- En cuanto a la influencia de cada una de las levaduras sobre los diferentes mostos, *Kloeckera* es la que produce mayor cantidad de eritritol, mientras que *Torulaspore* es la que metaboliza mayor cantidad de sorbitol.

2.4.- Vinos elaborados en las bodegas de Nava del Rey.

2.4.1.- Vinos varietales de Verdejo (VT, VS, VEz, VVc).

Los datos correspondientes a los análisis de polialcoholes de estos vinos a los seis y doce meses de su embotellado se encuentran reflejados en la tabla VI.7 que se muestra a continuación.

Tabla VI.7

POLIALCOHOLES EN VINOS DE VERDEJO					
Compuesto	Análisis	T	S	Ez	Vc
Eritritol (x10 <sup>-1</sup> mg/l)	6 meses	0.73	0.44	0.38	0.41
	12 meses	0.58	0.56	0.48	0.52
Arabitol (x10 <sup>-1</sup> mg/l)	6 meses	0.26	0.31	1.00	0.29
	12 meses	0.87	0.74	0.50	0.50
Inositol (x10 <sup>-1</sup> mg/l)	6 meses	3.73	3.35	4.39	3.46
	12 meses	4.04	4.03	3.88	4.00
Manitol (x10 <sup>-1</sup> mg/l)	6 meses	0.61	0.68	0.88	0.73
	12 meses	0.57	0.55	0.55	0.63
Sorbitol (x10 <sup>-1</sup> mg/l)	6 meses	0.48	0.50	0.38	0.56
	12 meses	0.44	0.42	0.42	0.49
Polialcoholes totales (x10 <sup>-1</sup> mg/l)					
Muestreo		T	S	Ez	Vc
6 meses		5.81	5.28	7.03	5.45
12 meses		6.50	6.30	5.83	6.14

**Eritritol.** El mayor valor se da en el testigo, tanto a los seis como a los doce meses, aunque en el segundo análisis se observa disminución respecto al primero. A los seis meses de embotellado, el vino con enzimas pectolíticos es el que muestra menor concentración, que es casi la mitad de la detectada en el testigo. Los vinos con anhídrido sulfuroso, enzimas pectolíticas y ácidos cítrico y ascórbico presentan incremento en su concentración con relación al primer muestreo. Para el primero y el último las cantidades son semejantes e intermedias a las del testigo y con enzimas pectolíticas. A los doce meses las concentraciones presentes en los cuatro vinos parecen unificarse.

**Arabitol.** Con excepción del vino con enzimas pectolíticos, en el que se advierte disminución con relación al primer muestreo, se produce incremento en la concentración. Este vino tiene la mayor cantidad, cuatro veces mas que el testigo, que es el vino con menor cantidad en el primer análisis. A los doce meses del embotellado los vinos con enzimas pectolíticos y con ácidos cítrico y ascórbico tienen igual cantidad, que corresponde a la más baja, y es en el testigo donde se aprecia ahora la más alta.

**Inositol.** Una vez más la concentración mayor corresponde al vino con enzimas en el primer análisis, pero es en el único vino de los cuatro en el que hay menor cantidad a los doce meses, el resto incrementa su concentración con el paso del tiempo, alcanzándose en el testigo la más alta de las cuatro, aunque las otras muestras contienen casi iguales cantidades de este polialcohol. Las variaciones son tan pequeñas que se puede decir que no existe influencia del tratamiento.

**Manitol.** VEz contiene, en el primer muestreo, alrededor de un tercio más que los otros vinos. En el segundo, las concentraciones han descendido, y además se han igualado con la exclusión del vino con vitamina C y ácido cítrico, en el cual aparece la mayor cantidad. La disminución mas importante corresponde al vino con enzimas pectolíticos y la menor al testigo.

**Sorbitol.** Tanto a los seis como a los doce meses, la concentración mas elevada se encuentra en el vino adicionado de los ácidos cítrico y ascórbico, este junto con el testigo y el que contiene anhídrido sulfuroso sufren descenso tras la permanencia en botella, mientras que el vino con enzimas muestra un ligero incremento. A los doce meses los valores se igualan.

A la vista de la tabla, el polialcohol más abundante en estos vinos, independiente del tratamiento, es el inositol seguido del manitol; el sorbitol y el eritritol son de un orden parecido y el menos abundante a los seis meses es arabitol, excepto en los vinos con enzimas.

Considerados los polialcoholes en su conjunto aumentan ligeramente su concentración, igualándose en los vinos sus contenidos a los doce meses de permanencia en botella, con independencia del tratamiento, menos en el vino tratado con enzimas pectolíticas.

Pormenorizadamente se observa un aumento para eritritol, arabitol e inositol, y un descenso en manitol y sorbitol en la mayoría de los tratamientos menos en el eritritol del testigo y

arabitol, inositol y sorbitol en el vino tratado con enzimas, que presenta un comportamiento contrario.

#### 2.4.2.- Vinos varietales de Viura (ViT, ViS, ViEz, ViVc).

Los vinos de la variedad Viura con los diversos tratamientos y después de seis y doce meses en botella muestran las concentraciones de polialcoholes que aparecen en la tabla VI.8.

**Eritritol.** La mayor concentración a los seis meses se observa en el vino con anhídrido sulfuroso, a continuación se encuentran el testigo, el que contiene enzimas y el adicionado con los dos ácidos, por este orden; en el último vino se cuantifica una cantidad que es la mitad de la existente en ViS. En el análisis realizado a los doce meses se observa que en el testigo y en el vino con ácido ascórbico y ácido cítrico ha habido aumento, mientras que en los otros dos hay descenso; el vino con enzimas pectolíticos, que es el que tiene en este momento menor cantidad, contiene la mitad de este polialcohol que el vino testigo, al que corresponde la más alta.

**Arabitol.** Para este compuesto, en el primer análisis, la cantidad más alta se mide en el vino con enzimas, además esta concentración no sufre variación con el tiempo, mientras que en los otros vinos existe incremento, llegando a alcanzarse casi tres veces más que a los seis meses en los vinos testigo y con ácidos cítrico y ascórbico.

Tabla VI.8

POLIALCOHOLES EN VINOS DE VIURA					
Compuesto	Análisis	T	S	Ez	Vc
Eritritol (x10 <sup>-1</sup> mg/l)	6 meses	0.58	0.74	0.50	0.38
	12 meses	0.66	0.50	0.33	0.50
Arabitol (x10 <sup>-1</sup> mg/l)	6 meses	0.43	0.49	0.65	0.40
	12 meses	1.15	0.85	0.66	1.66
Inositol (x10 <sup>-1</sup> mg/l)	6 meses	3.29	3.30	3.22	2.91
	12 meses	3.74	3.28	3.11	3.34
Manitol (x10 <sup>-1</sup> mg/l)	6 meses	0.84	0.80	0.86	0.80
	12 meses	0.75	0.65	0.67	0.72
Sorbitol (x10 <sup>-1</sup> mg/l)	6 meses	0.44	0.41	0.48	0.44
	12 meses	0.42	0.36	0.40	0.42
Polialcoholes totales (x10 <sup>-1</sup> mg/l)					
Muestreo		T	S	Ez	Vc
6 meses		5.58	5.74	5.71	4.93
12 meses		6.72	5.64	5.17	6.64

**Inositol.** Las concentraciones, a los seis meses, son parecidas en los cuatro casos, aunque en el vino con ácidos ascórbico y cítrico es algo menor que el resto. Después de doce meses se aprecia que en este y en el testigo ha existido incremento, mientras que en los otros hay disminución; la cantidad mayor en este momento corresponde al vino testigo.

**Manitol.** En los cuatro vinos se advierte descenso en las concentraciones conforme el tiempo de permanencia en botella es más largo, las mayores bajadas se observan en presencia de sulfuroso y enzimas.

**Sorbitol.** En el primer muestreo las cantidades son similares en los cuatro casos, aunque la mayor se encuentra en la muestra con enzimas. Tras los doce meses las concentraciones han descendido, pero de nuevo son muy parecidas entre sí.

Las variaciones sufridas entre los dos muestreos son pequeñas, a excepción del arabitol, para el que en todos los tratamientos, excepto el realizado con enzimas, se duplican los valores en relación a la primera toma. En cuanto a los polialcoholes totales, los vinos testigo y el adicionado con los ácidos cítrico y ascórbico presentan mayor concentración a los doce que a los seis meses (el mayor incremento se encuentra en ViVc), mientras que en el vino con anhídrido sulfuroso y en el que contiene enzimas pectolíticos hay menor cantidad que a los seis meses, el descenso mayor se observa en este último vino.

#### 2.4.3.- Vinos varietales de Jerez (JT, JS, JEz, JVC).

En la tabla VI.9 se indican los resultados de la cuantificación de los cromatogramas correspondientes a estos vinos.

**Eritritol.** En el primer muestreo las cantidades de este polialcohol son iguales para los vinos testigo y con enzimas; el que contiene anhídrido sulfuroso presenta la mayor concentración y el tratado con los ácidos cítrico y ascórbico la menor. Seis meses más tarde no se aprecia ningún cambio en el vino tratado con sulfuroso, mientras que se nota descenso en los vinos testigo

y adicionado con los ácidos ascórbico y cítrico y aumento en el que contiene enzimas pectolíticos.

Arabitol. Los vinos con sulfuroso y con enzimas tienen igual cantidad y el testigo y el adicionado con ácidos presentan aproximadamente la mitad en el primer muestreo. En los análisis realizados a los doce meses se aprecia que ha habido incremento en todos los casos, correspondiendo a la muestra con enzimas el menor, mientras que los otros vinos prácticamente duplican su concentración.

Tabla VI.9

POLIALCOHOLES EN VINOS DE JEREZ					
Compuesto	Análisis	T	S	Ez	Vc
Eritritol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	6 meses	0.39	0.46	0.39	0.29
	12 meses	0.32	0.46	0.43	0.26
Arabitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	6 meses	0.48	0.74	0.75	0.50
	12 meses	0.77	1.24	0.86	0.95
Inositol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	6 meses	4.04	4.63	4.03	3.59
	12 meses	4.15	4.63	4.21	4.13
Manitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	6 meses	0.16	0.51	0.13	0.10
	12 meses	0.40	0.17	0.44	0.09
Sorbitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	6 meses	0.14	0.39	0.15	0.07
	12 meses	0.29	0.13	0.34	0.09
Polialcoholes totales ( $\times 10^{-1}$ mg/l)					
Muestreo		T	S	Ez	Vc
6 meses		5.21	6.73	5.45	4.55
12 meses		5.93	6.63	6.28	5.52

Inositol. En los vinos testigo y con enzimas se encuentra el mismo valor, con sulfuroso es más alto y con los ácidos menor.

Prácticamente no hay variación respecto al primer análisis, aún cuando hay ligero aumento de concentración en todas los vinos excepto en la que contiene anhídrido sulfuroso.

**Manitol.** En el primer muestreo el vino adicionado de anhídrido sulfuroso presenta un valor cinco veces superior al de los otros vinos, que tienen para este compuesto valores similares. Los vinos testigo y con enzimas casi triplican el valor de la primera determinación, el vino con sulfuroso desciende su concentración tres veces y en el que contiene los ácidos no se aprecia diferencia.

**Sorbitol.** Testigo y con enzimas presentan la misma cantidad, con sulfuroso aparece más del doble y en presencia de los ácidos ascórbico y cítrico la mitad. Seis meses más tarde en el adicionado con sulfuroso desciende, en el testigo y el vino con enzimas aumenta y en el adicionado con ácidos casi no se observa variación.

En esta variedad la acumulación entre los dos períodos de conservación de polialcoholes distintos al arabitól, puede considerarse con una cierta significación, lo cual se traduce en una acumulación de polialcoholes totales en todos los tratamientos, la variación es entre el 14 y 21%.

Las muestras con anhídrido sulfuroso tienen una pérdida de 1.5% (semejante a la observada en la variedad Viura), que quizás podría considerarse como no significativa para el contenido en polialcoholes totales durante la conservación.

