

UNIVERSIDAD DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS DOCTORAL

**Contribución al estudio de la fermentación del mosto :
evolución de la acidez orgánica por acción de diferentes
especies de levaduras vínicas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Francisco Bravo Abad

DIRECTOR:

Íñigo Leal

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA FERMENTACION DEL MOSTO:

**EVOLUCION DE LA ACIDEZ ORGANICA POR ACCION DE
DIFERENTES ESPECIES DE LEVADURAS VINICAS.**

**TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:
FRANCISCO BRAVO ABAD**

Deseo manifestar mi agradecimiento al profesor Dr. Don Manuel LORA TAMAYO, director del Instituto de Química "ALONSO BARBA", en cuyo Departamento de Fermentaciones Industriales y bajo su patrocinio, hemos realizado el trabajo experimental.

Al Director del Departamento Dr. Don José M^o GARRIDO MARQUEZ, por sus enseñanzas y orientaciones.

Al Dr. Don Baldomero INIGO LEAL, por el acierto en la dirección del trabajo y por la ayuda prestada en todo momento.

A todos los compañeros del Departamento, especialmente a las señoritas Ilse SCHNABEL BENDIN y M^o Elena FERNANDEZ Y FERNANDEZ.

Al Dr. D. J. R. BARCELO, jefe de la Sección de Espectros Moleculares del Instituto "LAZA DE VALDES" de Optica y a los colaboradores del mismo, señorita Dr. J. BELLARATO y Dr. A. HIDALGO por la exacta y atenta colaboración.

Y a cuantos con su ayuda han facilitado la realización del trabajo.

INDICE

Páginas

Introducción

PARTE I

<u>Capítulo I.-</u> Especies de levaduras ensayadas en el presente trabajo.....	11
Aspecto de los cultivos en mosto estéril y cambios, macro y microscópicos de los mismos durante el curso fermentativo.....	13
<u>Capítulo II.-</u> Productos metabólicos más importantes en los fermentados resultantes.....	25

PARTE II

<u>Capítulo III.-</u> Producción de acidez volátil en la fermentación de mosto, a cargo de diferentes especies de levaduras.....	35
Evolución durante el curso fermentativo.....	43
<u>Capítulo IV.-</u> Acción del ácido acético sobre el poder fermentativo de diferentes especies de levaduras.....	49
Influencia del ácido acético en el metabolismo de las especies de levaduras filamentosas del género Saccharomyces.....	70

Páginas

PARTE III

<u>Capítulo V.-</u> Los ácidos orgánicos del mosto..	80
Evolución de la acidez fija del mosto por el proceso fermentativo a cargo de diferentes especies de levaduras.....	93
Balace de acidez al término de la fermentación en pureza del mosto, a cargo de diferentes especies de levadura.....	101
<u>Capítulo VI.-</u> Los ácidos orgánicos del vino..	111
Origen de los ácidos producidos durante la fermentación alcohólica de mosto.....	112
<u>Capítulo VII.-</u> estudio cualitativo de la metabolización de la acidez orgánica fija del vino, por la actividad aeróbica de diferentes especies de levadura.....	123
<u>Capítulo VIII.-</u> Estudio de una substancia con caracter ácido que aparece en fermentados de mosto, a cargo de diferentes especies de levaduras vínicas.....	135
CONCLUSIONES.....	146
BIBLIOGRAFIA.....	163

"La ciencia no impone nada, simplemente declara. La ciencia no aspira a nada, sino a hacer declaraciones veraces y adecuadas sobre su objeto. El científico solo impone dos cosas: verdad y sinceridad, y se las impone a sí mismo y a los demás científicos." ERWIN SCHÖRDINGER.

INTRODUCCION

HISTORIA.- Los primeros datos de observaciones sobre las consecuencias de los fenómenos de fermentación y su aprovechamiento por el hombre están fechados en los más antiguos documentos históricos de la humanidad. La Biblia menciona por primera vez el vino, narrando el abuso cometido por Noé después del diluvio.

Se ha demostrado la existencia de cultivos de vid entre los asirios 3500 años a. de J.C. Asimismo unos 2500 años a. de J.C. el Código de Hammurabi cita normas para la preparación de licores y da leyes para la cervecería y similares.

Sin embargo durante un gran período de tiempo que comprende hasta principios del siglo XVII de nuestra era, solo tenemos datos empíricos de la técnica fermentativa; no habiéndose conseguido mayor esclarecimiento sobre el proceso fermentativo.

Fue Leeuwenhoek (1680), al construir un sistema de lentes capaz de descubrir un fabuloso mundo de excepcional e insospechada importancia para todos los seres vivos, el que con su extraordinaria aportación, estableció el punto de partida de tan desconcertante situación.

A parte de los meritorios esfuerzos de Stahl -

(1697), Febroni (1787), Thénard, François Apert, Gay-Lussac, Lavoisier, etc. como mentalidades representativas del estudio químico de los productos de la fermentación, merecen especial mención los trabajos de Erxleben (1837), Cagniard Latour (1835), y Theodor Schwann, este último creador de la célebre teoría celular.

Friedrich Kützing (1834) en un informe a la Sociedad de Historia Natural de Herz, en Alexisband (1837), comunicó que la levadura o "hongo del azúcar" se originaba en la fermentación vinica y era una forma vegetativa y no un compuesto químico orgánico. El botánico Meyar lo incluyó en la sistemática vegetal con el nombre de Saccharomyces.

Pasteur (1857) impuso la teoría vitalista gracias a sus exactas investigaciones, estableciendo además que los diferentes tipos de fermentaciones necesitan micro-organismos específicos.

Teniendo en cuenta balances analíticos sobre el proceso fermentativo, Carl Nageli afirmó que el fenómeno de la fermentación, nada tiene que ver con la alineación, ya que de 100 partes de azúcar de uva transformada por acción de 1,5 partes de levadura (materia seca) en 18 horas, 95 se transforman en alcohol y anhídrido carbónico, y de las 5 restantes, 4 se transforman en glicerina y otros productos secundarios y una en sustancia celular.

Berthelot (1860) aisló la invertasa de la levadura; trabajo que también realizó Liebig.

Moritz Traube (1858) autor de la teoría enzimática que lleva su nombre suponía que además de la invertasa y las diastasa podían existir otras enzimas (nombre propuesto por Kühne) difíciles de obtener, suponiendo que podrían ser aisladas de las células.

Emil Fischer aisló de distintas especies de levaduras los enzimas que se podían obtener al triturar las células con polvo de vidrio. Lindner y Fischer aislaron del *Monilia candida* la invertasa. Fischer además encontró que los enzimas son específicos de la configuración del sustrato.

E. Buchner (1896) consiguió separar de los extractos celulares el sistema enzimático responsable de la fermentación, facilitando así la prueba de su carácter enzimático.

La fermentación producida por el jugo de extractos celulares difiere de la llevada a cabo por células vivas; la célula viva es más activa que el preparado enzimático, al cual pierde gran parte de su actividad en el curso fermentativo, produciendo rendimientos reducidos; la célula viva tiene actividad mientras dispone de sustrato fermentescible, de sustancias nutritivas y de factores físico-químicos apropiados. Las fermentaciones en escala industrial son de naturaleza vital, y

aunque la actividad sobre el sustrato, de los sistemas enzimáticos son independientes de las células vivas, éstas son necesarias para la producción de los mismos. El empleo de células vivas es insustituible - si se trata de obtener productos de calidades organolépticas especiales, alcanzando determinada degradación energética del sustrato, etapa que representa la más profunda transformación de la materia prima.

F. Ehrlich, Dumas y Boulay estudiaron como el ácido láctico, el succínico, y el aceite de fusal no desempeñan ningún papel en el balance de la fermentación, teniendo por precursores ciertos aminoácidos.

Los trabajos de Buchner y Lebedev abrieron un valioso camino para el estudio del mecanismo de la fermentación, problema que se abordó apoyándose indistintamente en los principales métodos siguientes:

I.- Estudio de la formación de ácido láctico por extractos musculares (Eabden, Meyerhof y su escuela).

II.- Extractos libres de las células de levadura (Buchner y Lebedev).

III.- Método de fijación: empleo de sulfito cálcico, dimetilcicloheptanodiona (dimecilon) etc. (Neuberg).

IV.- Venenos selectivos: Actúan sobre determinados sistemas enzimáticos, permitiendo acumular en el

medio substancias que delatan reacciones intermedias. - Han sido muy empleados el ácido monoclorosuccínico y fluoruro sódico.

V.- Difusión: Para la separación fraccionada - de algunos constituyentes del extracto de levadura.

VI.- Otros medios:

a) Elzyver y Van der Leek, y otros autores han demostrado el valor que tienen al estudio de las relaciones cuantitativas de productos finales e intermedios para la formulación de esquemas.

b) Lehmann ha obtenido datos interesantes a - partir del tiempo necesario para separar los fosfatos - de los compuestos de fosforilo con ácido clorhídrico - normal.

c) También constituye una buena fuente de información el estudio de la fermentabilidad y de la cinética de fermentación de las substancias que se suponen intermedias.

d) El empleo de la acción específica de colorantes ha hecho posible el estudio de la formación y - utilización del hexosaminofosfato.

En el estudio del mecanismo de la fermentación destaca los trabajos de A. Wohl (1904), Kaden y Young (1905), Embden y Meyerhof, Neubauer y Fromherz, Robinson, Neuberg, Levene y Raymond, Smythe y Morgan entre - otros.

Ya hemos apuntado anteriormente como la historia de la clasificación de levaduras empieza con la descripción del *Saccharomyces*, realizada por J. Meyen (1838) confirmando las observaciones de Schwann y Cagnard-Latour; - fué pues J. Meyen el introductor del nombre genérico *Saccharomyces*. Posteriormente se fueron encontrando otros microorganismos, muy similares en ciertos aspectos morfológicos, pero presentando notables diferencias, tales como distinto poder o comportamiento en la fermentación de determinados azúcares, formación o no de ascosporas, reproducción por tabicación, partición, formación de pigmentos, etc.

El término levaduras acoge un grupo no homogéneo de microorganismos, debiendo de admitirse que los límites de esta denominación, son vagos y sujetos a decisiones arbitrarias.

A medida que se incrementaba el número de organismos descubiertos y se estudiaban con mayores posibilidades sus características diferenciales fueron cambiando las propiedades que se tomaban como base para la clasificación de levaduras, evolucionando hasta la actualmente admitida.

Saldría fuera de los límites de esta breve introducción, con rasgos cronológicos y bibliográficos, si - quiera el tratar de presentar resumidos, al unisino de sus relevantes trabajos, los nombres de los prestigiosos

investigadores en el vasto campo de estudios taxonómicos de levaduras. Sin embargo permitámonos, aunque sea sucintamente, hacer referencia a las primeras investigaciones sobre la flora blastomicótica natural de los mostos, que desde el punto de vista taxonómico y de manera sistemática inició en 1933 De'Rosai (1) seguido de los trabajos de Castelli (2), Santarelli (3), Capriotti y Cantarelli (4), entre otros, abriéndose así una serie de vastas investigaciones, en el Institute de Microbiologia de Perugia, sobre los agentes de la fermentación de mostos, producidos en distintas regiones vitivinícolas de Italia e Israel.

Peynaud y Domerg (5) comienzan posteriormente, - en Francia, este tipo de investigaciones. Sucevic-Safer (6) ha realizado interesantes trabajos sobre el particular en mostos yugoeslavos.

En 1957 aparecen en España los primeros trabajos en esta línea de investigación, sobre los agentes de la fermentación vinica de las zonas de La Mancha y Rioja, - debidos a la colaboración entre Castelli e Iñigo (7), - iniciándose con ello un vasto plan de estudios que se viene desarrollando en el Departamento de Fermentaciones Industriales del C.S.I.C., extensivo a las principales - regiones vitivinícolas españolas.

Tomando como base los estudios taxonómicos y ecológicos de las distintas especies de levaduras vinicas -

puédieren plantearse de forma comparativa y sistemática - una serie de problemas de carácter microbiológico y bioquímico que se presentan en la fermentación de los mostos y cuyo esclarecimiento se abordó desde distintas ramas de la especialidad.

Los problemas de nutrición de especies de levaduras y la activación de la fermentación alcohólica de los mostos a cargo de especies perfectamente identificadas, han sido tratados por numerosos autores desde los puntos de vista más interesantes, motivo por el que la bibliografía es muy extensa, abarcando desde investigaciones de interés fisiológico y bioquímico, hasta experimentos de carácter escuetamente técnico.

En los trabajos publicados por la Estación Enológica de Burdeos (8, 9, 10, 11) además de ensayar una serie de factores de crecimiento y activadores de la fermentación, tanto en medios sintéticos como en mostos, estudian balances de productos secundarios, tomando como punto de partida para las ecuaciones propuestas, el acetaldehído, realizando ensayos bajo diversas condiciones: - distintos tipos de levaduras, variación de la concentración de oxígeno, variación del pH, de las vitaminas, evolución del acetaldehído durante la fermentación, etc.; - así como las desviaciones producidas en la fermentación por adición de ácidos grasos y de acetaldehído.

Por el especial enfoque del trabajo es interesante

te el estudio que sobre activadores de fermentación alcohólica, realiza Cantarelli (12), ya que con anterioridad se habían ocupado del particular Joslyn, Thorne, Szilvinyi, Pyke, etc.

Un detallado y vasto estudio de la flora blastomycética indígena de los mostos de las más calificadas zonas vitivinícolas españolas, iniciado por Castelli e Migo (13, 14 y 15) nos precede y gracias a él hemos podido disponer de la colección de levaduras seleccionadas del Departamento de Fermentaciones Industriales (C. S. I. C.), para la elección de las cepas de especies estadísticamente más notables por su participación en las distintas fases de fermentación, así como de las especies aisladas en fase oxidativa o especies filmógenas.

En el presente trabajo se toma un mismo tipo de substrato natural, mosto estéril perteneciente a la misma cosecha, y un complejo enzimático reproducible en cuanto está elaborado por células vivas, pertenecientes en cada caso a las correspondientes especies, adscritas a sus respectivas cepas, formadas por la multiplicación vegetativa de una célula y conservadas en condiciones de estabilidad genética.

Por primera vez se hace un estudio cuantitativo y cualitativo de las distintas fracciones ácidas del mosto y paralelamente de las fracciones ácidas de los fermentados en pureza obtenidos del mismo por acción de

distintas especies de levaduras pertenecientes a diferentes fases fermentativas, así como a las especies de fase filmógena, dedicando especial atención a la evolución de dichas fracciones durante el curso fermentativo y simultáneamente a los balances de ácidos, en algunas etapas del proceso y para algunas especies, con posible interés microbiológico, bioquímico o enológico.

Hemos tenido en consideración las desviaciones producidas en la fermentación por diferentes concentraciones de ácido acético, así como las dosis de ácido - sórbico que inhiben el metabolismo de especies filmógenas del género *Saccharomyces*.

CAPITULO I

ESPECIES DE LEVADURAS ENSAYADAS EN EL PRESENTE TRABAJO.

Consideramos oportuno completar nuestros conocimientos sobre levaduras vinicas, con el estudio realizado en este capítulo, pues aunque partimos de cultivos puros de especies perfectamente identificadas, quería - nos salir al encuentro de cualquier eventualidad de contaminación o trueque, disponiendo así de cuantos criterios, objetivos y subjetivos, suelen aportar estas observaciones, para darnos una información de la pureza - de los cultivos, lo suficientemente rápida y segura, como para sernos útil, dado el planteamiento de nuestro trabajo.

Entre las especies de levaduras aisladas, de - mostos en los trabajos taxonómicos, que anteriormente - hemos mencionado, destacan por su activa participación en las distintas fases fermentativas, las que han sido objeto de nuestra elección: *Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora guillermondii*, *Hansenula subpelliculosa*, *Zigosaccharomyces veronae*, *Torulaspore rossi*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces manginii*, *Saccharomyces oviiformis*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces italicus*.

Además hemos incluido en este estudio dos especies aisladas de velos sobre vino, como representantes

de las levaduras filamentosas: *Saccharomyces charesiensis*, *Saccharomyces boticus* (Cepas números 1004, 888, 926, 607, 749, 87, 415, 468, 556, 514, 159, 937, respectivamente, de la colección del Laboratorio de Microbiología del Departamento de Fermentaciones Industriales C.S.I.C.)

Las doce especies tras un paso a mosto estéril, son sembradas a las cuarenta y ocho horas en una serie de tubos de ensayo, que contienen diez c.c. de mosto estéril, manteniéndose los cultivos a la temperatura de 25°.

El tiempo, para todas las especies, se cuenta a partir del momento de hacer las siembras (tiempo 0).

ASPECTO DE LOS CULTIVOS EN MOSTO ESTERIL Y CAMBIOS MA-
GRO Y MICROSCÓPICOS DE LOS MISMOS DURANTE EL CURSO FER-
MENTATIVO.

Kloeckera apiculata

CULTIVO EN MOSTO.

Tiempo
en horas

1º) Aspecto del cultivo

- 24 : Fermentación ténue= ligera turbidez.
48 : Fermentación buena; fuerte turbidez; ligero -
depósito.
72 : Fermentación media; fuerte turbidez; discreto
depósito.
120 : No hay apreciables modificaciones.
172 : Ligero burbujeo a partir del fondo del t.e.;
buena turbidez; discreto depósito.
244 : Ligero burbujeo; ligera turbidez; discreto de-
pósito.

2º) Aspecto de las células

- 24 : Discreto número de células en parejas gemantes
ó en grupos de 3; gemación bipolar.
72 : Abundante número de células en parejas gemen-
tes, grupos de 3, apiculadas; células hijas -
aisladas pequeñas elipsoidales.

Hanseniaspora guillermondii

CULTIVO EN MOSTO.

**Tiempo
en horas**

1º) Aspecto del cultivo

- 24 : No fermentación, ligera turbidez.
- 48 : Fermentación buena; buena turbidez, ligero depósito.
- 72 : Fermentación media; media turbidez; escaso depósito.
- 120 : Fermentación escasa; media turbidez; finos en flocculación; depósito en las paredes.
- 172 : Ligero burbujeo ; ligera turbidez; depósito mínimo.
- 244 : No fermentación; ligerísima turbidez; anillo iridescente que sube por las paredes. Vole muy tenue. Ligero depósito.
- 316 : No fermentación; ligerísima turbidez; vestigios de anillo grasoso en las paredes del tubo de ensayo; depósito ligero.

2º) Aspecto de las células

- 24 : Discreto número de células apiculadas, delgadas; en parejas gemantes y grupos de tres; germinación bipolar.
- 72 : Abundantes células apiculadas; tamaño variado en parejas o en grupos de cuatro.

Hansenula subpelliculosa

CULTIVO EN MOSE O

<u>Tiempo en horas</u>	<u>1º) Aspecto del cultivo</u>
24	: No fermentación; ligera turbidez.
48	: No fermentación; ligera turbidez, ligero depósito.
72	: Ligerísima fermentación; escasa turbidez; escaso depósito.
120	: Ligerísima fermentación; turbidez media; velo casi completo, grisáceo; depósito discreto.
172	: Marcado burbujeo; anillo tenue completo; velo pulverulento, levantado por el CO ₂ .
244	: Fuerte fermentación; fuerte turbidez; anillo y velo pulverulento.
316	: Buena fermentación; fuerte turbidez; buen depósito.

2º) Aspecto de las células

24	: Escasas células redondas, pequeñas, aisladas o en grupos de 2 a 10, multigemas, algunas con forma irregular; con pequeño corpúsculo refringente.
72	: Escasas células redondeadas; tamaño mediano - otras elipsoidales en parejas gemantes o grupos multigemas de 4-6 elementos en cadenas cortas.
172	: El velo está formado por células redondeadas.

ligeramente elipsoidales; otras completamente esféricas, en parejas o grupos multigenerantes de 8-10 células; cadenas ramificadas de células mucho más pequeñas elipsoidales 4-10.

Zigosaccharomyces varonae

CULTIVO EN MOSTO

Tiempo en horas

1ª) Aspecto del cultivo

- 24 : No fermentación; Fuerte turbidez
- 48 : Fuerte fermentación; turbidez con floculos; - ligero depósito.
- 72 : Fuerte fermentación; turbidez floculosa; Depósito bueno.
- 120 : Fermentación ligerísima; mediana turbidez floculosa; abundante depósito. Depósito en las paredes.
- 172 : Ligero burbujeo; ligera turbidez; depósito en las paredes; depósito bueno; islotes de vales con anillo incompleto.
- 244 : Ligerísimo burbujeo; transparente; depósito - en las paredes; depósito muy abundante en el fondo del t.e.
- 316 : No fermentación; transparente; buen depósito en las paredes y en el fondo.

2ª) Aspecto de las células

- 24 : Discreta cantidad de células pequeñas de dos tipos: a) elíptico-redondeadas en parejas o grupos multigenerantes 8-10; b) alargadas en cadenas de 3-6 elementos.
- 72 : Abundante número de células redondas pequeñas en parejas gemelas o grupos muy numerosos de 4-6 elementos. Otras células, alargadas, en cadenas de tamaño mayor.

Torulaspora rosei

CULTIVO EN MOSTO

**Tiempo
en horas**

1º) Aspecto del cultivo

- 24 : No fermentación, ligera turbidez
- 48 : Fuerte fermentación; fuerte turbidez opalescente; depósito discreto.
- 72 : Buena fermentación; turbidez fuerte; depósito discreto.
- 120 : Buena fermentación; fuerte turbidez; depósito discreto.
- 172 : Buena fermentación; fortísima turbidez; discreto depósito.
- 244 : Buena fermentación; zona transparente en la parte superior del t.e., en el resto fuerte turbidez; buen depósito.
- 316 : Leve burbujeo; buena turbidez nebulosa; buen depósito.

2º) Aspecto de las células

- 24 : Discreto número de células pequeñas redondas - en parejas o grupos de 4-8 elementos multigermantes y aisladas.
- 72 : Abundante número de células redondas, elipsoidales; aisladas y en parejas gemantes o grupos de 2-4 elementos.
- 172 : Células elíptico-redondeadas en grupos gemantes de 3-4 elementos, gruesas dentro de la especie; buen número de ascas (muy curioso) con 2-3 esporas redondas provistas de granulo refringente; algunas ascas llevan una célula hija procedente de gemación.

Saccharomyces ellipsoideus

CULTIVO EN MOSTO

Tiempo
en horas

1ª) Aspecto del cultivo

- 24 : No fermentación; transparente
- 48 : Fuerte fermentación; fuerte turbidez opalescente; discreto depósito.
- 72 : Fuerte fermentación; fuerte turbidez; discreto depósito.
- 120 : Buena fermentación; fuerte turbidez; buen depósito.
- 172 : Buena fermentación; ligera turbidez; depósito bueno.
- 244 : Ligero burbujeo al agitar el tubo de ensayo; transparencia; discreto depósito.
- 316 : Poco burbujeo al agitar el tubo de ensayo; transparente (ligera opalescencia), depósito compacto.

2ª) Aspecto de las células

- 24 : Escasas células elípticas, aisladas o en parejas gemantes, y en grupos de 3-4 elementos.
- 72 : Células elíptico-ovoideas, abundantes, ligeramente alargadas; tamaño normal, aisladas o en parejas gemantes; otras alargadas formando cadenas ramificadas 10-12 elementos.

Saccharomyces mangini

CULTIVO EN MOSTO

<u>Tiempo en horas</u>	<u>1º) Aspecto del cultivo</u>
24	: Ligera fermentación; discreta turbidez
48	: Fuerte fermentación; fuerte turbidez opalescente; discreto depósito.
72	: Idem
120	: Fermentación media; turbidez media; buen depósito.
172	: Discreta fermentación; turbidez muy ligera; - buen depósito compacto.
244	: Burbujeo al agitar el t.e.; transparente depósito compacto.
316	: Burbujeo al agitar el t.e. (muy ligero); transparente (ligera opalescencia a la luz del foco); depósito bueno y compacto.

2º) Aspecto de las células

24	: Discreto número de células redondeadas y elípticas, en parejas gemantes o en grupos de 4 - elementos.
72	: Abundantes células ovoides, aisladas o en parejas gemantes o en grupos de 3-4 elementos - tamaño normal.

Saccharomyces oviformis

CULTIVO EN MOSTO

Tiempo
en horas

1ª) Aspecto del cultivo

- 24 : No fermentación; ligera turbidez
- 48 : Buena fermentación; ligera turbidez; buen depósito esponjoso.
- 72 : Buena fermentación; escasa turbidez; depósito abundante.
- 120 : Buena fermentación; turbidez media; buen depósito.
- 172 : Buena fermentación; turbidez media; buen depósito.
- 244 : Idem; depósito compacto
- 316 : Fino burbujeo; transparente, ligera opalescencia al foco luminoso; depósito bueno y compacto.

2ª) Aspecto de las células

- 24 : Escasas células ovoides-redondeadas, tamaño normal, parejas gemetas o en grupos de 4-6 elementos.
- 72 : Abundante número de células; células medianas, escasas parejas gemetas; abundantes grupos de 20-30 elementos; ascas de cuatro esporas.

Saccharomyces pastorianus

CULTIVO EN MOSTO

Tiempo
en horas

1ª) Aspecto del cultivo

- 24 : No fermentación; ligera turbidez.
- 48 : Buena fermentación; mediana turbidez; discreto depósito.
- 72 : Buena fermentación; turbidez buena; depósito discreto.
- 120 : Buena fermentación; turbidez buena; depósito escaso.
- 172 : Buena fermentación; turbidez media; buen depósito.
- 244 : Fino burbujeo al agitar el t.e.; transparencia con ligera nube en la parte inferior del tubo; depósito bueno, compacto.
- 316 : Finísimo burbujeo al agitar el t.e.; ligera opalescencia al foco luminoso; buen depósito compacto.

2ª) Aspecto de las células

- 24 : Escasas células redondeadas, aisladas o en parejas gemantes, otras alargadas medianas, cadenas alargadas de 4-6 elementos muy escasas.
- 72 : Abundantes células elipsoidales medianas, en parejas gemantes o grupos de 4-6 elementos.

Saccharomyces italicus

CULTIVO EN MOSTO

Tiempo
en horas

1ª) Aspecto del cultivo

- 24 : Fermentación ligera; discreta turbidez.
- 48 : Fermentación buena, mediana turbidez, discreto depósito.
- 72 : Fuerte fermentación, fuerte turbidez, depósito discreto.
- 120 : Fuerte fermentación, fuerte turbidez, abundante depósito.
- 172 : Buena fermentación; buena turbidez; buen depósito.
- 244 : Burbujeo al agitar el t.e.; ligerísima turbidez; abundante depósito.
- 316 : No fermentación; no hay burbujeo al agitar - el t.e.; casi transparente; buen depósito - compacto.

2ª) Aspecto de las células

- 24 : Discreto número de células elíptico-ovoidales; tamaño normal; parejas gemantes o grupos de 4-6 elementos.
- 72 : Abundante número de células elípticas algo alargadas tamaño normal; en parejas gemantes o aisladas; escasos grupos de 6-8 unidades.

Saccharomyces cheresiensis

CULTIVO EN MOSTO

Tiempo
en horas

1º) Aspecto del cultivo

- 24 : Ligera fermentación, discreta turbidez.
- 48 : Fermentación buena, fuerte turbidez opalescente; discreto depósito.
- 72 : Fuerte fermentación; fuerte turbidez; discreto depósito.
- 120 : Fermentación mediana; fuerte turbidez; depósito bueno.
- 172 : Idem.
- 244 : Ligerísimo burbujeo; ligera turbidez; abundante depósito.
- 316 : No fermentación; casi transparente; buen depósito compacto.

2º) Aspecto de las células

- 24 : Discreto número de células elíptico-ovoidales, de tamaño mediano; ascas con 3-4 esporas; parejas gemelas, relativamente abundantes.
- 72 : Abundante número de células elipsoidales de tamaño normal, algunas células alargadas con dos esporas y ascas con 3-4 esporas.

Saccharomyces beticus

CULTIVO EN MOSTO

Tiempo
en horas

1º) Aspecto del cultivo

- 24 : No fermentación; transparente
- 48 : Buena fermentación; ligera turbidez; ligero depósito.
- 72 : Fuerte fermentación; fuerte turbidez; ligero depósito.
- 120 : Fermentación media; turbidez media; floculos gruesos, buen depósito.
- 172 : Fermentación media; turbidez buena, floculosa; buen depósito; trazas de anillo.
- 244 : Ligero burbujeo al agitar el t.e.; ligera turbidez; depósito bueno; anillo incompleto.
- 316 : No fermentación; ligera turbidez; buen depósito de forma anular; anillo incompleto; se inicia la formación de velo.

2º) Aspecto de las células

- 24 : Escaso número de células, redondeadas, en grupitos de tamaño mediano; grupos de 4-8 elementos.
- 72 : Abundante número de células; redondeadas, tamaño mediano, grupos numerosísimos de 4-10 - elementos; escasas parejas gemantes.

CAPITULO II

PRODUCTOS METABOLICOS MAS IMPORTANTES EN LOS FERMENTADOS

RESULTANTES

La fermentación espontánea del mosto de uva, según los estudios microbiológicos realizados, es un proceso biológico conducido por una flora mixta de levaduras en el que se sucede y, en determinadas fases de la metabolización de los azúcares, se simultánea, el desarrollo vegetativo de varias especies blastomicóticas.

Entre las especies de levaduras aisladas en anteriores trabajos taxonómicos, (13, 14 y 15) interesantes por su activa participación en la fermentación, hemos elegido las siguientes: *Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora guillermondii*, *Hansenula subpelliculosa*, *Zygosaccharomyces veronae*, *Torulasporea rosei*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces mangini*, *Saccharomyces oviformis*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces italicus*, *Saccharomyces cheresiensis* y *Saccharomyces beticus*.

Existen entre ellas marcadas diferencias fisiológicas y morfológicas que justifican su inclusión en distintas especies. Las diferencias fisiológicas, se ponen esencialmente de manifiesto por la distinta dotación enzimática de sus células, traduciéndose en diferencias analíticas de los fermentados producidos por su actividad

vital.

El mosto de uva por su compleja y característica composición química, en la que esencialmente entran hexosas: glucosa y fructosa, ácidos orgánicos, especialmente tartárico y málico, materias colorantes de estructura quinónica, polifenólica y flavoproteica, y una fracción proteico-vitaminica, tan íntimamente relacionada con los sistemas enzimáticos que catalizan toda una serie de reacciones bioquímicas, esenciales en la degradación fermentativa de azúcares, constituye el sustrato base sobre el que actúan estas especies de levaduras, dando la amplia gama de compuestos químicos que, en tan variables concentraciones, se encuentran en el vino, producto final de la fermentación.

El mecanismo de acción de las levaduras al metabolizar la fracción azucarada del mosto, están en íntima dependencia y relación con el mecanismo químico de la fermentación alcohólica, tema central de los más interesantes trabajos sobre la bioquímica dinámica de los hidratos de carbono, plasmados en el esquema de Meyerhoff, como la más satisfactoria expresión del camino metabólico que sigue la glucosa en su transformación hasta llegar a alcohol etílico y anhídrido carbónico.

