

---

**VI Jornadas Científicas 2001**  
**Grupos de Investigación Enológica**

Valencia, 5-7 de junio del 2001

**Microbiología**

---

# Primeros criterios de selección de levaduras para la vinificación en tinto

---

Morata, A., F. Calderón, M. C. González, F. Varela, B. Colomo, C. Uthurry y J. A. Suárez Lepe

A partir de 114 cultivos puros de levadura, se han preseleccionado 10 cepas de las especies *Saccharomyces bayanus* y *S. cerevisiae*. Como pruebas clásicas se ha realizado la determinación de poder fermentativo, acidez volátil y cinética fermentativa con expresión de las correspondientes curvas termodinámicas. Los mostos terminaban con aproximadamente 2 g/L de azúcares residuales y sin ningún problema de paradas o retrasos en el acabado. La fermentación se desarrolló a temperaturas controladas (25-32 °C).

La producción de SH<sub>2</sub> determinada mediante precipitación con acetato de plomo dio valores medios bajos, en torno a su umbral de percepción.

La resistencia al SO<sub>2</sub> presentada por las cepas de levadura, mostró que se completaban con correcta cinética hasta valores de 350 mg/L de SO<sub>2</sub> total, valores superiores producían retrasos de hasta 1 día en el arranque de la fermentación aunque algunas cepas acababan con valores superiores a 500 mg/L de SO<sub>2</sub> total.

La producción de glicerina evaluada mediante análisis enzimático arrojó una media

de 10,67 g/L en las microvinificaciones por triplicado de los mostos de 16,5 Bé para las diez cepas seleccionadas. Se obtuvieron valores máximos de 11,77 con s.d. de 0,42 para la cepa 9CVG2r.

En el estudio de parámetros que tienen influencia en la estabilidad de color del vino, se ha evaluado mediante GC la producción de acetaldehído por su importancia como molécula puente para la síntesis de formas estables de color encontrándose en los fermentados valores de 120,64 mg/L, que no suponen defectos organolépticos.

En el estudio de actividades enzimáticas, las levaduras seleccionadas no expresan excelentemente el enzima β-glucosidasa que hidroliza la unión β-glucosídica entre la antocianidina y la molécula de azúcar unida a ella en posición 3.

Las cepas seleccionadas 5CVT2r y T 2.4, de las especies *S. bayanus* y *S. cerevisiae* respectivamente, se han evaluado en la vendimia del 2000 a nivel semiindustrial sobre mosto de tempranillo (vinificaciones de 500 L) con un desarrollo de las fermentaciones correcto y rápido (tabla 1).

**Tabla 1:** Determinación de parámetros de color (método de Glories)

	<b>Intensidad</b>	<b>Tonalidad</b>	<b>% Amarillo</b>	<b>% Rojo</b>	<b>% Azul</b>	<b>% dA (% de rojo puro)</b>
<b>Control</b>	1,05	0,53	31,06	58,94	9,99	65,18
	0,05	0,00	0,03	0,11	0,10	0,16
<b>T 2.4</b>	1,02	0,54	31,41	58,37	10,22	64,34
	0,008	0,005	0,17	0,15	0,098	0,22
<b>5CVT2r</b>	1,14	0,53	30,81	58,72	10,48	64,83
	0,04	0,015	1,20	0,83	0,47	1,21

Además las matrices ANOVA de intensidad y porcentaje de amarillos mostraron que la 5CVT2r produjo mayor intensidad de color diferenciándose significativamente de la T 2.4 y el control y que la T 2.4 causó un elevado porcentaje de amarillos.

Otros parámetros como la adsorción de antocianos, la incidencia en la autólisis de la fermentación maloláctica y la liberación de polisacáridos se estudian en la actualidad. •

# Efecto de activadores de fermentación sobre la cinética fermentativa y producción de volátiles secundarios de distintas cepas de levadura

F. Varela, C. Uthurry, F. Calderón, M.C. González, B. Colomo y J.A. Suárez Lepe

La fermentación alcohólica en la elaboración en blanco puede convertirse en un proceso problemático ya que se desarrolla en un sistema biológico con condiciones difíciles para los microorganismos encargados de su realización, tales como las bajas temperaturas y el empobrecimiento en nutrientes debido a la clarificación del mosto. Sobre el factor temperatura no es posible actuar, ya que la fermentación entre 16 y 18 °C provoca vinos más aromáticos que las fermentaciones a temperaturas más altas. En cuanto a la composición del mosto, la realización del desfangado también es imprescindible para la elaboración de vinos blancos de calidad. Por ello la industria enológica ha desarrollado activadores complejos de fermentación, que son productos cuya finalidad es aumentar la complejidad nutricional del mosto supliendo las deficiencias del desfangado, y facilitando el metabolismo de las levaduras alcoholígenas.

Este trabajo evalúa el efecto de 5 activadores de fermentación de diferente composición química:

- *Activador A*: Activador comercial: fosfato amónico, clorhidrato de tiamina, celulosa y corteza de levadura.
- *Activador B*: Fosfato biamónico.
- *Activador F*: Activador comercial: NFA, tiamina, ácido fólico, niacina, pantotenato cálcico y corteza de levadura.