Los valores obtenidos en todos los polialcoholes son muy semejantes en Verdejo, Viura y Jerez, aunque las variedades Jerez y Verdejo tienen un contenido en inositol ligeramente superior a la Viura, que a su vez es la de más concentración en eritritol, arabitol y manitol, siendo sus variaciones de pequeño orden; en Verdejo los cambios son ligeramente más importantes. Mención aparte merece el arabitol, que duplica sus concentraciones en las tres variedades en los vinos testigo, con anhídrido sulfuroso y con los ácidos cítrico y ascórbico, mientras que en el vino adicionado con enzimas pectolíticos decrece, en Verdejo casi cincuenta por ciento, en Viura no se aprecia variación y en Jerez hay ligero aumento.

#### 2.4.4.- Vinos de la mezcla de variedades (MT, MS, MEZ, MVC).

La tabla VI.10 muestra los valores de polialcoholes encontrados en estos vinos a los seis y doce meses del embotellado.

**Eritritol.** La mayor cantidad esta presente en el vino adicionado con anhídrido sulfuroso, y la menor en el que contiene ácido ascórbico y ácido cítrico; después de doce meses se comprueba que ha habido incremento en la concentración de este polialcohol, de tal forma que la cantidad en los cuatro vinos parece unificarse, en el vino con sulfuroso prácticamente no se aprecia cambio, mientras que en los otros tres se observa incremento, el mayor corresponde al vino con los ácidos cítrico y ascórbico.

Tabla VI.10

POLIALCOHOLES EN VINOS DE LA MEZCLA DE VARIEDADES					
Compuesto	Análisis	T	S	Ez	Vc
Eritritol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	6 meses	0.60	0.68	0.56	0.52
	12 meses	0.71	0.66	0.64	0.68
Arabitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	6 meses	0.70	0.69	0.65	0.68
	12 meses	0.47	0.71	0.57	0.79
Inositol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	6 meses	2.73	3.12	3.13	3.04
	12 meses	3.58	3.61	3.58	3.55
Manitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	6 meses	0.63	0.57	0.65	0.62
	12 meses	0.55	0.56	0.54	0.53
Sorbitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	6 meses	0.53	0.45	0.51	0.52
	12 meses	0.45	0.49	0.46	0.46
Polialcoholes totales ( $\times 10^{-1}$ mg/l)					
Muestreo		T	S	Ez	Vc
6 meses		5.19	5.51	5.50	5.38
12 meses		5.76	6.03	5.79	6.01

**Arabitol.** En el segundo análisis se percibe disminución en la cantidad cuantificada en los vinos testigo y con enzimas pectolíticos, mientras que en los otros dos hay incremento, mayor en MVC, que es el vino que a los doce meses presenta la concentración más elevada.

**Inositol.** En el primer análisis se tiene en el testigo la concentración más baja, para los otros vinos las cantidades son mayores y parecidas entre si. Después de los otros seis meses, en el segundo muestreo, se cuantifica mayor concentración para este polialcohol, la tasa es semejante en los cuatro vinos, el mayor incremento se observa en el testigo.

**Manitol.** Para este compuesto la menor concentración se tiene en la muestra MS, en los otros vinos las concentraciones son parecidas aunque algo más altas. En el análisis realizado a los doce meses del embotellado de los vinos la cantidad para los cuatro es igual. En todas ha habido disminución, aunque en el tratado con anhídrido sulfuroso prácticamente no se observen diferencias.

**Sorbitol.** Este compuesto muestra un comportamiento semejante al del manitol comentado anteriormente; pero en el vino con sulfuroso se advierte, para este polialcohol, un ligero incremento que hace que sea este vino el que presenta, a los doce meses, la concentración más alta, los otros tres tienen igual cantidad entre ellos, y esta es muy ligeramente inferior a la que corresponde al que contiene sulfuroso.

Para los polialcoholes totales se aprecia aumento de concentración entre los dos períodos analizados en todos los vinos, aunque es destacable que el menor se produce en el vino con enzimas.

#### 2.4.5.- Vinos de los fangos de la variedad Verdejo (FVT, FVS, FVEz, FVVC).

En la tabla VI.11 se indican las cantidades de polialcoholes encontrados en estos vinos.

**Eritritol.** La mayor concentración se da en el testigo, y las menores en FVVC y FVS. En el testigo, el vino con enzimas y el

que contiene ácidos cítrico y ascórbico hay descenso, a los doce meses en relación a la cantidad encontrada a los seis, mientras que en FVS hay aumento; FVEz y FVVC no varían sustancialmente sus concentraciones a pesar de la disminución.

Tabla VI.11

POLIALCOHOLES EN VINOS DE LOS FANGOS DE LA VARIEDAD VERDEJO					
Compuesto	Análisis	T	S	Ez	Vc
Eritritol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	6 meses	0.49	0.37	0.42	0.33
	12 meses	0.33	0.52	0.40	0.30
Arabitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	6 meses	0.66	0.69	0.69	0.69
	12 meses	0.80	1.09	0.90	1.18
Inositol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	6 meses	3.73	3.13	3.68	3.57
	12 meses	3.70	4.03	4.03	3.94
Manitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	6 meses	0.68	0.57	0.81	0.68
	12 meses	0.63	0.68	0.64	0.62
Sorbitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	6 meses	0.36	0.35	0.40	0.33
	12 meses	0.34	0.38	0.36	0.34
Polialcoholes totales ( $\times 10^{-1}$ mg/l)					
Muestreo		T	S	Ez	Vc
6 meses		5.92	5.11	6.00	6.38
12 meses		5.80	6.70	6.33	6.38

**Arabitol.** Al comparar los resultados obtenidos en el segundo análisis con los del primero, se advierte aumento en todas las muestras, la cantidad más elevada corresponde a FVVC y la más baja a FVT. A los seis meses los valores eran iguales en tres de los cuatro vinos, siendo el testigo el que tenía una cantidad ligeramente inferior.

**Inositol.** La cantidad más baja, en la medida realizada a los seis meses, corresponde a la del vino tratado con anhídrido sulfuroso, los otros contienen cantidades mayores y semejantes entre sí. En el vino testigo se observa, tras otros seis meses, descenso de concentración, en los otros, por el contrario, hay incremento, mayor en FVS; las concentraciones de estos se han unificado y son casi iguales.

**Manitol.** En el primer análisis la cantidad más alta se encuentra en FVEz y la más baja en FVS, los otros dos vinos tienen una cantidad igual e intermedia. A los doce meses se advierte descenso en FVEz, FVT y FVVC, en estos dos últimos la pérdida es casi la misma, mientras que en el vino que fue adicionado con anhídrido sulfuroso se observa aumento.

**Sorbitol.** Las cuatro concentraciones son parecidas. Se advierte disminución en relación al primer muestreo, en todos los vinos excepto en el tratado con sulfuroso donde hay un ligero incremento; las cantidades finales son parecidas para los cuatro vinos.

2.4.6.- Vinos de los fangos de la mezcla de variedades (FMT, FMS, FMEz, FMVC).

La tabla VI.12 muestra los valores de polialcoholes encontrados en estos vinos a los seis y doce meses de almacenamiento.

Tabla VI.12

POLIALCOHOLES EN VINOS DE LOS FANGOS DE LA MEZCLA DE VARIEDADES					
Compuesto	Análisis	T	S	Ez	Vc
Eritritol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	6 meses	0.49	0.65	0.42	0.33
	12 meses	0.46	0.51	0.44	0.47
Arabitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	6 meses	0.76	0.74	0.73	0.75
	12 meses	1.02	0.91	0.95	0.92
Inositol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	6 meses	3.23	3.79	3.63	3.49
	12 meses	3.77	4.00	3.75	4.12
Manitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	6 meses	0.68	0.78	0.70	0.11
	12 meses	0.64	0.64	0.61	0.61
Sorbitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	6 meses	0.38	0.44	0.39	0.10
	12 meses	0.36	0.37	0.35	0.36
Polialcoholes totales ( $\times 10^{-1}$ mg/l)					
Muestreo		T	S	Ez	Vc
6 meses		5.54	6.40	5.87	4.78
12 meses		6.25	6.43	6.10	6.48

**Eritritol.** A los seis meses la mayor concentración se encuentra en el vino tratado con anhídrido sulfuroso, este contiene una cantidad doble de la presente en el vino adicionado de ácido ascórbico y ácido cítrico, entre los dos se encuentran las cantidades que tienen el testigo y el que contiene enzimas pectolíticos. En el segundo muestreo, ha habido descenso en las concentraciones de FMT y FMS, e incremento en las correspondiente a FMEz y FMVC.

**Arabitol.** Con los cuatro tratamientos se cuantifican cantidades semejantes tanto a los seis como a los doce meses, pero en este segundo análisis las cantidades son superiores a las

primeras. El incremento observado en los cuatro vinos es casi igual; la tasa más elevada se encuentra en el vino testigo.

**Inositol.** La concentración más alta, a los seis meses, se mide en FMS y la más baja en el testigo, entre ellas se encuentran FMEz y FMVc por este orden. Hay aumento en la concentración de inositol en todos los vinos después de los otros seis meses de almacenado a 3 °C, la cantidad más alta en este momento corresponde al vino adicionado con ácido cítrico y ácido ascórbico.

**Manitol.** A los seis meses, momento en el que se lleva a cabo el primer muestreo, FMT, FMS y FMEz presentan concentraciones similares mientras que en el vino con ácido cítrico y ascórbico se cuantifica una cantidad siete veces menor. A los doce meses se ha producido disminución de este compuesto en las tres primeras muestras citadas mientras que ha habido aumento en la última, de tal forma que los valores encontrados se han unificado.

**Sorbitol.** Es en FMVc donde existe menor cantidad de este compuesto, con notable diferencia frente a las otras muestras entre las que FMS muestra la mayor concentración. Sucede para este polialcohol lo mismo que para el manitol, mencionado anteriormente, los valores encontrados en el segundo análisis se han igualado, y para ello en el vino con los ácidos cítrico y ascórbico la concentración se ha incrementado de forma importante, triplicando el valor de la primera medida.

2.4.7.- Vinos varietales de Verdejo con levaduras de bodega en pureza (VR1, VR2, VR3).

Los resultados obtenidos tras la cuantificación de los cromatogramas de estos vinos, que se lograron por acción de tres levaduras distintas, durante el período de almacenamiento de seis y doce meses, se muestran en la tabla VI.13.

Tabla VI.13

POLIALCOHOLES EN VINOS DE VERDEJO CON LEVADURAS DE BODEGA				
Compuesto	Análisis	VR1	VR2	VR3
Eritritol (x10 <sup>-1</sup> mg/l)	6 meses	0.33	0.48	0.51
	12 meses	0.47	0.44	0.61
Arabitol (x10 <sup>-1</sup> mg/l)	6 meses	0.93	0.61	0.56
	12 meses	0.97	0.64	0.58
Inositol (x10 <sup>-1</sup> mg/l)	6 meses	2.75	2.61	2.43
	12 meses	3.01	3.19	3.22
Manitol (x10 <sup>-1</sup> mg/l)	6 meses	0.97	1.13	1.38
	12 meses	0.75	0.94	1.14
Sorbitol (x10 <sup>-1</sup> mg/l)	6 meses	0.64	0.61	0.67
	12 meses	0.49	0.56	0.52
Polialcoholes totales (x10 <sup>-1</sup> mg/l)				
Muestreo		R1	R2	R3
6 meses		5.62	5.44	5.55
12 meses		5.69	5.77	6.07

**Eritritol.** La mayor concentración aparece en VR3, seguida por la de VR2 y VR1; en el análisis realizado a los doce meses, se observa ligera disminución en VR2 e incremento en VR1 y VR3,

mayor en el vino procedente de la levadura de primera fase. Los valores finales en VR1 y VR2 son casi idénticos.

**Arabitol.** Para este compuesto, en el primer muestreo, la mayor cantidad se tiene en VR1 y la menor en VR3, VR2 presenta un valor intermedio más cercano a VR3. A los doce meses se aprecia un muy ligero incremento aunque se mantiene el orden que se observaba en el primer análisis.