Ahora bien, todas las especies utilizadas en estos trabajos bioquímicos han sido levaduras altamente alcoholígenas, concretamente especies que producen un

elevado tanto por ciento de alcohol y un bajo porcentaje de productos secundarios. En nuestro trabajo, hemos elegido una gama más varia de agentes fermentativos y las 12 cepas empleadas representan las especies estadísticamente más numerosas y que participan activamente en las tres fases biológicas de la fermentación espontánea del mosto de uva, con una procedencia ecológica bien definida, y no todas consideradas como levaduras homoalcohólicas.

En el presente Capítulo se estudia, de manera comparada, la fisiología de las 12 especies mencionadas aisladas durante la fermentación espontánea de mostos procedentes de las zonas vitivinícolas de Montilla, Jerez, Aljarafe y Condado, en las tres fases de fermentación espontánea y en una cuarta fase filmógena, utilizando en todas las experiencias mostos de uva blanca.

MATERIAL Y METODOS.- Los métodos analíticos seguidos en este trabajo son los usualmente empleados y puestos a punto en este Departamento:

ACETAL: Método puesto a punto por Campos (16)

ACIDEZ FIJA: Diferencia entre volátil y total.

ACIDEZ TOTAL: Valoración con NaOH N/10 según Ribéreau Gayon y Peynaud, pág. 99 (17)

ACIDEZ VOLÁTIL: Arrastre de vapor en el aparato de Casenave-Farré, eliminación de CO₂ y valoración con NaOH N/10 y deducción del SO₂ según recomienda Jaumes (Peynaud -

(17), pág. 122, 127, 128).

ACIDOS: Cítrico, málico, tartárico, láctico y técnicas -
cromatográficas según Lugg y Overall (18).

ACIDO LACTICO: Oxidación cénica, tras defecación del vi-
no con subacetato de plomo y evaluación del etanal forma-
do, según Casas (19).

FRANAL: Método Jaulmes y Espesal (20) adaptado a los vi-
nos por Ribéreau - Gayon y Peynaud (21) modificado por -
Casas (22).

FRANOL: Oxidación crónica por el método de Serichon y -
Flanzy descrito por Peynaud (17) pág. 35.

P. H.: Electrometría con electrodo de vidrio.

SO₂ total: Valoración con solución de 12 N/50 después de
hidrólisis alcalina, método de Ripper (Peynaud (17) pág.
384).

MATERIAS REDUCTORAS A LA SOLUCION DE Fehling: Método de
Bertrand aplicado al vino defecado con sales de plomo. -
Los resultados se expresan en mmol/l. de glucosa (Peynaud
(17) pág. 285).

Los datos obtenidos en este trabajo indican cla-
ramente cómo las especies estudiadas pueden reunirse en
cuatro grupos bien definidos, en relación con la produc-
ción de alcohol y acidez volátil, y dentro de estos gru-
pos se hacen notar diferencias, que son dignas de tener
en cuenta a la hora de su aplicación industrial.

En la tabla nº 1 exponemos los resultados anali-

leas: cierre con algodón cardado.

O M A T O G R A F I A				
Espe	ácido	ácido	ac.láq	ac.succi
co	málico	cítrico	tico.	nico.
Kloech apicul	+	+	±	+
Hansen guillia	+	+	±	+
Hansen subpel	+	+	±	+
Zigosa verona	+	+	±	+
Toruly rosei.	+	+	±	+
Sacch ellip	+	+	±	+
Sacch m	+	+	±	+
Sacc ovifo	+	+	±	+
Sacch pasto	+	+	±	+
Sacch itol	+	+	±	+
Sacch beti	+	+	±	+
Sacch chore	+	+	±	+

(1) 11
(2)

ticos de los fermentados en pureza a cargo de las 12 especies blastomicóticas en estudio, sobre mosto de uva blanco de la siguientes composición:

Azúcares reductores.....	182,8	g/l
Acidez total	51	meq/l
pH (electrometría)	3,7	

Estos resultados ponen de manifiesto las marcadas diferencias cuantitativas en la fisiología de cada especie, pudiendo reunirse en cuatro grupos de características bien diferenciadas:

Grupo I.- Encuadra las especies que denominamos de fase inicial de la fermentación: *K. apiculata*, *H. guilliermondii* y *H. subpelliculosa*. Presentan de común, el metabolizar una pequeña fracción de azúcares reductores del mosto, así como el producir una elevada acidez volátil y un bajo rendimiento en etanol; dentro de este grupo sobresalen las características peculiares de cada especie, siendo digno de destacar, los bajos rendimientos en alcohol y acidez volátil de la *H. subpelliculosa*, al mismo tiempo que la elevada cantidad de azúcares reductores que consume tal vez por vía oxidativa, en fase de vida aeróbica, más que por el mecanismo fermentativo clásico.

La *K. apiculata* presenta un buen rendimiento en alcohol y volátil por unidad de azúcar consumida, pero - una acentuada incapacidad para metabolizar los azúcares;

en un plano análogo está la *H. guilliermondii*.

Grupo II.- Se incluyen en este grupo las especies de la fase biológica media de la fermentación espontánea: *Z. veronae* y *T. rosei*, caracterizadas por una media capacidad de metabolización de los azúcares del mosto y, sobre todo, por un bajo rendimiento en volátil. Destaca la acusada capacidad de metabolización de azúcares de *T. rosei* frente a *Z. veronae*, así como al bajo rendimiento en volátil, a favor de la primera especie en el mismo término de comparación. El rendimiento en alcohol por unidad de azúcar consumido es del mismo orden en ambas. Resalta la elevada producción de acidez fija, debido fundamentalmente al incremento de ácido láctico, que presenta el fermentado del *Z. veronae*, frente a los fermentados de las restantes especies.

Grupo III.- Se incluyen aquí las especies más representativas aisladas en la fase final de la fermentación espontánea del mosto; son las más numerosas y presentan de común, el elevado rendimiento en alcohol por unidad de azúcar consumido y la marcada capacidad para transformar altas concentraciones de azúcar con una producción de volátil, en general, baja.

Dentro de las especies estudiadas: *S. ellipsoideus*, *S. mangini*, *S. oviformis*, *S. pastorianus* y *S. italicus*, es digno de destacar la gran producción de alcohol etílico frente al bajo rendimiento en volátil del *S.*

italicus, produciendo además al fermentar el mosto el máximo rendimiento en acetal de todas las especies estudiadas, así como la baja producción de acetaldehído del *S. pastorianus*.

Grupo IV.- Dos han sido las especies que aisladas de velos sobre vinos, representan a las levaduras - filmógenas en estas fermentaciones en pureza: *S. cheresiensis* y *S. beticus*; ambas tienen de común una elevada producción de volátil y un rendimiento en alcohol ligeramente más bajo que las del grupo anterior, destacando la elevada producción de acetaldehído. El *S. cheresiensis* presenta estos caracteres más acusados que el *S. beticus*.

El incremento en acidez fija durante la fermentación del mosto, por las especies estudiadas, merece un comentario especial. Los datos analíticos de la determinación de la acidez fija en el mosto, y en el producto - a que ésta da lugar, como consecuencia de la fermentación en pureza, arroja en todos los casos un incremento positivo elevado, si bien hay que tener en cuenta, que por - la índole del trabajo, los datos analíticos se han obtenido sin tener en cuenta la natural concentración que - tiene lugar durante la fermentación y, además que la concentración de acidez fija en un vino es función de varios factores físico-químicos: Temperatura, concentración alcohólica alcanzada, concentración y variedad de los componentes ácidos, pH del vino, etc. (23, 24 y 25).

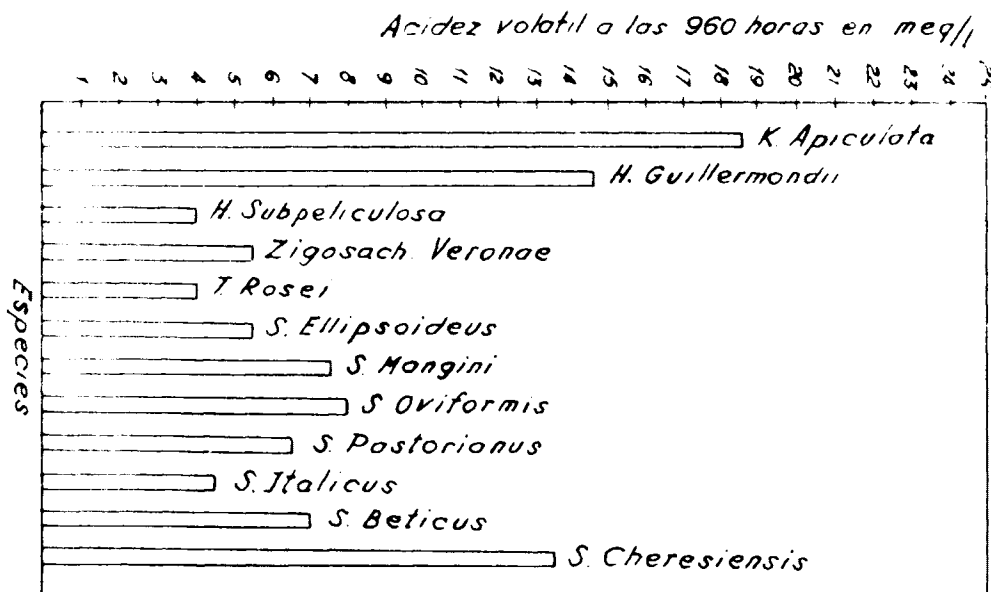
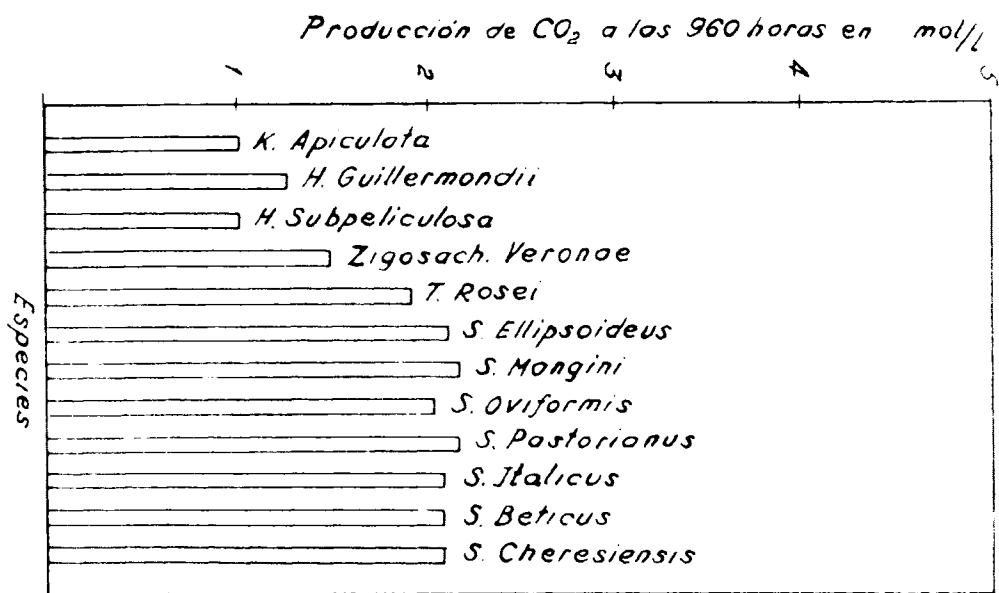


Figura 1

Un mosto de las características del empleado en nuestro trabajo, con un contenido azucarado de un 18,2%, alcanza en el más favorable de los casos estudiados, una concentración de 10,5% de alcohol, en volumen; sin embargo, todas las especies del género *Saccharomyces* estudiadas en el presente trabajo, tienen un poder fermentativo del 15 al 18% de alcohol en volumen. La influencia de la concentración de alcohol en el producto de solubilidad de las sales ácidas de tartárico (23) es notoria, y en nuestro caso hemos obtenido una concentración alcohólica baja respecto al contenido normal de un vino.

La fig. 1 es una representación gráfica en la que se puede observar los resultados de la producción de CO_2 y de acidez volátil al término de las fermentaciones en pureza, llevadas a cabo por las especies descritas.

CAPITULO III

ACIDEZ VOLATIL

1.- PRODUCCION DE ACIDEZ VOLATIL EN LA FERMENTACION DE MOSTO, A CARGO DE DIFERENTES ESPECIES DE LEVADURAS.

Numerosos investigadores se han ocupado de la formación de ácidos volátiles durante el curso de la fermentación alcohólica, y han sido estudiados un buen número de los factores que influyen la producción y concentración de los mismos, durante y al término de la fermentación; este tipo de orientación es el que preside en los trabajos de las citas bibliográficas (10, 11, 26, 27, 28, 29, 30, 31).

Pensamos contribuir a los estudios sobre la cuestión, haciendo un estudio comparado de la acidez volátil producida y del anhídrido carbónico desprendido en los procesos de descarboxilación, a través del curso fermentativo de diferentes cultivos, en mosto, de las especies de levaduras ensayadas; prestando con esta determinación, plena atención a un factor que tan decisivamente influye la producción de acidez volátil: la especie de microorganismo.

Si bien existen antecedentes sobre este aspecto (11, 30), los trabajos quedaron limitados a un escaso número de cepas, a veces de la misma especie, y siempre de la misma fase fermentativa, no pudiendoarse con-

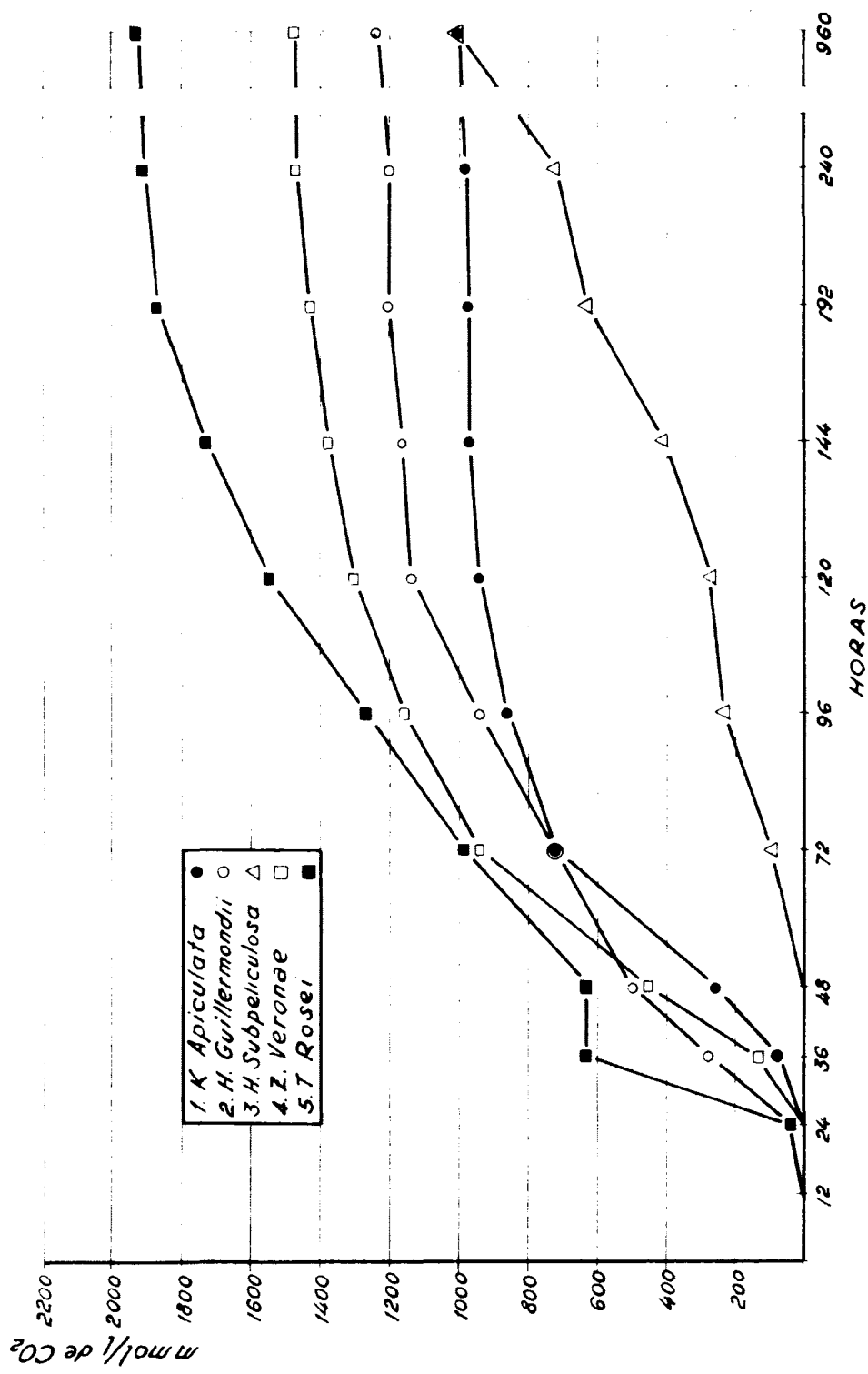


Figura 2

clusiones de validez general.

Por primera vez se realiza un estudio de la evolución de la fracción ácida volátil, en el transcurso de la fermentación, en los doce cultivos puros en mosto de uva, a cargo de las respectivas especies de levadura ya mencionadas.

MATERIAL Y MÉTODOS: Se emplea mosto estéril, de las características analíticas dadas en el anterior Capítulo.

Se disponen dos series de 12 matraces de 250 c.c. con mosto de uva estéril. Cierre con válvulas Müller. - Se siembran con las 12 especies respectivas y durante todo el tiempo de la experiencia permanecen a 25°C.

Una serie se utiliza para la determinación de anhídrido carbónico por pesada, la otra para la toma de muestras del análisis de la fracción ácida volátil.

Las pesadas para la determinación del CO₂ producido y la toma de muestra para el análisis de fracción ácida volátil se efectúan para cada cepa, al mismo tiempo.

El tiempo se cuenta a partir de la siembra de los cultivos. La determinación de ácidos volátiles se lleva a cabo por arrastre de vapor en el aparato de Cazeneuve-Farré, eliminando el CO₂ al vacío y valorando con NaOH N/10 (17).

La producción de CO₂ en función del tiempo duran

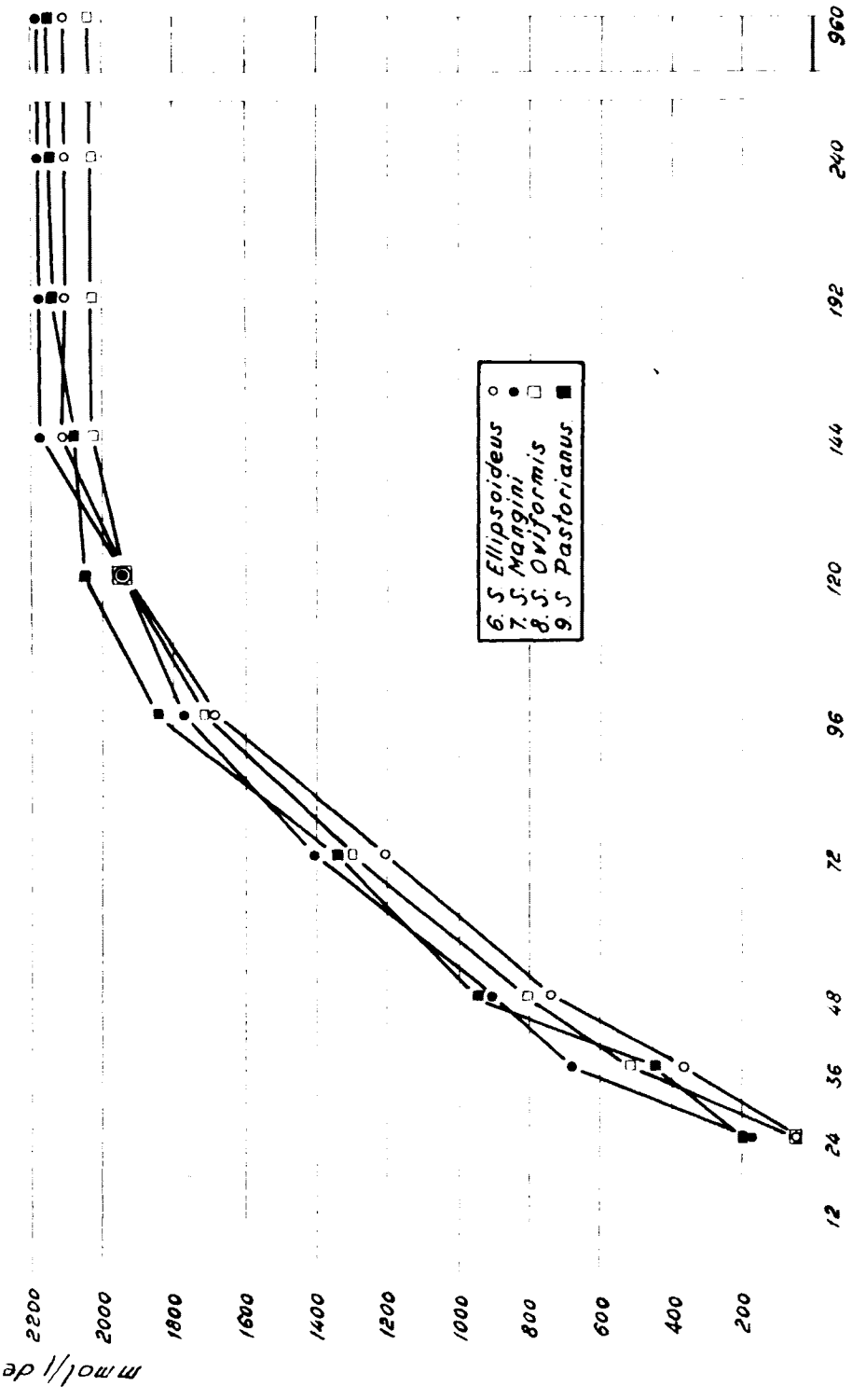


Figura 3

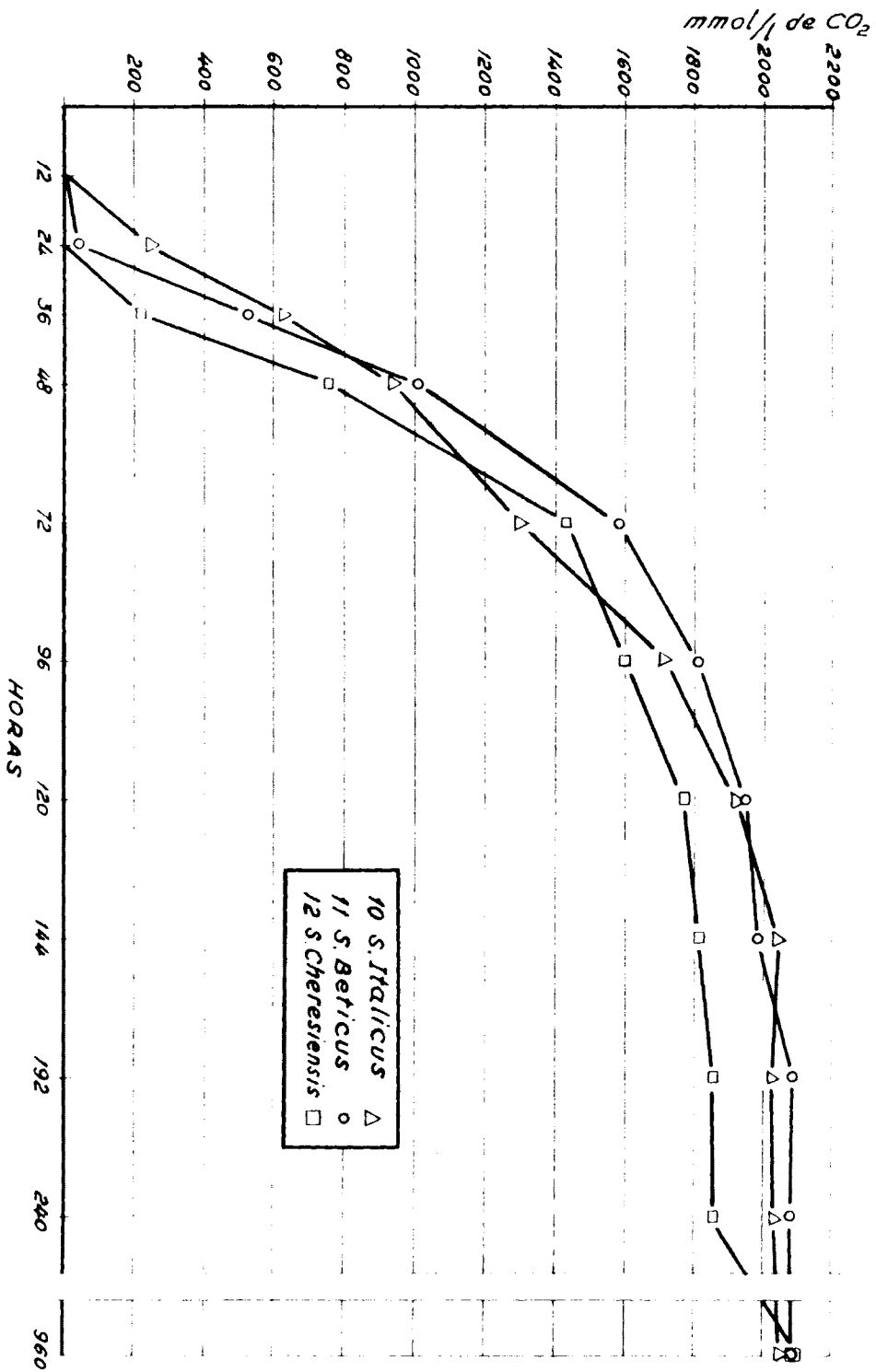


Figura 4.

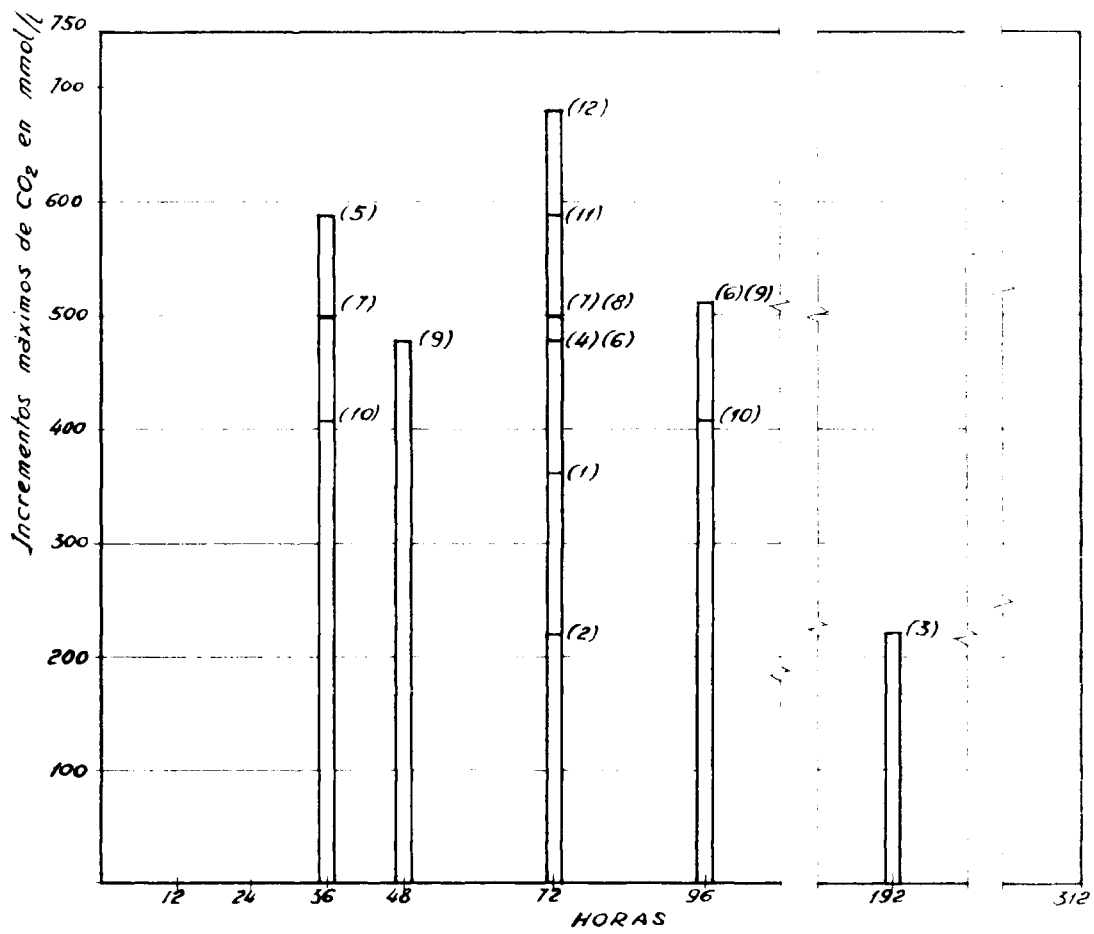
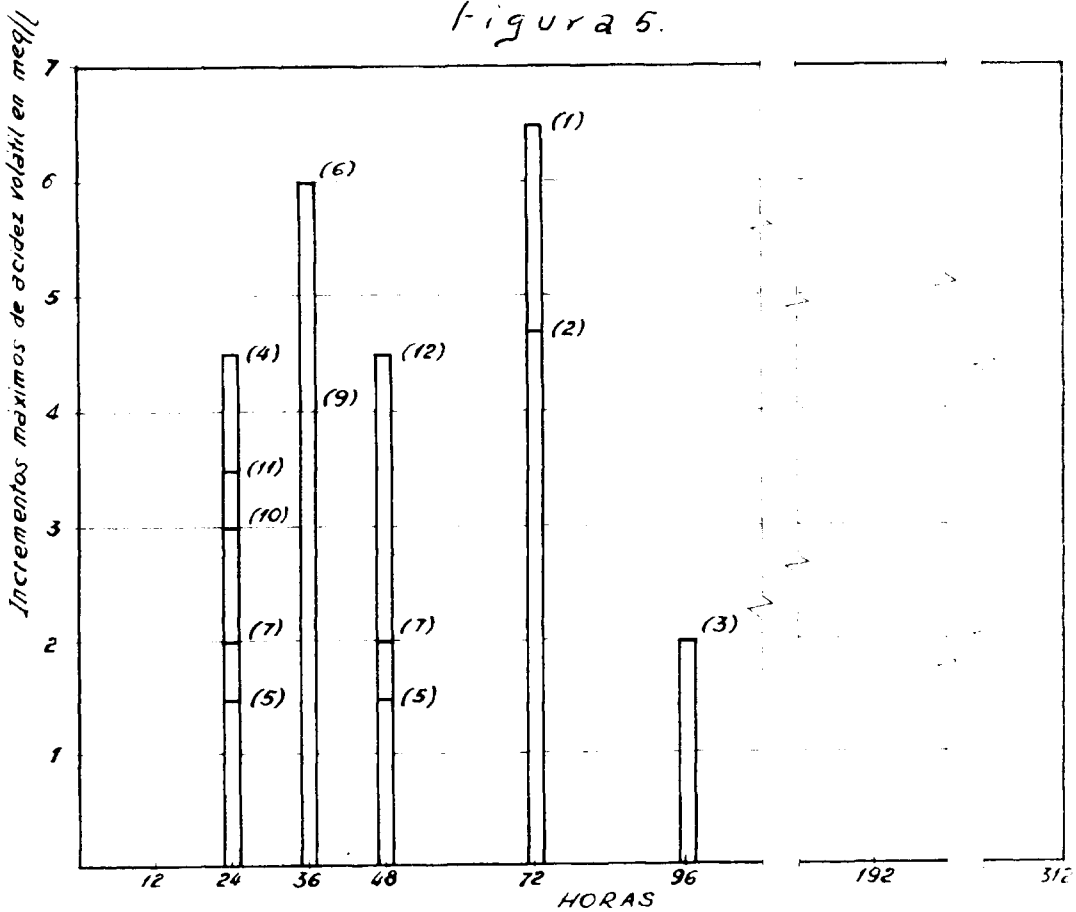


Figura 5.