**Inositol.** Los valores son similares, el más bajo es el de VR3 y el más alto el de VR1. También para este polialcohol se observa incremento en el segundo análisis con relación al primero, la cantidad en VR3 es ahora la mayor, mientras que la menor corresponde a VR1.

**Manitol.** La cantidad más alta aparece en VR3 y la menor en VR1. Se produce una bajada similar en la concentración de este polialcohol en los tres vinos tras doce meses en botella, pero se mantiene el orden que se advertía en el primer análisis, en cuanto a las cantidades.

**Sorbitol.** En el primer muestreo las concentraciones son parecidas, en el segundo ha habido disminución, mayor en presencia el vino VR1.

Los polialcoholes totales se cuantifican en mayor cantidad a los doce que a los seis meses, el incremento más significativo se encuentra en el vino que fue obtenido por fermentación con la levadura de tercera fase, mientras que el menos importante se observa en el caso de que la levadura fuese la de primera etapa.

## 2.5.- Actuación de especies filmógenas.

Se partió de un vino, una parte de el cual había sufrido un proceso de maderización de seis meses, y otra se mantuvo en tanque de acero inoxidable a 5 °C y con sobrepresión de nitrógeno para mantener el vino estabilizado.

El vino que estuvo en contacto con la madera contiene menor cantidad de polialcoholes que el otro, en especial eritritol y arabitol, con diferencias menos significativas en el resto. Los datos de estos vinos están reflejados en la tabla VI.14.

Tabla VI.14

POLIALCOHOLES EN VINOS PARA VELO		
Compuesto	SM	CM
Eritritol (x10 <sup>-1</sup> mg/l)	0.41	0.12
Arabitol (x10 <sup>-1</sup> mg/l)	0.48	0.24
Inositol (x10 <sup>-1</sup> mg/l)	3.30	3.06
Manitol (x10 <sup>-1</sup> mg/l)	0.54	0.51
Sorbitol (x10 <sup>-1</sup> mg/l)	0.37	0.33
Polialcoholes totales x10 <sup>-1</sup> mg/l		
Sin madera	Con madera	
5.10	4.26	

**Eritritol.** El vino sin maderizar contiene más de tres veces que el que ha sufrido este proceso.

**Arabitol.** En el vino que no estuvo en contacto con madera se aprecia una concentración doble que en el maderizado.

**Inositol.** Las concentraciones de este compuesto en los dos vinos son similares, aunque ligeramente superior la que corresponde al vino que no estuvo en contacto con madera.

**Manitol.** Sucede lo mismo que para el inositol.

**Sorbitol.** En el caso del vino que estuvo en madera hay una cantidad ligeramente inferior.

Determinaciones tras el período de permanencia con velo.

Los resultados (tabla VI.15) obtenidos para los polialcoholes tienden a unificarse tras este período, aunque hay alguna diferencia en función de la levadura que originó los velos. Tanto cuando se partió de vinos sin madera como cuando se partió de vinos maderizados se advierte un consumo de polialcoholes, aunque solo tendrían cierta significación las disminuciones observadas para eritritol y arabitol. Si bien el primero es el único polialcohol que aumenta de concentración con la fermentación según todo lo expuesto anteriormente en este capítulo, las levaduras de tercera fase eran las que menos incremento producían (lo cual puede estar relacionado con este descenso que vemos para las de velo, ya que, ellas como se comentó en el capítulo de microbiología, primero actúan como las de tercera fase y posteriormente se transforman y actúan en forma aerobia).

Eritritol y arabitol disminuyen su concentración después de la permanencia de los vinos con el velo, la disminución parece ser independiente de la cepa que le origina, ya que las concen-

traciones finales son iguales, tanto cuando se partió de vinos maderizados como sin maderizar, en este último las cantidades eran mucho mayores.

Manitol y sorbitol no varían prácticamente en relación a los vinos iniciales.

Inositol es el único de los polialcoholes que muestra incremento después de la permanencia del vino bajo velo, la cepa de *Saccharomyces montuliensis* produce mayor aumento.

Observando los polialcoholes totales se aprecia que cuando se parte de vinos maderizados hay incremento, y con el otro disminución; en cualquier caso no se observan diferencias en cuanto a la levadura que interviene.

Tabla VI.15

POLIALCOHOLES TRAS LA PERMANENCIA DE LOS VINOS CON VELO				
Compuesto	SM1663	SM1685	CM1663	CM1685
Eritritol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.04	0.06	0.04	0.05
Arabitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.15	0.15	0.13	0.15
Inositol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	3.55	3.63	3.47	3.55
Manitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.51	0.46	0.57	0.57
Sorbitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.32	0.32	0.34	0.34
Polialcoholes totales ( $\times 10^{-1}$ mg/l)				
Levadura	SM1663	SM1685	CM1663	CM1685
Concentración	4.57	4.62	4.55	4.66

2.6.- Vinos de mercado (MN86, MB86, MD)

La tabla VI.16 indica los resultados de la cuantificación de los polialcoholes en estos tres vinos.

MN.- Mantel Nuevo. Vino del año sin maderizar.

MB.- Mantel Blanco. Vino con seis meses en madera.

MD.- Mantel Dorado. Vino con crianza biológica.

Tabla VI.16

POLIALCOHOLES EN VINOS COMERCIALES			
Compuesto	MN	MB	MD
Eritritol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.07	0.08	0.45
Arabitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.17	0.18	0.16
Inositol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	3.25	3.33	3.32
Manitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.51	0.47	1.13
Sorbitol ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	0.33	0.29	0.43
Polialcoholes totales ( $\times 10^{-1}$ mg/l)	MN 4.33	MB 4.35	MD 5.49

**Eritritol.** La cantidad más alta aparece en MD, casi 6 veces más que en MN y MB.

**Arabitol.** Las concentraciones son prácticamente iguales en los tres vinos.

**Inositol.** Este polialcohol se encuentra en igual cantidad en los tres vinos.

**Manitol.** La concentración más elevada aparece en MD, en MB y MN se encuentra aproximadamente la mitad que en MD.

**Sorbitol.** MD es el vino con más cantidad, seguido por MN y MB en este orden.

### 3.- Conclusiones.

3.1.- La variedad Jerez es la de mayor contenido en polialcoholes.

3.2.- Las fermentaciones con levaduras seleccionadas producen una disminución en el contenido final de polialcoholes superior a la fermentación espontánea.

3.3.- En general los polialcoholes, individualmente, disminuyen con la fermentación excepto el eritritol, que es el único que aumenta con independencia de la variedad que se fermenta.

3.4.- Las levaduras de primera fase, R1 y *Kloeckera apiculata*, son las que producen mayor cantidad de eritritol, y las de tercera fase las que menos.

3.5.- Las levaduras formadoras de velo disminuyen las concentraciones de arabitol y eritritol, en mayor proporción de este último.

- 3.6.- En general los polialcoholes aumentan con la conservación a 4 °C entre seis y doce meses, independientemente del tratamiento aplicado al vino y de la variedad de uva de procedencia.
- 3.7.- El tratamiento con enzimas pectolíticos produce los menores aumentos e incluso disminuciones en función de la variedad.
- 3.8.- El arabitol es el polialcohol que experimenta mayores variaciones con la conservación, independientemente de tratamiento y variedad.

VII. - ESTUDIO DE AZÚCARES



## 1.- Materiales y métodos.

La metodología es la misma que la utilizada para el estudio de los polialcoholes descrita en el capítulo anterior; la única diferencia consiste en que al trabajar con mostos es necesario hacer dilución 1/250 en agua bidestilada antes de proceder a la acetilación de las muestras debido al gran contenido que de estos compuestos.

## 2.- Resultados y discusión.

### **2.1.- Mostos.**

Dada la riqueza de los mostos en azúcares monómeros, los azúcares totales reflejados en la tabla VII.1 se entienden como la suma de los pormenorizados fructosa y glucosa, puesto que son los mayoritarios en mostos y vinos. El mosto de la variedad Jerez es más rico que el de Verdejo, dentro de esta última variedad se aprecia mayor cantidad en el caso de que el mosto haya sido filtrado. Las diferencias encontradas entre los dos mostos (filtrado y sin filtrar) pueden ser debidas, como se dijo anteriormente, a que durante la filtración se eliminan sustancias que pueden interferir con los compuestos analizados, dificultando su detección, y por ello la cantidad medida es mayor.

En los mostos la relación entre los azúcares es distinta: 1.18 para el de la variedad Jerez y 0.97 para la variedad Verdejo, sin embargo es destacable que en esta segunda variedad

la relación fructosa glucosa es igual tanto si nos referimos a mosto filtrado como sin filtrar, aun cuando las cantidades de azúcares totales sean diferentes como se dijo en el párrafo anterior. La cantidad de fructosa es mayor que la de glucosa en el caso del mosto de la variedad Jerez, mientras que en el mosto Verdejo sucede lo contrario.

## 2.2.- Fermentados de los mostos de la variedad Jerez.

La tabla VII.1 indica los resultados de la cuantificación de los cromatogramas correspondientes. En la fermentación espontánea quedan restos importantes de los dos azúcares, considerando el mismo período de tiempo que cuando las realizadas con levaduras de bodega o de colección han finalizado el proceso; en estos casos se encuentran también restos puesto que el final de la fermentación no implica, como se dijo en la introducción, el agotamiento en azúcares del mosto de partida. La cantidad de fructosa final es, en la fermentación espontánea la mayor, más de ocho veces la concentración encontrada cuando la fermentación ha sido inducida; para la glucosa en la fermentación espontánea y en la llevada cabo con levaduras de la colección del I.F.I. la cantidad es casi igual, mientras que en la fermentación inducida con las levaduras de bodega únicamente es menor.

Las levaduras responsables de la fermentación espontánea consumen más glucosa que cuando la fermentación ha sido inducida

mediante la siembra de levaduras seleccionadas. El fermentado Je+R presenta un porcentaje de fructosa residual superior al encontrado en Je3 pero menor que el de Jeesp. Con las levaduras de bodega el consumo de azúcares es similar, puesto que los porcentajes residuales son parecidos a los del mosto, en la fermentación espontánea se ha utilizado más la glucosa, puesto que en los porcentajes de azúcares residuales se aprecia que el de este azúcar es mucho menor que el de fructosa, en el caso de las levaduras de la colección del I.F.I. sucede lo contrario y el porcentaje de glucosa residual es mayor que el de fructosa.

### 2.3.- Fermentados de los mostos de la variedad Verdejo.

La tabla VII.1 indica las cantidades y porcentajes de azúcares presentes en los fermentados de esta variedad.

#### 2.3.1.- Fermentación espontanea (Veesp), con tres levaduras de la colección del I.F.I. (Ve3), con tres levaduras autóctonas utilizadas en bodega (Ve+R), con tres levaduras de la colección del I.F.I. sobre mosto filtrado (Vef3).

Cuando la fermentación tiene lugar de forma espontánea, las cantidades de fructosa y glucosa son mayores que cuando han sido inducidas, con levaduras de bodega o de la colección. Los porcentajes de glucosa residual son mayores que los de fructosa en todos los casos excepto en Ve+R, aunque los valores son prácticamente iguales.

Las levaduras de la colección consumen menos fructosa que glucosa durante el proceso fermentativo si se partió de mosto filtrado que si actuaron sobre mosto sin filtrar. La relación fructosa glucosa es casi la misma cuando se fermentó mosto filtrado con las levaduras de la colección que cuando se fermentó de manera espontánea el mosto sin filtrar, aun cuando en este último caso la cantidad de azúcares totales es mucho mayor que en el primero. La terna de levaduras empleadas en bodega presenta menor apetencia por la fructosa que las levaduras de la colección, como se aprecia al observar los porcentajes de azúcares residuales de la tabla VII.1.

#### 2.3.2.- Fermentaciones con inducción por levaduras de bodega (Ve+R1), (Ve+R2), (Ve+R3).

Las mayores concentraciones se observan en el fermentado correspondiente a R3, tanto para fructosa como para glucosa, y las menores en el debido a R1. La glucosa es en los tres casos el azúcar más utilizado. Cuando las levaduras actúan por separado, el azúcar residual más abundante es la fructosa, que supera en cinco veces la concentración de la glucosa, mientras que cuando actúan conjuntamente se encuentran cantidades semejantes.