(1) *K. Apiculata*
 (2) *H. Guillermondii*
 (3) *H. Subpelliculosis*
 (4) *S. Veronae*

(5) *T. Rosei*
 (6) *S. Ellipsoideus*
 (7) *S. Mangini*
 (8) *S. Oriformis*

(9) *S. Pastorianus*
 (10) *S. Italicus*
 (11) *S. Beticus*
 (12) *S. Cheresiensis*

te la fermentación, fué objeto de estudio, en las 12 especies que nos ocupan. En la fig. 2, se agrupan, las relaciones gráficas CO_2 tiempo de fermentación, para las especies de la fase inicial y media; observándose las diferencias propias entre ambos grupos, y dentro de ellos, entre los distintos géneros y especies.

La fig. 3 dá cuenta del desarrollo de producción de CO_2 tiempo de fermentación, por las especies de la fase final de la fermentación y, la fig. 4 para dos especies filidógenas comparadas con una especie perteneciente a la fase final.

Las figs. 5 y 6 representan gráficamente, la magnitud de los incrementos máximos de CO_2 y de acidez volátil, producidos por las distintas especies y los tiempos en que se han alcanzado. De la observación de ambas, se deduce que los incrementos máximos de producción de CO_2 y acidez volátil, coinciden en el tiempo, para las especies blastomicóticas encuadradas en el grupo I; *K. apiculata*, *H. guilliermondii*; sin embargo la *H. subpelliculosa* presenta un notable retardo en alcanzar ambos máximos, que por otro lado, no están sincronizados (máximos de CO_2 a las 192 h.; máximo de acidez volátil a las 96 h.).

Las especies de la fase media, *Z. veronae* y *T. rosei*, presentan un incremento máximo de acidez volátil a las 24 horas (la *T. rosei* vuelve a conseguirlo a las 48 horas), en cambio el máximo incremento de producción

de CO_2 se consigue a las 36 h. para la *T. rosei*, y para el *Z. veronae* a las 72 h.

Las especies de la fase final de la fermentación y las filmógenas, tienen los respectivos incrementos máximos de CO_2 entre las 24 y 48 horas, y los incrementos máximos de volátil se alcanzan entre las 48 y 96 horas de fermentación.

II.- EVOLUCION DURANTE EL CURSO FERMENTATIVO

En las figs. 7, 8, 9 y 10 hemos presentado las variaciones que la acidez volátil en función del tiempo, tomando en consideración los incrementos positivos o negativos (producción o consumo), de la misma, a medida que transcurre la fermentación. Los intervalos de tiempo para realizar los análisis, se han fijado teniendo en cuenta anteriores experiencias que aconsejan dejar transcurrir un tiempo que permita obtener valores diferenciados que caigan dentro de los márgenes de apreciación del método analítico seguido.

En cada figura se representa la evolución de la acidez volátil durante la fermentación, llevada por una especie de cada grupo, con lo que se puede hacer un contraste de la actividad de tres especies pertenecientes a tres fases biológicas diferentes; este es el sentido de las figuras 7 y 8. En las figs. 9 y 10 se hace esto mismo, pero en el contraste se incluye una especie filógama respectivamente cuando actúan como agentes fermentativos (*S. beticus* y *S. chereciensis*).

Las especies del grupo I producen un incremento máximo de acidez volátil del orden de 5 a 6,5 mg/l. a las 72 horas de fermentación, manteniendo una producción de volátil durante toda su actividad fermentativa. Representa una excepción en este grupo, la *H. subpelliculosa*

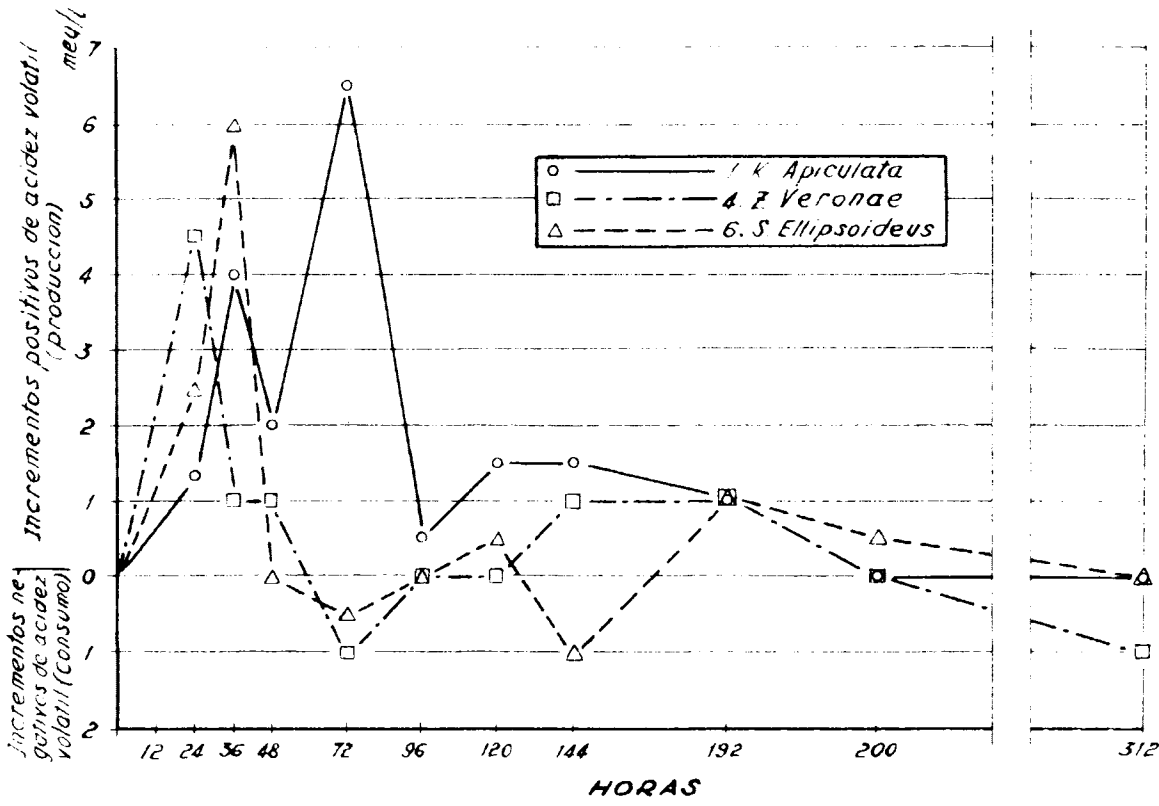


Figura 7.

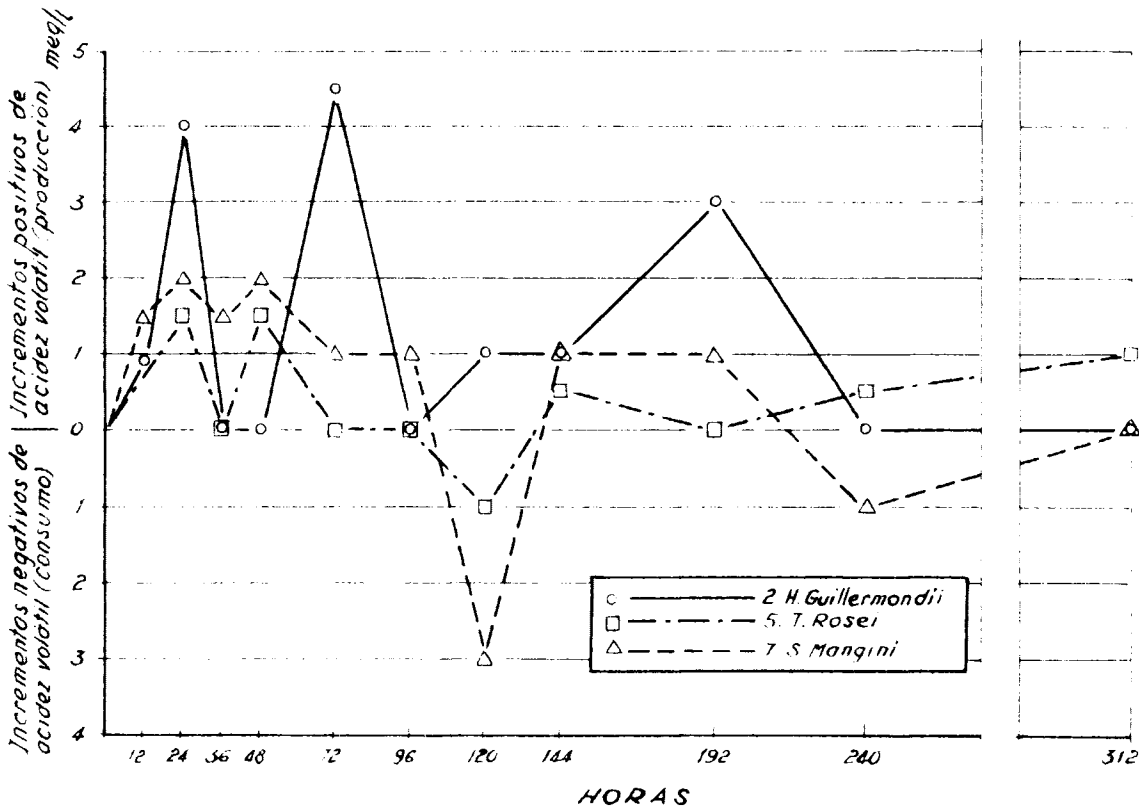


Figura 8

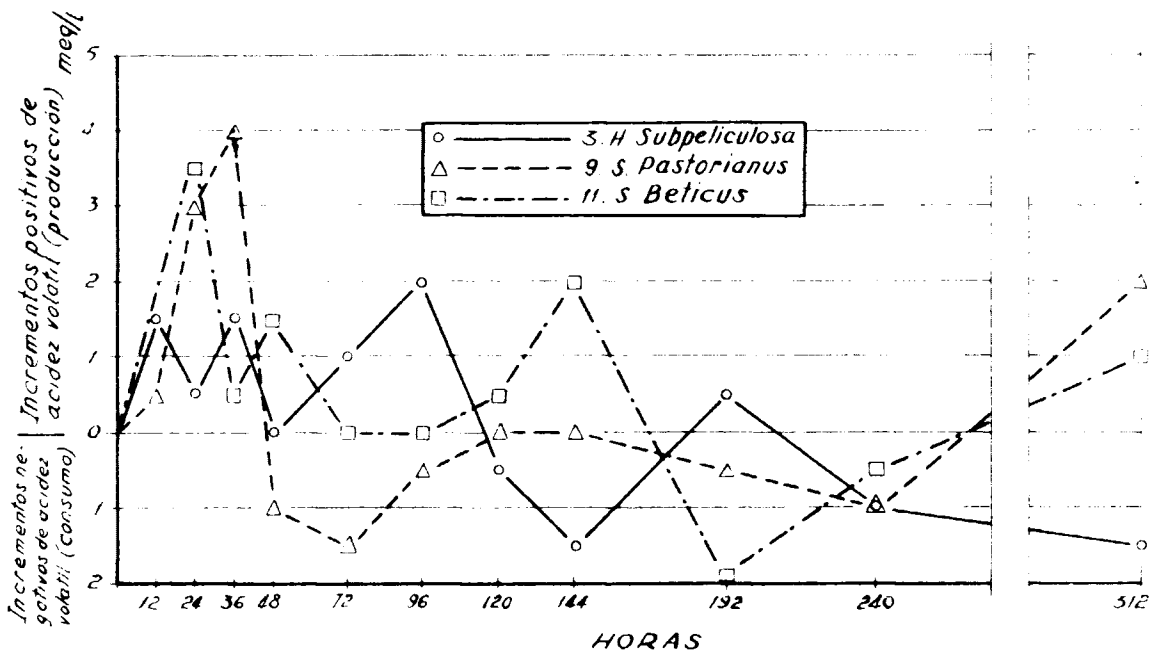


Figura 9

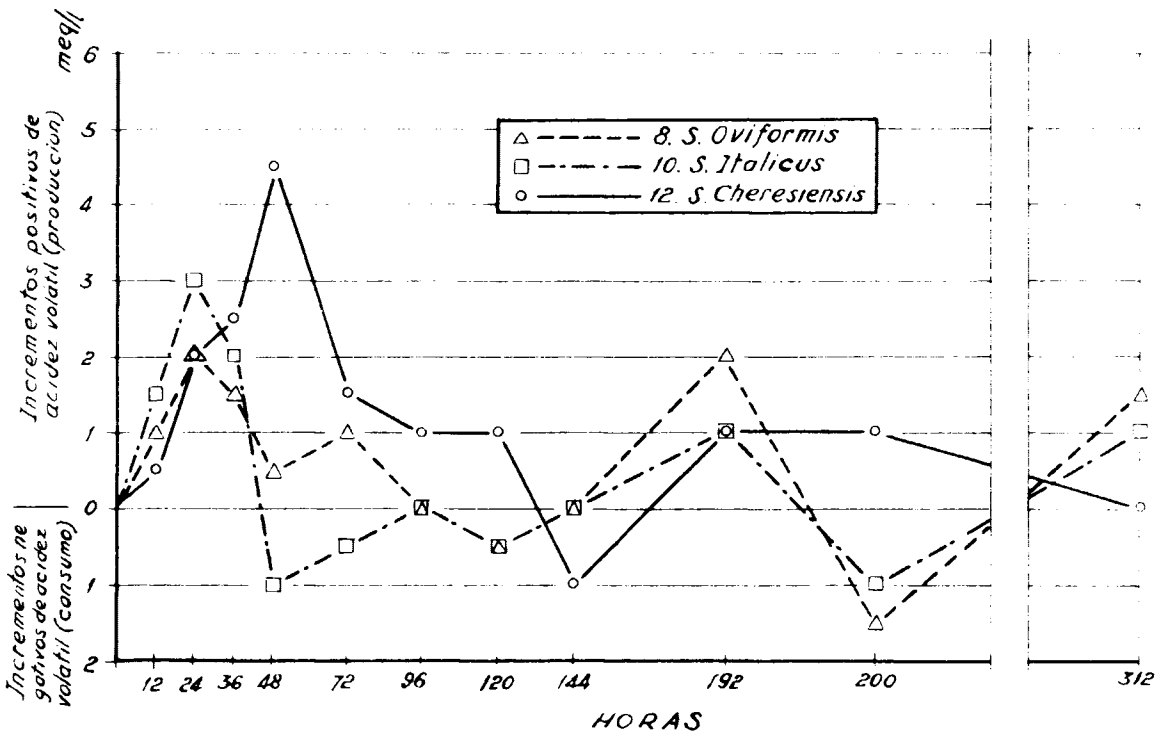


Figura 10.

que, como anteriormente hemos indicado presenta un incremento máximo de volátil del orden de 3 meq/l a las 96 horas de la fermentación y la metaboliza posteriormente hasta producir un sensible consumo de la misma.

Las especies del grupo II alcanzan los máximos incrementos, 1,5 meq/l la primera y 4,5 meq/l la segunda, a las 24 horas de fermentación, llegando a metabolizar a través del curso fermentativo parte de la volátil acumulada.

Las especies del grupo III tienen el máximo incremento de volátil, del orden de 2 a 6 meq/l, a las 24 - 36 horas de fermentación, y todas metabolizan parte de la acidez volátil producida durante un periodo de tiempo variable comprendido entre las 48 y 120 horas de fermentación, a partir de cuyo momento se repite alternativamente la producción y consumo de la misma.

Las especies filmógenas, presentan un incremento máximo en acidez volátil del orden de 3,5 a 4,5 meq/l alcanzándose a las 36-48 horas de fermentación. También a través del curso fermentativo, metabolizan parte de la acidez producida, pero al final siempre resta cantidad muy superior a la que acumulan las especies del grupo III.

De todos estos resultados es fácil colegir que las especies del grupo I son, desde el punto de vista - aplicativo, indeseables, dado el elevado rendimiento en volátil, la baja concentración en alcohol capaces de so-

portar, y sobre todo, la incapacidad de agotar los azúcares del mosto. Se explica fácilmente la necesidad de alejar su intervención en un proceso fermentativo bien llevado. Esta es la idea de la fermentación en pureza.

Las especies del grupo II presentan, especialmente la *T. rosei*, un valor enológico considerable, ya que tienen una actividad metabólica frente a los azúcares del mosto, con un buen rendimiento en alcohol y un bajo rendimiento en acidez volátil, durante todo su curso fermentativo; y lo que aún resulta interesante, cuando hay una alta concentración de azúcares en el mosto, que es cuando las restantes especies suelen acumular los máximos de volátil en el medio. De aquí surge la idea aplicativa de la modalidad llamada fermentación - escalar, en la que esta especie inicia la fermentación del mosto.

Las especies del grupo III presentan una elevada concentración de volátil a las 48 horas de fermentación, cuando despliegan la máxima actividad fermentativa, momento en el que el contenido azucarado del mosto es aún elevado; en cambio posteriormente, y en intervalos de tiempo variables, todas presentan una capacidad de metabolización de la volátil acumulada durante estas primeras horas, a medida que el contenido azucarado disminuye, y la concentración de alcohol en el medio se eleva. Esto explicaría el interesante fenómeno aplica-

tivo puesto en evidencia durante las fermentaciones continuas, llevadas a cabo con un límite máximo de azúcar en el medio, que puede oscilar entre un 2 a un 3% según las características del mosto empleado.

Finalmente las especies filmógenas ensayadas como agentes fermentativos, muestran una capacidad aceptable para este fin, si bien es necesario hacer resaltar, el diferente comportamiento del *S. cheresiensis* frente al *S. beticus*. La primera especie alcanza un incremento máximo en acidez volátil de más alto valor, y apesar de metabolizar ambas la volátil producida, en algunos momentos del curso de la fermentación, la concentración de volátil al término de la fermentación, es más elevada en el *S. cheresiensis*. El *S. beticus* tiene por este motivo un interés aplicativo como agente fermentativo, en las modalidades de fermentación en pureza y escalar, mayor que el *S. cheresiensis*.

CAPITULO IV

I.- ACCION DEL ACIDO ACETICO SOBRE EL PODER FERMENTATIVO DE DIFERENTES ESPECIES DE LEVADURAS.

La formación de productos secundarios en la fermentación alcohólica, y los posibles precursores han sido motivo de una continuada serie de trabajos; en ellos se han conjugado diversas hipótesis y se formalan ciclos que esquematizan las reacciones supuestas.

Por lo que representan de actualidad o resumen sobre esta materia, y especialmente por el estudio que dedican al mecanismo de formación del ácido acético, hemos tomado, en consideración de la bibliografía consultada, los trabajos correspondientes a las citas(10), (11), (27) y (30).

En ellos se hace un estudio de los factores físico-químicos y biológicos que rigen el proceso fermentativo y la influencia que ejercen sobre la concentración de estos productos secundarios.

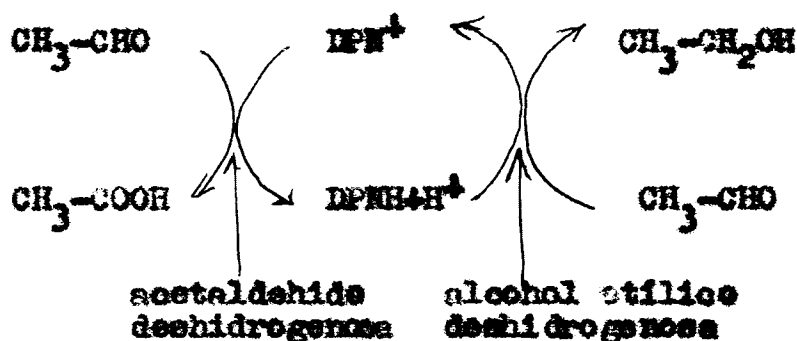
Referente a la acción del ácido acético, sobre el curso fermentativo, si bien no se ha estudiado en función de la especie de levadura empleada en la fermentación del mosto de uva, merecen subrayarse dos hechos puestas de manifiesto en estos trabajos:

- 1º) Una débil adición de ácido acético acelera la fermentación.
- 2º) La simple interpretación de que el ácido acético añadido a un medio en fermentación, pasa por reducción a acetaldehído, pareció confirmada por la curva de evolución del acetaldehído libre en el medio, cuyo máximo era mucho más alto si se añadía ácido acético al medio.

Sin embargo algunos autores (11) manifiestan la imposibilidad de conocer si el incremento de acetaldehído tiene como origen la reducción del acético añadido - o bien es debido a la acumulación de acetaldehído, por el bloqueo de la dismutación coenzimática del mismo.

La dismutación coenzimática y su significado biológico es un hecho bien conocido en la bioquímica de las fermentaciones; el paso de acetaldehído a etanol y ácido acético, dentro del proceso de la fermentación alcohólica, actuando el sistema redox de las moléculas de piridina, en presencia de las enzimas (presentes en los sistemas enzimáticos de las levaduras vínicas) acetaldehído deshidrogenasa y alcoholdehidrogenasa, constituye un ejemplo de decisiva importancia en embriología; se puede esquematizar según la ecuación:





En trabajos posteriores (11) parece que se descarta la hipótesis de que se forme acetaldéhidase por reducción de ácido acético añadido al medio de fermentación, pero se justifica la acumulación del acetaldéhidase en el medio por la inhibición ejercida por el ácido acético sobre las enzimas que gobiernan el proceso de formación de acético, particularmente de la aldehidomutasa responsable de esta formación; es poco probable que el acético pueda ejercer una acción retardativa o inhibidora masiva sobre la dismutación del acetaldéhidase, ya que el acetaldéhidase que en una fermentación se transforma en ácido acético, en fermentaciones desviadas se acumula hasta que es empleado nuevamente en otras reacciones secundarias, pues en estos casos se observó un incremento en butilenglicol y derivados, que tienen como precursor el etanal.

Estudiamos la acción del ácido acético sobre el poder fermentativo de 18 diferentes especies de levaduras, así como la posible relación que concentraciones crecientes de acético ejercen sobre la concentración de

acetaldehído libre en los respectivos fermentados.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL Y METODOS

Se disponen siete series; cada serie consta de - 20 matraces Erlenmeyer de 100 cc. de volumen, en los que se miden 50 cc. de mosto de uva de densidad (13°0° B).

Estas series comprenden: la testigo y las correspondientes a la adición de ácido acético en dosis de 17, 34, 50, 84, 167, 334 meq/l.

La esterilización se efectúa antes de la adición de ácido acético, operación que igual que la de siembra se llevan a cabo en cámara de siembras con material estéril y las precauciones de rigor. Los blancos respectivos se conservan en las mismas condiciones que las respectivas series de fermentados durante todo el tiempo de la experiencia.

La temperatura se mantiene a 25°C durante todo el tiempo que duran los ensayos. Cierre con válvulas Müller.

Serie T: (Testigo): Consta de 20 matraces Erlenmeyer de 100 cc., con 50 cc. de mosto de uva de 13°0° B estéril: dos de ellos se utiliza como blancos; los restantes se siembran respectivamente con la especie de levadura de número de orden en que los exponemos en la tabla.

Serie A: Consta de 20 matraces Erlenmeyer de -
100 cc. con 50 cc. de mosto de uva de 13°O^B., estéril,
adicionados de acético en dosis de 17 meq/l. de acéti -
co. Dos de ellos utilizados como blancos, y los restan -
tes sembrados respectivamente en la especie de levadura
según el orden expuesto en la tabla nº III.

Serie B: Consta de 20 matraces Erlenmeyer de -
100 cc. con 50 cc. de mosto de uva de 13°O °B, estéril,
adicionados de ácido acético en dosis de 34 meq/l. Dos
de ellos se utilizan como blancos y los restantes sem -
brados respectivamente con la especie de levadura seg -
gún el número de orden expuesto en la tabla III.

Serie C: Consta de 20 matraces Erlenmeyer de -
100 cc. con 50 cc. de mosto de uva de 13°O °B, estéril,
adicionados de ácido acético en dosis de 50 meq/l. Dos
de ellos se utilizan como blanco y los restantes sem -
brados respectivamente con la especie de levadura se -
gún el número de orden expuesto en la Tabla III.

Serie D: Consta de 20 matraces Erlenmeyer de -
100 cc. con 50 cc. de mosto de uva de 13°O °B, estéril,
adicionados de ácido acético en dosis de 84 meq/l. Dos
de ellos se utilizan como blancos y los restantes sem -
brados respectivamente con la especie de levadura se -
gún el número de orden expuesto en la tabla III.

Serie E: Consta de 18 matraces Erlenmeyer de
100 cc. con 50 cc. de mosto de uva de 13°O °B, estéril,

TABLE II

Serie E: 0.4 meq/l (1) Serie A: 17 meq/l (2) Serie B: 34 meq/l (2) Serie C: 50 meq/l (2) Serie D: 84 meq/l (2) Serie L: 167 meq/l (2) Serie R: 334 meq/l (2)

Nº de orden	Especie	Serie E: 0.4 meq/l (1)				Serie A: 17 meq/l (2)				Serie B: 34 meq/l (2)				Serie C: 50 meq/l (2)				Serie D: 84 meq/l (2)				Serie L: 167 meq/l (2)				Serie R: 334 meq/l (2)			
		Anhidrido carbónico (3)	Acidez volátil (4)	Acetaldehído (5)	Formación de velo	Anhidrido carbónico	Acidez volátil	Acetaldehído	Formación de velo	Anhidrido carbónico	Acidez volátil	Acetaldehído	Formación de velo	Anhidrido carbónico	Acidez volátil	Acetaldehído	Formación de velo	Anhidrido carbónico	Acidez volátil	Acetaldehído	Formación de velo	Anhidrido carbónico	Acidez volátil	Acetaldehído	Formación de velo	Anhidrido carbónico	Acidez volátil	Acetaldehído	Formación de velo
1	<i>S. italicus</i>	1.9	8	1.1		1.9	19	2.9		1.9	34	1.5		2.0	51	3.2		1.7	86	3.4		0.0	170	0.4		0.0	326	0.0	
2	<i>S. nanini</i>	2.0	6	2.7		2.3	19	3.4		2.3	30	2.0		2.2	50	1.2		1.8	80	2.2		0.0	157	0.2		0.0			
3	<i>S. ellipsoides</i>	2.1	6	0.6		2.4	14	0.6		2.2	35	2.0		2.3	52	1.0		2.2	87	1.3		0.0	167	0.2		0.0			
4	<i>S. ellipsoides</i>	2.2	7	0.6		2.4	19	1.7		2.2	35	1.2		2.0	56	0.8		1.9	86	1.5		0.0	168	0.3		0.0			
5	<i>S. oviformis</i>	2.4	6	0.9		2.8	14	0.4		2.1	36	1.1		2.3	55	1.2		2.0	82	3.7		0.0	170	0.4		0.0	320	0.2	
6	<i>K. apiculata</i>	0.8	10	0.6		0.5	20	2.6		0.2	34	1.6		0.0	54	0.2		0.0	91	0.2		0.0				0.0			
7	<i>C. mycoderma</i>	0.5	13	1.1		0.4	14	0.1		0.4	15	0.4		0.0	48	0.2		0.0	27	0.2		0.0	163	0.1		0.0			
8	<i>S. veronae</i>	0.7	6	4.6		0.4	27	1.3		0.3	37	1.2		0.5	60	1.2		0.0	93	0.1		0.0				0.0			
9	<i>S. rosei</i>	1.2	2	2.0		1.3	17-16	2.7		1.2	37	4.7		0.7	57	1.4		0.0	86	0.0		0.0	163	0.2		0.0			
10	<i>S. montulienses</i>	1.9	18	1.1		1.9	25	4.6		1.8	30	3.1		1.9	58	0.9		0.7	85	6.1		0.0	169	0.0		0.0			
11	<i>S. rouxii</i>	2.4	19	1.1		2.4	20	-		2.4	29	3.0		2.2	46	2.0		0.9	91	1.7		0.0	169	0.2		0.0			
12	<i>S. chorocianis</i>	1.9	17	0.6		1.8	23	6.0		1.9	29	3.0		1.9	54	2.8		1.5	82	0.2		0.0	167	0.2		0.0			
13	<i>S. boticus</i>	2.2	17	1.7		2.2	24	1.6		2.3	31	1.1		2.4	54	3.3		0.0	88	0.3		0.0	172	0.2		0.0			
14	<i>K. magna</i>	1.1	10	1.4		0.9	21	1.4		0.9	36	3.0		0.9	59	1.5		0.8	92	2.7		0.0	166	0.2		0.0			
15	<i>H. anomala</i>	1.1	8	2.7		0.8	36	2.9		0.5	42	0.5		0.5	19	2.5		0.0	80	0.4		0.0	169	0.4		0.0	324	0.2	
16	<i>Z. acidificans</i>	1.2	9	2.3		1.1	15	0.9		1.2	22	2.9		1.1	60	0.6		1.2	84	3.0		1.1	173	1.0		1.1	326	2.3	
17	<i>S. pastorianus</i>	1.8	15	1.1		1.6	24	1.5		1.6	34	1.9		1.1	56	2.7		0.0	93	0.4		0.0	181	0.2		0.0			
18	<i>C. pulcherrim</i>	0.5	2	1.6		0.4	3	1.0		0.0	33	0.2		0.0	56	0.1		0.0				0.0				0.0			

- (1) Acidez volátil del mosto
- (2) Acidez volátil de los testigos
- (3) Mol/litro de mosto
- (4) Mec/litro de fermentado
- (5) Mol/litro de fermentado

Las especies de levaduras empleadas y los números de orden en este trabajo y en la colección se dan en la tabla III.

TABLA III

<u>Nº orden</u>	<u>Especie</u>	<u>Nº cepa colección D.F.I.</u>
1	<i>S. italicus</i>	46
2	<i>S. mangini</i>	56
3	<i>S. ellipsoideus</i>	87
4	<i>S. ellipsoideus</i>	98
5	<i>S. oviformis</i>	162
6	<i>K. apiculata</i>	96
7	<i>G. mycoderma</i>	90
8	<i>Z. veronae</i>	80
9	<i>T. rossi</i>	99
10	<i>S. montuliensis</i>	V-20
11	<i>S. rouxii</i>	V-4
12	<i>S. charesiensis</i>	V-7
13	<i>S. béticus</i>	V-21
14	<i>M. magna</i>	149
15	<i>H. anomala</i>	V-9
16	<i>S. acidifaciens</i>	V-12
17	<i>S. pastorianus</i>	553
18	<i>C. pulcherrima</i>	1.202

- - - - -

Los datos analíticos obtenidos, la producción de CO_2 y las observaciones de formación de velo se exponen en las tablas.

La influencia de la concentración de ácido acético en la producción de acetaldehído libre al término de la fermentación, en cada serie, y para cada especie se refleja en las gráficas.