En contra de lo esperado, la siembra de la cepa de primera etapa deja la menor cantidad residual de azúcares totales, mientras que la de tercera, las levaduras con mayor poder fermentativo, son las que mantienen más altos niveles de azúcares

al final de la fermentación, sin embargo se puede interpretar este hecho considerando que los cultivos no son en pureza, y las levaduras de primera fase tienen menor interferencia sobre la microflora epifítica espontánea, para ello nos debemos remitir al capítulo de análisis microbiológico donde figuran las curvas de fermentación de estas levaduras.

Tabla VII.1 Azúcares cuantificados en los mostos y en los fermentados llevados a cabo en el laboratorio.

Muestra	Fructosa		Glucosa		Azúcares totales	Fr/Gl
	g/l	%	g/l	%		
Ve	77.67	49.2	80.02	50.8	157.69	0.97
Vef	82.57	49.2	85.07	50.8	167.64	0.97
Je	96.42	54.2	81.60	45.8	178.02	1.18
Jeesp	1.21	82.7	0.25	17.3	1.46	4.84
Je3	0.15	36.6	0.26	63.4	0.41	0.58
Je+R	0.17	51.5	0.16	48.5	0.33	1.06
Veesp	0.20	46.5	0.23	53.5	0.43	0.87
Ve3	0.03	27.3	0.08	72.7	0.11	0.37
Ve+R	0.06	44.4	0.05	55.6	0.11	1.20
Vef3	0.04	54.5	0.05	45.5	0.09	0.80
Ve+R1	0.24	85.7	0.04	14.3	0.28	6.00
Ve+R2	0.29	82.8	0.06	17.2	0.35	4.83
Ve+R3	0.34	82.9	0.07	17.1	0.41	4.86
VeK1	0.31	86.1	0.05	13.9	0.36	6.20
VeTsp	0.39	86.6	0.06	13.4	0.45	6.50
VeSacch	0.23	85.2	0.04	14.8	0.27	5.75
VefK1	1.64	81.2	0.38	18.8	2.02	4.31
VefTsp	0.26	83.8	0.05	16.2	0.31	5.20
VefSacch	0.28	84.8	0.05	15.2	0.33	5.60

Se puede observar, por los valores de la relación fructosa glucosa, que estas levaduras muestran preferencia en el consumo de glucosa frente a la fructosa; R1 es la cepa con mayor consumo de glucosa de las tres, R2 y R3 tienen el mismo comportamiento, como se aprecia en los valores porcentuales para las fermentaciones realizadas por siembra de los mostos con estas levaduras.

2.3.3.- Fermentaciones con levaduras de la colección del I.F.I. sobre mosto filtrado y sin filtrar (VeKl), (VeTsp), (VeSacch), (VefKl), (VefTsp), (VefSacch).

Lógicamente son consumidos durante el proceso fermentativo y las cantidades finales son semejantes en todas las muestras con excepción de la originada por *Kloeckera apiculata* sobre mosto filtrado en este caso la fermentación no esta completa cuando han terminado todas las demás y por ello los restos de azúcares son importantes.

Cuando las levaduras han actuado de forma individual se aprecia en todos los casos mayor consumo de glucosa que de fructosa puesto que los valores porcentuales del primer azúcar en relación a los mostos han descendido de forma notable.

**2.4.- Vinos elaborados en las bodegas de Nava del Rey.**

Los porcentajes de variación se han calculado en cada caso, con relación al cambio del azúcar correspondiente sin tener en cuenta su participación sobre el total.

2.4.1.- Vinos varietales de Verdejo (VT, VS, VEz, VVc).

La tabla siguiente (VII.2) corresponde a estos vinos.

AZÚCARES EN VINOS DE VERDEJO					
Análisis	Azúcares	Tratamiento			
		T	S	Ez	Vc
6 meses	Totales	0.93	0.78	1.26	0.49
	Fructosa	0.80	0.61	0.84	0.22
	% Fructosa	86	78	67	49
	Glucosa	0.13	0.17	0.42	0.27
	% Glucosa	14	22	33	51
12 meses	Totales	1.05	1.13	1.19	1.08
	Fructosa	0.61	0.71	0.66	0.56
	% Fructosa	58	63	55	52
	Glucosa	0.44	0.42	0.53	0.52
	% Glucosa	42	37	45	48
Variación	Totales	0.12	0.35	- 0.07	0.59
	% Total	13	44.9	- 5.5	120
	Fructosa	- 0.19	0.1	- 0.18	0.34
	% Fructosa	- 23.7	16.4	- 11.5	154.5
	Glucosa	0.31	0.25	0.11	0.25
	% Glucosa	238	147	26	92.6

Tabla VII.2

**Fructosa.** A los seis meses del embotellado donde mayor concentración se aprecia es en el vino con enzimas pectolíticos, seguido por el testigo y el adicionado con sulfuroso; en el que contiene los ácidos cítrico y ascórbico la cantidad es casi cuatro veces menor que en el primero. Tras doce meses en botella, la cantidad de este azúcar ha disminuido en los vinos testigo y

con enzimas, mientras que ha aumentado en aquellos que contienen sulfuroso o ácido ascórbico y ácido cítrico; la concentración más alta en este segundo período se encuentra precisamente en estos dos vinos.

**Glucosa.** En el primer muestreo, el vino que contiene enzimas es el que presenta mayor cantidad de este azúcar, seguido por el que contiene ácido ascórbico y cítrico, a continuación se sitúa el adicionado con anhídrido sulfuroso y por fin el testigo, estos dos últimos contienen una cantidad sensiblemente inferior y semejante entre si. Tras los doce meses de guarda es destacable el incremento experimentado por todos los vinos, en especial el testigo y el tratado con anhídrido sulfuroso que casi triplican la concentración medida a los seis meses; de todas formas es en VEz y VVc donde se tienen de nuevo las mayores cantidades. El vino testigo y el que contiene anhídrido sulfuroso a los doce meses siguen manteniendo niveles muy semejantes entre si, como ocurría a los seis meses; las concentraciones en los vinos adicionados con enzimas pectolíticos o con los ácidos ascórbico y cítrico no eran similares a los seis meses, el primero presentaba casi doble cantidad, pero tras otros seis meses las concentraciones también se unifican.

#### 2.4.2.- Vinos varietales de Viura (ViT, ViS, ViEz, ViVc).

La tabla VII.3 indica los azúcares, porcentajes y variación de estos vinos.

**Fructosa.** A los seis meses del embotellado, testigo y el adicionado con sulfuroso, tienen las concentraciones más altas y parecidas entre ellas (los porcentajes en azúcares totales son próximos al 50%), los otros dos vinos tienen concentraciones 5 veces menores, siendo los porcentajes respecto al total muy próximos entre si. En el segundo muestreo con todos los tratamientos se advierten mayores cantidades, siendo más importantes los incrementos en los vinos que presentaban las menores concentraciones a los seis meses, en el caso del vino adicionado con anhídrido sulfuroso no hay variación significativa.

Tabla VII.3

AZÚCARES EN VINOS DE VIURA					
Análisis	Azúcares	Tratamiento			
		T	S	Ez	Vc
6 meses	Totales	0.24	0.30	0.19	0.17
	Fructosa	0.14	0.12	0.02	0.02
	% Fructosa	58	40	10.5	11.7
	Glucosa	0.10	0.18	0.17	0.15
	% Glucosa	42	60	89.5	88.3
12 meses	Totales	0.48	0.45	0.42	0.49
	Fructosa	0.17	0.13	0.09	0.17
	% Fructosa	35.4	28.8	21.4	34.7
	Glucosa	0.31	0.32	0.33	0.32
	% Glucosa	64.6	71.2	78.6	65.3
Variación	Totales	0.24	0.15	0.23	0.32
	% Total	100	50	121	188
	Fructosa	0.03	0.01	0.07	0.15
	% Fructosa	21.4	8.3	350	750
	Glucosa	0.21	0.14	0.16	0.17
	% Glucosa	210	77.8	94	113

**Glucosa.** La concentración más baja, a los seis meses, es la que se encuentra en el testigo, prácticamente la mitad que la presente en los otros tres. A los doce, los vinos han sufrido incremento en la concentración de este azúcar, obteniéndose en los cuatro cantidades semejantes, siendo en el testigo donde se aprecia mayor aumento (210%).

2.4.3.- Vinos varietales de Jerez (JT, JS, JEz, JVc).

La tabla VII.4 se refiere a los azúcares presentes en los vinos de la variedad Jerez.

Tabla VII.4		AZÚCARES EN VINOS DE JEREZ			
Análisis	Azúcares	Tratamiento			
		T	S	Ez	Vc
6 meses	Totales	2.39	2.11	1.41	0.80
	Fructosa	2.26	1.81	1.18	0.61
	% Fructosa	94.5	85.8	83.7	76.3
	Glucosa	0.13	0.30	0.23	0.19
	% Glucosa	5.5	14.2	16.3	23.7
12 meses	Totales	1.58	2.13	1.63	1.23
	Fructosa	1.28	1.62	1.19	0.94
	% Fructosa	81	76	73	52
	Glucosa	0.30	0.51	0.44	0.29
	% Glucosa	19	24	27	48
Variación	Totales	- 0.81	0.02	0.22	0.43
	% Total	- 33.9	1	15.6	53.7
	Fructosa	- 0.98	- 0.19	0.01	0.33
	% Fructosa	- 43.4	- 10.5	0.8	54
	Glucosa	0.17	0.21	0.21	0.10
	% Glucosa	130	70	91.3	34.5

El contenido en azúcares residuales totales es superior al encontrado en las otras dos variedades ya comentadas, como era de esperar puesto que las concentraciones iniciales en el mosto de esta variedad son muy superiores a las de los otros.

**Fructosa.** El valor más alto se encuentra en el testigo, siendo menor en JS, JEz y JVC en este orden. A los doce meses en JT se reduce a la mitad, en JS desciende ligeramente, JEz no se modifica y JVC aumenta un poco. Los porcentajes de fructosa a los seis meses son muy altos, siendo el valor de JVC, ya indicado como el más bajo, ligeramente inferior al 80%. Después de otros seis meses los porcentajes disminuyen con todos los tratamientos, siendo JVC el que presenta menor descenso.

A semejanza de lo que sucede en la variedad Verdejo, la fructosa sufre descenso en la concentración, pero al ser su contribución en el total muy superior en Jerez, se refleja este descenso en la variación de azúcares totales, cosa que no ocurría en Verdejo.

**Glucosa.** El vino que presenta mayor cantidad es el que contiene anhídrido sulfuroso, por detrás se sitúan JEz, JVC y JT por este orden, siendo la concentración en JS más del doble que la presente en JT. En el segundo análisis se aprecia aumento de concentración, del orden del doble, en los cuatro vinos, pero manteniéndose la misma secuencia que la observada a los seis meses.

2.4.4.- Vinos de la mezcla de variedades (MT, MS, MEz, MVc).

En la tabla VII.5 se reflejan los resultados de la cuantificación de los cromatogramas correspondientes a los vinos obtenidos en bodega partiendo de mostos mezcla de las tres variedades.

Tabla VII.5

AZÚCARES EN VINOS DE LA MEZCLA DE VARIEDADES					
Análisis	Azúcares	Tratamiento			
		T	S	Ez	Vc
6 meses	Totales	0.23	0.53	0.22	0.15
	Fructosa	0.09	0.09	0.01	0.01
	% Fructosa	39	17	4.5	6.6
	Glucosa	0.14	0.44	0.21	0.14
	% Glucosa	61	83	95.5	93.4
12 meses	Totales	0.41	0.92	0.52	0.42
	Fructosa	0.10	0.24	0.12	0.13
	% Fructosa	24.4	26	23	31
	Glucosa	0.31	0.68	0.40	0.29
	% Glucosa	75.6	74	77	69
Variación	Totales	0.18	0.39	0.30	0.27
	% Total	78.3	73.6	136	180
	Fructosa	0.01	0.15	0.11	0.12
	% Fructosa	11.1	166	1100	1200
	Glucosa	0.17	0.24	0.19	0.15
	% Glucosa	121.4	54.5	90.5	107

Las variaciones entre los seis y doce meses de almacenamiento son del mismo orden para el testigo y el adicionado con

anhidrido sulfuroso, y muy superiores en los otros dos tratamientos, siendo el vino que contiene los ácidos cítrico y ascórbico el que muestra el valor más elevado.

En el testigo la modificación global de azúcares se debe como se observa en la tabla al incremento experimentado por la glucosa. En los otros vinos es la fructosa la responsable de ese cambio.

**Fructosa.** En el análisis realizado a los seis meses los vinos con enzimas pectolíticos o con los ácidos cítrico y ascórbico presentan concentraciones más de nueve veces menores que las encontradas en los otros vinos. Tras otros seis meses, en el momento de realizar el segundo análisis, se aprecia que ha habido incremento en las concentraciones, los más destacables corresponden a MEz y MVC, en ellos se pasa de encontrar 0.01 g/l a tener 0.13 g/l mientras que en el testigo el valor es prácticamente el mismo.

**Glucosa.** A los seis meses la concentración en el testigo y en el vino tratado con los ácidos cítrico y ascórbico es del mismo orden, muy inferior a la observada en los otros dos que presentan valores mayores. A los doce meses las cantidades medidas en MT, MEz y MVC duplican a las encontradas a los seis, en el vino tratado con sulfuroso el incremento es mucho menor (la tercera parte).

Comparando los resultados obtenidos en los vinos univarietales y los de la mezcla de variedades se observa que los porcenta-

jes de fructosa, cualquiera que sea el tratamiento, a los seis meses es superior en Verdejo y Jerez, pero no en Viura y Mezcla de variedades en donde la glucosa puede presentar porcentajes muy superiores a los de fructosa, aunque aquí si influyen los tratamientos.

A los doce meses se aprecia el mismo fenómeno y en el mismo sentido comentado en el párrafo anterior.

Con relación a lo observado en cada uno de los tratamientos, el comportamiento del testigo y el adicionado con anhídrido sulfuroso son muy semejantes, independientemente de los valores absolutos, en Verdejo, Jerez y Mezcla; los vinos adicionados de ácido cítrico y ácido ascórbico presentan siempre los valores más altos en el incremento de los porcentajes de azúcares totales.

Hemos visto que los porcentajes de fructosa respecto a los totales era o bien marcadamente superior al de glucosa o de un orden muy próximo, excepto en el vino con enzimas y en el que contiene cítrico y ascórbico en donde son semejantes a los observados en el vino de la mezcla de variedades. Interpretamos esta variación en el comportamiento de los azúcares sobre todo en el testigo, debido a que las vinificaciones tienen lugar de forma espontánea, por tanto se producirá una competencia interespecie que no tiene porque corresponder con la realizada en los vinos univarietales.

2.4.5.- Vinos de los fangos de la variedad Verdejo (FVT, FVS, FVEz, FVVC).

Tabla VII.6

AZÚCARES EN VINOS DE LOS FANGOS DE VERDEJO					
Análisis	Azúcares	Tratamiento			
		T	S	Ez	Vc
6 meses	Totales	0.32	0.29	0.24	0.36
	Fructosa	0.11	0.10	t	0.10
	% Fructosa	34.4	34.5	4.2	27.8
	Glucosa	0.21	0.19	0.23	0.26
	% Glucosa	65.6	65.5	95.8	72.2
12 meses	Totales	0.47	0.57	0.62	0.71
	Fructosa	0.13	0.15	0.15	0.29
	% Fructosa	27.6	26.3	24.2	40.8
	Glucosa	0.34	0.42	0.47	0.42
	% Glucosa	72.4	73.7	75.8	59.2
Variación	Totales	0.15	0.28	0.38	0.35
	% Total	46.9	96.5	158.3	97.2
	Fructosa	0.02	0.05	0.14	0.19
	% Fructosa	18.2	50	1400	190
	Glucosa	0.13	0.23	0.24	0.16
	% Glucosa	61.9	121	104.3	61.5

A los seis meses en T, S, y VC las cantidades y porcentajes de fructosa y glucosa son semejantes, como se observa en la tabla VII.6, aunque los valores de los vinos Vc podrían considerarse ligeramente superiores en valores absolutos. En el vino con enzimas pectolíticos el valor de la fructosa es menor de 0.01 (cantidades traza) mientras que la glucosa mantiene un valor real

semejante al de los otros tratamientos y al de el vino testigo, pero dada la diferencia entre los valores absolutos de ambos azúcares, los porcentajes son muy distintos.

A los doce meses la concentración de glucosa se ha duplicado, mientras que la de fructosa se mantiene en los mismos valores en T, S y Vc, razón por la cual la contribución del primero aumenta en igual grado para los tres tratamientos. En el vino con enzimas la cantidad de glucosa también se ha duplicado, presentando la misma concentración que en los otros tratamientos, pero como la fructosa ha aumentado considerablemente el porcentaje disminuye, aunque su contribución sigue siendo mayor que en los otros.

#### 2.4.6.- Vinos de los fangos de la mezcla de variedades (FMT, FMS, FMEz, FMVC).

A los seis meses del embotellado, en el vino tratado con enzimas pectolíticos solo se aprecia fructosa en cantidades traza (tabla VII.7); a los doce meses se mide mayor cantidad de este azúcar en todos los vinos, siendo en FMEz donde se observa el mayor incremento.

La concentración más alta de glucosa se valora en el vino con los ácidos cítrico y ascórbico y la más baja en el testigo. A los doce meses, al igual que para fructosa, también hay incremento de concentración, el más importante se da en el vino con enzimas pectolíticos.

Tabla VII.7 AZÚCARES EN VINOS DE LOS FANGOS DE LA MEZCLA DE VARIEDADES					
Análisis	Azúcares	Tratamiento			
		T	S	Ez	Vc
6 meses	Totales	0.27	0.31	0.17	0.38
	Fructosa	0.13	0.13	t	0.17
	% Fructosa	48.1	41.9	5.9	44.7
	Glucosa	0.14	0.18	0.16	0.21
	% Glucosa	51.9	58.1	94.1	55.3
12 meses	Totales	0.40	0.42	0.46	0.53
	Fructosa	0.14	0.14	0.13	0.20
	% Fructosa	35	33.3	28.3	37.7
	Glucosa	0.26	0.28	0.33	0.33
	% Glucosa	65	66.7	71.7	62.3
Variación	Totales	0.13	0.11	0.29	0.15
	% Total	48.1	35.5	170.6	39.5
	Fructosa	0.01	0.01	0.12	0.03
	% Fructosa	7.7	7.7	1200	17.6
	Glucosa	0.12	0.10	0.17	0.12
	% Glucosa	25.7	55.5	106.2	57.1

2.4.7.- Vinos varietales de Verdejo con levaduras de bodega en pureza (VR1, VR2, VR3).

Con el paso del tiempo se observa aumento de concentración de azúcares totales en VR1 y VR3, mientras que los valores en VR2 permanecen constantes (tabla VII.8).

**Fructosa.** El porcentaje respecto a los azúcares totales aumenta entre los dos muestreos en VR1, sin embargo en VR2 y VR3

es semejante, aún cuando la cantidad real sea mayor a los doce meses.

Tabla VII.8

AZÚCARES EN VINOS DE VERDEJO POR INDUCCION CON LEVADURAS				
Análisis	Azúcares	Levadura		
		R1	R2	R3
6 meses	Totales	0.16	0.07	0.27
	Fructosa	t (0.01)	t (0.01)	0.17
	% Fructosa	6.3	14.3	62.9
	Glucosa	0.15	0.06	0.10
	% Glucosa	93.7	85.7	37.1
12 meses	Totales	0.47	0.08	0.35
	Fructosa	0.15	0.01	0.23
	% Fructosa	31.9	12.5	65.7
	Glucosa	0.32	0.07	0.12
	% Glucosa	68.1	87.5	34.3
Variación	Totales	0.32	0.01	0.08
	% Total	200	14.3	29.6
	Fructosa	0.14	0	0.06
	% Fructosa	1400	0	35.3
	Glucosa	0.17	0.01	0.02
	% Glucosa	113	16.6	20

Glucosa. La cantidad de este azúcar se duplica en VR1, manteniéndose dentro del mismo orden entre los dos períodos para los otros dos vinos, para estos los cuatro valores son similares. El porcentaje de glucosa con relación a los azúcares totales desciende significativamente en VR1, luego este carbohidrato presenta menor contribución al total a los doce que a los seis

meses. En VR2 y VR3 los porcentajes no varían entre los dos muestreos, aunque si el valor de ellos, puesto que en VR2 es del orden del 85% y en VR3 tan solo del 35%.

La importancia de los porcentajes relativos de estos azúcares en los vinos comentados, en nuestra opinión, se traduce en una característica organoléptica, ya que si la contribución al total de azúcares residuales es mayor para la fructosa, implica un mayor dulzor del vino, puesto que esta tiene mayor poder edulcorante que la glucosa.

#### 2.5.- Actuación de especies filmógenas.

Para los dos azúcares las cantidades presentes son superiores en el vino que no estuvo en contacto con madera; la fructosa se encuentra en una cantidad 2 veces superior, mientras que la glucosa es casi 4 veces más alta (tabla VII.9).

Tabla VII.9

AZÚCARES EN LOS VINOS ANTES Y DESPUES DEL VELO						
AZUCARES	VINOS		VINOS DOS MESES BAJO VELO			
	SM	CM	SM1663	CM1663	SM1685	CM1685
Totales	0.58	0.18	0.05	0.05	0.05	0.04
Fructosa	0.19	0.09	tr	0.02	tr	0.02
% Fructosa	32.7	50	20	20	40	50
Glucosa	0.35	0.09	0.04	0.03	0.04	0.02
% Glucosa	67.3	50	80	60	80	50

Los resultados obtenidos tras el período de permanencia con velo están reflejados en la tabla VII.9.

Cuando se partió de vinos sin maderizar, tras el período de permanencia con velo, solo se observan cantidades traza de fructosa; las concentraciones de glucosa han disminuido también durante este período, y la cantidad cuantificada es la misma para las dos levaduras utilizadas.

Cuando se partió de vinos que habían permanecido durante seis meses en madera en los resultados obtenidos para los azúcares se puede observar que los valores obtenidos para glucosa y fructosa son semejantes a los obtenidos en vinos sin madera, pero al haber partido de valores más bajos, la disminución es menor.

#### 2.6.- Vinos de mercado (MN86, MB86, MD).

Solo se pueden comparar MN y MB, ya que a MD antes de comercializar se le adiciona jarabe. La cantidades de fructosa y glucosa son parecidas en los dos vinos, ligeramente superior en MB (tabla VII.10).

Tabla VII.10 AZÚCARES EN VINOS COMERCIALES		
AZUCARES	MN	MB
Totales	0.19	0.22
Fructosa	0.10	0.10
% Fructosa	52.6	45.5
Glucosa	0.09	0.12
% Glucosa	47.4	54.5

### 3.- Conclusiones.

- 3.1.- El mosto de la variedad Jerez es más rico en azúcares que el de Verdejo, y además, contiene mayor cantidad de fructosa que de glucosa.
- 3.2.- La fermentación espontánea presenta la concentración de azúcares residuales más alta.
- 3.3.- Las levaduras de la colección del I.F.I. mantienen mayor concentración de azucars residuales que las de bodega, siendo glucosa el predominante.
- 3.4.- Despues de mantener el vino bajo velo, el contenido en azúcares residuales es del mismo orden, con independencia del vino y levadura filmógena utilizada.
- 3.5.- En general durante la conservación, a los doce meses hay una cantidad de azúcares superior a la presente a los seis.
- 3.6.- La variación de los azúcares totales entre los seis y doce meses de conservación, parece tener relación con el tratamiento y variedad de uva, observandose las menores en los vino de Jerez y las mas altas en los de Viura.

3.7.- La fructosa es el azúcar que presenta más diferencias en su comportamiento, en especial en los vinos con tratamiento con enzimas pectolíticos y con los ácidos cítrico y ascórbico.