Es interesante observar el paralelismo entre las curvas pertenecientes a las especies encuadradas con arreglo al criterio expuesto en anteriores Capítulos: fase inicial, fase media y fase final de la fermentación y especies filológicas, pudiéndose comprobar una vez más la analogía fermentativa entre las especies de estos grupos naturales.

Resultados:

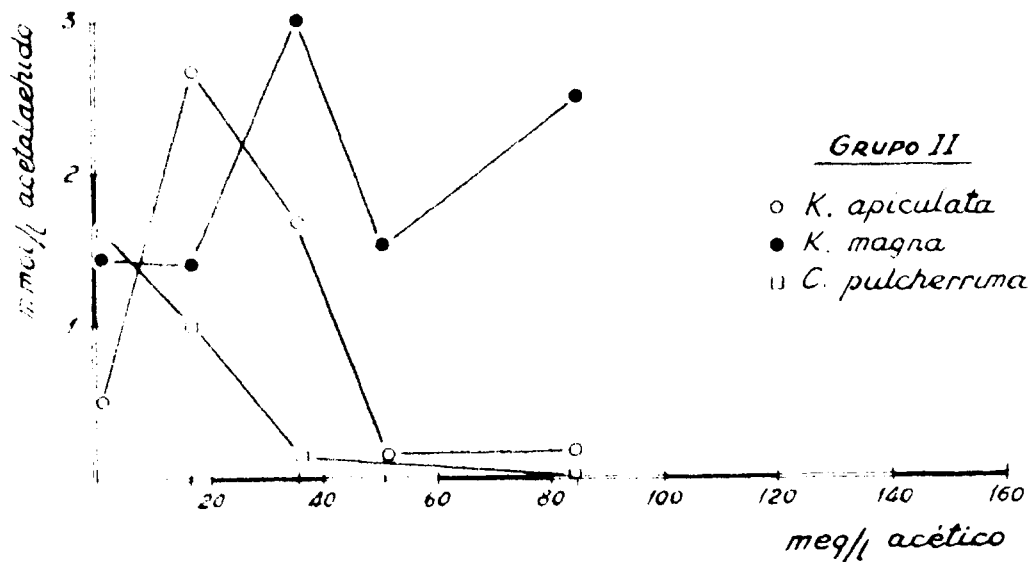
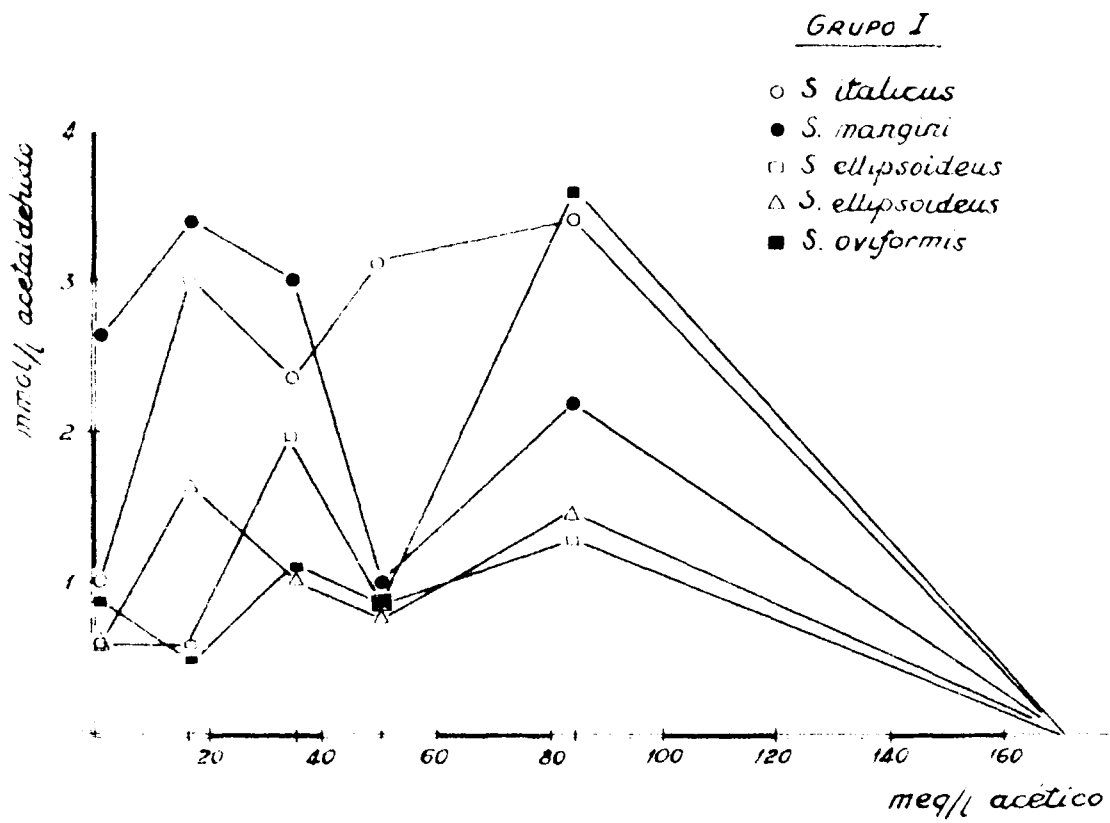
En orden a la inhibición de la actividad fermentativa de las distintas especies de levaduras por crecientes concentraciones de ácido acético, que superen el contenido normal de los vinos, se hace patente un paralelismo en ciertas especies, por lo que las agruparemos para facilitar el comentario de los resultados.

Grupo I (Gráfica I): Las especies:

S. italicus, *S. mangini*, *S. ellipsoideus*, *S. ellipsoideus*, *S. oviformis*, no sufren acción inhibitoria en su actividad fermentativa con dosis iguales o inferiores a

84 meq/l. de acético, observándose una producción de CO_2 igual a la serie testigo; asimismo no se puede poner de manifiesto la utilización de ácido acético adicionado al medio, en favor del incremento en la producción de acetaldéhid.

Los incrementos relativos, en función del tiempo, de pérdida de CO_2 , comparados con la serie testigo, son significativamente superiores para estas cinco especies de la serie A, a las 24 horas (al tiempo se empieza a contar a partir de realizada la siembra); es decir hay una exaltación en las reacciones de descarboxilación por la adición de dosis de 17 meq/l. de ácido acético; para estas mismas especies, en las series B y C (34 y 50 meq/l.) el incremento total de pérdida de CO_2 es también ligeramente superior, pero los parciales a las 24, 48, 72 y 92 horas son ligeramente inferiores, si bien los correspondientes a los restantes tiempos superan los datos de la serie testigo; es decir estas concentraciones de acético retardan la velocidad de descarboxilación en las primeras 92 horas, si bien el rendimiento es ligeramente superior en el tiempo; en la serie D (84 meq/l.) el incremento total de desprendimiento de CO_2 es ligeramente inferior, hay un retardo de 24 h. en la iniciación de la fermentación y los incrementos relativos correspondientes a las 48, 72 y 96 horas también son inferiores a la serie testigo.

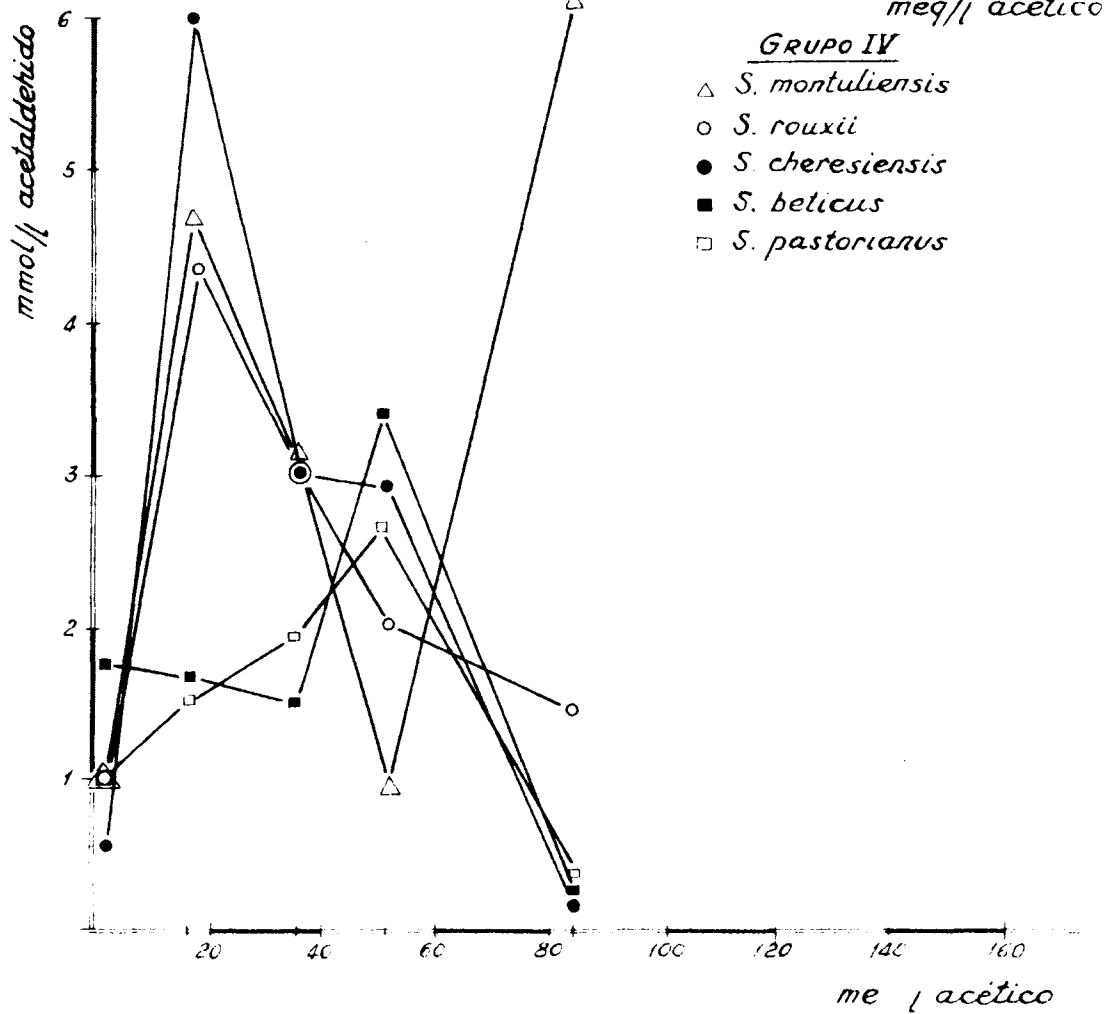
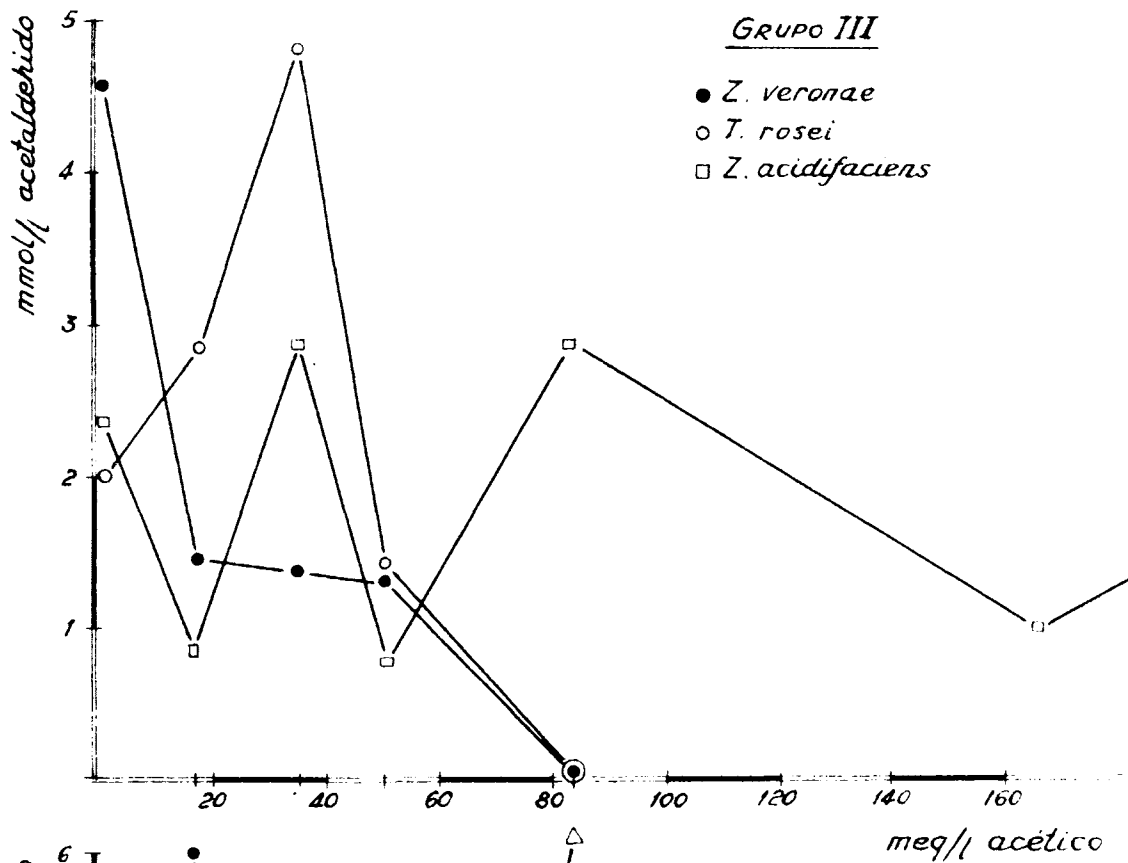


En la serie E (167 mg/l.) la actividad fermentativa de las células es nula.

En cuanto a la desviación de la fermentación o influencia de concentraciones crecientes de ácido acético en la concentración de acetaldéhidó libre al término de la fermentación, se pone de manifiesto la no fundida línea! entre las mismas; así como el doble efecto producido, influenciando la elevación de la concentración de acetaldéhidó, y el consumo del mismo, sin que en ningún caso, para estas cinco cepas, la concentración de acetaldéhidó producida haya rebasado cantidades que puedan relacionarse con una disminución en la concentración de acético añadido; lo que hace suponer que el acético añadido no es utilizado, a través del curso fermentativo, por ninguna de estas cepas.

Grupo II: La dosis de acético capaz de inhibir la actividad fermentativa de las cepadas:
K. epulenta, K. magna y C. pulcherrima varía sensiblemente entre ellas; mientras dosis de 34 mg/l. de acético inhiben el desarrollo de C. pulcherrima; la K. epulenta necesita dosis del orden de 50 mg/l. y la K. magna de 167 mg/l. Se pone de manifiesto que para estas tres especies dosis de acético que no inhiben la actividad fermentativa, en ningún caso exalton la producción de CO₂, sino que la disminuyen ligeramente.

La desviación de la fermentación, en cuanto a



producción de acetaldehído libre se refiere, es distinta para las tres especies: *K. apiculata* presenta un máximo en la concentración de acetaldehído para dosis de 17 meq/l. disminuyendo al aumentar la dosis de acético; el comportamiento de *K. magna* en este aspecto, es similar a las especies del grupo primero; la *C. pulcherrima* disminuye la producción de acetaldehído proporcionalmente al aumento de la concentración de acético en el medio.

Grupo III. *Z. veronae*, *T. rosei*, *Z. acidifaciens*.

La acción inhibitoria del ácido acético, sobre la actividad fermentativa de estas tres especies es similar en las dos primeras, y muy distinta en la tercera.

La actividad fermentativa del *Z. veronae* queda inhibida por dosis de 84 meq/l. de acético; las dosis inferiores ninguna de ellas resulta estimulante de la actividad fermentativa para esta especie.

T. rosei necesita dosis de 84 meq/l. para inhibir totalmente su actividad fermentativa; si bien dosis de hasta 34 meq/l. ejercen acción ligeramente estimulante en la producción de CO_2 .

El *Z. acidifaciens* presenta una extraordinaria capacidad para desplegar su actividad fermentativa, con producción de CO_2 igual o similar a la serie testigo, en presencia de altas concentraciones de acético, ya -

que con dosis de 334 meq/l. de acético, realiza fermentaciones normales en cuanto a producción de CO₂ se refiere. Dosis de 417 meq/l, inhiben su actividad fermentativa.

En cuanto a la influencia de la concentración del ácido acético sobre el mecanismo de formación o consumo de acetaldehído durante la fermentación, es interesante la actividad del *Z. veronae*, buen productor de acetaldehído en la serie testigo, y al aumentar la concentración de ácido acético disminuye la concentración de acetaldehído libre formado, llegando a ser independiente de dosis superiores, hasta anularse con dosis que inhiben la fermentación.

T. rossi presenta un máximo de producción de acetaldehído con dosis de 34 meq/l. a partir de la cual va disminuyendo al aumentar la dosis de acético, hasta anularse con la actividad fermentativa.

Z. acidifaciens, es una buena productora de acetaldehído, y se encuentran valores alternativos para la concentración de acetaldehído libre producido durante la fermentación, llegándose a una producción igual a la serie testigo a pesar de contener el medio una dosis de ácido acético correspondiente a 334 meq/l.

Grupo IV: La acción inhibitoria del ácido acético sobre las especies *S. montaliensis*, *S. rouxii*, *S. cheresiensis* y *S. beticus* difiere ligeramente entre

elias; la más sensible de estas especies es el *S. beticus*, que con dosis de 84 meq/l. no ejerce acción fermentativa; esta misma dosis ejerce una acción inhibitoria sobre el poder fermentativo del *S. montoliensis* y *S. rouxii* del 50% de desprendimiento de carbónico; y un 25% sobre los del *cheresiensis*. Dosis de 167 meq/l. producen la total inhibición de estas tres especies.

La actividad fermentativa del *S. pastorianus* se inhibe un 40% con dosis de 50 meq/l. y totalmente con dosis de 84 meq/l.

En las especies *Milógenas* es digno de notar que ni ligeras ni superiores concentraciones de ácido acético, exaltan la actividad fermentativa; solo excepcionalmente para el *S. beticus* en dosis de 34 y 50 meq/l.

En fermentados a campo del *S. pastorianus* tampoco hay activación de fermentación por pequeñas o elevadas dosis de acético.

En cuanto a la acción que ejercen concentraciones variables de ácido acético en la producción de acetaldehído, sobresale el análogo comportamiento de *S. cheresiensis* y *S. rouxii*, ambas producen un máximo de acetaldehído con la dosis más baja (17 meq/l) a partir de la cual decrece la producción de acetaldehído con el aumento de la concentración de acético.

S. beticus tiene la máxima producción de acetaldehído con dosis de 50 meq/l. de acético, habiendo con-

sumo de acetaldehído respecto al testigo en las otras dos anteriores dosis.

El *S. montuliensis*, guarda a este respecto un análogo comportamiento con los restantes *Saccharomyces*, presentando un mínimo con dosis de 50 meq/l y un máximo en dosis de 84 meq/l.

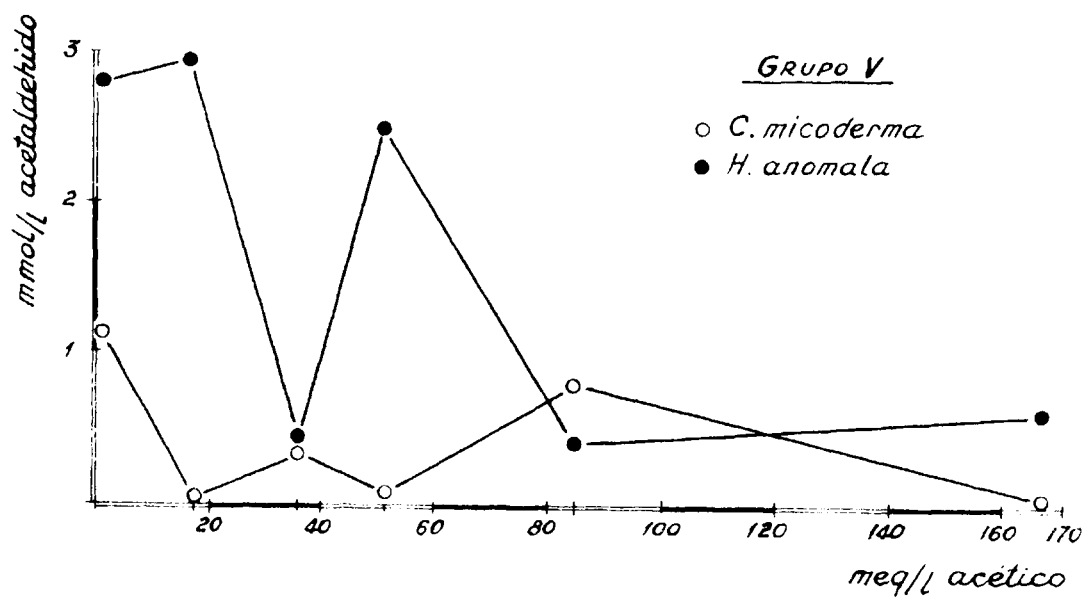
El *S. pastorianus* presenta una proporcionalidad en la producción de acetaldehído y el aumento de la dosis de acético; empezando a disminuir la concentración de acetaldehído, cuando la dosis de acético empieza a inhibir la producción de CO_2 .

Grupo Va Los resultados referentes a la *C. mycoderma* y *H. anomala*, los comentamos paralelamente, dada la analogía de los mismos.

Ambas presentan la interesante propiedad de formar velo sobre el mosto testigo, y sobre el adicionado de acético, hasta que dosis, diferentes para cada especie, inhiben esta capacidad. Las observaciones de formación de velo de estas dos especies, para las series respectivas, las resumimos en la tabla

La actividad fermentativa de la *C. mycoderma* queda inhibida con dosis de 50 meq/l. y su capacidad de formar velo con dosis de 167 meq/l.

La *H. anomala* pierde su actividad fermentativa con dosis de acético de 84 meq/l. de mosto y su capacidad de formar velo desaparece con dosis superiores a 84



mg/l.

Respecto a la acción de la concentración de ácido acético en la producción de acetaldehído libre, al término de la fermentación, es interesante subrayar la elevada producción de la *H. anomala*, así como la elevación que en esta producción ejercen las dos primeras dosis de acético en la producción de acetaldehído, existiendo al mismo tiempo producción de ácido acético. También se pone de manifiesto en esta especie, como al inhibirse la fermentación en un 50% ó más, los velos producidos, tienen como consecuencia un consumo de la dosis inicial de acético del orden del 40%, sin que repercuta en el incremento de la producción de acetaldehído.

La acción del ácido acético sobre la actividad fermentativa de la *H. mycoderma*, trae como consecuencia una ligera disminución en la producción de acetaldehído, a medida que es mayor la concentración de acético. La formación de velos está íntimamente ligada al consumo de acético, incluso para dosis en las que el mecanismo fermentativo ha quedado inhibido.

Conclusiones:

1º) La dosis de ácido acético capaz de inhibir la actividad fermentativa de las distintas especies de blastomicetos ensayados, varía con la especie; pero en todos los casos es superior al contenido permisible por la legislación, oscilando entre 2 a 10 gramos de acéti-

co por litro de fermentado; excepcionalmente el *Z. acidifaciens* es capaz de fermentar mostos cuyo contenido en acético es del orden de 20 gramos por litro de mosto.

2ª) En las especies de alto poder fermentativo dosis de acético del orden de 1 - 2 g/l, de mosto exaltan el poder fermentativo (ligera elevación en la producción de CO₂).

3ª) No hay proporcionalidad entre la concentración de acético añadido al substrato, y la concentración de acetaldehído al término de la fermentación, ni aún teniendo en cuenta la gradual inhibición de la fermentación a medida que aumenta la concentración de ácido acético. Tampoco hay consumo de las dosis de acético, añadidas al mosto, por vía fermentativa.

4ª) La concentración de ácido acético influencia el mecanismo de formación y consumo del acetaldehído en el curso fermentativo, para dosis de acético que no inhiben la fermentación; esta influencia no es directa y debe ser del mismo orden, al menos ésta podría ser la explicación de las oscilaciones en los valores obtenidos para la concentración de acetaldehído al término de la fermentación, a medida que aumenta la concentración de acético.

5ª) La especie *Z. veronae* capaz de producir un 75% de acetaldehído sobre las especies máximas productoras, sufre una disminución en la producción de acetaldehído a

medida que aumenta la concentración de acético añadido al mosto.

6ª) *C. mycoderma* y *H. anomala* son capaces de formar ve los sobre mosto de uva, adicionado de acético en dosis de 3 a 5 gramos por litro de mosto, sin llegar a fermentarlo. La formación de velo trae como consecuen cia un consumo de acético que oscila entre el 30 y el 70% de las dosis añadidas, en las condiciones de la experiencia (a 25º centígrados y cierre con válvula Mu - ller), sin que se traduzcan en incrementos en la producción de acetaldehído.

II.- INFLUENCIA DEL ACIDO SORBICO EN EL METABOLISMO DE
LAS ESPECIES DE LEVADURAS FILHOGENAS DEL GENERO -
SACCHAROMYCES.

PARTE TEORICA

El ácido sórbico, ácido graso insaturado de seis átomos de carbonos, con una conjugación diénica en su molécula, ejerce una acción fungistática y fungicida sobre las más variadas especies de eumicetos. Según Gooding y colaboradores (32), tal acción discurre por inhibición - en las deshidrogenosas que presiden los procesos de oxidación de los ácidos grasos saturados por obra de tales microorganismos.

Fue aislado por primera vez de los puntos maduros del Sorbus aucuparia y actualmente se obtiene en escala industrial a partir de la sorbosa, que a su vez se obtiene del sorbitol por vía fermentativa.

Su actividad fungicida fue descubierta en observaciones hechas sobre mermeladas de frutas, a las que para su conservación eran adicionados, de manera empírica, frutos maduros de la mencionada planta. En 1945, Gooding (33) propone por primera vez su adición a los alimentos como preventivo del desarrollo de mohos. Comprobada científicamente su acción antimicrobiana (34, 35) un gran número de investigadores han dedicado su atención,

en los últimos años, al estudio de dicho ácido, enfocando el problema desde distintos puntos de vista, con miras a esclarecer todo lo relativo a su toxicidad (36), mecanismo de metabolización en seres superiores (37),- detección y valoración cuantitativa en alimentos (38) y sus posibilidades de empleo en la conservación de los más variados tipos de alimentos: pepinillos, mermelada de fresas y jugo de tomate.

Relacionados con el uso del ácido sórbico en la conservación de bebidas alcohólicas, concretamente sobre zumos de frutas sin fermentar, existe una extensa bibliografía. Salmike (39) recomienda la adición de 0'10 a 0'15 gra/litro de ácido sórbico en la conservación del zumo de manzana después de haber sido sometido a una ligera pasteurización; Robinson (40), preconiza la asociación sórbico-sulfurosa en la conservación del zumo de manzana, ya que el primero ejerce una acción antiséptica muy débil sobre las bacterias. Ferguson (41) llega a la conclusión de que dosis de 0'35 gra/litro son suficientes para prevenir fermentaciones en zumo de manzana, y considera que la adición simultánea de 0'50 mg/l, de vitamina C inhibe el desarrollo de bacterias acéticas.

Higoby y Vázquez D (42) hacen un detenido estudio sobre la acción del ácido sórbico y otros conservadores frente a las distintas especies de levaduras respon-

sables de la fermentación de los mostos de manzana de Asturias y de otros que producen alteraciones en la sidra resultante. De todas las especies examinadas, la *Cándida micoderma*, *Cándida pulcherrima* y *Kloasckera apiculata*, resultaron ser las más sensibles a la acción antiséptica del ácido sórbico, bastando dosis comprendidas entre 0'10 y 0'25 para inhibir totalmente su desarrollo al cultivar en tales mostos. La especie más resistente resultó ser el *Saccharomyces chevalieri*, levadura capaz de soportar dosis de 0'50 grs/l de ácido sórbico.

Respecto al empleo del ácido sórbico en Enología, las investigaciones realizadas han ido encaminadas a prevenir e impedir la refermentación de vinos dulces embotellados (43, 44) y la aparición de *Cándida micoderma* en vinos de baja graduación alcohólica (45, 46). Tarantola en un reciente estudio, pone de manifiesto la influencia que el ácido sórbico ejerce sobre la actividad fermentativa de diferentes especies de levaduras vinícolas, cuando es empleado en dosis inferiores a la fungistática, determinando las dosis fungistáticas y fungicidas frente al *Saccharomyces ellipsoideus*. Ensayó frente al ácido sórbico diferentes especies del género *Saccharomyces* y pone de relieve la influencia que la densidad de población blastomioética y la concentración alcohólica del medio tienen sobre la eficacia del ácido sórbico como inhibidor de la fermentación alcohólica; de—

terminando las dosis adecuadas para inhibir la refermen-
tación de vinos dulces, llegando a la conclusión de que
el ácido sórbico puede asegurar la estabilidad biológi-
ca de los vinos dulces en botellas cuando viene usado a
razón de 200 - 250 mg por litro, si el contenido alcohó-
lico del vino está comprendido entre 5 y 7'5 por 100 y
150 - 200 mg de sórbico por litro, para vinos de gradua-
ción alcohólica superior.

Por este motivo nuestro trabajo experimental -
queda centrado en el estudio que el ácido sórbico y sus
sales potásicas ejerce sobre el curso fermentativo y el
desarrollo de velos de especies de levaduras filmógenas.
Prestando especial atención a las experiencias realiza-
das con vinos de graduación alcohólica en torno a los -
15 grados, producidos en las regiones del sur de nues-
tra Península, vinos que deben sus características orga-
nolépticas especiales a la crianza biológica que sufren
a cargo de tales levaduras, denominadas comunmente de -
"flor". El inhibir el desarrollo de velos, una vez -
criado el vino sin forzar la dosis de alcohol, evitaría
la reproducción de los mismos al ser embotellados sin -
previa estabilización del producto acabado por la pre-
sencia de estos velos o bien por depósitos blastomicti-
cos en el fondo de la botella.

El trabajo experimental lo planteamos con el -
propósito de:

- a) Determinar la dosis de ácido sórbico y su correspondiente sal potásica que tienen una acción fungistática y fungicida sobre las especies de levaduras del género *Saccharomyces* que forman los típicos velos sobre vinos producidos en el sur de España.
- b) Determinar las dosis adecuadas de cada uno de los dos antisépticos, ácido sórbico y anhídrido sulfuroso, que en la práctica enológica inhiban totalmente la aparición de velos blastomicrobicos en estos vinos dispuestos para el embotellado.

PARTE EXPERIMENTAL

En primer lugar se ha determinado la acción inhibidora que dosis progresivamente crecientes de ácido sórbico ejercen sobre la actividad fermentativa de las cuatro especies de levaduras de "flor" más comúnmente halladas en la crianza de vinos del sur de España, al ser cultivadas en mosto de uva estéril. Las levaduras ensayadas en esta experiencia forman parte de la colección de este Departamento y han sido aisladas de velos formados sobre vinos procedentes de las zonas de Montilla, Aljarafe, Jerez y Condado. Estas especies son:

Saccharomyces beticus.... cepa nº 1.642
Saccharomyces cheresiensis cepa nº 483
Saccharomyces montuliensis cepa nº 1.687
Saccharomyces rouxi..... cepa nº 663

Técnica.- En 32 matraces Erlenmeyer de 100 cc. y timetros cúbicos de capacidad se colocan 50 c.c. de mosto de uva estéril de la siguiente composición: azúcares reductores, 24 por 100; acidez total, 4,65 gr/litro; pH 3,5.