3.8.- El tratamiento con enzimas pectolíticos provoca una acumulación del mismo orden para todos los tipos de vino excepto los obtenidos de la variedad Verdejo.

## VIII.- CONCLUSIONES



- 1.- La variedad Jerez, que presenta los seis géneros de levaduras identificadas, tiene así mismo la mayor riqueza en compuestos fenólicos de bajo peso molecular, polialcoholes y azúcares.
- 2.- Los compuestos fenólicos en general y el eritritol aumentan con la fermentación independientemente de la variedad de uva.
- 3.- Con las levaduras de primera fase se obtienen las menores concentraciones de tirosol y triptofol, productos de fermentación. Así mismo se originan las más altas de eritritol.
- 4.- Entre las levaduras residuales se aísla una especie filmógena de *Saccharomyces* que parece ser propia de la zona.
- 5.- *Kloeckera apiculata*, *Torulasporea rosei* y *Saccharomyces ellipsoideus* se confirman como la terna de levaduras más adecuada para llevar a cabo la fermentación de estos mostos de uva.
- 6.- En los vinos obtenidos respetando la microflora epifítica natural de los mostos, pero utilizando un esquema secuencial de levaduras autóctonas, sin adición por tanto de anhídrido sulfuroso en la fermentación.

tación, se observa que la adición 25 ppm de esta molécula antes de embotellar impide la viabilidad de levaduras residuales.

- 7.- Bajo la acción de las levaduras de velo el contenido de compuestos fenólicos y azúcares desciende, llegando a alcanzar para cada grupo valores semejantes. El arabitol y el eritritol también disminuyen.
- 8.- Con la conservación disminuye el triptofol y aumentan el tirosol y los polialcoholes totales, independientemente del tratamiento y variedad de uva.
- 9.- En los vinos, el tratamiento con enzimas pectolíticos implica menor cantidad de esteres tartáricos de los ácidos cinámicos y mayor de esos ácidos libres y produce el menor aumento de polialcoholes.
- 10.- A lo largo del trabajo se ha puesto de manifiesto que la variedad Jerez presenta unas características muy diferenciadas de las de Verdejo, de forma que su presencia, en gran cantidad, podría modificar los vinos de la zona, y originar otros en los que esta última perdería parte de su importante contribución en los vinos de Nava.

## IX. - BIBLIOGRAFÍA



Aerny, J. (1986 a) L'anhydride sulfureux est-il-indispensable en oenologie?. Bull. Soc. Frib. Sc. Nat. 75: 15-16.

Aerny, J. (1986 b) Disminution de la teneur des vins en anhydride sulfureux. I. L'anhydride sulfureux et sus propriétés utiles en vinification. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic. 18-1: 17-21.

Aerny, J. (1986 c) Disminution de la teneur des vins en anhydride sulfureux. II. Aspects pratiques. Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic. 18-3: 143-146.

Alonso, E. (1985) Los flavonoles de los vinos como criterio de diferenciación. Tesis Doctoral. Madrid: Fac. de Ciencias U.A.M.

Amerine, M.A., C.S. Ough (1976) Análisis de vinos y mostos. Zaragoza. Acribia.

Arroyo, V. (1962) Agentes de fermentación y crianza de los mostos y vinos de Montilla y los Moriles. Tesis Doctoral. Madrid: Fac. de Ciencias, Químicas U.C.M..

Aulin-Erdman, G., R. Sandin (1968) Spectrographic contributions to lignin chemistry. Acta Chem. Scand. 22: 1187-1209.

Barcenilla, J.M., V. Arroyo (1989) Dinámica fermentativa de los mostos de uva por levaduras en la comunidad de Madrid. *Alimentaria*. 203: 57-65.

Barcenilla, J.M., V. Arroyo (1990) Agentes de fermentación de los mostos de uva de la zona de Toro (Zamora). *Alimentación Equipos y Tecnología*. Noviembre: 99-102.

Barcenilla, J., M.I. Estrella, C. Gomez-Cordoves, T. Hernandez, L. Hernandez (1989) The influence of yeasts on certain non volatile components of wine. *Food Chemistry* 31: 177-187.

Barnett, J.A., R.W. Payne, D. Yarrow (1979) A guide to identifying and classifying yeast. Cambridge: Cambridge University Press.

Barnett, J.A., R.W. Payne, D. Yarrow (1983) *Yeast: Characteristics and identification*. Cambridge: Cambridge University Press.

Bate-Smith, E.C. (1954) Leucoanthocyanins.I. Detection and identification of anthocyanidins formed from leuco-anthocyanins in plant tissues. *Biochem. J.* 58: 122-125.

Beech, F.W., S. Thomas (1985) Action antimicrobienne de l'anhydride sulfureux. *Bull. l'O.I.V.* 58: 564-581.

Berger, K., G. Sperlich (1951). H. Dtsch. Lebensm. Rund-  
schon 47: 134.

Bertrand, A., R. Pissard (1976) Dosage du sorbitol dans les  
vins par chromatographie en phase gazeuse de son dèrivé  
acètylé. Ann. Fals. Exp. Chim. 69 (742): 571-579.

Bertrand, A., R. Pissard, C. Sarre, J.C. Sapis (1976) Etude  
de l'influence de la pourriture grise des raisins (*Botritis  
cinerea*) sur la composition chimique et la qualite des  
vins. Conn. Vigne Vin 10 (4): 427-446.

Bidan, P., Y. Collon (1985) Metabolisme de soufre chez la  
levure. Bull. l'O.I.V. 58: 544-562.

Blumental, H.J. (1976) The filamentous fungi. Biosynthesis  
and Metabolism. London: Smith, J.E., Berry, D.R..

BOE (1981) Anexo XI Vinos. Orden de Presidencia de Gobierno  
de 17.9.1981. : 24021-24023.

Bravo, F., E.M. Garcia (1987) Seleccin de microorganismos  
para la produccin de vinos higienicos. I. Produccin de  
sulfuro de hidrógeno e histamina durante la fermentación  
vínica. Alimentaria 103: 103-108.

Bravo, F., B. Iñigo (1989) "Nueva biotecnología de vinifi-  
cación:I. Aspectos fisico-químicos". IV Jornadas Universi-

tarias de Viticultura y Enología en Jerez. Cadiz: Fac. Ciencias Universidad de Cadiz, pp. 159-167.

Cabezudo, M.D. (1988) La investigación enológica en estos cien años, desde la invasión de la filoxera. Alimentación Equipos y Tecnología Sep-Oct: 67-74.

Castelli, T., B. Iñigo (1957) Los agentes de la fermentación vínica en la región Manchega y zonas limítrofes. Ann. Fac. Agr. Università di Perugia. Vol. 3

Castelli, T., B. Iñigo (1958) Los agentes de la fermentación vínica de la Rioja. Ann. Fac. Agr. Università di Perugia. 13: 183

Castino, M (1988) Connaissance de la composition du raisin et du vin. Passage au vin des substances non transformées par la fermentation. Apparition dans le vin des substances nées lors de la fermentation. Bull de l'OIV 61:539-553.

Cela, R., R. Natera, J.A. Perez-Bustamante (1982) Determinación de polifenoles totales en mostos y vinos blancos. Anal. Bromatol. 34: 207-217.

Charalambous, G., K. Bruckner, W.A. Hardwick, A. Linnebach (1973) Determination of beer flavor compounds by high pressure liquid chromatography. Mast. Brew. Ass. Am. Tech. Quart 10: 74-78.

Colomo, M.B. (1987) Efecto inductivo de levaduras vínicas de primera fase en la etapa final de vinificación. Su explicación desde una perspectiva ecológica. Tesis Doctoral. Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. U.C.M.

Coombe, B.G. (1987) Distribution of solutos within the developing grape berry in relation to its morphology. Am. J. Enol. Vitic. 38 (2): 120-126

Delgado, T. (1986) Compuestos fenólicos de bajo peso molecular en brandies. Identificación y relación con su añejamiento y calidad. Tesina de Licenciatura. Madrid: Facultad de Farmacia U.C.M..

De Smedt, P., P.A.P. Liddle, B. Cresto, A. Bossard (1979) Application de la CPG sur colonne capillaire a l'analyse des compose fixes du vins. Ann. Fals. Expert. Chim. 72: 633-642.

De Smedt, P., P.A.P. Liddle, B. Cresto, A. Bossard (1981) The analysis of non-volatile constituents of wine by glass capillary gas chromatography. J. Inst. Brew. 87: 349-351.

Diez, C. (1989) Los compuestos fenólicos en alimentos de origen vegetal. En: Apuntes del Curso Los compuestos fenólicos de origen vegetal.

Diez, M. (1977) La viticultura y la Enología romanas y su proyección en Hispania. Tesis Doctoral. Madrid: Fac. Filosofía y Letras U.C.M..

Dubernet, M.O., A. Bertrand, P. Ribereau-Gayon (1974) Presence constante dans les vins d'erytritol, d'arabitol et de manitol. C.R. Acad. Sci. Paris Serie D 279: 1561-1564.

Erlich, F. (1907) Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über den Zusammenhang mit Eiweissabbau der Hefe. Ber. Deut. Chem. Ges. 40 b: 1027-1047.

Eschenbruch, R. (1974) Sulphite and sulphide formation during winemaking. A review. Am. J. Enol. Vitic. 25: 157-161.

Estrella, M.I., M.T. Hernandez, C. Diez (1983) Evoluzione dei composti fenolici di basso peso molecolare durante la maturazione dei vini di Jerez. Vigne Vini 1-2: 33-38.

Estrella, M.I., G. Santa-Maria, T. Hernandez, C.A. Diez (1978) les reactions flavonol et flavandiol avec des groupes carbonyles. Bull. Liason Groupe Plphenols 8: 311-314.

Feduchi, E., T. Hidalgo (1963) Análisis de sorbita en vinos españoles. Bol. Inst. Nac. Inv. Agr. XXIII49: 189-204.

Fernandez de Simon, B (1990) Contribución al estudio de la maduración del fruto de *Vitis vinifera*: evolución de los compuestos fenólicos C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> y C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Tesis Doctoral. Madrid: Facultad de Farmacia. U.C.M.

Fernandez de Simon, B., C. Gomez-Cordoves, T. Hernandez (1987) Estudio de los compuestos fenólicos no flavonoideos e indoles durante el proceso de maduración de la uva. II World Cogress of Food Technology. Barcelona.

Fernandezde Simon, B., J. Perez-Ilzarbe, Hernandez, T., C. Gomez-Cordoves (1990) HPLC study of the efficiency of extraction of phenolic compounds. *Cromatographia* 30: 35-37.

Flanzy, M. (1959) Recherches sur la vinification des vin doux naturels. *Ann. Technol. Agric.* : 285-320.

Flanzy, M., S. Aubert (1969) Evaluation des composés phénoliques des vins blancs comparée de quelques vins de *Vitis vinifera* et de cépages hybrides interspécifiques producteur directs. *Ann. Technol. Agr.* 18: 27-44.

Fregoni, M. (1977) Effects of the soil and water on the quality of the harvest. Proc. 1st Internatonal Symposium on the Quality of the vintage. Ciudad del Cabo.

Galasi, B.M., C. Mancini (1985) Tecnologie per ridurre l'uso di SO<sub>2</sub> in enologia. *Vigne Vini* 12 (5): 13-18.

Genevois, L. (1952) Formation des alcools supérieurs et de leurs dérivés au cours de la fermentation alcoolique. *Industr. Aliment. Agric.* 1: 27-32.

Gibbs, B.M., D.A. Shapton (1968) *Identification Methods for Microbiologists*. London: Academic Press.

Gil, C., C. Gomez-Cordovés (1986) Tryptophol content of young wines made from Tempranillo, Garnacha, Viura and Airen grapes. *Food Chemistry* 22(1): 59-65

Glories, Y. (1984) La couleur des vins rouges. 2. Measure, origine et interprétation. *Connais. Vigne Vin* 18: 253-271.

Goldstein, J.C., T. Swain (1963) Changes in tannins in ripening fruit. *Phytochemistry* 2: 371-383.

Gomez-Cordoves, C., D. Garrido, C. Diez (1978) Etude des composés phénoliques des eaux-de-vie vieilles en bois de chêne. *Bull. Liaison Groupe Polyphenols* 8: 369-373.