Estos matraces fueron agrupados en cuatro series de ocho matraces cada una.

En el primer matraz de cada serie no fué adicionado ácido sórbico, sirviendo de testigo; en cada uno de los restantes matraces de cada serie se disolvieron dosis crecientes de ácido sórbico, desde 50 a 300 mg/l, con diferencias de 25 mg. Posteriormente, en los ocho matraces de cada serie fué sembrada una levadura distinta, procedente de un cultivo joven en mosto de uva estéril, conteniendo unas $2 \cdot 10^6$ células por cm^3 , sustituyéndose el tapón de algodón cardado en cada matraz por una válvula Muller de ácido sulfúrico.

Después de ser pesados exactamente se llevaron a la estufa a 25°C. Periódicamente se efectuaron pesadas para seguir la pérdida de anhídrido carbónico.

Al cabo de los cincuenta días, cuando los pesos eran constantes en todos los matraces, se dió por terminada la prueba, habiéndose notado, como más relevantes, los siguientes hechos:

a) Para las cuatro especies ensayadas, las pérdidas de anhídrido carbónico fueron ligeramente superiores -

en los matraces conteniendo 50 mg de ácido sórbico que en los matraces testigos, deduciéndose que, a pequeñas dosis, este compuesto exalta la actividad fermentativa de las cuatro especies de levaduras ensayadas.

b) El *Saccharomyces montuliensis* fué la única especie que no inició la fermentación del mosto conteniendo dosis de 200 mg de sórbico por litro.

c) En los matraces conteniendo 225 mg/l el *Saccharomyces oheresiensis* fué la especie que más anhídrido carbónico produjo, pues el *Saccharomyces béticus* y el *rouxii* produjeron una cantidad casi inapreciable.

d) Dosis de 250 mg/l de ácido sórbico inhiben totalmente la actividad fermentativa de todas las levaduras empleadas.

En un segundo ensayo se ha determinado la acción fungistática que dosis crecientes de ácido sórbico, anhídrido sulfuroso y sorbato potásico (SORBISTAT-k, de la casa Pfizer) ejercen sobre las cuatro especies de levaduras antes citadas, sembradas simultáneamente en vino de Jerez, de la siguiente composición: alcohol, 15,3 por 100 en volumen; ácidos total, 4,26 gr/l. exp. en tartárico; anhídrido sulfuroso, 10 mg/l., y pH, 3,2.

Finalmente se ha probado la acción de la mezcla anhídrido sulfuroso más ácido sórbico sobre las mismas levaduras, al ser cultivadas en vino de Jerez, tal como queda dispuesto para el embotellado.

Técnica.- Se han preparado cuatro series de matrazes de 100 c.c. de capacidad. En cada matraz se colocan 50 c.c. de vino de Jerez. El primer matraz de cada serie se usa de testigo y en los restantes se adicionan dosis crecientes de los tres compuestos mencionados y de la mezcla ácido sórbico más anhídrido sulfuroso. Sembrados todos con la mezcla de las cuatro especies de levaduras de "flor" y tapados con algodón cardado se llevan a la estufa, a temperatura de 18°C. Diariamente se van haciendo observaciones, anotándose los días que tarda en aparecer el velo, contando a partir de la fecha en que fueron sembrados.

A continuación se dan los resultados para cada producto ensayado:

Acido sórbico:

Dosis en mg/l	0	50	100	150	200	250	300
Días que tarda en aparecer el velo....	9	18	29	43	no	no	no

Las dosis de 200 mg de ácido sórbico por litro inhibe totalmente el desarrollo de estas levaduras en vino de Jerez durante los 120 días que duró la experiencia.

A dosis de 150 mg/l de ácido sórbico, la aparición del velo es notablemente retardada (cuarenta y tres días), produciéndose un velo de aspecto muy tenue, fino, sin mucha rugosidad y bastante incompleto. A dosis -

de 100 mg el velo tardó sólo veintinueve días en aparecer y el aspecto es completamente normal, esto es, con abundante rugosidad, grueso y que sube por las paredes del matraz.

Sorbato potásico:

Dosis en mg/l.....	0	50	100	150	200	250	300
Días que tarda en aparecer el velo ...	9	16	25	35	52	75	no

Se nota que a igualdad de dosis, el sorbato potásico ejerce una acción fungística más débil que el ácido sórbico, siendo precisos 300 mg/l para inhibir totalmente el desarrollo de levaduras.

Anhídrido sulfuroso:

Dosis en mg/l	0	50	100	150	200	250	300
Días que tarda en aparecer el velo.....	9	15	32	53	no	no	no

La dosis de 200 mg/l inhibe el desarrollo del velo durante los 120 días que duró la experiencia; a dosis de 150 mg/l, la aparición del velo viene retardada unos diez días más que la misma dosis de ácido sórbico, siendo el velo más tenue e incompleto que en aquel caso.

Asociación anhídrido sulfuroso más ácido sórbico:

Dosis en mg/l SO ₂ ...	0	100	100	100	100	100	100
Dosis en mg/l sórbico	0	50	100	150	200	250	300
Días que tarda en aparecer el velo	9	54	no	no	no	no	no

Con dosis de 100 mg de anhídrido sulfuroso y 50 mg de ácido sórbico se produce un efecto análogo al que se obtiene con dosis de 150 mg de anhídrido sulfuroso solo, consiguiéndose una inhibición total del desarrollo de estas levaduras sobre vino de Jerez con dosis de 100 mg/l de cada uno de los dos compuestos citados.

Como conclusión nos parece de interés hacer resaltar el marcado sinergismo de la asociación anhídrido sulfuroso + ácido sórbico en la actividad fungistática de cada uno de ellos sobre las especies de levaduras en ensayadas. Siendo suficientes 100 mg/l de cada uno de los dos productos, ácido sórbico y anhídrido sulfuroso, para preservar estos vinos del posterior desarrollo de levaduras, cuando ya no interesa que éste ocurra a concentraciones alcohólicas no muy superiores a 15°C.

Se nos brinda, pues, de esta manera un medio comodo y eficaz para la estabilización microbiana en vinos de crianza cuando han de ser conservados en botella.

CAPITULO V

I.- LOS ACIDOS ORGANICOS DEL MOSTO

La degradación de los glucidos en las células - de la uva sigue el ciclo general del proceso oxidativo de la respiración, ingresando el ácido pirúvico en forma de acetil-coenzima A en el ciclo tricarboxílico al - combinarse con el ácido oxalacético para dar cítrico, siguiendo las conocidas transformaciones del ciclo de - Krebs.

Cuando este ciclo deja de actuar dos ácidos apa - recen como detectables del mismo; ácido málico y cítri - co. Juntamente con éstos se han podido detectar ácido tartárico y bitartratos, y en cantidades muy pequeñas, y no en todos los tipos de mostos: oxálico, glioxílico, glicólico y glicérico; sin embargo hay datos para am - pliar a un número mayor la gama de ácidos que puede con - tener un mosto, pero hay serias dificultades para esta - blecer su identificación, pues ni aún con la técnica - cromatográfica de doble dimensión se pueden identificar con la debida seguridad, ya que la abundancia relativa de ácido tartárico, málico y cítrico, limitan una eleva - da concentración de la muestra en el origen del papel, so pena de obtener una gran extensión de las manchas, - haciendo ineficaz el cromatograma (46).

La concentración de los iones H^+ en el mosto proviene de la disociación de los ácidos que entran en su composición.

La concentración equivalente de H^+ (número de gramos de ión H^+ por litro) es en los mostos del orden de 0,001 ó sea de 10^{-3} ; ó expresado según la definición de $pH = -\log 10^{-3}$, es decir $pH=3$,

Es fundamental la diferencia entre la acidez real o actual, dada en valores de pH y la llamada acidez de titulación o potencial, que en Enología se denomina también acidez total y que se determina por una valoración volumétrica, provocando el desplazamiento del equilibrio de disociación de los ácidos hasta lograr la total neutralización.

La mayor parte de los fenómenos que ocurren en la fermentación están directamente influenciados por la acidez real ó pH del mosto, así como los fenómenos de floculación, color, sabor, quiebras férricas o cúpricas etc. - que pueden tener lugar en los fermentados resultantes.

Los fermentados en pureza de mosto a cargo de especies de blastomicetos, suelen presentar un pH comprendido entre 2,5 y 4,5, dependiendo de la variedad y grado de madurez de la uva, de las especies de levadura y de las condiciones físico-químicas que intervienen en la fermentación. La concentración de hidrogeniones se debe en gran parte a los ácidos que provienen de la uva, tartárico y -

málico, que representan del 20 al 50 por ciento de la acidez, orgánica total y el ácido cítrico que representa del 1 al 6 por ciento de la misma; en un tanto por ciento muy bajo, pueden existir además: oxálico, glicólico, glioxílico y glicérico, desapareciendo, generalmente, durante el curso de la fermentación.

La cuestión de conocer qué proporción de cada uno de los distintos ácidos del mosto o del vino está libre ó combinado con las bases, no puede ser resuelta en rigor - con solo conocer el valor del pH y la constante de disociación de estos ácidos, ya que la fórmula a partir de la cual se calculan es una aplicación de la ley de acción de masas, no siendo rigurosamente exacta al no cumplirse determinadas condiciones en el sistema al que se aplica. En mostos y en vinos estas condiciones están seriamente interferidas, dada su compleja composición, por lo que su aplicación al equilibrio de determinados ácidos débiles, o que funcionen como tales tiene una validez aproximada.

Aplicando la ley de acción de masas al equilibrio:



de disociación de un ácido débil, en un sistema homogéneo, siendo C, C₁ y C₂, las concentraciones moleculares o iónicas (expresadas en moléculas-gramo o iones gramo por litro) de RH y de los iones R y H respectivamente, la expresión matemática es:

$$\frac{C_1 \cdot C_2}{C} = K$$

Se pueden considerar los siguientes casos en orden de complejidad:

I.- Solución diluida del ácido sin otros ácidos o sales; entonces $C_1 = C_2$ y por tanto $C_1^2 = K \cdot C$, aplicando logaritmos a la ecuación anterior: $2 \log C_1 = \log K + \log C$ ó sea $-\log C_1 = -\frac{1}{2} \log K + \frac{1}{2} \log \frac{1}{C}$; como $\text{pH} = -\log C_1$ por analogía $-\log K = \text{pK}$; sustituyendo tenemos:

$$\text{pH} = \frac{1}{2} \text{pK} + \frac{1}{2} \log \frac{1}{C}$$

fórmula que nos da la concentración de ácido sin disociar en función del pH y del pK.

II.- Solución de un ácido en presencia de otro:
En este caso $C_1 \neq C_2$ y $C_1 = K \frac{C}{C_2}$ por lo que:

$$\log C_1 = \log K + \log \frac{C}{C_2} \quad \text{ó sea} \quad \text{pH} = \text{pK} + \log \frac{C}{C_2} \quad (\text{I})$$

III.- Solución de un ácido en presencia de otro y de sales:

El ácido débil está poco disociado y la concentración de moléculas no disociadas C , está incluida en la concentración total de ácido no disociado A ; las sales están muy disociadas y la concentración de aniones del ácido C_2 , está incluida (formando parte) de la concentración total de aniones B .

La ecuación (I), al sustituir en ella los valo-

res anteriores, queda:

$$pH = pK + \log \frac{B}{A} \quad \text{ó sea} \quad \log \frac{B}{A} = pH - pK$$

Esta ecuación permite calcular la relación $\frac{B}{A}$, es decir la proporción en la cual un ácido presente en una solución en presencia de otros y de las sales, está neutralizado, sin más que conocer el pH y el pK. Según la anterior ecuación un ácido está semi-neutralizado cuando $pH = pK$; la neutralización de un ácido, en las condiciones de este caso, tiene lugar en la proximidad del valor del pK.

Los ácidos bibásicos tienen dos constantes de di sociación. Aplicando la anterior ecuación al ácido tartárico, en un mosto que presente un $pH = 3$ (y suponiendo que los valores de las constantes de ionización son de $K_1 = 3,01$ y $K_2 = 4,05$), la primera acidez se encuentra neutralizada, mientras que solo $\frac{1}{10}$ de la otra función está neutralizada.

Los valores de las constantes de disociación expresados en pK, de los principales ácidos que influyen en el pH del mosto del vino (25) los resumimos en la siguiente tabla:

	pK_1	pK_2	pK_3
Tartárico	3,01	4,05	
Cítrico	3,08	4,75	6,41
Málico	3,46	5,05	
Láctico	3,81		
Succínico	4,18	5,23	

PARTE EXPERIMENTAL

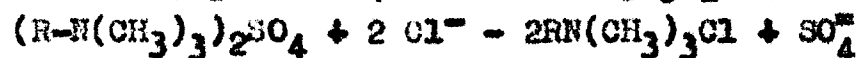
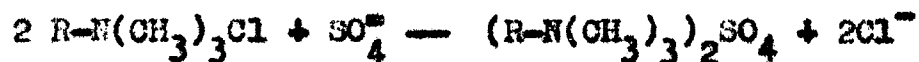
En análisis cromatográfico realizado al mosto empleado en todos los ensayos de fermentación está basado en las clásicas técnicas cromatográficas empleadas por Lugg y Overell (18), con algunas modificaciones aparecidas en recientes trabajos sobre el particular (47, 48, 49, 50, 51, 52 y 53).

Se presenta en las técnicas cromatográficas sobre papel en análisis de mostos dificultades que derivan de la aplicación directa de mosto sobre el punto de origen, pues a parte de la influencia de los distintos componentes no ácidos sobre el coeficiente de reparto entre las dos fases, la absorción de la muestra en el papel es deficiente, limitando la cantidad de esta en el origen y, como consecuencia, la aparición de manchas al revelar el cromatograma; existe un efecto impermeabilizante del mosto sobre el papel, tal vez debido a la naturaleza peptídica de algunos componentes y al alto contenido de azúcares, por lo que el coeficiente de reparto de los ácidos queda seriamente modificado, explicándose así las irregularidades en el recorrido del disolvente y la consecuente aparición de bandas al revelar.

Por este motivo, y pensando en las fracciones sacarificadas, hemos recurrido al empleo de resinas cambiadoras de iones, siguiendo y adaptando a los mostos el méto-

do empleado en los trabajos correspondientes a las citas (54, 55, 56, 57 y 58).

Como cambiador aniónico empleamos una resina de base fuerte, capaz de cambiar todos los aniones con igual facilidad e independientemente del pH. La empleada en este trabajo es una resina de cambio monofuncional, de alta basicidad, en forma de perlas de poliestireno de esferas cruzadas, conteniendo grupos de amonio cuaternario; está completamente ionizada tanto en forma de sal como de hidróxido y las reacciones más características de este tipo de resina son:



El cambiador catiónico empleado es una resina fuertemente ácida, monofuncional, de poliestireno sulfonado, siendo el grupo activo $-\text{SO}_3\text{H}$; la capacidad de cambio de este tipo de resinas es la misma para todos los cationes, incluyendo al hidrógeno e independiente del pH. El paso de una sal neutra a través de la resina sulfónica, suministra una cantidad equivalente del ácido correspondiente según la ecuación: $\text{R-SO}_3\text{H} + \text{NaCl} \longrightarrow \text{RSO}_3\text{Na} + \text{ClH}$.

MATERIAL Y METODO

Resina fuertemente básica: Empleamos "Zerolit F.P." resina de cambio monofuncional de alta basicidad, en forma de perlas de poliestireno con enlaces cruzados, conteniendo grupos de amonio cuaternario; con una capacidad total de 3,5 meq/g, muy independiente del pH. Se suministra en forma de cloruro, húmeda, no debiendo dejar que se seque.

No la empleamos en fase de hidróxido pues en esta forma presenta una alta capacidad para los ácidos débiles tales como CO_2 , HCN , H_2S , H_3PO_4 , SiO_2 , fenoles, etc.

Pasamos Na_2CO_3 2N hasta no detectar cloruros.

La regeneración se efectúa (pasando de 10 a 20 veces el volumen de resina) con Na_2CO_3 2N.

Resina fuertemente ácida: Zerolit 2256Dowex 50; resina no funcional de poliestireno sulfonado, suministrada en forma sódica; grupo activo $-\text{SO}_3\text{H}$; la capacidad de cambio es la misma para todos los cationes, incluyendo el hidrógeno; su capacidad total es de 5 meq/g (substancia seca) e independiente del pH; muy resistente a los agentes reductores y oxidantes fuertes, así como a los alcalis cáusticos.

La regeneración se efectúa pasando 1,5 veces el volumen de resina, de ácido clorhídrico al 10%.

El lavado se realiza con agua destilada, pasando 3 veces el volumen de resina, a razón de 1 ml. por minuto.

Método: Se toma una cantidad de mosto tal que contenga unos 25 mg de ácidos (dato para el que previamente se han calculado los volúmenes de resinas empleadas), se neutraliza cuidadosamente y se llevan, en un matraz aforado, a 100 ml., empleando para enrasar agua destilada.

Se pasan a través de la columna aniónica, a razón de 1 ml. por minuto. Cuando el menisco del líquido alcanza el nivel superior de la resina, se lava la columna con agua destilada, hasta comprobar mediante medida de pH, que el agua de lavado sale neutra; seguidamente se eluyen los ácidos con 100 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 1,5 N. recogiendo el eluido en un matraz aforado de 100 ml (velocidad: 1 ml. por minuto).

Determinación cualitativa de ácidos: Se toman 25 ml de sales de amonio eluidas y se llevan a un vaso de precipitados de 100 ml., introduciéndolo en un baño de agua a 70°C, hasta eliminación total de amoníaco (descomposición de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ en exceso). Se enfría a la temperatura ambiente. Esta solución concentrada se pasa lentamente (0,5 ml por minuto) a través de la resina catiónica. Se enjuaga el vaso con varias pequeñas porciones de agua destilada y se adicionan a la columna; se lava con agua destilada utilizando unos 50 ml. Finalmente se concentra la solución hasta 1 ml, quedando dispuesta para poner las muestras en papel Watman nº 1, sobre el que

se realiza la cromatografía.

Determinación cuantitativa de acidez orgánica:

Se toman 25 ml de las sales amónicas eluidas, y una vez eliminado el $(\text{NH}_4)\text{CO}_3$, por calefacción en baño de agua a 70°C , se pesa la solución concentrada por la resina catiónica (0,5 ml por minuto). Finalmente se titula el eluido, conteniendo los ácidos libres, con NaOH 0,02 N., empleando fenolftaleína.

Se utiliza un blanco de la solución de carbonato amónico empleada.

El método se ensaya con soluciones patrón de ácidos, conteniendo: 200 mg de málico, 100 mg de cítrico, 400 mg de tartárico, 300 mg de láctico y 300 mg de succínico, en 100 ml de agua destilada.

La media de los resultados obtenidos para los cinco ensayos realizados es:

Cantidad de ácidos pesada	212 meq/l
Cantidad de ácidos valorada	210 "

Técnica cromatográfica:

Desarrollo.- Se realiza sobre papel Watman nº 1 que actúa como soporte de la fase acuosa.

La cantidad de ácidos requerida puesta en el origen debe ser proporcional a la distancia alcanzada por el frente del eluyente. Una cantidad aceptable es la de 2 γ por centímetro, para cada ácido.

En desarrollo monodimensional descendente emplea

mos como solvente butanol-n: ácido fórmico 4N: agua -
(1:1:2).

Reveladores.- Hemos ensayado los clásicos reveladores indicadores de pH. De este tipo de indicadores hemos adoptado el azul de bromo-fenol, por ser el que mejores resultados nos ha proporcionado.

Hemos utilizado el revelador propuesto por Jirí-
napasková y Munk (53), consistente en dos soluciones:

I.- 0,075% de verde de bromocresol + 0,025% de azul de bromofenol en alcohol etílico absoluto.

II.- 0,05 de MnO_4K y 1% de $Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$ en agua destilada.

Ambas soluciones son estables separadamente. Se mezclan en proporción 1:1 e inmediatamente se pulveriza para revelar el cromatograma; este reactivo es solo estable por 5-10 minutos.

Para detectar posibles manchas ácidas atribuibles a aminoácidos, hemos empleado una solución de ninhidrina en butanol al 0,25%. Siguiendo el orden operatorio siguientes:

I.- Se pulveriza sobre el papel la solución de ninhidrina; se introduce el papel en una estufa a 80°C - durante 5 minutos.

II.- Posteriormente se pulveriza con solución de azul de bromofenol.

RESULTADOS.

Hemos operado con soluciones testigo de: oxálico, bitartrato potásico, tartárico, cítrico, málico, glioxílico, glicólico, láctico, succínico y fumérico; empleando técnicas monodimensional descendente y dimensional. - Con ambas hemos puesto de manifiesto la aparición de las manchas respectivas indistintamente: si bien la técnica dimensional da unas manchas de menor intensidad y más - difuminadas en igualdad de condiciones, especialmente para pequeñas concentraciones de ácidos.

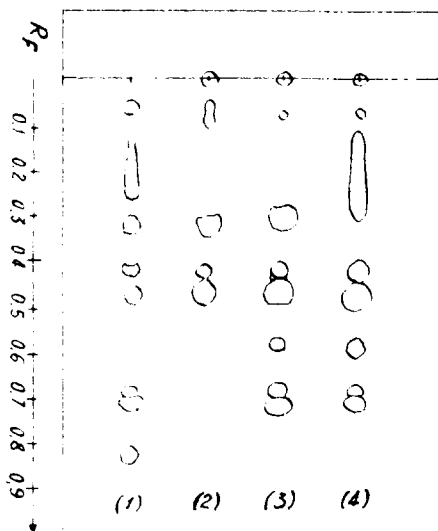
Hemos podido detectar en el mosto estudiado con este método analítico, tartárico, cítrico y málico; vestigios de oxálico, y una ligera mancha en el origen atribuible a acidez inorgánica; fijando los Rf respectivos - con los solventes empleados, y adaptando la técnica para un estudio comparativo con los fermentados en pureza que hemos de obtener.

Hemos puesto a punto mediante el empleo de resinas cambiadas de iones, un método para la determinación de la acidez fija libre en mostos; y hemos determinado los valores de la misma para el mosto, que empleamos en todo nuestro trabajo experimental; junto a los valores de acidez volátil y total del mismo, nos permite - calcular el tanto por ciento de acidez salificada en el mosto.

CROMATOGRAMAS DE ACIDEZ

DE

SOLUCION PATRON DE ACIDOS, MOSTO Y FERMENTADO EN PUREZA



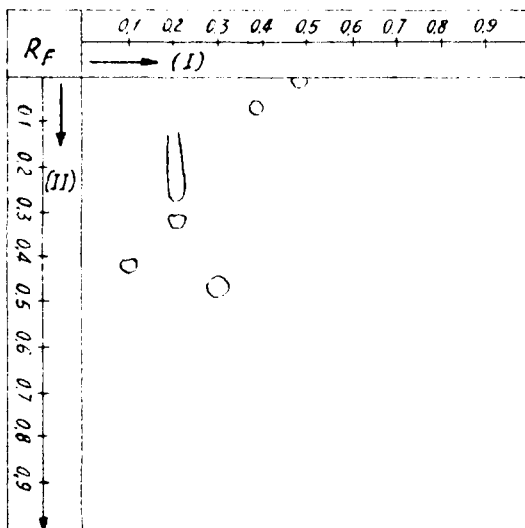
- (1) - Solución patrón.
 (2) - Mosto pasado por resinas.
 (3) - Fermentado pasado por resinas.
 (4) - Fermentado.

SOLVENTE EMPLEADO

n-Butanol: fórmico 4N
 AGUA (1:1:2)

REVELADOR: Azul de bromofenol

SOLUCIÓN PATRÓN: oxálico, bitartrato potásico, tartárico, cítrico, málico, láctico, succínico y fumárico. (ordenados por valores crecientes de R_f).



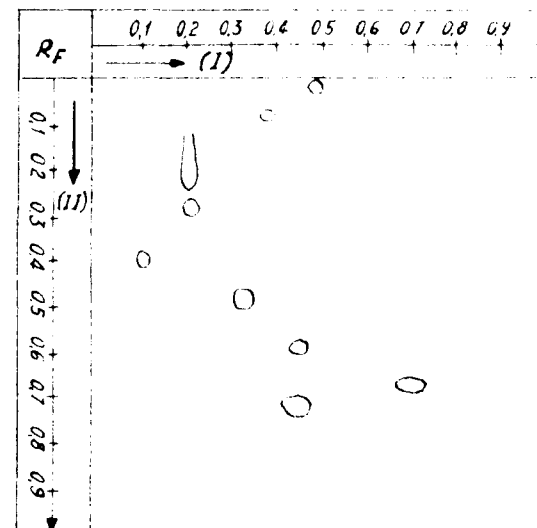
MOSTO: del empleado en las fermentaciones en pureza a cargo de las 18 especies de levaduras.

CROMATOGRAMA bidimensional sobre papel Watman nº 1.

SOLVENTE EMPLEADO:

- (I) - Etanol absoluto: NH_4OH : 22°B: Agua (80:5:15).
 (II) - *n*-Butanol: Fórmico 4N: Agua (1:1:2)

REVELADOR: Azul de bromofenol.



FERMENTADO EN PUREZA por la cepa nº 1

CROMATOGRAMA bidimensional sobre papel Watman nº 1: realizado en las mismas condiciones que el anterior.

SOLVENTE EMPLEADO:

- (I) Etanol absoluto: NH_4OH : 22°B: Agua (80:5:15)
 (II) *n*-Butanol: Fórmico 4N: Agua (1:1:2)

REVELADOR: Azul de Bromofenol.

Figura 11

II.- EVOLUCION DE LA ACIDEZ FIJA DEL MOSTO POR EL PROCESO FERMENTATIVO A CARGO DE DIFERENTES ESPECIES DE LEVADURAS.

En el apartado anterior de este Capítulo hemos estudiado la identificación cualitativa cromatográfica de los ácidos orgánicos presentes en el mosto, así como la valoración total de los mismos, en el estado en que se encuentran en el mosto, y de las fracciones solidificadas, mediante el empleo de resinas cambiadoras de ion.

No faltan en la literatura química procedimientos analíticos clásicos para la valoración individual de algunos ácidos presentes en mostos y vinos, pero son bastante laboriosos, lentos y de precisión limitada por lo que son inadaptables a las necesidades de nuestro trabajo.

Los métodos cromatográficos presentan precisión en sus resultados (54, 55, 56, 57 y 58), pero hay que prestar atención a la exactitud de los mismos, al aplicarlos a los vinos, ya que pueden existir errores debidos a no tener en cuenta algunos ácidos presentes, aunque en ligeras concentraciones, no identificadas, y que inevitablemente se anexionaren a las distintas fracciones ácidas de análisis cualitativo conocido que se tra-

tan de valorar.

Por este motivo hemos prestado atención a la evolución de la acidez del mosto, al término de la fermentación llevada a cabo por 18 diferentes especies de levaduras antes de abordar el complejo problema de valoración cuantitativa de cada uno de los ácidos que la componen.

Numerosos autores se han ocupado del estudio de la acidez de mostos y vinos, estudiando factores físico-químicos que pueden influenciar el pH, la concentración y las fracciones salificadas de los mismos (23, 24, 25, 59 y 60).

Sin embargo un estudio de la evolución y producción de la acidez en los mostos a causa de la fermentación, en función del agente biológico que la produce, no se ha realizado hasta el presente, pues son escasos los trabajos que han tenido en consideración variedades de especies de la misma fase fermentativa o distintas cepas de la misma especie (60).

La influencia de los factores físico-químicos sobre la concentración y disociación de los ácidos orgánicos de los fermentados, determina la necesidad de definir y mantener las condiciones fijadas en proceso de las características dinámicas de un fermentado, para poder obtener resultados precisos en orden a la nueva variable introducida: la especie blastomicética empleada en cada caso.

En virtud de las características fermentativas de cada especie de levadura la composición del medio se va modificando tanto cualitativa como cuantitativamente al transcurrir del tiempo, siendo inevitables las modificaciones debidas a evaporación o arrastre de sustancias más o menos volátiles por el carbónico desprendido, y los fenómenos redox, en gran parte eliminados por el cierre empleado; el aumento de la concentración de alcohol y la reducción de volumen del sustrato en el transcurso de la fermentación, son dos factores que influyen decisivamente el producto de solubilidad de las sales ácidas de tartárico, cuya precipitación, por la continuidad de los procesos que operan y determinan la saturación, es función del tiempo.

PARTE EXPERIMENTAL.

Material y método.- Se prepara una serie de 20 matraces Erlenmeyer de 100 ml. Cada matraz contiene 50 ml de mosto estéril, previamente estudiado, de las siguientes características: Densidad 13° Bé (15°C); materia reductora al feheling expresada en glucosa 234 g/l.

Cada especie de levadura de las 18, objeto de nuestro estudio es sembrada en el matraz preparado al efecto; dos matraces se dejan como blancos, uno se analiza al efectuar las siembras, y otro cuando se considera terminada la experiencia. La fermentación de toda la serie y el testigo se mantiene a 25°C; los matraces cerrados con válvulas Müller cargadas de sulfúrico.

A los 30 días de efectuada la siembra, se llega a la constancia de pérdida de peso en todos los matraces y se procede el análisis.

Se determina acidez volátil, acidez total, acidez fija libre (paso por resinas) y el análisis cromatográfico cualitativo de ácidos, para cada fermentado y para el mosto. Los métodos seguidos para estas determinaciones se encuentran expuestos en las páginas 27, 88, y 89

Resultados: En la tabla nº V damos los resultados correspondientes a la producción de acidez volátil, acidez total, acidez fija libre (paso de mosto y fermen-

TABLA V

Número de orden	Especie	Anhídrido carbónico. Mol/litro de mosto	Acidez volátil Meq/litro	Acidez salificada %	Acidez total en mosto y fermentos en Meq/litro	Acidez fija libre (resinas) Meq/litro	Acidez salificada Meq/litro	CROMATOGRAFIA DE ACIDOS						
								n-Butanol: Acetico 4 l: Agua (1:1:2)-Watman nº 1						
(1)								Tartárico	Cítrico	Gálico	Desconocido	Láctico	Stacónico	Humánico
	MOSTO ESTERIL	-	2'2	69'8	40'1	125'6	87'7	+	+	+	-	-	-	-
1	S. italicus	1'9	8'0	56'3	55'4	108'7	61'3	+	+	++	+	+	++	-
2	S. hungari	2'0	5'8	55'8	61'3	123'3	68'8	+	+	+++	+	+	++	.
3	S. ellipsoideus	2'1	5'5	56'2	53'5	109'7	61'7	+	+	+++	+	+	++	-
4	S. ellipsoideus	2'2	7'1	55'2	63'4	125'7	69'4	+	+	+++	+	+	++	-
5	S. oviformis	2'4	6'3	55'4	53'5	105'9	58'7	+	+	+++	+	+	++	-
6	K. apiculata	0'8	9'7	58'2	53'5	104'7	60'9	+	+	++	+	+	+	-
7	C. myoderma	0'5	12'6	62'9	55'5	115'9	73'0	+	+	++	+	+	+	-
8	Z. veronae	0'7	6'3	8'9	152'4	160'4	14'3	+	+	++	++	+++	+	-
9	T. rosei	1'2	2'2	59'8	47'2	112'1	67'1	+	+	+++	+	+	++	-
10	S. montaliensis	1'9	17'6	61'3	65'3	123'3	75'6	+	+	+++	+	+	+	-
11	S. rouxii	2'4	19'3	60'3	68'3	123'3	74'3	+	+	+++	+	+	+	-
12	S. cheresiensis	1'9	16'8	56'0	63'4	105'9	59'3	+	+	+++	+	+	+	-
13	S. heticus	2'2	16'8	54'9	67'3	112'1	61'6	+	+	+++	+	+	+	-
14	K. magna	1'1	10'5	60'3	53'5	108'5	65'5	+	+	+++	+	-	+	-
15	H. anomala	1'1	7'6	66'0	49'5	123'3	81'4	+	+	+++	+	-	+	-
16	Z. acidifaciens	1'2	9'2	50'3	85'1	152'9	77'0	+	+	+++	+	+	++	-
17	S. pastorianus	1'8	15'5	55'4	65'4	112'1	62'2	+	+	+++	+	+	+	-
18	C. pulcherrimo	0'5	2'1	58'2	51'5	118'2	68'8	+	+	+++	-	+	+	+

tados por resinas, y ulterior valoración) y el número de equivalentes de acidez orgánica fija que se encuentran - salificados, (calculados por diferencia entre la acidez fija libre y la acidez total, descontando de esta última la acidez volátil); los resultados de estos análisis efectuados al mosto, empleado como blanco se expresan junto a los anteriores; también se incluyen los resultados del análisis cromatográfico de ácidos del mosto y de los fermentados producidos por la actividad fermentativa de las 18 especies estudiadas.

Conclusiones:

1º) Respecto a la producción de acidez volátil vuelven a corroborarse los datos obtenidos en el Capítulo dedicado a su estudio; es interesante la elevación en la producción de acidez volátil en la fermentación del mosto a cargo de las especies filidgenas, cuando la fermentación se lleva a cabo en condiciones anaeróbicas, frente a una producción relativamente baja, cuando la fermentación transcurre en condiciones aeróbicas o semi-aeróbicas.

2º) El porcentaje de ácidos salificados en el mosto alcanza un valor de 69,8, superior a todos los fermentados en pureza que hemos obtenido.

3º) El tanto por ciento de acidez salificada en los fermentados en pureza a cargo de las especies pertenecientes a la última fase fermentativa (*S. italicus*, *S.*

mangini, S. ellipsoideus y S. oviformis) es prácticamente el mismo lo que significa que la composición en los factores que influyen en el producto de solubilidad de estas sales es análoga en los respectivos fermentados en pureza. El valor de la acidez salificada en los fermentados correspondientes a estas cinco especies está comprendido entre 56,3 y 55,2 mg/l, diferencia que está dentro del límite de error del método analítico empleado. Para un mosto dado, y unas condiciones definidas de temperatura y de aireación en que se verifica la fermentación, se puede considerar este tanto por ciento como característico de estas especies.

4º) Las especies de la primera fase fermentativa presentan un tanto por ciento de acidez salificada mayor que las especies del grupo anterior; observándose que los valores obtenidos están en razón inversa al poder fermentativo (rendimiento en alcohol) por un lado, y a la capacidad de formación de ácidos orgánicos por otro. Así la H. anomala y K. magna de poderes fermentativos elevados dentro del grupo, pero de baja producción en ácidos, tienen junto a la C. micoedema, productora de bajas concentraciones de acidez, los valores más altos de acidez salificada.

Las especies de segunda fase fermentativa: Z. verone y T. rosei presentan distintos porcentajes de acidez salificada como corresponde a una marcada diferencia

en su fisiología fermentativa. *Z. veronae* tiene un 8,9% de acidez salificada a pesar de presentar un poder fermentativo inferior a la *T. rosei*, pero es la especie - que presenta mayor producción de acidez en la fermentación de mosto.

El tanto por ciento de acidez salificada en el fermentado a cargo de la *T. rosei* es de 59,8 aproximándose su valor a los de las especies de la última fase fermentativa. El *Z. acidifaciens* es una buena productora de acidez presentando un 50,3% de acidez salificada, a pesar de que su poder fermentativo es del mismo orden que el de la *T. rosei*.

Las especies filológicas *S. cheresiensis* y *S. batiana* presentan un tanto por ciento de acidez salificada del mismo orden que las especies aisladas en la última fase, lo que presupone la análoga composición cualitativa y cuantitativa de los fermentados; en cambio las especies *S. montaliensis* y *S. rouxii* con un 61,3 y con 60,3% de acidez en forma de sales, nos habla de un menor rendimiento alcohólico, entre otras posibles diferencias cualitativas o cuantitativas que influencia el producto de solubilidad de las sales en sus fermentados.

5^a) En los análisis cromatográficos de acidez realizados en los distintos fermentados, se pone de manifiesto la presencia de los ácidos detectados en el mosto, así como las manchas correspondientes a los fer-

nados durante la fermentación; en los fermentados correspondientes a la *C. pulcherrima* y *Z. varoneae*, se aprecian dos hechos sobresalientes: *C. pulcherrima* no forma, al menos en concentraciones detectables por el método empleado, una sustancia ácida no identificada hasta el presente, y en cambio es la única especie productora de ácido fumárico durante el proceso fermentativo. El *Z. varoneae* presenta una intensidad y extensión en la mancha correspondiente al láctico fuera de lo normal respecto a las restantes especies; este hecho está en consonancia con la alta concentración de acidez en las determinaciones volumétricas.

III.- BALANCE DE ACIDEZ AL TERMINO DE LA FERMENTACION -
DEL MOSTO, A CARGO DE DIFERENTES ESPECIES DE LEVA
DURAS.

Cuando la actividad fermentativa de células de levaduras en mosto, cesa, hay una serie de características macroscópicas en los fermentados cuya intensidad y cualidad depende en gran parte de la especie blastomictica que ha conducido el fenómeno; destacan como características generales, el llegar a una constancia en la pérdida de peso del sistema fermentativo, así como la suspensión del burbujeo que se mantuvo a través del proceso, acompañado de limpidez o no y de un cambio de color, más o menos patente, en el substrato, pero en todos los casos de la existencia de un precipitado en el fondo del recipiente.

Si se partió de un mosto homogéneo y filtrado, es evidente adjudicar a consecuencias fermentativas el precipitado obtenido en los recipientes donde se ha realizado la fermentación, si en los blancos empleados no se ha podido apreciar precipitación alguna.

Es fácil observar, por simple inspección macroscópica, en estos precipitados (en la industria enológicos llamos lías o hacos) formas cristalinas, factibles de separación mecánica e identificables como sales potásicas o cálcicas del ácido tartárico. La influencia -

que el pH y la acidez total ejercen sobre la solubilidad del tartrato cálcico (23, 24, 59), y los factores que determinan la solubilidad de bitartrato potásico en vinos y en soluciones azucaradas (24), ha sido estudiada con detalle.

Por otro lado es un hecho manifiesto que durante el proceso fermentativo además de existir una reducción de volumen, hay formación de nuevos ácidos (ácidos de los que hemos hecho referencia en el segundo apartado de este capítulo); sin embargo el contenido de acidez fija libre (peso por resmas) es superior o ligeramente superior (excepto en los casos del *S. veronae* y del *S. acidifaciens*) en el mosto lo que nos indica que la disminución en la concentración de ácidos es debida a insolubilización de estos ácidos; el hecho de que el pH no varíe al fermentar el mosto o si existe variación sea en el sentido de disminuir, indica el intercambio entre los ácidos formados en el curso fermentativo, permaneciendo en forma libre en solución, y las sales ácidas, que al insolubilizarse se separan del fermentado.

Nuestro trabajo ha ido encaminado a analizar las distintas fracciones ácidas del fermentado, y la acidez en forma de sales que se encuentran en el precipitado del correspondiente fermentado, haciendo un estudio comparativo con las fracciones ácidas del mosto, poniendo de manifiesto el valor cuantitativo y cualitativo del in-

cremento de acidez debido al proceso fermentativo conducido por diferentes especies.

PARTI EXPERIMENTAL

Material y método

Preparamos 7 matraces Erlenmeyer de 100 ml de capacidad, en los que se miden exactamente 50 ml de mosto (densidad 10,5. B; materia reductora al Fehling expresada en glucosa 184 g/l); se esterilizan a vapor fluyente. Dos matraces se utilizan como blancos. Las especies se siembran en los matraces correspondientes preparados al efecto. La temperatura, durante todo el tiempo que dura la experiencia es de 25°C. El cierre se efectúa con válvula Müller cargada de ácido sulfúrico.

Especies de levaduras. Hemos elegido especies representativas de las distintas fases naturales de la fermentación: *S. ellipsoideus* (3ª fase), *T. rosei* (2ª fase), *S. beticus* (aislada de velos), *C. pulcherrima* (1ª fase), incluyendo al *S. veronae* por la peculiaridad presentada en producción de acidez (ácido láctico), con el nº de orden: 3, 9, 13, 18 y 8, respectivamente.

Cada 7 días se controla la producción de CO₂ por la pérdida de peso, la cuarta semana se hacen pesadas cada dos días. A los 30 días se alcanza la constancia en la pérdida de peso. Efectuándose los análisis de la serie y de los blancos.

Métodos analíticos. Acidez volátil, acidez total, acidez fija libre (paso por resinas) y análisis cualitativos

cromatográficos, realizados por las técnicas descritas anteriormente. (pág. 27, 88 y 89).

Determinación de acidez en las lias:

Una vez centrifugado, y lavado con alcohol etílico el precipitado seguimos el siguiente método, inspirado en el de Goldemberg y Geromont para la determinación de tartárico en lias:

1º) Se trata el precipitado con ClH , de densidad 1,10, permaneciendo en maceración a 60-70°C durante 15 minutos. Se filtra, lavando bien el precipitado y el filtro con agua destilada; el filtrado se neutraliza con NaOH 0,1 N.

2º) Se pasa por resina aniónica Zerolit F.F. a razón de 1 ml por minuto; eluyendo con $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 1,5 N.

3º) Los sales amónicas son calentadas en un baño de agua a 70°C hasta no detectar amoníaco en los vapores desprendidos.

4º) Se dejan enfriar y se pasan a través de la resina catiónica Zerolit 225.

5º) Se concentra al baño maría, hasta que los vapores desprendidos no den reacción ácida al papel tornasol; las paredes del vaso se lavan repetidamente.

6º) Finalmente se valora con NaOH 0,08 N empleando fenolftaleína.

Este procedimiento se ha ensayado con soluciones puras de ácido tartárico y málico, obteniéndose re-

sultados exactos; cuando en este tipo de soluciones se pasó oxálico, se obtuvieron resultados experimentales bajos.

Resultados.

Los resultados analíticos obtenidos los presentamos en la tabla nº VI. Expresamos la acidez volátil, acidez total, acidez fija libre (es decir previo paso por resinas aniónicas y catiónicas) en miliequivalentes por litro de mosto y de fermentado. Incluimos los valores encontrados para la acidez presente en las lías de las distintas especies; también incluimos datos referentes a la reducción de volumen debido fundamentalmente al desprendimiento de CO_2 , y finalmente al aumento de acidez debido a la fermentación, expresada en miliequivalentes por litro de mosto fermentado, calculada restando de la suma de ácidos volátil, acidez fija libre y acidez del precipitado (expresadas todas en meq/l de mosto fermentado), la acidez del mosto, formada por la suma: acidez volátil y acidez fija libre (paso por resinas).

La figura nº 12 representa el cromatograma de acidez realizado con los precipitados de los fermentados, - previamente pasados por resinas.

Conclusiones.-

1º) Existe un aumento de acidez debido a la actividad fermentativa, siendo, a igualdad de todas las demás variantes que pueden modificarla, función de la actividad específica de formación de ácidos de la cepa empleada.

2ª) Los valores obtenidos para los aumentos de acidez en la fermentación a cargo de los representantes de las especies de las tres fases fermentativas presentan diferencias que no guardan proporción con la producción de CO_2 ó dicho de otro modo no están en razón directa del poder fermentativo.

3ª) Las especies filmógenas presentan mayor producción de acidez, durante el proceso fermentativo - en condiciones anaeróbicas, que las especies de la última fase fermentativa debida fundamentalmente a fracciones ácidas volátiles. Esta consecuencia se obtiene comparando los análisis correspondientes al fermentado del *S. beticus* con el del *S. ellipsoideus*.

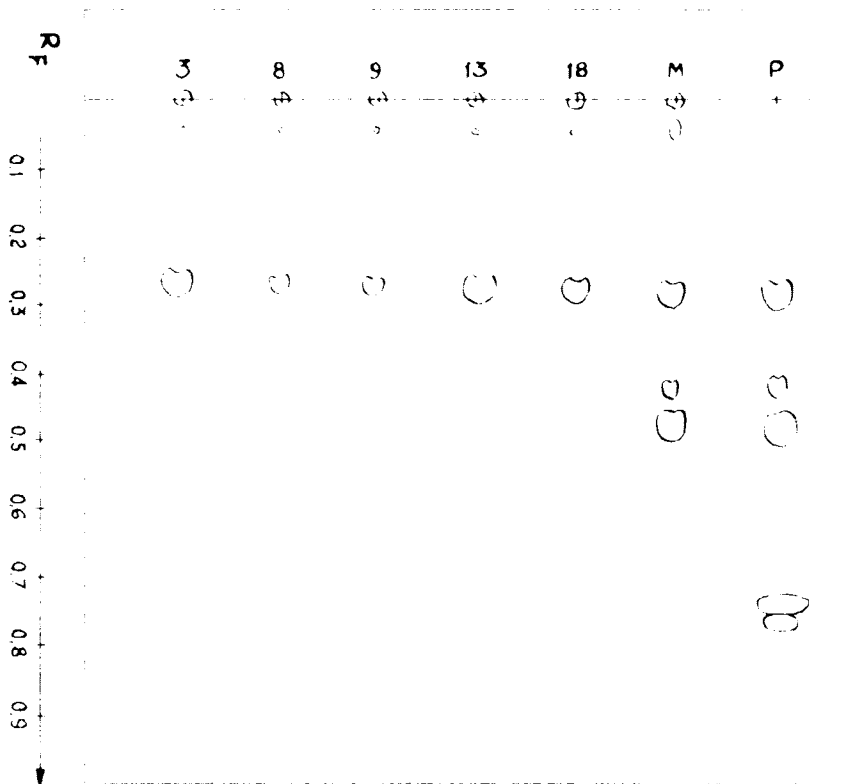
C. pulcherrima y *T. rosei* tienen una baja producción en acidez, siendo ligeramente inferior en la última.

El *S. veronae*, especie aislada de la segunda fase fermentativa presenta una extraordinaria producción de acidez; cromatográficamente se pone de manifiesto como una gran parte de esta producción corresponde a ácido láctico.

C. pulcherrima presenta la propiedad diferencial de no producir una sustancia con carácter ácido detectada cromatográficamente en todos los demás fermentados.

CROMATOGRAMAS DE ACIDEZ

DE LOS
PRECIPITADOS PRODUCIDOS EN LA FERMENTACION DEL MOSTO
Watman n°1. Butanol-n-: Fórmico 4N: AGUA(1 1 2). Técnica descendente.



PRECIPITADOS producidos en la fermentación del mosto correspondientes a los cepas: *S. ellipsoideus*; *Z. veronae*, *T. rosei*; *S. beticus*; y *C. pulcherrima*.

M: mosto empleado en la fermentación.

P: solución acuosa de ácidos puros: tartárico $R_F = 0.29$; cítrico $R_F = 0.43$; málico $R_F = 0.52$; láctico $R_F = 0.72$.

succínico $R_F = 0.76$.

Figura 12.

48) En los precipitados obtenidos en la fermentación del mosto a cargo de las diferentes especies, se encuentran presentes sales de tartárico y lágarisinas - cantidades de oxalatos, sin que hayamos detectado otras sales de ácidos orgánicos.

CAPITULO VI

I.- LOS ACIDOS ORGANICOS DEL VINO.-

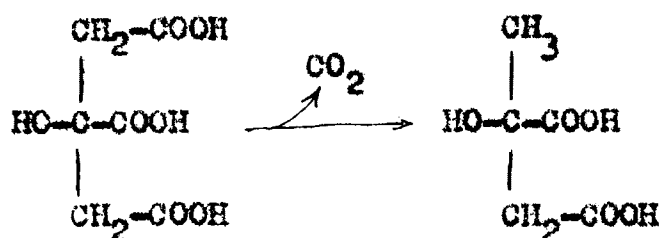
Los fermentados en pureza de mosto se pueden considerar como soluciones ácidas hidroalcohólicas, en los que la concentración relativamente elevada de hidrogeniones se debe a la ionización de los ácidos existentes en el mosto (oxálico, tartárico, málico y cítrico) y a la aportada por los producidos durante la fermentación alcohólica; succínico, láctico y acético, fundamentalmente.

En determinados tipos de vinos se han podido detectar los ácidos mándelico o amigdalico (61) y (62), - quinico (considerado como el primer eslabón en la biosíntesis de cuerpos aromáticos), shikimico, fumárico (en algunos vinos nuevos) y pirrolidincarboxílico.

Especial atención merece el hallazgo de ácido citramílico en vinos analizados cromatográficamente, motivo de un trabajo experimental para aclarar el origen, precursores, así como el mecanismo mediante el cual se forma (61).

II.- ORIGEN DE LOS ACIDOS PRODUCIDOS DURANTE LA FERMENTACION ALCOHOLICA DE MOSTO.

J. Carles al encontrar ácido citramálico en toda una serie de vinos, ha establecido la hipótesis de la existencia de una fermentación llamada citramálica, teniendo cierto paralelismo con la fermentación maloláctica, y consistiendo en esencia en una descarboxilación de ácido cítrico:



Sin embargo este hecho tiene menor importancia cuantitativa, pues el contenido en ácido cítrico es mucho menor que en ácido málico tanto en los mostos como en los vinos.

El ácido citramálico puede metabolizarse a su vez, dando ácido pirúvico y ácido acético.

El mismo autor realizó ensayos para poner en claro el origen de este ácido en el vino (61), adicionando cítrico, pirúvico y propiónico a respectivas muestras de vinos de Gaillac, sometidos a fermentación maloláctica, observando un ligero aumento de citramálico

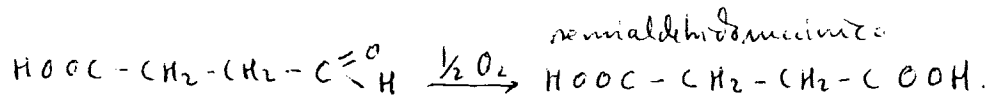
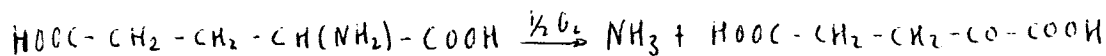
en el ensayo que se había adicionado un 2% de ácido cítrico.

El autor sugiere, sin descartar una posible identidad entre las bacterias malolácticas y las que puedan realizar esta transformación, que la fermentación citromálica está fundamentalmente sincronizada con la fermentación alcohólica, mientras que la fermentación maloláctica tiene lugar cierto tiempo después de la fermentación alcohólica. También abre un interrogante, sobre la posibilidad de que la fermentación maloláctica esté enlazada a la citromálica, de tal manera que durante la fermentación alcohólica pueda ocurrir una descarboxilación suministrando cantidades insignificantes de láctico y la mayor parte de citramálico, y posteriormente tenga lugar el segundo proceso de descarboxilación sobre el ácido málico para dar láctico; o bien que la fermentación maloláctica provenga directamente de los glúcidos por metabolización de levaduras o bacterias.

Nosotros en las experiencias realizadas con 18 especies de levaduras, no hemos detectado, empleando las técnicas cromatográficas descritas (págs 89 y 90), ácido citramálico, en ninguno de los fermentados en pureza obtenidos a partir del mosto estudiado bajo este mismo aspecto.

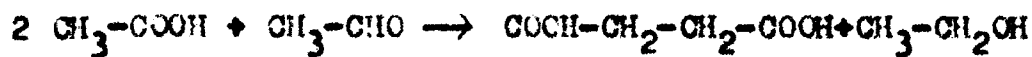
Erllich en 1909 después de una serie de ensayos con varios aminoácidos, comprobó que el ácido glutámico

era el único que añadido a un medio en fermentación, producía un sensible aumento en la concentración de ácido succínico formado, según el esquema:



El ácido succínico no se produce, en las anteriores condiciones, en ausencia de azúcar, ni con el empleo de células vivas de levaduras, ni por sistemas enzimáticos extraídos de las mismas. Además se ha comprobado, - posteriormente, que mostos conteniendo poco ácido glutámico o cetoglutarico, así como en medios privados de estos ácidos, se producen cantidades significativas de ácido succínico en la fermentación alcohólica. Por este motivo se le atribuyó otro origen al ácido succínico producido en la fermentación alcohólica de mostos.

Para la formación de succínico en anaerobiosis - Ribereau-Gayon, J; Peynaud, E; y Lafon M. proponen la ecuación siguiente (10) y (11):



En esta condensación actúa como aceptor de hidrógeno el acetaldehído. Esta hipótesis parece confirmarse por los siguientes hechos experimentales:

a) Una adición, al medio en fermentación, de acetaldehído

do o pirúvico, produce un incremento en ácido succí
nico.

b) Al adicionar acetato sódico marcado en un átomo de
carbono se aísla del medio fermentado ácido succini
co radiactivo.

De aquí se deducen que el ácido acético es un -
eslabón intermedio en la transformación de los azúcares
en ácidos succinico; y que este mecanismo es más proba-
ble que el ciclo de Krebs o que la reacción de Wood y -
Werkman: $\text{CH}_3\text{-CO-COOH} + \text{CO}_2 \text{ — COOH-CH}_2\text{-CO-COOH}$.

Aunque la formación de ácido cítrico es típica
de la actividad de microorganismos de metabolismo oxida
tivo, existe un proceso de formación de ácido cítrico -
conectado con la fermentación alcohólica, llevada a ca-
bo por acción de Blastomicetos. La producción de este
ácido en el transcurso de la fermentación alcohólica -
normal del mosto, a cargo de levaduras, ha sido observa
da por algunos investigadores (63), así L. Gentillini,
J. Ribereau-Gayon y E. Peynaud, han podido poner de ma-
nifiesto la formación de una sensible cantidad de ácido
cítrico en el curso de la fermentación del mosto.

El origen del ácido láctico en la fermentación
del mosto se presta a la coexistencia de varias hipóte-
sis:

a) Puede proceder de la degradación de los glucidos -
por vía fermentativa, por reducción biológica del -

ácido piruvico, en presencia de DPNH + H y del sistema enzimático correspondientes:



b) Puede proceder de una descarboxilación enzimática - de ácido málico, tal como tiene lugar en la fermentación maloláctica, nuestra de manifiesto después que ha tenido - lugar la fermentación alcohólica.

c) La hipótesis de que proceda, al menos en parte, de - la autólisis de las células de levadura presentes en el sustrato, tampoco puede ser excluida hasta el presente.

Resulta difícil, como demuestra la existencia de diversas hipótesis sobre el origen y el mecanismo de producción de ácidos durante la fermentación, sacar conclusiones de validez general, pues por un lado la especificidad fermentativa como consecuencia de la distinta fisiología de las especies de levadura, y por otro la composición variable de sustratos tan complejos como son el - mosto y el vino, obligan a trabajar, definiendo lo más - exactamente posible todas las condiciones que influyen - en la marcha del proceso.

PART E EXPERIMENTAL

El estudio experimental realizado está orientado

a la identificación, por técnicas cromatográficas, de los ácidos formados durante la fermentación alcohólica del mosto, en función de diferentes especies de levaduras; haciendo un estudio previo de las técnicas cromatográficas utilizadas en este tipo de trabajos.

Se ha hecho un estudio comparativo de soluciones acuosas de ácidos puros, de mosto y de los fermentados en pureza resultantes de la actividad biológica de las 18 especies de levaduras en estudio.

Material y método.-

Disponemos una serie de 20 matraces Erlenmeyer de 100 ml. de capacidad, conteniendo 50 ml de mosto estéril.

Se realiza la siembra de las 18 diferentes especies en los 18 matraces preparados al objeto; dos matraces, con mosto estéril, se emplean como blancos; uno se analiza al tiempo de sembrar la serie, y otro cuando se considera finalizada la fermentación de toda la serie.

La temperatura se mantiene durante todo el tiempo que dura la experiencia a 25°C. Se emplean válvulas Müller, cargadas de sulfúrico, para el cierre de los matraces.

Controlando la pérdida de peso de la serie se sigue el desarrollo de la fermentación y cuando se alcanza la constancia de peso en todas las unidades de la serie, se procede al análisis cromatográfico, incluyendo el

blanco.

Las técnicas cromatográficas empleadas han sido descritas en el Capítulo anterior (págs 89 y 90). Hemos realizado ensayos de cromatograma mono y bidimensionales, ambos con técnicas descendentes, analizando paralelamente mosto, el fermentado en pureza a cargo de la especie *S. italicus* (cepa nº I) y solución acuosa de ácidos puros: acético, oxálico, bitartrato, tartálico, cítrico, málico, láctico, succínico y fumárico.

En el revelado de cromatogramas hemos ensayado tres métodos:

1º) Empleo de azul de bromofenol.

2º) a- Pulverizar sobre el papel una solución de ninhidrina (al 0,25% en butanol), introduciendo el papel en estufa a 80°C durante 5 minutos.

b- Posterior pulverización sobre el papel de la solución de azul de bromofenol (50 mg disueltos en 100 ml de alcohol etílico, y adición de NaOH 0,1 N, hasta obtener color púrpura).

3º) Empleo del revelador utilizado por J. Páscová y Munk (53).

Resultados.-

Estos ensayos de los que exponemos los tipos de cromatogramas en las figuras 11 y 13 nos han permitido adoptar la técnica descendente monodimensional para toda la serie de fermentados en pureza, ya que si bien la

doble dimensión aporta una clara separación entre las manchas, es a costa de una menor intensidad en los mismos especialmente cuando la concentración del ácido es baja, teniendo por otro lado la limitación de tener que utilizar un papel por cada muestra de fermentado.

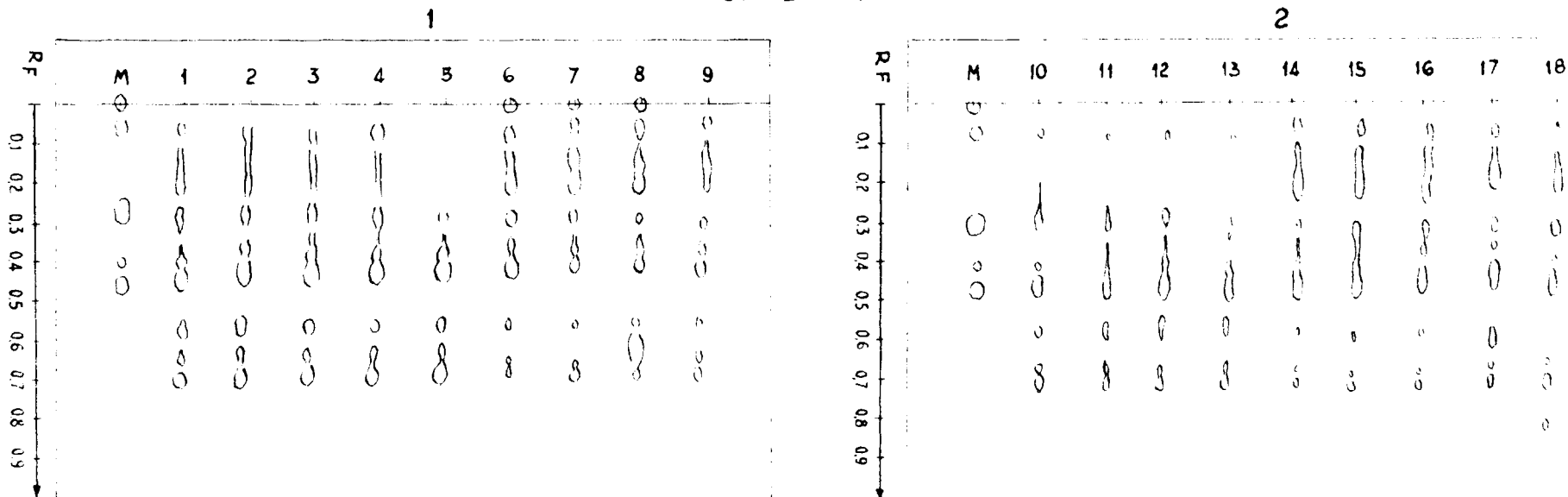
En cuanto al revelador preferimos emplear el ensayado en segundo lugar, puesto que con el empleo de ninhidrina, detectamos previamente las manchas de aminoácidos, que al no coincidir con las que aparecen al pulverizar el azul de bromofenol descartan la posibilidad de que estas últimas tengan estructura de aminoácidos.

En cuanto al revelador propuesto por J. Pascové y Munk hemos podido apreciar sus ventajas, pero los colores varían sensiblemente con el tiempo perdiendo su carácter de identificación. Con este revelador la sustancia de carácter ácido de $R_f = 0,58 - 0,60$, no identificada, da una coloración azul-violeta, frente a los colores claros, nómuras, o rojos obtenidos con los ácidos empleados como testigos. Los resultados obtenidos al cromatografiar el mosto y los fermentados en pureza a cargo de las 13 diferentes especies de levaduras los exponemos en las figuras nº 13.

CONCLUSIONES

1º) El estudio cromatográfico cualitativo de acidez realizado al mosto empleado y a los fermentados a cargo de 13 especies de levaduras, pone de manifiesto

**CROMATOGRAMAS DE ACIDEZ CORRESPONDIENTES AL MOSTO Y A LOS FERMENTADOS
RESULTANTES DE LA ACTIVIDAD DE LAS 18 ESPECIES
DE LEVADURAS.**



TECNICA: MONODIMENSIONAL, DESCENDENTE.- **SOORTE DE LA FASE ACUOSA:** PAPEL WATMAN N° 1.

SOLVENTE EMPLEADO: BUTANOL 71 : FORMICO 4N : AGUA (1:1:2)

REVELADOR: (I) NINHIDRINA (AL 0.25% EN BUTANOL); LAS MANCHAS CORRESPONDIENTES NO SE HAN REPRESENTADO.

(II) AZUL DE BROMO FENOL.

1
M = Mosto
1 = *S. italicus*
2 = *S. margini*
3 = *S. ellipsoideus*
4 = *S. ellipsoideus*

5 = *S. oviformis*
6 = *K. apiculata*
7 = *C. mycoderma*
8 = *Z. veronae*
9 = *T. rosei*

2
M = Mosto
10 = *S. montuliensis*
11 = *S. rouxii*
12 = *S. cheresiensis*
13 = *S. beticus*

14 = *K. magna*
15 = *H. anomala*
16 = *Z. acidifaciens*
17 = *S. pastorianus*
18 = *C. pulcherrima*

Figura 13

que durante la fermentación alcohólica de mosto todas las especies empleadas en este trabajo, forman láctico y succínico, así como una sustancia de carácter ácido de $R_f = 0,58-0,60$, no identificada hasta el presente en vinos; la *C. pulcherrima* es la única excepción, ya que no produce esta sustancia o lo hace en concentraciones no apreciables.