Gomez-Cordoves, C., T. Delgado (1984) Rapport entre aldehydes et acides phénoliques présents dans les eaux-de-vie vieilles par le système de "soleras". *Bull. Liason Groupe Polyphenols* 12: 449-453.

Gomez-Cordoves, C., L. Hernandez (1987) Polialcoholes y azúcares en vinos con distinto grado de prensada. *Alimentaria* :109-111.

Gomez-Cordoves, C., M.T. Hernandez, M.I. Estrella, C. Diez (1984) Study on the content of Tryptophol in different varieties of *Vitis vinifera*. Proceedings of the I.U.F.S.T. international Symposium. 1: 186-191.

Gonzales, L. (1990) Contribución al estudio de la estabilidad fisicoquímica del vino. Tesis Doctoral. Madrid: E.T.S.I.I. Universidad Politécnica.

Gonzalez, M.L. (1989) Comportamiento del metabolismo secundario en la maduración de la uva *Vitis vinifera*. Tesis Doctoral. Madrid: Facultad de Ciencias U.A.M.

Grisebach, H., M. Bopp. (1959) Studies on the biogenetic relation between quercetin and cyanidin in buckheat whit the help of C<sub>14</sub>-labeled compounds. *Ztsch. Naturf.* 14b: 485-490

Guimberteau, G. (1969) Etude de la formation des polyols dans la fermentation lactique des glucides. *Conn. Vigne vin* 3 (1): 1- 41.

Gupta, S.P. (1968) Thin-layer chromatographic separation of flavonoids in *Medicago* (Papillonacea). *J. Chromatog.* 36: 258- 261.

Hamond, S.M., J.G. Carr (1976) Inhibition and inactivation of vegetative microbes. *Society for Applied Bacteriology Symposium.*: Skinner, F., Hugo, W. Academic Press.

Heacock, R.A., M.E. Mahon (1965) The colour reactions of the hydroxyskatoles. *J. Chromatog.* 17: 338.

Heftman, E. (1967) *Chromatography*. Second edition. New York: Renhold Publishing Corporation.

Hernandez, T., J.L. Dorronsoro (1984) Comportement des composés phénoliques mesures á différentes longueurs d'onde dans analyse par CLHP. *Bull. Liason Groupe Polyphenols* 12: 587-590.

Hernandez, L., M.C. Gomez-Cordoves (1986) Determinación rápida de polialcoholes y azúcares en vinos por cromatografía gas-liquido. *La Semana Vitivinícola* 2102: 4673-4675.

Hernandez, M.T., E. Sanchez (1980) La séparation des phénols non flavonoides par la CLHP. *Bull. Liason Groupe Polyphenols* 10: 263-268.

Huss, A., C.A. Eckert (1977) Equilibria and ion activities in aqueous sulphur dioxide solutions. J. of Physical Chemistry 81: 2268-2270.

Iñigo, B., V. Arroyo (1970) Agentes de fermentación de mostos de uva de Navarra. Agricultura 39: 830-831

Iñigo, B. (1971) Fermentación dirigida y contaminación microbiana. Revista Afinidad 288: 673-678.

Iñigo, B. (1986) Elaboración ecológica del vino. Enología y Enotecnia 1: 10-13.

Iñigo, B. (1986) Hacia una nueva biotecnología de la vinificación. Simposio de Microbiología sobre la elaboración de vino. X. Congreso Nacional de Microbiología. Valencia. 52.

Iñigo, B., V. Arroyo, R. Ripio (1968) Agentes de fermentación de los mostos de Extremadura. Rev. Agricultura. 438: 536-540.

INDO (1984) Reglamento del "Estatuto de la viña, del vino y de los alcoholes". Secretaria General Técnica del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.

Jangaard, N.O. (1970) Thin-layer chromatography of some plant phenolics. J. Chromatog. 50: 146-148.

Joseph, E., M. Marche (1972) Contribution a l'étude du vieillissement du cognac: Identification de la scopolétine, de l'aesculetine, de l'ombelliferóne, de la  $\alpha$ -methyl ombelliferóne, de l'aesculine, et de la scopoline, heterosides provenant du bois. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 6 (3): 173-330.

Junquera, B (1990) Factores condicionantes del proceso de maduración del fruto de *Vitis vinifera*. Caracterización varietal. Tesis Doctoral. Fac. de Farmacia. U.C.M.

Jurd, C., T.A. Geissmann. (1956) *J. Org. Chem.* 28: 1935.

Khayyat, N., V. Arroyo, J. F. Somavilla, B. Iñigo (1982) La España Vitivinícola. Estudio microbiológico. *Alimentaria* 131: 29-32.

Khayyat, N., V. Arroyo, J. F. Somavilla, B. Iñigo (1982) La microflora de levaduras de los vinos de Yecla. *Alimentaria*. 135:

Kichner, J.G. (1978) *Techniques of chemistry*. New York: Weissberger, Wiley and Sons.

Kliwer, W.M. (1965) Changes in concentration of glucose, fructose, and total soluble solids in flowers and berries of *Vitis vinifera*. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 101-110.

Kliewer, W.M. (1967) The glucose-fructose ratio of *Vitis vinifera* grapes. Am. J. Enol. Vitic. 18: 33-41.

Kliewer, W.M. (1970) Effect of day temperature and light intensity on coloration of *Vitis vinifera* grapes. J. Am. Soc. Hort. Sci. 95: 693-697.

Kliewer, W.M. (1977) Effect of temperature, solar radiation and nitrogen on coloration and composition of Emperor grapes. Am. J. Enol. Vitic. 31: 7-13.

Kramling, T.E., V.L. Singleton (1969) An estimate of the nonflavonoid phenols in wines. Am. J. Enol. Vitic. 20: 86-92.

Kreger-van Rij, N.J.W. (1984) The yeast a taxonomic study. Amsterdam: Elsevier Science Publisher B.V..

Lea, A.G.H., P. Bridgman, C.F. Timberlake, and V.L. Singleton (1979) The procyanidins of white grapes and wines. Am. J. Enol. Vitic. 30: 289-300.

Lehninger, A.L. (1982) Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. Segunda edición. Barcelona: Ediciones Omega S.A..

Lodder, J. (1970) The yeast, a taxonomic study. Second edition. Amsterdam: North-Holland Publishing Company.

Lodder, J., N.J.W. Kreger-van Rij (1957-1967) *The yeast, a taxonomic study*. Amsterdam: North-Holland Publishing Company.

Lozano, R.D. (1978) *El color y su medición*. Americalee. Buenos Aires.

Lueck, E. (1980) *Antimicrobial food: additives*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Mabry, T.J., K.R. Markham, M.B. Thomas (1970) *The systematic identification of Flavonoids*. New York: Springer-Verlag.

Macris, B.J., P. Markakis (1974) Transport and toxicity of sulphur dioxide in *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *J. Sci. Food Agric.* 25: 21-29.

Mareca, I. (1982) *Enología*. Madrid: Editorial Alhambra S.A..

Margheri, G., G. Versini (1986) Aspetti tecnologici e biochimici connessi con la produzione dei vini bianchi di qualita con basso tenore di anidride solforosa. *Vignevini* 13 (5): 61-65.

Markham, K.R. (1982) *Techniques of Flavonoid Identification*. London: Academic Press.

Markhan, K.R. (1975) The flavonoids. New York: Academic Press.

Masquelier, J., J. Michaud, J. Triaud (1965) Fractionnement des leucoanthocyanes du vin. Bull. Soc. Pharm. Bourdeaux 104: 145-148.

Masquelier, J., G. Vitte, M. Ortega (1959) Dósage colorimétrique des leucoanthocyanes dans les vins rouges. Bull. Soc. Pharm. Bourdeaux 98: 145-148.

Mc Clary, D.O., W.L. Nulty, G.R. Miller (1959) Effect of potassium versus sodium in the sporulation of *Saccharomyces*. J. Bacteriol. 78: 362.

Milisayljevic, D. (1967) Action postfermentaire dei levures sur les composeés phénoliques du vin. C.R. 2eme Symposium International d'Oenologie. Burdeos.

Ministerio de Agricultura, INDO (1977). Catastro Vitícola y Vinícola 47.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (1989). Boletín Mensual de Estadística. Julio.

Ministerio de, Agricultura, Pesca y Alimentación (1988). Boletín Mesual de Estadística. Agosto.

Moll, M., R. Flayeux, D. Bazard, A. Mouet (1978) Separation des acides phénoliques par CLHP. Application a la bière. Bull. Liaison Groupe Polyphenols 8: 364-368.

Moutounet, M. (1969) Biosynthèse des alcools supérieurs des boissons fermentées. Ann. Technol. Agric. 18 (3): 249-261.

Nieto, M.J. (1988) Compuestos fenólicos presentes en el ecosistema del Parque Nacional de Doñana, lagunas Zahillo y Santa Olalla. Tesina de Licenciatura. Madrid: U.A.M..

Okamura, S., M. Watanabe (1981) Formation of beta-phenethyl alcohol, tyrosol, and tryptofol from some sugars by *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of the Society of Brewing 76 (9): 629-634.

Olano, A. (1983) Presence of trehalose and sugar alcohols in sherry. Am. J. Enol. Vitic. 34 (3): 148-151.

Ough, C.S. (1987) Chemical used in making wine. Chemical and Engineering News 5: 19-28.

Peri, C., C. Pompei, G. Montedoro, C. Cantarelli (1971) Maderization of white wines. I. Influence of pressing of the grapes on the susceptibility to oxidative browning. J. Sci. Food Agric. 22: 24-28.

Peri, C., C. Pompey, G. Montedoro (1971) Le dosage des leucoanthocyanes dans les vins blancs. Ann. Technol. Agr. 20: 21-34.

Peynaud, E. (1971) Connaissance et travail du vin. Paris: Dunod ed. Bordas.

Peynaud, E. (1989) Enologia practica. Conocimiento y elaboracion del vino. Tercera edicion revisada y ampliada. Madrid: Mundi- Prensa.

Possner, D.R.E., W.M. Kliewer. (1985) The localisation of acids, sugars, potassium and calcium into developing grape berries. Vitis 24: 229-240

Reglero, g. (1987) Nuevas tecnicas en la elaboracion del vino. Agroquimica y Tecnologia de Alimentos 27 (4): 463--470.

Riberea-Gayon, J., E. Peynaud (1962) Análisis de vinos. Madrid: Aguilar.

Ribereau-Gayon, J., E. Peynaud (1961) Traite d'oenologie. Tome second. Paris-Lieja: Librairie Polytechnique CH Beranger.

Ribereau-Gayon, J., E. Peynaud, P. Ribereau-Gayon, P. Sudraud (1977) Traite d'oenologie. Sciences et techniques du vin. Tome 4. Paris: Dunod Bordas.

Ribereau-Gayon, J., E. Peynaud, P. Sudraud, P. Ribereau-Gayon (1972) Traite d'oenologie. Sciences et techniques du vin. Tome 1. Paris: Dunod.

Ribereau-Gayon, J., E. Peynaud, P. Sudraud, P. Ribereau-Gayon (1975) Traite d'oenologie. Sciences et techniques du vin. Tome 2. Paris: Dunod Bordas.

Ribereau-Gayon, J., P. Peynaud, P. Ribereau-Gayon, P. Sudraud (1976) Traite d'oenologie. Sciences et techniques du vin. Tome 3. Paris: Dunod Bordas.

Ribereau-Gayon, P. (1957) Le leucocyanidol dans les vins rouges. C. R. Acad. Agr. France 43: 596-598.

Ribereau-Gayon, P. (1958) Formation et evolution des anthocyanes au cours de la maturation du raisin. C. R. Acad. Sci. Paris Serie D: 1271-1273.

Ribereau-Gayon, P. (1968) Les composés phénoliques des végétaux. Paris: Dunod.

Ribereau-Gayon, P. (1971) Evolution des composés phénoliques au cours de la maturation du raisin. I. Experimentation 1969. *Conn. Vigne Vin* 5: 247-261.