2ª) Por la intensidad y extensión de las manchas se observa una superior producción de succínico y láctico en las especies: *S. italicus*, *S. mangini*, *S. ellincoideus*, *S. oviformis* y en todas las especies filamentosas ensayadas: *S. montuliensis*, *S. rouxii*, *S. cheresiensis* y *S. beticus*, frente a las especies *K. apiculata*, *C. micoderma*, *T. rosei*, *K. magna*, *H. anomala*, *S. pastorianus* y *C. pulcherrima*.

3ª) La especie *Z. veronae* presenta una extraordinaria capacidad de producción de ácido láctico; este hecho ya lo pusimos de manifiesto en el Capítulo II.

La especie *C. pulcherrima* es la única entre todas las ensayadas que no produce una sustancia ácida de $R_f = 0,58-0,60$, y la única productora de ácido fumárico en cantidades apreciables.

4ª) La concentración de bitartrato y tartárico en los fermentados correspondientes a las especies filamentosas: *S. montuliensis*, *S. rouxii*, *S. cheresiensis* y *S. beticus*, es casi inapreciable en los cromatogramas,

especialmente la banda de bitartratos; estas mismas manchas son un poco más intensas en los fermentados correspondientes a las especies *S. italicus*, *S. mangini*, *S. ellipsoideus* y *S. oviformis*, pero inferiores a las presentadas por los fermentados de las restantes especies.

CAPITULO VII

ESTUDIO CUALITATIVO DE LA METABOLIZACION DE LA ACIDEZ - ORGANICA FIJA DEL VINO, POR LA ACTIVIDAD AEROBICA DE - DISTINTAS ESPECIES DE LEVADURAS.

PARTE TEORICA

Es notoria la capacidad que presentan las células de algunas especies de levaduras para multiplicarse en substratos naturales, sobre las que previamente han desarrollado actividad fermentativa. Es el caso de algunas especies de levaduras que en determinadas condiciones tienen una capacidad adaptativa, a la vida aeróbica, de sus sistemas enzimáticos, multiplicándose en la superficie libre del substrato, llegando a producir notables modificaciones en la composición química de los mismos. Este hecho es el fundamento del envejecimiento biológico de vinos, característico de las zonas vitivinícolas de Jerez y Montilla, presentándose también en otros puntos aislados de la Península. La evolución de los componentes fundamentales de los vinos por especies filmógenas ha sido estudiada con detalle (64).

Con el suministro de oxígeno al medio se puede conseguir activar la acción biológica de un gran número de especies de levaduras y como consecuencia obtener una degradación más avanzada de algunos componentes del

substrato, que todavía presentan una considerable energía potencial en su estructura molecular, y al mismo tiempo variables cantidades de levadura, dependiendo de la especie, de la composición del medio y de los factores físico-químicos que rigen el proceso.

Numerosos trabajos han puesto de manifiesto la capacidad de estas células para multiplicarse a expensas de fuentes hidrocarbonadas en cuya composición entran exclusivamente ácidos que están relacionados o toman parte activa en el ciclo de Krebs (65, 66, 67).

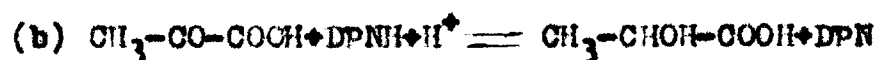
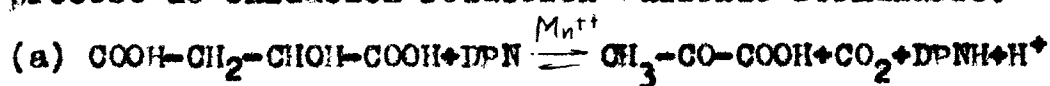
Por otro lado, la degradación de los ácidos orgánicos en los vinos es un fenómeno al que se le ha venido prestando atención desde hace tiempo, especialmente el conocido con el nombre de fermentación maloláctica. Pero las dificultades que se presentan para reproducir y controlar este fenómeno, le otorgan un carácter indefinido y espontáneo, que ha motivado la dedicación de un gran número de trabajos, así como las más diversas hipótesis, no solo sobre el mecanismo biológico del proceso, sino también sobre los agentes microbiológicos implicados en él.

Gracias a los trabajos de Ochoa y sus colaboradores (68, 69, 70), el mecanismo enzimático de la degradación del ácido málico ha sido puesto en claro, aislando de hígado de palomo y del *Lactobacillus arabinosus* - adaptado a la degradación de ácido l-málico, una enzima

que cataliza la reacción:



La málico-enzima aislada del *Lactobacillus arabinosus* requiere la presencia de difosfopirifinnucleotido (D.P.N.) e iones manganeso; la reacción supone un proceso de oxidación reducción pudiendo formularse:



Las reacciones que explican el mecanismo del proceso están de acuerdo con el hecho de haber aislado, en todos los casos, junto a málico-enzimas, el enzima lactico-deshidrogenasa específica de la reacción (b).

Respecto a la degradación de ácido cítrico en vinos existen diversas hipótesis basadas en los hechos experimentales encontrados (61, 71).

Aparte del valor aplicativo que presenta la multiplicación celular en subproductos que se pueden utilizar como sustratos naturales, la metabolización de determinados ácidos o el valor nutritivo de los mismos, como una consecuencia de la fisiología celular podría suministrar nuevos criterios con valor taxonómico.

PORTE EXPERIMENTAL

La capacidad de las diferentes especies de levaduras para metabolizar los ácidos orgánicos del vino ha

sido estudiada en un sustrato natural como es un fermentado de mosto a cargo de una especie de levadura, al que se había privado por destilación al vacío de un 95-99% de alcohol, actuando como soporte de los ácidos orgánicos fijos y siguiendo por análisis cromatográfico sobre el papel, en cultivos sumergidos, la evolución de los ácidos objeto de estudio.

MATERIAL Y METODO:

El sustrato empleado es un fermentado de mosto a cargo de la especie *S. itálica*, al que se priva de alcohol, por destilación al vacío, hasta dejarlo con un 2% de alcohol como máxima.

Se distribuye en dos series de matraces Erlenmeyer de 100 cc. de capacidad; cada serie consta de 20 unidades. La primera serie (Serie A) contiene 25 cc. de sustrato, y la segunda (Serie B) 50 cc. Se procede a la esterilización y después al análisis de un blanco de cada serie: controlando la acidez total, el pH y la presencia de los ácidos existentes en el fermentado en pureza, empleando para ello la técnica cromatográfica adoptada en este trabajo.

Las series se introducen en un agitador-bandeja de 72 r.p.m., conociendo la relación volumen del medio de cultivo, volumen total del Erlenmeyer, calcula los valores para la absorción de oxígeno según el procedimien-

to expuesto en el trabajo de Hodge y Roth (72).

Se realizan cromatogramas a las 72, 144, 264 y 384 horas, y a los 38 y 48 días de agitación. Después de 10 días de suspender la agitación se realizan cromatogramas de acidez en ambas series.

La toma de muestras se realiza con pipetas de 1 ml estériles, en cámara de siembras previamente esterilizada.

En cada papel de cromatograma va un punto con muestra del blanco y al que en cada tiempo se refieren la evolución de los ácidos por diferentes especies de levaduras.

RESULTADOS:

I.- A las 72 horas de agitación

Blancos: presentan la misma situación que en el tiempo.

Cepas núms. 1, 2, 3, 4 y 5: Se observa la desaparición de ácido láctico, al menos hasta el límite de apreciación del método cromatográfico; el resto de los ácidos permanece prácticamente igual que en los blancos.

Cepa Nº 6: Las manchas obtenidas se corresponden exactamente con los blancos. No se aprecia disminución en la concentración de ninguno de los ácidos.

Cepas núms. 7 y 15: Presentan la desaparición de las manchas correspondientes a todos los ácidos, excep-

to la de RF = 0'58-0'60.

Cepas núms. 8 y 9: Se aprecia comparativamente con los blancos un ligero consumo de láctico en la n^o 8 y prácticamente total en la n^o 9.

Cepas núms. 10, 11 y 12: Todos han consumido láctico, los demás ácidos permanecen sin apreciable degradación.

Cepas núms. 13 y 14: No presentan diferencias apreciables con el blanco.

Cepas n^o 16: Presenta vestigios de láctico: los demás ácidos presentan la misma extensión o intensidad en sus manchas que en el blanco.

Cepa n^o 17: Se observa una ligera disminución en la mancha de láctico. No hay modificación apreciable en las restantes.

Cepa n^o 18: El consumo de láctico y succínico llega al límite de apreciación del método cromatográfico; aunque existen ligeros vestigios de succínico; se observa un sensible consumo de cítrico y málico. La substancia se caracter ácido de RF = 0'58- 0'60 permanece prácticamente igual al blanco.

II.- A las 144 horas:

Blancos: Permanecen las manchas del control.

Cepas núms. 1, 2, 3, 4, y 5: Se confirma el total consumo de láctico y una ligera disminución de la concentración de succínico.

Cepas núms. 6, 7, 9, 14, 15 y 17: No presentan va-

riaciones respecto al cromatograma anterior.

Cepa nº 8: Ha presentado una evolución notoria, desapareciendo totalmente las manchas correspondientes al láctico y succínico, y reduciéndose a una ligera banda las manchas de cítrico y málico. Solo permanece igual al blanco la mancha de $RF = 0.58 - 0.60$.

Cepas núms. 10, 11 y 12: Se observa la aparición de una banda del mismo carácter (RF) que al ácido acético.- El consumo de ácidos no sufre variación apreciable.

Cepa nº 13:- Se observa disminución en la banda correspondiente al ácido láctico.

Cepa nº 16: Desaparición de láctico hasta el límite de apreciación de la técnica cromatográfica empleada.

Cepa nº 18: Ligero consumo de málico.

III.- A las 264 horas:

Blancos: Permanece con la misma extensión e intensidad las manchas observadas en el cromatograma correspondiente al tiempo.

Cepas núms. 1, 2, 3, 4 y 5: Desaparición total de la mancha correspondiente al ácido láctico: presentan consumo de succínico.

Cepas núms. 6, 7, 9, 14, 15, 16 y 17.- No presentan variaciones respecto al cromatograma anterior.

Cepa nº 8: Sigue la metabolización de ácidos: han desaparecido totalmente las manchas de láctico, succínico, málico y cítrico, solo queda una ligera banda de -

bitartatos, y un ligero vestigio de tartárico.

Cepas núms. 10, 11, 12 y 13: No es perceptible la mancha correspondiente al láctico, tampoco es apreciable la correspondiente al succínico en las 12 y 13; las 10 y 11 presentan vestigios de succínico.

Cepa nº 18: La única mancha apreciable en la correspondiente a la sustancia ácida de $Rf = 0'58 - 0'60$.

IV.-- A las 384 horas:

La degradación de los ácidos por las distintas especies es cada vez más lenta, haciéndose patente en algunas especies una fase estacionaria.

Cepas núms. 1, 2, 3, 4 y 5: Han agotado el ácido láctico y han metabolizado casi todo el succínico.

Cepas núms. 6 y 14: Permanecen con la misma extensión e intensidad que las manchas aparecidas en el blanco.

Cepas núms. 7, 8, 15 y 18: Han agotado todos los ácidos excepto el correspondiente a la mancha de $Rf = 0'58 - 0'60$.

Cepas núms. 9 y 10: Presentan una degradación de ácidos del mismo orden: degradan totalmente el láctico, y parte del succínico.

Cepas núms. 11 y 13: Degradación total de láctico; se aprecian vestigios de succínico.

Cepa nº 12: Total degradación de ácido láctico y succínico; vestigios de ácido cítrico y málico.

Cepas núms. 16 y 17: Degradación total de ácido láctico.

V.- A los 38 días de agitación:

Blancos: La intensidad de las manchas aparece reformada.

Cepas: Se ha observado un aumento de acidez en todas las cepas, existiendo ligeras diferencias y destacando la aparición de ácidos volátiles, láctico, málico y fumérico; permaneciendo con la misma intensidad y extensión la mancha correspondiente a la sustancia ácida de $R_f = 0'58 - 0'60$. Se ha puesto de manifiesto la producción de aminoácidos no coincidiendo sus R_f con ninguno de los ácidos que hemos venido considerando en este estudio.

VI.- A los 48 días de agitación: Se realiza un cromatograma con los matraces de la serie B; la extensión e intensidad de las manchas es del mismo orden que las obtenidas en la serie A. en 384 horas de agitación, poniendo de manifiesto la importancia de absorción de oxígeno por las células, impuesta por la agitación y disposición del medio de cultivo.

VII.- A los 10 días de haber suspendido la agitación:

Aparición de intensas y extensas bandas de acidez, en todos los cultivos de las diferentes especies; se observa un aumento en la intensidad y extensión de las manchas correspondientes a los aminoácidos.

COMENTARIO:

Las especies *S. italicus*, *S. mangini*, *S. ellipsoideus* y *S. oviformis*, son capaces de crecer en el medio ensayado, degradando láctico, succínico y cítrico; en cambio el consumo de málico es inapreciable. La substancia de carácter ácido de Rf - 0'58 - 0'60 no es degradada por estas especies al menos en las condiciones del ensayo.

Las especies *K. apiculata* y *K. magna*, alcanzan un desarrollo precario y desde luego no utilizan ninguno de los ácidos en estudio; si bien la *K. magna* presenta un ligero consumo de láctico.

C. micoderma y *H. anomala* presentan los más rápidos y ponderables desarrollos celulares de todas las especies ensayadas, agotando todos los ácidos del medio ensayado, detectables por la técnica cromatográfica empleada, excepto la substancia de carácter ácido de Rf = 0'58 - 0'60 alcanzando esta situación a las 72 horas de agitación.

La especie *C. pulcherrima* presenta un crecimiento proporcional al tiempo de agitación y al consumo de ácidos; en esta especie se pone de manifiesto de manera patente la secuencia de metabolización de los ácidos, en las condiciones descritas, siendo la siguiente: láctico, succínico, cítrico y málico; la substancia de carácter ácido de Rf - 0'58 - 0'60 no es degradada.

La especie *Z. veronae* presenta un crecimiento análogo al obtenido por la *C. pulcherrima*, diferenciándose únicamente en presentar una velocidad menor en la metabolización de ácidos.

Z. acidifaciens y *S. pastorianus* solo muestran capacidad de metabolizar ácido láctico, en las condiciones del ensayo.

Las especies filmógenas: *S. montuliensis*, *S. reu xii*, y *S. beticus*, tienen un comportamiento idéntico en lo que a degradación de ácidos se refiere; agotando totalmente, del substrato empleado, láctico y succínico y disponiendo parcialmente de cítrico y málico.

El *S. cheresiensis* solo deja vestigios de málico y cítrico; el crecimiento celular es más acusado que en las anteriores cepas.

CONCLUSIONES.-

1ª) Las especies *C. microderma*, *H. anomala*, *Z. veronas* y *C. pulcherrima* metabolizan, en las condiciones descritas, los ácidos láctico, succínico, cítrico y málico, presentes en el vino; una substancia ácida de $R_f = 0.58 - 0.60$ es la única que permanece inatacable a través de todo el tiempo que dure la experiencia. Las dos primeras especies, dentro del intervalo de tiempo de 71 horas de agitación, alcanzan la situación descrita; mientras las dos restantes especies necesitan 384 horas para alcanzar dicho estado, poniéndose de manifiesto la secuencia de metabolización de los mismos.

2ª) Las especies *K. apiculata* y *K. magna* son incapaces de metabolizar los ácidos estudiados en las condiciones del presente trabajo.

3ª) Las especies *S. italicus*, *S. ellipsoideus*, - *S. mangini*, *S. oviformis*, *S. montaliensis*, *S. rouxii* y *S. beticus* metabolizan láctico y succínico, y parcialmente cítrico y málico; destacada la mayor capacidad del *S. chere* *siensis* para metabolizar cítrico y málico, hasta el punto de casi agotarlos.

4ª) *Z. acidifaciens* y *S. pastorianus* solo metabolizan ácido láctico y parcialmente succínico.

5ª) La sustancia de carácter ácido de $R_f = 0.58-0.60$, que a lo largo de los trabajos cromatográficos hemos venido detectando, y llamando la atención sobre su presencia en los fermentados, no es metabolizada por ninguna de las especies ensayadas, en las condiciones de la experiencia.

6ª) Si el período de agitación se prolonga, después de obtener un estado estacionario en la metabolización de ácidos, tiene lugar una producción de acidez; detectándose un incremento en la intensidad y extensión de las manchas correspondientes a aminoácidos.

CAPITULO VIII

ESTUDIO DE UNA SUBSTANCIA CON CARACTER ACIDO QUE APARECE EN FERMENTADOS DE MOSTO A CARGO DE DIFERENTES ESPECIES DE LEVANTURAS VINICAS.

En el estudio cualitativo de los ácidos orgánicos habíamos identificado por cromatografía las manchas correspondientes a las sustancias ácidas capaces de producir el viraje del indicador ácido-base empleado; los ácidos correspondientes a estas manchas son los descritos en la bibliografía sobre esta cuestión; sin embargo hemos podido detectar, al contrastar con soluciones puras de diferentes ácidos orgánicos, con existencia habitual o circunstancial en los vinos, una sustancia ácida con un Rf que no coincide con los ácidos patrón ensayados.

Estas observaciones han sido hechas a través de todo el trabajo cromatográfico realizado en los distintos fermentados en pureza, poniendo de manifiesto que esta sustancia de carácter ácido se forma durante la fermentación del mosto por acción de cualquiera de las especies ensayadas, exceptuando la *C. pulcherrima*.

Por la extensión e intensidad de las manchas correspondientes a esta sustancia, comparadas con las de otros ácidos presentes en los fermentados, deducimos que

La concentración de la misma es baja, del orden de 10^{-1} gramos por litro como máximo; motivo que nos condujo a pensar en la técnica cromatográfica como un auxiliar para su identificación. Se cromatografiaron junto al fermentado en pareza soluciones acuosas de ácidos puros, - cuya presencia se había descubierto en toda clase de vinos, así como los que accidentalmente pueden formar parte de los mismos; además ampliamos este tipo de ensayos con algunos de los ácidos que desde un punto de vista teórico podrían estar implicadas en el mecanismo fermentativo.

De la diferencia de valores de Rf obtenidos para los ácidos empleados como patrones y el valor del Rf de la sustancia que tratamos de identificar, así como teniendo en cuenta los ácidos que forman bandas o dan lugar a dos o más manchas, hemos podido descartar los siguientes ácidos: láctico, β -hidroxipropionico, β -hidroxibutírico, glioxílico, glicólico, α -hidroxisobutírico, α -hidroxicapronico, α -hidroxisocaprónico, mevalónico, α -cetoglutérico, oxalacético, pirúvico, succínico, málico, tartárico, cítrico, isocítrico, cis-aconítico, fosfoglicérico y oxálico.

AISLAMIENTO.

Con estos primeros datos negativos a cerca de la sustancia con caracter ácido, presente en las fermen

tados en pureza, y habiendo obtenido en el estudio que hicimos sobre metabolización de ácidos en los fermentados por diferentes especies, que la *H. anomala*, *C. micoderma* y *C. pulcherrima* son capaces de agotar, en cultivos sumergidos, todos los ácidos excepto esta substancia pensamos aplicar la capacidad de estas levaduras como un paso interesante en el aislamiento de esta substancia.

Entonces decidimos hacer una serie de ensayos, para determinar el tiempo de metabolización de los restantes ácidos en función de la relación S/V.

Realizamos ensayos en matraces Erlenmeyer de 100 ml de capacidad, poniendo 25 y 50 ml de sustrato.

Se dispone de mosto fermentado en pureza a cargo de la cepa N° 1, y al que previamente se ha privado de alcohol por destilación al vacío. Una vez distribuido en las series respectivas, esterilizado, y sembrado con las 3 especies en estudio, se coloca en el agitador-bandeja de 72 r.p.m. Se realizan cromatogramas control a las 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 148 horas.

C. micoderma y *H. anomala* agotan todos los ácidos exceptuando la substancia problema, en un tiempo que oscila entre las 24 y 48 horas de agitación, para los matraces con 25 ml. de sustrato y de 120 a 148 horas para los matraces que contienen 50 ml. La especie *C. pulcherrima* es mucho más lenta en la metabolización de estos ácidos, necesitando 268 horas en los matraces con 25 ml.

y 504 horas, en los matraces con 50 ml de sustrato.

Adoptamos como más conveniente la relación de 50 ml de sustrato en Erlenmeyer de capacidad total de 100 ml; y utilizamos la cepa nº 15 (*H. anomala*), como la especie de levadura encargada de privar el sustrato de ácidos orgánicos, exceptuando la substancia que tratamos de aislar.

Material y método.-

Empleamos mosto de idéntica composición al que hemos venido utilizando en estos trabajos; una vez terminada la fermentación a cargo de la cepa nº 1 (*S. italicus*); efectuando un análisis de control de los ácidos presentes, se destila al vacío hasta conseguir que la concentración de alcohol sea menor del 1%. Después de esterilizado se procede a otro análisis cromatográfico de ácidos, y posteriormente se siembra con la cepa nº 15 (*H. anomala*).

El cultivo (1000 ml de sustrato en Erlenmeyer de 2000 ml) se coloca en un agitador bandeja de 72 r.p.m. Se realizan medidas de pH, siguiendo por el aumento de este la marcha del proceso; cuando los valores de pH se aproximan a 6, se empieza el control cromatográfico; observándose que para un pH comprendido entre 6,7 y 7,2 han sido degradados los ácidos orgánicos, pues solo aparece la mancha correspondiente a la substancia ácida que tratamos de aislar.

Una vez conseguida esta situación en el sustrato, separamos por centrifugación la masa celular formada. Con una porción del líquido obtenido realizamos ensayos para aislar esta sustancia empleando resinas cambiadoras de ión. Los resultados de estos ensayos no son satisfactorios ya que la sustancia aislada presenta impurificaciones, correspondientes a tartárico y acidez inorgánica, que en forma de sales en el sustrato, han sido retenidas por la resina aniónica y posteriormente liberadas al estado de ácidos en la resina catiónica.

Por este motivo recurrimos al método cromatográfico como técnica de purificación y aislamiento.

Realizamos los primeros ensayos en papel Watman nº 1, poniendo la muestra por riegos repetidos sobre una banda de 1 cm. de anchura y 40 cm de longitud. Empleamos como solvente butanol-n: ácido fórmico: agua (1:1:2)

Una vez desarrollado el cromatograma, se cortan dos tiras de 1 cm de anchura de las márgenes del papel y se revelan con azul de bromofenol; así podemos determinar la posición de la sustancia ácida y cortar exactamente la banda de papel que la soporta.

En un Soxhlet extraemos del papel la sustancia problema, empleando éter. Al evaporar el éter nos queda un residuo, soluble en agua y en alcohol, pero no cristalizabile en ninguno de estos disolventes.

La sustancia aislada no presenta color, es pastosa, de aspecto ceroso y presenta un marcado carácter ácido.

El empleo de papel Watman nº 1 tiene el inconveniente de que la cantidad de sustrato que se puede poner en la banda origen, es muy pequeña frente al volumen necesario para obtener una cantidad de sustancia problema significativa. Por este motivo empleamos cartones de celulosa pura, de 1 mm de espesor, en los que se pueden absorber en forma de banda de 1 cm de anchura unos 100 - ml de sustrato. Una vez desarrollado el cromatograma para localizar la posición de la banda ácida sobre el cartón se cortan dos tiras paralelas a los márgenes del mismo, pulverizando sobre ellas agul de bromofenol.

Las tiras de cartón conteniendo la sustancia problema se someten a una extracción con éter en un Soxhlet; prolongando la misma hasta asegurarnos, mediante control cromatográfico, que están agotados de sustancia.

Así hemos podido tener una solución concentrada de la sustancia problema en éter; sin embargo el control cromatográfico, acusa ligeras impurificaciones ácidas, probablemente debidas a impurezas de los cartones empleados y a vestigios de ácidos todavía presentes en el sustrato.

La purificación se realiza a través de un nuevo cromatograma, sobre papel Watman nº 1. La solución en

eter, obtenida después de esta operación, presenta pureza cromatográfica.

CARACTERIZACION

La identificación de esta sustancia ha tenido como principal inconveniente el hecho de no ser cristalizable en condiciones normales, junto a las exiguas cantidades que hemos podido aislar, motivo por el que no hemos podido seguir la metodología del análisis clásico cualitativo, a la que nos hemos ajustado en cuantos ensayos han sido posibles.

Resultados de los ensayos realizados:

- 1º) Análisis elemental cualitativo: No contiene S, N, Cl, I, Br, P.
- 2º) Reacción ácida al papel indicador Universal.
- 3º) Descomposición de Na_2CO_3
- 4º) Ensayos con:
 - a) Reactivo de Benedict: negativo.
 - b) Reactivo de Fehling: negativo.
 - c) Reactivo de Barfoed: negativo.
 - d) Solución acuosa de KMnO_4 al 1%: es reducida lentamente.
- 5º) Reacción con FeCl_3 (solución acuosa al 2,5%)
Se produce un color amarillo típico de hidroxidación.

Ante la imposibilidad, con la pequeña cantidad de que disponemos, de proceder a la preparación de derivados, se procede a un estudio de espectros de absorción

infrarroja (.)

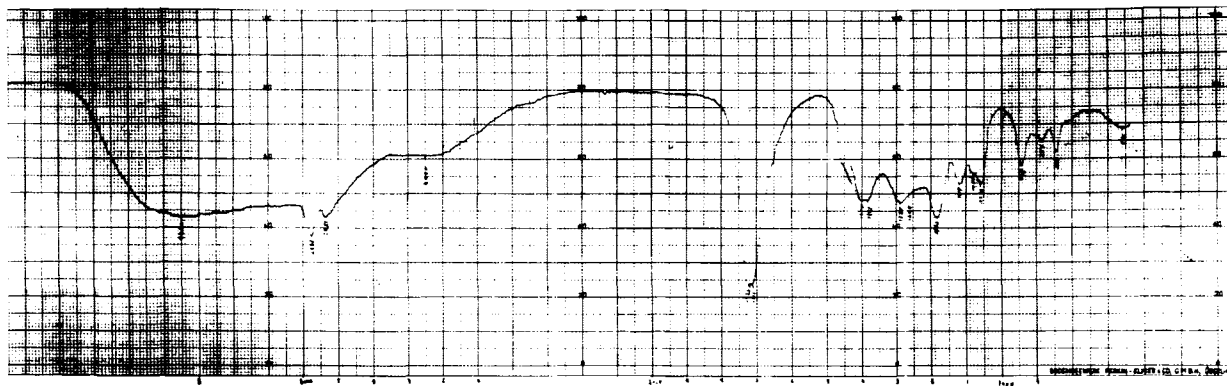
Se han registrado los espectros de absorción infrarroja de la sustancia problema y de una serie de óxidos conocidos, para que pudieran servir de términos de comparación. Los registros se han efectuado con un espectrofotómetro para infrarrojo Perkin-Elmer 221, de doble haz, equipado con un prisma de NaCl y una red, lo que permite estudiar los espectros en la zona espectral comprendida entre 4.000 y 650 cm^{-1} con una buena dispersión.

En el espectro obtenido, se pueden observar bandas de absorción características de los siguientes grupos: a 3.000 cm^{-1} una banda ancha originada por los OH ligados por puentes de hidrógeno; a 3.975 y 3.935 cm^{-1} absorciones intensas originadas por la vibración de valencia de los grupos CH_3 y CH_2 ; a 1.725 cm^{-1} se encuentra la banda más intensa del espectro atribuible a la vibración de valencia del grupo C=O.

Puede por lo tanto asegurarse que la sustancia estudiada es un óxido.

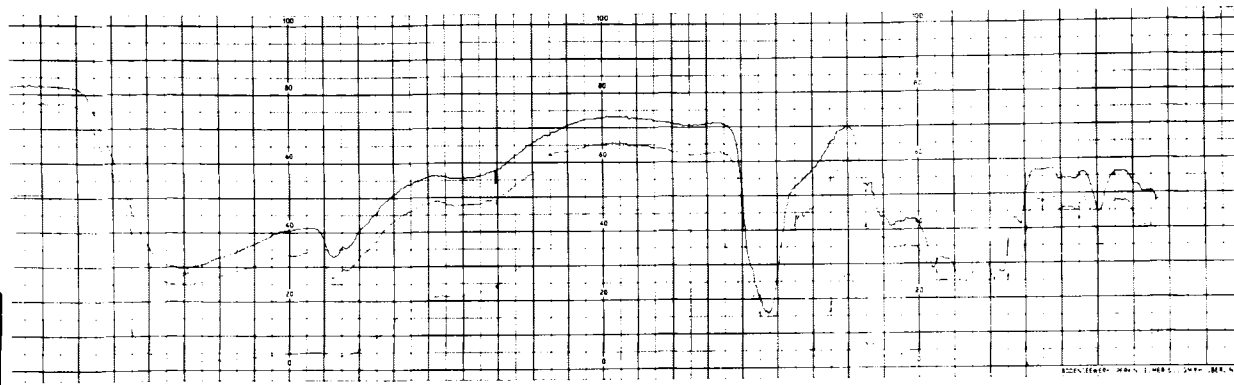
Se han registrado los espectros de varios óxidos

(.) Los espectros han sido registrados en el Laboratorio del transporte y Mecánica del Suelo de Centro y Estudios y Experimentación de Obras Públicas; la interpretación de los mismos se ha realizado por la Sección de Espectros Moleculares del Instituto de Óptica "Daza de Valdés".



Espectro del ácido β -hidroxibutírico

Fase: líquido viscoso
Thickness: entre láminas
Operator: Dr. A. Hidalgo
Prism: red-ClNa
Resolution: 927
Gain: 2
Speed: 2
Suppression: 9



Espectro de la substancia aislada

Fase: sólido (pastoso)
Thickness: entre láminas
Operator: Dr. A. Hidalgo
Prism. red-ClNa
Resolution: 927
Response: 1100
Gain: 2
Speed: 2
Suppression: 9

dos conocidos y al comparar los espectros así obtenidos con el de la substancia problema, se observa una cierta semejanza en líneas generales con el del β -hidroxi**buti**rico, lo que permite suponer que el compuesto estudiado tiene una estructura semejante a aquel.

CONCLUSIONES

PARTE I.

1ª) Un estudio comparativo del aspecto macroscópico de los cultivos en mosto estéril, descarta desde el punto de vista enológico a las especies: *K. apiculata*, *H. guillermondii* y *H. subpalliculosa*, que suministran mostos con acusada turbidez y color.

2ª) Las especies *S. veronae*, *S. rossi*, *S. ellipsoideus*, *S. mangini*, *S. oviformis*, *S. pastoriana*, *S. italicus*, *S. boticus* y *S. cheresiensis*, producen depósitos compactos y otorgan una notable transparencia a los mostos que fermentan en pureza.

3ª) Las especies aisladas de la fase inicial de la fermentación espontánea: *K. apiculata*, *H. guillermondii* y *H. subpalliculosa* presentan de común al metabolizar una pequeña fracción de azúcares reductores del mosto, produciendo una elevada concentración en acidez volátil y un bajo rendimiento en etanol. Dentro de este grupo sobresalen las características de cada especie, - siendo digno de destacar los bajos rendimientos en alcohol y en acidez volátil de la especie *H. subpalliculosa*, frente a la elevada cantidad de azúcares que consume, más por vía oxidativa, en fase aeróbica, que por el mecanismo fermentativo. La *K. apiculata* presenta un buen rendimiento en acidez volátil y en alcohol por un

dad de azúcar consumido, pero manifiesta una acentuada - incapacidad para agotar los azúcares del medio.

En plano análogo se encuentra el comportamiento de la *H. guillermondii*.

4^a) Las especies aisladas de la fase biológica - media de la fermentación espontánea: *Z. veronae* y *T. rosei* presentan una media capacidad de metabolización de - los azúcares del mosto y un bajo rendimiento en volátil.

Destaca la acusada capacidad de metabolización - de azúcares de *T. rosei* frente al *Z. veronae*, así como - el bajo rendimiento en volátil a favor de la primera. El rendimiento de alcohol por unidad de azúcar consumido es del mismo orden en ambas.

Destaca la elevada producción en acidez fija, de - bida fundamentalmente al incremento en la producción de ácido láctico, por parte de la especie *Z. veronae*.

5^a) Las especies representativas de las aisladas en la última fase de la fermentación espontánea del mosto, presentan de común, el elevado rendimiento en alcohol por unidad de azúcar consumido y la marcada capacidad para transformar altas concentraciones de azúcares, con baja producción de acidez volátil.

Dentro de las especies estudiadas: *S. ellipsoideus*, *S. mangini*, *S. oviformis*, *S. pastorianus* y *S. italicus*, destaca el *S. italicus* en el sentido de producir el mínimo rendimiento en acidez volátil, el máximo ren-

dimiento en acetal manteniendo elevado rendimiento alcohólico; es digno de destacar la baja producción de acetaldehído del *S. pastorianus*.

68) Las especies aisladas de velos sobre vinos, como representativas de las levaduras filmógenas: *S. cheresiensis* y *S. beticus*, tienen de común una elevada producción de volátil y un rendimiento en alcohol ligeramente más bajo que las del grupo anterior, destacando la elevada producción de acetaldehído. El *S. cheresiensis* presenta estos caracteres más acusados que el *S. beticus*.

79) La acidez fija en los productos obtenidos, como consecuencia de la fermentación en pureza del mosto ensayado, da un incremento positivo en todas las especies, sobresaliendo el *S. veronae*.

PARTE II

80) Por primera vez se hace un estudio comparativo entre la producción de CO_2 y la producción de acidez volátil en función del tiempo y de las distintas especies de levaduras en estudio; en las figs. n.ºs 5 y 6, se representan la magnitud de los incrementos máximos - de CO_2 y de acidez volátil, producidos por distintas especies y los tiempos en que se alcanzan. Los incrementos máximos coinciden en el tiempo para las especies: *K. apiculata* y *H. guillermondii*; *H. subpelliculosa* presen-

ta un notable retardo (respecto a las anteriores especies) en alcanzar ambos, que por otra parte no están sincronizados (máximo de CO_2 a las 192 h.; máximo de acidez volátil a las 96 h.).

Las especies representativas de la fase media: *Z. veronae* y *T. rosei* presentan el máximo incremento de CO_2 a las 24 horas y el de acidez volátil a las 72 y 36 horas respectivamente.

Las especies aisladas de la fase final de la fermentación espontánea y las especies filiformes, alcanzan los incrementos máximos de acidez volátil entre las 48 y 96 horas de fermentación.

9ª) Por primera vez se hace un estudio de las variaciones que presente la concentración de acidez volátil a medida que transcurre la fermentación en pureza - del mosto a cargo de diferentes especies de levaduras.

Las especies *K. spiculata* y *H. guilliermondii* producen un incremento máximo de acidez volátil del orden - de 5 a 5'5 meq/l a las 76 horas de fermentación, manteniendo una producción de acidez volátil durante toda su actividad fermentativa. La *H. subpelliculosa* presenta - un incremento máximo de 3 meq/l a las 96 horas de fermentación, y posteriormente produce un notable consumo de - la misma.

Las especies *Z. veronae* y *T. rosei* alcanzan los máximos incrementos 1'5 meq/l la primera y 4'5 meq/l la

segunda, a las 24 horas de fermentación, llegando a metabolizar, a través del curso fermentativo, parte de la acidez volátil acumulada.

Las especies aisladas de la fase final de la fermentación producen el máximo incremento de acidez volátil del orden de 2 a 6 meq/l, a las 24-36 horas de fermentación y todas metabolizan parte de la acidez volátil producida, durante un período de tiempo que varía entre las 48 y 120 horas de fermentación, a partir del cual se repite la producción y el consumo de la misma.

Las especies filiógenas presentan un incremento máximo en acidez volátil, del orden de 3'5 a 4'5 meq/l, a las 36-48 horas de fermentación; metabolizando a través del curso fermentativo parte de acidez volátil producida, pero al final de la fermentación, los mostos obtenidos presentan una concentración en acidez volátil superior a la acumulada en fermentados del grupo anterior.

La representación gráfica correspondiente está en las figuras 7, 8, 9 y 10.

10*) La dosis de ácido acético capaz de inhibir la actividad fermentativa de las distintas especies de hongos micocetos ensayadas, varía con la especie; pero en todos los casos es superior al contenido permisible por la legislación, oscilando entre 2 a 10 gr acético por litro de fermentado; excepcionalmente el *S. acidifaciens* es capaz de fermentar mostos cuyo contenido en acético es del

orden de 20 gr/l de mosto.

11*) En las especies de alto poder fermentativo dosis de acético del orden de 1-2 gr/l exaltan el poder fermentativo (ligera elevación en la producción de CO_2).

12*) No hay proporcionalidad entre la concentración de acético añadido al sustrato, y la concentración de acetaldehído al término de la fermentación, ni aún teniendo en cuenta la gradual inhibición de la fermentación a medida que aumenta la concentración de ácido acético. Tampoco hay consumo de las dosis de acético, añadidas al mosto, por vía fermentativa.

13*) La concentración de ácido acético influye en el mecanismo de formación y consumo del acetaldehído en el curso fermentativo, para dosis de ácido acético que no inhiben la fermentación; esta influencia no tiene proporcionalidad con la concentración y debe ser del mismo orden, al menos ésta podría ser la explicación de las oscilaciones en los valores obtenidos para la concentración de acetaldehído al término de la fermentación, a medida que aumenta la concentración de acético.

14*) La especie *Z. veronae* capaz de producir un 75% de acetaldehído sobre las especies, máximas productoras, sufre una disminución en la producción de acetaldehído a medida que aumenta la concentración de acético añadido al mosto.

15*) *C. mycoderma* y *H. anomala* son capaces de -

formar velos sobre mosto, adicionado de acético en dosis de 3 a 5 gr/l de mosto, sin llegar a fermentarlo. La formación de velo trae como consecuencia un consumo de acético que oscila entre el 30 y el 70% de las dosis asignadas, en las condiciones de la experiencia (a 25°C y cierre con válvula Miller), sin que se traduzcan en incrementos en la producción de acetaldehído.

16a) Se ha determinado la acción inhibitoria que dosis progresivamente crecientes de ácido sórbico ejercen sobre la actividad fermentativa de cuatro especies de levaduras filológicas, más comunmente halladas en la crianza de vinos del sur de España, al ser cultivadas en mosto estéril *Saccharomyces beticus*, *Saccharomyces cheresiensis*, *Saccharomyces montuliensis* y *Saccharomyces rouxii*.

a) Para las cuatro especies ensayadas, las pérdidas de anhídrido carbónico fueron ligeramente superiores en los matraces que contenían 50 mg/l de ácido sórbico, que en los matraces testigos, deduciéndose que, a pequeñas concentraciones, este compuesto exalta la actividad fermentativa.

b) En los matraces con 225 mg/l de ácido sórbico el *S. cheresiensis* fué la especie que más anhídrido carbónico produjo; el *S. beticus* y el *S. rouxii* produjeron una cantidad inapreciable.

c) El *S. montuliensis* fué la única especie que no ini-

ció la fermentación del mosto que contenía dosis de -
200 mg/l de ácido sórbico.

d) Dosis de 250 mg/l de ácido sórbico inhiben totalmen-
te la actividad fermentativa de todas las especies
filamentosas ensayadas.

17^a) Se ha determinado la acción fungistática -
que dosis crecientes de ácido sórbico, anhídrido sulfuro-
so, sorbato potásico y la mezcla anhídrido sulfuroso y -
ácido sórbico, ejercen sobre las cuatro especies antes -
citadas sembradas en vino de Jerez, de la siguiente com-
posición: alcohol 15'3% en volumen; acidez total 4'26 -
gr/l exp. en ácido tartárico; anhídrido sulfuroso 10 mg/l
y pH 3'2 .

a) Dosis de 200 mg. de ácido sórbico por litro de vino,
inhiben totalmente el desarrollo de estas levaduras,
en vino de Jerez, durante 120 días que duró la experien-
cia.

Con dosis de 150 mg/l de ácido sórbico, la apari-
ción del velo es notablemente retardada (43 días) produ-
ciéndose un velo de aspecto muy tenue, fino, sin rugosi-
dades y bastante incompleto. Con dosis de 100 mg/l de -
ácido sórbico los velos tardan solo 29 días en aparecer
y el aspecto es completamente normal, esto es, con abun-
dante rugosidad, grueso y que sube por las paredes del -
matraz.

b) A igualdad de dosis, el sorbato potásico ejerce una

acción fungistática más débil que el ácido sórbico, imponiéndose dosis de 300 mg/l para inhibir totalmente el desarrollo de levaduras.

c) La dosis de 200 mg/l de anhídrido sulfuroso inhibe el desarrollo de velos durante 120 días que duró la experiencia; con dosis de 120 mg/l, la aparición de velos viene retardada unos 10 días más que la misma dosis de ácido sórbico; el velo es más tenue que en aquel caso.

d) Con dosis de 100 mg, de anhídrido sulfuroso y 50 mg de ácido sórbico por litro de vino se produce un efecto análogo al que se obtiene con dosis de 150 mg/l de anhídrido sulfuroso sólo, consiguiéndose una inhibición total del desarrollo de estas especies sobre vino de Jerez con dosis de 100 mg/l de cada uno de los compuestos ensayados.

PORTE III.

18*) Hemos utilizado métodos cromatográficos de partición (soporte de la fase acuosa: papel Watman) y de cambio de ion. Aplicando cromatografía de papel, con técnicas mono y dimensional descendentes, operando con soluciones testigo, hemos podido detectar en el mosto estudiado los ácidos; tártrico, cítrico, málico, vestigios de oxálico y una ligera mancha, en el origen, que se atribuye a acidez inorgánica; se adaptan estas técnicas para un estudio comparativo con los fermentados en pureza que se obtienen de este mosto.

19*) Hemos puesto a punto, mediante el empleo -

de resinas cambiadoras de ion, un método para la determinación de la acidez que se encuentra salificada en el mosto, determinando el valor de la misma para el mosto que empleamos en nuestro trabajo.

20º) El porcentaje de ácidos salificados en el mosto alcanza un valor de 69'8 siendo superior al porcentaje alcanzado en los fermentados en pureza que hemos obtenido.

21º) El tanto por ciento de acidez salificada en los fermentados en pureza a cargo de las especies pertenecientes a la última fase fermentativa (*S. italicus*, *S. mangini*, *S. ellipsoideus*, *S. oviformis*) es prácticamente el mismo, lo que significa que la composición de los factores que influyen en el producto de solubilidad de estas sales es análogo en los respectivos fermentados en pureza. El valor de la acidez salificada en los fermentados correspondientes a estas cinco especies está comprendido entre 56'3 y 55'2 meq/l, diferencia que está dentro del límite de error del método analítico empleado. Para un mosto dado, y unas condiciones definidas de temperatura y de aireación en que se verifica la fermentación, se puede considerar este tanto por ciento como característica de estas especies.

22º) Las especies de la primera fase fermentativa presentan un tanto por ciento de acidez salificada mayor que las especies del grupo anterior; observándose que los valores obtenidos están en razón inversa al poder

fermentativo (rendimiento en alcohol) por un lado, y a la capacidad de formación de ácidos orgánicos por otro. Así la *H. anomala* y *H. magna* de poderes fermentativos elevados dentro del grupo, pero de baja producción en ácidos, tienen junto a la *C. mycoderma* productora de bajas concentraciones de acidez los valores más altos de acidez salificada.

23ª) Las especies de segunda fase fermentativa: *Z. veronae* y *T. rosei* presentan distintos porcentajes de acidez salificada como corresponde a una marcada diferencia en su fisiología fermentativa, *Z. veronae* tiene un 8'9% de acidez salificada, a pesar de presentar un poder fermentativo inferior a la *T. rosei*, pero es la especie que presenta mayor producción de acidez en la fermentación de mosto.

El tanto por ciento de acidez salificada en el fermentado a cargo de la *T. rosei* es de 59'8 aproximándose su valor a los de las especies de la última fase fermentativa.

El *S. acidifaciens* es una buena productora de acidez presentando un 50'3% de acidez salificada, a pesar que su poder fermentativo es del mismo orden que el de la *T. rosei*.

24ª) Las especies filmógenas *S. cheresiensis* y *S. boticus* presentan un tanto por ciento de acidez salifica-

da del mismo orden que las especies aisladas en la última fase, lo que presupone una analogía en la composición cualitativa y cuantitativa de los fermentados; en cambio las especies *S. montubiensis* y *S. rouxii* con un 61,3 y un 60,3% de acidez en forma de sales, nos indican que los fermentados respectivos tienen un rendimiento alcohólico más bajo, entre otras posibles diferencias cuali y cuantitativas que influyen en el producto de solubilidad de estas sales.

25ª) En los análisis cromatográficos realizados en los distintos fermentados, se pone de manifiesto la presencia de los ácidos detectados en el mosto, así como las manchas correspondientes a los ácidos formados durante la fermentación. En los fermentados correspondientes a la *C. pulcherrima* y *Z. veronae*, se aprecian dos hechos sobresalientes: *C. pulcherrima* no forma al menos en concentraciones detectables por el método empleado, una sustancia ácida no identificada hasta el presente, y en cambio es la única especie productora de ácido fumárico durante el proceso fermentativo. El *Z. veronae* presenta una intensidad y extensión en la mancha correspondiente al ácido láctico muy superior a las restantes especies; este hecho está en consonancia con la alta concentración de acidez en las determinaciones volumétricas.

26ª) Existe un aumento de acidez fija debido a la actividad fermentativa, siendo, a igualdad de todas las demás variantes que pueden modificarla, función de la

actividad específica de formación de ácidos de la cepa empleada.

27ª) Los valores obtenidos para los aumentos de acidez en la fermentación de mosto a cargo de los representantes de las especies de las tres fases fermentativas, presentan diferencias que no guardan proporción con la producción de CO_2 , es decir no están en razón directa al poder fermentativo.

28ª) Las especies filmógenas presentan mayor producción de ácidos durante el proceso fermentativo, en condiciones anaeróbicas, que las especies de la última fase fermentativa, debida fundamentalmente a fracciones ácidos volátiles.

29ª) a) *C. pulcherrima* y *E. rosei* tienen una baja producción en acidez, ligeramente inferior en la última de estas especies.

b) *S. veronae* presenta una extraordinaria producción de acidez; cromatográficamente se pone de manifiesto como una gran parte de esta producción corresponde a ácido láctico.

c) *C. pulcherrima* presenta la propiedad de no producir una sustancia con carácter ácido, detectada por cromatografía, en todos los fermentados analizados.

30ª) En los precipitados obtenidos en la fermentación del mosto, a cargo de las especies ensayadas, se encuentran presentes sales de tartárico y ligerísimas -

cantidades de oxalatos, sin que hallamos detectado otras sales de ácidos orgánicos.

31ª) El estudio cromatográfico cualitativo de acidez realizado al mosto empleado y a los fermentados en pureza a cargo de las 18 especies de levaduras ensayadas, pone de manifiesto que durante la fermentación alcohólica de mosto todas las especies empleadas, forman láctico y succínico, así como una sustancia de carácter ácido de $R_f = 0'58 - 0'60$, no identificada hasta el presente en vinos; la *C. pulcherrima* es la única excepción, ya que no produce esta sustancia o lo hace en concentraciones no apreciables.

32ª) Por la intensidad y extensión de las manchas se observa una superior producción de succínico y láctico en las especies: *S. italicus*, *S. mangini*, *S. ellipsoideus*, *S. oviformis* y en todas las especies filodógenas ensayadas: *S. montuliensis*, *S. rouxii*, *S. cheresiensis* y *S. beticus*, frente a las especies *K. apiculata*, *C. mycodexma*, *T. rosei*, *K. magna*, *H. anomala*, *S. pastorianus* y *C. pulcherrima*.

33ª) La concentración de bitartrato y tartárico en los fermentados correspondientes a las especies filodógenas; *S. montuliensis*, *S. rouxii*, *S. cheresiensis* y *S. beticus*, es casi inapreciable en los cromatogramas, especialmente la banda de bitartratos; estas manchas son un poco más intensas en los fermentados correspondientes a

Las especies *S. italicus*, *S. mangini*, *S. ellipsoideus* y *S. oviformis*, pero inferiores a las presentadas por los fermentados de las restantes especies.

34ª) Las especies *C. mycoderma*, *H. anomala*, *Z. venosus* y *C. pulcherrima* metabolizan, en cultivos sumergidos de vino, los ácidos láctico, succínico, cítrico y málico presentes en vino privado de alcohol; una sustancia ácida de $R_f = 0.58 - 0.60$ es la única que permanece intacta a través de todo el tiempo que dura la experiencia. - Las dos primeras especies, dentro del intervalo de tiempo de 72 horas de agitación, alcanzan la situación descrita; mientras las dos restantes necesitan 348 horas para metabolizar totalmente los ácidos mencionados, poniéndose de manifiesto la secuencia de metabolización de los mismos.

35ª) Las especies *H. spiculata* y *K. magna* son incapaces de metabolizar los ácidos estudiados en las condiciones ensayadas.

36ª) Las especies *S. italicus*, *S. ellipsoideus*, *S. mangini*, *S. oviformis*, *S. montuliensis*, *S. rouxii* y *S. beticus*, metabolizan láctico y succínico, y parcialmente cítrico y málico; destaca la mayor capacidad del *S. chereziensis* para metabolizar cítrico y málico.

37ª) *Z. acidifaciens* y *S. pastorianus* sólo metabolizan ácido láctico y parcialmente succínico.

38ª) La sustancia ácida de $R_f = 0.58-0.60$, que a lo largo de los trabajos cromatográficos hemos venido

detectando y llamando la atención sobre su presencia en los fermentados, no es metabolizada por ninguna de las especies ensayadas.

39*) Si el período de agitación se prolonga, después de obtener un estado estacionario en la metabolización de ácidos, tiene lugar una producción de ácidos; detectándose un incremento en la intensidad y extensión de las manchas correspondientes a aminoácidos.

40*) Por métodos cromatográficos de reparto, se ha logrado aislar una substancia ácida de los fermentados en pureza de diferentes especies de levaduras al actuar sobre mosto; esta substancia de carácter ácido no ha sido identificada hasta el presente en vinos. La identificación de esta substancia ha tenido como principal inconveniente el hecho de no ser cristalizable en condiciones normales, junto a las exiguas cantidades que hemos podido obtener en los aislamientos.

Resultados de los ensayos analíticos realizados:

- a) Análisis elemental cualitativo: no contiene S, N, Cl, I Br ni P.
- b) Muy soluble en agua y éter
- c) Reacción ácida al papel indicador Universal
- d) Descompone Na_2CO_3
- e) Ensayos con:

Reactivo de Benedict: negativo

Reactivo de Fehling: negativo

Reactivo de Barfoed: negativo

- f) La solución acuosa de KMnO_4 al 1% es reducida lentamente.
- g) Reacción con FeCl_3 (solución acuosa al 2.5%): produce un color amarillo típico de hidróxicidos.

41*) Se han registrado los espectros de absorción infrarroja de la sustancia problema y de una serie de oxiácidos conocidos. En el espectro obtenido, perteneciente a la sustancia aislada, se pueden observar bandas de absorción características de los siguientes grupos: a 3.000 cm^{-1} una banda ancha originada por los OH ligados por puentes de hidrógeno; a 3.975 y 3.935 cm^{-1} - absorciones intensas originadas por la vibración de valencia de los grupos CH_3 y CH_2 ; a 1.725 cm^{-1} se encuentra la banda más intensa del espectro, atribuible a la vibración de valencia del grupo C=O. Puede por lo tanto asegurarse que la sustancia aislada es un oxiácido.

Al comparar los espectros de varios oxiácidos conocidos con los de la sustancia aislada, se observa cierta semejanza, en líneas generales, con el del β -hidroxibutírico, lo que permite suponer que el compuesto estudiado tiene una estructura semejante.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Rossi G de: Relazione al IV Congresso della vigna e del Vino. Lausana 1935.
- (2) Castelli T: Nuovi Annali dell'Agricoltura, 19, 1939.
- (3) Bantarelli D: Ann. Fac. Agr. Perugia, I, 1942
- (4) Carriotti A y Cantarelli C.; Riv. Vit. Enol; Conegliano núms 6, 7, 8 (1952)
- (5) Peynaud E. y Domerg: Ann. Technol. 4, 265 (1953).
- (6) Sucefic-Safer O: Biljne Proizvodnje, 4, 1955.
- (7) Castelli T. e Inigo B.: Ann. Fac. Agr. Tec. Univ. Perugia (1957).
- (8) Peynaud E. y Mlle Lafourcade S.: "Estudios recientes de la Estación Enológica de Burdeos sobre los factores de crecimiento". Tesis Doctoral de Mlle. S. Lafourcade.
- (9) Ribereau-Gayon et Peynaud: "Sur l'emploi en vinification de quelques activateurs vitaminiques de la fermentation". C. R. Acad. Agric. 39, 444, 1952.
- (10) Lafon M.: "Sur las reactions de formation de l'acide acetique, de l'acide succinique et du 2-3butanediol dans la fermentation alcoolique." Bull. de la Soc. - de Chim. Biol. Tome XLI, nº 4, 503, 1959.
- (11) Ribereau-Gayon J., Peynaud E. y Lafon M.: "Investigations on the origin of secondary products of alcoho-

- lic fermentation." Am. Journ. of Enol. V.7, nums. 2, 3, 1956.
- (12) Cantarelli C.: "On the activation of alcoholic fermentation in wine making." Am. Journ. of Enol. V.8, nums. 3 y 4, 1957.
- (13) Castelli e Iñigo B.: "Los agentes de la fermentación vinica en la región Manchega y zonas limítrofes."
- (14) Castelli T. e Iñigo B.: "Los agentes de la fermentación vinica de la Rioja."
- (15) Iñigo B. y Arroyo V. "Los agentes de la fermentación vinica en la zona de Horiles-Montilla". R.C.A nº 72, 1960.
- (16) Carras M.: Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias de Madrid 1952.
- (17) Ribereau-Gayon J. y Peynaud E.: Analyse et Contrôle des vins. Paris (1951)
- (18) Lugg J.W. and Overell B.T.: "One" and "Two-dimensional" partition chromatographic separations of organic acids on an inert sheet support." Austral. J. - Sci. Research, 1, págs. 98-111 (1948).
- (19) Casas J.: Rev. Cien. Aplc. 7, nº 35, págs. 526-529 (1953).
- (20) Jaulmes P., Espezel P.: Ann. Falsif. Fraudes 28, - 325-335 (1935)
- (21) Ribereau-Gayon J., Peynaud E.: Ann. Inst. Pasteur -

- 73, págs. 777-796 (1947).
- (22) Casas J.: Rev. cienc. Aplic. 8, nº 37, págs. 103-11 (1954).
- (23) Berg H.W. and Keefer R.M. "Analytical Determination of tartrate stability in wine."
I.- Potassium bitartrate. A. Journ. Enol. 9:180(1958)
II- Calcium tartrate. Am. Journ. Enol. 10: 105-09(1959)
- (24) Carpenter D.C. and Mack G.L.: "The solubility of - KHT in various sugar solutions." J. Am. Chem. Soc. 56: 311 (1934).
- (25) Garoglio P.G.: Nuovo Trattato di Enologia. Vol. II. pág. 664. Sansoni Edizioni Scientifiche 1953.
- (26) Miigo Leal B.: "Vinificaci3n del mosto de uva con - asociaci3n escolar de levaduras seleccionadas." Rev. Cien. Apl. nº 63. págs. 318-324 (1958).
- (27) Joslyn M.A. and Dun R. "Acid Metabolism of Wine - Yeast." J. Am. Chem. Soc. 60: 1137 (1938).
- (28) Nunes Caetano A: "Acidez volátil e forza alcoolica en fermenta3oes puras "in vitro". Anais da Junta Na cional do vinho págs. 45-50 (1957-58).
- (29) Peynaud E. Rev. Vitic. 88, (1938).
- (30) Van Zyl J.A. "La formation d'acides volatiles par les cellules de levaduras dans diferentes conditions de fermentation." Forming South Afr/nº 357 (XXX) - 1955.
- (31) Jolivet. "Contribution a l'estude des fermentations."

Vignes et vins. n° 72. págs. 12-16, 1958.

- (32) Gooding C., Melnick D., Luckmann F.: Food Research 19-44 (1954).
- (33) Gooding C., U.S., Patent. 2, 379-294 (1945).
- (34) Shelhorn M.V.: Dents. Lebensm. Rundschau. 50-267 - (1954).
- (35) Nomoto M., Naraschshi Y., Nukawa y.: J. Agric. Chem. Soc. Jap. 29-10-805 (1955).
- (36) Beneke E., Fabian F., Food Technology 9, 486 (1955)
- (37) Demareé G., Sjogren D., Mc Cashland B., Cosgrove F., J. Am. Pharm Ass. 44, 10-619 (1955).
- (38) Denel H., Calvert C., Anisfeld L; Mac Keehan H.: Food Research 19-13 (1954).
- (39) Salunke D: Food Technolo. 9, 590 (1955).
- (40) Robinson J., Weaver E., Hills C.: Fruchtsaft. Ind. 2, 5, 184 (1957).
- (41) Ferguson W., Powrie W., Appli. Microb., 5, 41 (1957)
- (42) Illigo B., Vázquez D.: Rev. Cien. Apl. 68, 222 (1959)
- (43) Saller W., Kolewa S.: A Rebe u Wein 7, 1, 21 (1957).
- (44) Vitagliano M: Rev. Vitic. Anol. 11, 1, 15 (1958).
- (45) Auerbach R.C.: Wines and Vines 8, 26 (1959).
- (46) Tarantola C.: Att. Acc. Ital. della Vita e del Vino 9, 1, (1958).
- (47) "Dosage chromatographique des acides dans le vin." Cultiv. Giorn. Vinic. Ital. n° 10, pág. 15 (1955).
- (48) Dyr J. et Krumphnal V.: "La chromatographie sur pa-

- pier au service de la chimie des fermentations." -
Ind. Aliment. et Agr. n° 6, pág. 441 (1956).
- (49) Carles J., Shneider A., Lacoste A.M.: "Bulletin de
la Société de Chim. Biol. 40, I, pág. 221, 1958: -
"Contribution a l'étude chromatographique des prin-
cipaux acides organiques."
- (50) Hawkins N.G., Dinsmoor W., and Kepner R.E.: "Use -
of 2-4-dinitrophenylhydrazones, of p-phenylphenacyl
esteres as second derivaties in identification of -
organic acids."
- (51) Cordonnier R. et Bizeau Cl: "Separation par chroma-
tographie d'échange d'ions et dosage des acides lag-
tique succinique et malique du vin." Ann. Tech. Agr.
Vol. 9, n° 4, pág. 349-362 (1960).
- (52) Hartley R.D. and Lawson G.J., "Improved methods for
the paper chromatography of organic acids." Journ.
Chrom. pág. 410-413, Vol. 4 (1960).
- (53) Jirinapánkva and Vladimir Munk: "A combined detec-
ting reagent for the identification of organic acid
on paper chromatograms." Journ. Chrom. Vol. 4, págs.
241-243 (1960).
- (54) Isherwood F.A.: "The determination and isolation of
the organic acids in fruit". Biochem. J. 40, 688, -
(1946).
- (55) Bulen W.A., Varner J.E. and Burrell R.C.: "Separa-
tion of organic acids from plant tissues." Anal. -

- Chem. Vol. 24, n° 1, págs. 187-90 (1952).
- (56) Marvel C.S. and Rands R.D. Jr.: "Separation of organic acids" J. Am. Chem. Soc. 72, 2642 (1950)
- (57) Resnik R.E., Conard L., Lee A. Wallan Powell.: "Chromatography of organic acids in cured tobacco". Anal. Chem. pág. 928 (1955).
- (58) Zampelas D.A. and Clark W.L.: "Separation and quantitative determination of four organic acids from wine by partition chromatography." Am. Journ. of Enol. Vol. n° 2, págs. 43-49 (1957).
- (59) De Soto R. and Watkentin H.: "Influence of pH and total acidity on calcium tolerance of sherry wine." A. Jour. of Enol. Vol. 7, n° 3, págs. 91-97.
- (60) Mlle Jourakou V.: "Contribution a l'etude des Variations de l'acidité des mouts Grecs au cours de la fermentation". Chimiste de l'Institut du vin. - Atenas 1958.
- (61) Carles J., Mlle. Lamazour-Betbeder et M^{me}. Pech. R.: "Existe-t-il une fermentation citramalique dans le vins?" Comp. rend. des sean. de l'Academie des Sciences t. 246. págs. 2160-2162 seance du 9 avril 1958.
- (62) Carles J. et Lamazour-Betbeder M.: "Le probleme du Vieillissement des vins". Bulet. de la Soc. d'His. Natur. de Toulouse. T94, 1959.
- (63) Gobis Livia.: "Ricerche sul meccanismo di formazione Dell'acido citrico nel corsi della fermentazione

- alcoholica." Estracto agli Annali della Sperimentazione Agraria. Nuova serie. Vol. IV, nº 4. Roma 1950
- (64) Saavedra I.: Tesis Doctoral. Madrid 1960.
- (65) Phillips J.D., Pollard A. et Whiting G.C.: "Le metabolisme des acides organiques dans les fermentations du cidre et du poiré." J. Sci. Food. Agr. nº 1, págs. 31-41 (1956).
- (66) Peynaud E.: "New Information concerning biological - degradation of acids." Am. Journal of Enology. Vol.7 nº 4, págs. 150 (1956).
- (67) Bennett and Kornberg H.L.: "The utilization by yeasts of acids of tricarboxylic acid cycle." The Journ. of Gen. Micro. Vol. 23, nº 1, págs. 65-82 (1960).
- (68) Salles J.B.V. and Ochoa S.: "Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation." II. Further study of the properties of the malic enzyme of pigeon liver." Journ. Biol. Chem. 187. 849 (1950).
- (69) Kokes S., del Camillo A., and Ochoa S.: "Biosynthesis of dicarboxylic acids by carbon dioxide fixation." - IV. Isolation and properties of and adoptive malic enzyme from Lactobacillus arabinosus." Jour. Biol. Chem 187, 891 (1950).
- (70) Ochoa S.: "Biological mechanisms of carboxylation and decarboxylation." Physiol. Reviews 31, 56 (1951).
- (71) Daffner M.: Ann. Chimie. 535, 44 (1938)
- (72) Auro M.A., Hodge H.M., Roth N.G., Ind. Eng. Chem. 49, págs. 1237-1238 (1957).