Ribereau-Gayon, P. (1982) The anthocyanins of grape wines. En (ed): *Anthocyanins as food colours*. New York: Academic Press.

Ribereau-Gayon, P. (1964) Les composés phénoliques du raisin et du vin. *Inst. Natl. Rech. Agron. Paris*.

Ribereau-Gayon, P., E. Stonestreet (1966) D dosage des tannins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal.* 48: 188-196.

Rosazza, J.P., R. Juhl, P. Davis (1973) *Appl. Microbiol.* 26 (1): 98-105. *C.A.* 1973 79:63451z.

Rose, A.H., J.S. Harrison (1969) *The yeasts. Volume I: Biology of yeasts*. London: Academic Press.

Salagoity-Auguste, M.H., A. Bertrand (1984) Wine phenolics. Analysis of low molecular weight components by HPLC. *J. Sci. Food Agric.* 35: 1241-1247.

Santa-Maria, G., A. Olano (1985 a) Differences in polyols content among fermentations of the some must with several yeasts. *Biotechnology Letters* 7(4): 229-234.

Santa-Maria, G., A. Olano, M. Tejedor (1985 b) Quantitative determination of polyalcohols in wine and vinegar by gas chromatography. *Chromatographia* 20 (3): 197-200.

Sapis, J.C., P. Ribereau-Gayon (1969 a) Etude dans les vins du tyrosol, tryptophol, de l'alcool phénylethylique et de la  $\gamma$ -butyrolactone, produits secondaires de la fermentation alcoolique. I. Identifications et méthodes de dosage. *Ann. Technol. Agric.* 18 (3): 207-219.

Sapis, J.C., P. Ribereau-Gayon (1969 b) Etude dans les vins du tyrosol, tryptophol, de l'alcool phénylethylique et de la  $\gamma$ -butyrolactone, produits secondaires de la fermentation alcoolique. II. Présence et signification. *Ann. Technol. Agric.* 18 (3): 221-229.

Schopfer, J.F., J. Aerny (1985) Le role de l'anhydride sulfureux en vinification. *Bull. l'O.I.V.* 58: 515-542.

Scienza, A., M. Fregoni, M. Boselli (1981) Rapporti tra origine geologica del terreno e composizione polifenolica del vino di Schava in Alto Adagio. *Vignevini* 8(3): 39-43.

Singleton, V.L., P. Esau (1969) *Advances in food research. Supplement 1. Phenolic substances in grape and wine, and their significance.* New York: Academic Press.

Singleton, V.L., J.A. Rossi (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolydic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* 16: 144-158.

Singleton, V.L., J. Zoya, E. Trousdale (1980) White table wine quality and polyphenol composition as affected by must SO<sub>2</sub> content and pomace contact time. *Am. J. Enol. Vitic.* 31: 14-19.

Smedt, P., P.A.P. Liddl, B. Cresto, A. Bossard (1979). *Ann. Fals. Chem.* 72(781): 633-642.

Spencer, J.F.T., D.M. Spencer (1980) *The biochemistry of plants.* New York: Academic Press.

Sponholz, W.R. (1988) *Modern Methods of plant analysis.* Vol 6. Wine analysis. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.

Sponholz, W.R., H. H. Dittrich, A. Barth (1982) *Über die Zusammensetzung essigstichiger weine.* *Dtsche. Lebensm. Rundsch.* 78:423-428.

Sponholz, W.R., H. H. Dittrich (1985) *Zuckeralkohole und myo-Inosit in Weinen und Sherries.* *Vitis* 24: 97-105.

Sponholz, W.R., M. Lacher, H. H. Dittrich (1986) *Die Bildung von alditolen durch die hefen des weines.* *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 10: 19-24.

Stahl, E. (1969) Thin-Layer Chromatography. Berlin: Springer-Verlag.

Strack, D., J. Krause (1978) Reverse-phase HPLC separation of naturally occurring mixtures of flavona derivatives. J. Chromatog. 156: 357-361.

Stratford, M., A.H. Rose (1986) Transport of sulfur dioxide in *Saccharomyces cerevisiae*. J. of General Microbiology 132: 1-6.

Suarez, J.A., B. Iñigo (1990) Microbiología enológica. Fundamentos de vinificación. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.

Sudraud, P. (1958) Interprétation des courbes d'absorption des vins rouges. Am. Technol. Agric. 7: 203-208.

Swain, T., J.L. Goldstein (1964) Method in Polyphenol Chemistry. Oxford: J.B. Pridham Pergamon Press.

Swain, T., W.E. Hillis (1959) Phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. J. Sci. Food Agric. 10: 63-68.

Szlauko, C.M. (1973) Tryptophol, tyrosol and phenylethanol. The aromatic higher alcohols in beer. Journal of the Institute of Brewing. 79 (4): 283-288.

Tabor, H., C.W. Tabor (1970) Methods in enzymology. Volume XVII. Part A. New York: Academic press.

Triquet-Pissard, R. (1981) Actualités oenologiques et viticoles. Paris: Dunod Bordas.

Useglio-Tomasset, L. (1985) Les technologies de vinification permettant de diminuer les doses de SO<sub>2</sub>. Bull. l'O.I.V. 58: 606-616.

Villarroya, B., L. Hernandez, Gomez-Cordoves, C. (1988) Diferencias en la maduración de uvas blancas y tintas por determinación de azúcares y polialcoholes. Resúmenes de la XXII reunion de R.S.E.Q. 356.

Villarroya, B., M.C. Gomez-Cordoves (1990) Determinación de azúcares, ácidos orgánicos y polialcoholes en zumos y néctares comerciales. Resúmenes de la bienal de la R.S.E.Q. 420.

Villechenouse, M., G. Santa-Maria, C. Gomez-Cordoves, M.I. Estrella, C. Diez (1976). Reunión anual de cromatografía y técnicas afines.

Wehrli, A., J.C. Hildebrand, H.P. Keller, R. Stampfli, R.W. Fres (1978) Influence of organic bases on the stability and separation properties of reverse-phase chemical bonded silica gels. J. Chromatog. 149: 199-.

Weimberg, R. (1962) Mode of formation of D-arabitol by *Saccharomyces mellis*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 8: 442-445.

Wood, W.A. (1961) The bacteria. Vol 2. New York: Academic Press.

Wulf, L., C.W. Nagel (1976) Analysys of phenolic acids and flavonoids by high-pressure liquid chromatography. J. Chromatog. 116: 271-279.

Wulf, L.W., C.W. Nagel (1980) Identification and changes of flavonids in Merlot and Caverned-Sauvignon wines. J. Food Sci. 45: 479-484.

Zironi, R., C. Riponi, R. Ferrarini, A. Amati (1982) Effetti del Marciume acido sul costituenti delle uve e sulle caratteristiche dei mosti e dei vini. Vignevini 9(10): 39-46.

## FE DE ERRATAS

- Página 9 ..... Mateos, P., P. Sanchez-Infante, V. Arroyo, B. Iñigo (1985) Mostos de uva de la zona de Utiel-Requena. Influencia del anhídrido sulfuroso en la microflora fermentativa. Alimentaria 164: 29-36
- Página 9 ..... Sanchez-Infante, P., P. Mateos, A. Ruiz, V. Arroyo (1986) Influencia del anhídrido sulfuroso en el proceso de fermentación de los mostos de la denominación de Origen Alicante. Alimentaria 49-52
- Página 18 .... "adaptación a sido" debe decir "adaptación ha sido"
- Página 22 .... "Castelli, quien junto a Iñigo (1957)" debe decir "Castelli (1957), quien junto a Iñigo"
- Página 33 .... Ribereau-Gayon, P (1986) Control of alcoholic fermentation during vinification. Prog. Congr. Eur. Brew. Conv. 1985 20th: 51-64
- Página 41 .... "y de lata resolución" debe decir "y de alta resolución"
- Página 47 .... "En muchas ocasiones el contenido" debe decir "En muchas ocasiones el análisis del contenido"

- Página 49 .... "Fernandez de Simón 1990" debe decir "Fernandez de Simon y col. 1987"
- Página 51 .... Jenkins, G.L., W.H. Hartung, K.E. Hamlin, J.B. Dahe (1957) The chemistry of organic Medicinal Products. 4 edición, New York p-569
- Página 52 .... Maschelein, C.A., J. Haboucha (1965) Cell surface adsorption phenomena during fermentation. Soc. Chem. Ind. (London) Monograph 19: 202-213
- Página 52 .... Singleton, V.L. (1967 a) Fining-phenolic relationships. Wines-Vines 48(3): 23-26
- Página 52 .... Singleton, V.L. (1967 b) Adsorption of natural phenol from beer and wine. Tech. Quart. Master Brewers Assoc. Am. 4(4): 245-253
- Página 52 .... Goldman, L.M. (1963) Factors influencing the rate of carbon dioxide formation in fermented-in-the-bottle champagne. Am. J. Enol. Vitic. 14: 36-42
- Página 52 .... Schanderl, H. (1962) Der Einfluss von Polyphenolen und Gerstoffen auf die Physiologie der Weinhefe und der Wert des pH-7 testes für Auslauf von Sektgrundweinen. Mitt (Klosterneuburg) 12A: 265-274

- Página 53 .... Sikkovec, S (1966 a) Der Einfluss einiger Polyphenole auf die Physiologie von Weinhefen. I. Der Einfluss von Polyphenolen auf den Verlauf der alkoholischen Gärung insbesondere von Umgärungen. Mitt (Klosterneuburg) 16: 127-138
- Página 53 .... Sikkovec, S (1966 b) Der Einfluss einiger Polyphenole auf die Physiologie von Weinhefen. II. Der Einfluss von Polyphenolen auf die Vermehrung und Atmung von Hefen. Mitt (Klosterneuburg) 16: 272-281
- Página 53 .... Marcilla, J., G. Alas, E. Feduchi (1939) Contribución al estudio de las levaduras que forman velo sobre ciertos vinos de elevado grado alcohólico. Anales del centro de investigaciones Vinícolas. Madrid. 1(1)
- Página 53 .... Florenzano, G (1952) Film-forming wine yeasts with reference to sherry making and other applications. II. Zymotechnical properties. Agr. Ital. (Pisa) 7: 177-199
- Página 54 .... Cantarelli, C (1955) Biochemical aspects of red wine accelerated aging by film-forming strains of *Saccharomyces oviformis*. Biochem. Appl. 2: 167-190

Página 54 .... Cantarelli, C (1958) Invecchiamento naturale lento e invecchiamento accelerato del vino in rapporto ai caratteri organolettici ad valore biologico del prodotto. Accad. Ital. Vite Vino, Siena 10: 192-227

Página 62 y 64 "Santa-Maria y col (1986)" debe decir "Santa-Maria y col (1985 b)

Página 65 .... Spencer, J.F.T., H.R. Sallans (1956) Production of polyhydric alcohols by osmophilic yeast. Can. J. Microbiol. 2: 72-79

Página 66 .... Peynaud, E., S. Lafourcade (1955) Ann. Technol. Agric. 4: 381

Página 66 .... "Santa-Maria y col (1986)" debe decir "Santa-Maria y col (1985 b)

Página 67 .... Makinen, K., Soderlinger (1989) Methods of biochemical analysis and food analysis. W-Germany: Boehringer Manhein.

Página 68 .... "Ribereau-Gayon 1989" debe decir "Ribereau-Gayon 1986)

Página 83 .... "Je ..... Fermentación espontanea" debe decir "Jeesp ... Fermentación espontanea"

Página 91 .... "de Bartolimew y Mittwer (1976)" debe decir "de Castelli (Suarez e Iñigo 1990)

Página 105 ... "Suarez 1990" debe decir "Suarez e Iñigo 1990"

Página 107 ... Marcilla, J. (1947) Tratado práctico de Viticultura y Enología Españolas. Ed. Saeta. Madrid

**Presidentes:**

Dr. Tamayo Torres

**Vocales:**

Dr. Antonio Pedraza

Dr. Guillermo López

Dr. Ramón Abad

**Secretario:**

Dr. Manuel Rosales

... el día ... para ...  
... Dr. Juan ... ...

... de 1922

**El Secretario del Tribunal**

Manuel Rosales