- *Activador G*: Aceite de pepita de uva, formado en un 98% por ácidos grasos y esteroides.
- *Activador P*: Activador comercial: fosfato amónico, clorhidrato de tiamina y celulosa.

Aplicados sobre un mosto blanco desfangado mediante frío (8 °C, 48 horas) y coadyuvantes (gelatina y sol de sílice). Se evalúa el efecto de estos activadores sobre la cinética de fermentación a 18 °C de las distintas cepas empleadas (levadura seca activa comercial, levadura autóctona seleccionada de la colección de la ETSI Agrónomos y fermentación espontánea) y sobre la producción de compuestos volátiles secundarios.

Los resultados indican que el activador A es el único que incide en la cinética fermentativa, con arranques de fermentación más rápidos y duraciones de fermentación más cortas, independientemente de los microorganismos empleados. En cuanto a la composición en volátiles secundarios, se observan claras diferencias debido a los diferentes activadores empleados; si el enriquecimiento se realiza con aceite de pepita de uva se produce un aumento de la acidez volátil. Este activador A, y en menor medida el activador P, provocan un aumento de butanodiol en todos sus isómeros: L, D y meso, sin que las características organolépticas acusen diferencias significativas. •

# Acidificación del mosto por *Saccharomyces* spp.

N. Yeramian,<sup>1</sup> F. Varela,<sup>1</sup> F. Calderón,<sup>1</sup> B. Colomo,<sup>1</sup> A. Morata,<sup>1</sup>  
J.A. Suárez Lepe<sup>1</sup> y E.D. Sancho<sup>2</sup>

Una importante vía de acidificación biológica es la selección y utilización de levaduras productoras de ácidos orgánicos en el curso de la fermentación alcohólica.

La hipótesis más difundida postula dicha formación por fijación de CO<sub>2</sub> sobre el piruvato, producto final de la glucólisis, para dar oxaloacetato que es reducido a continuación a ácido málico (Pronk *et al.*, 1966).

Un proyecto de investigación sobre "Acidificación biológica en mostos de zonas cálidas" de las universidades Politécnica de Madrid, Córdoba y Valencia, ha aislado y caracterizado 282 cepas de levaduras autóctonas pertenecientes al género *Saccharomyces* de mostos de airén, Pedro Ximénez, tempranillo y monastrell de las DO Madrid, Montilla-Moriles y Jumilla.

Los primeros ensayos de selección se han efectuado atendiendo a la producción de ácido málico, haciendo fermentar cada cepa en mostos con distintas concentraciones de este ácido.

En cada microvinificación se evalúa la concentración de málico producido (g/L) y el por-

centaje sobre el inicial. Las determinaciones se han efectuado por triplicado, en microvinificaciones a 25 °C, utilizando cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE-HPLC) y el método enzimático de Boehringer Mannheim-Roche. Los resultados alcanzan como valores medios más elevados 0,89 g/L lo que representa un 68,14% sobre el contenido inicial.

La selección de estos *Saccharomyces* prosigue estudiando otros criterios de interés enológico así como:

- la influencia de parámetros fisicoquímicos que optimicen la producción de ácido málico,
- el efecto de adición de moléculas precursoras,
- el estudio de las enzimas malato deshidrogenasa y piruvato carboxilasa de las levaduras productoras y,
- pruebas de vinificación a escala semi-industrial en bodega con cultivos iniciadores de estas levaduras en la vendimia 2001. •

<sup>1</sup> Laboratorio de Enología, Departamento de Tecnología de Alimentos, Escuela Técnica de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid

<sup>2</sup> Departamento de Microbiología, Escuela Técnica Superior Ingenieros Agrónomos y Montes, Universidad de Córdoba

# Implantación de levaduras seleccionadas durante la fermentación

S. López Gaviño,<sup>1</sup> R. García Martín,<sup>1</sup> F. Calderón Fernández,<sup>1</sup> J.A. Suárez Lepe,<sup>1</sup> A. Palacios García<sup>2</sup> y E. Navascués López-Cordón

La implantación de levaduras seleccionadas durante la fermentación es un problema relevante en las regiones cálidas. La microbiota autóctona parece ser en muchos casos más competitiva debido a su tolerancia a altas temperaturas y grado probable elevado, además de que su población en el mosto puede ser muy superior a lo que cabría esperar en una vendimia en buenas condiciones.

En el presente trabajo se estudia la implantación de tres levaduras enológicas comerciales usando dos métodos en paralelo: análisis de fragmentos *delta* y una adaptación del método tradicional de *replica plating*. Los ensayos se realizan a partir de mosto estéril de la variedad airén en condiciones difíciles de fermentación. Se utilizan dos dosis de levadura 15 y 25 g/hL ( $3 \cdot 10^6$  y  $5 \cdot 10^6$  UFC/mL) (intervalo recomendado por el fabricante), así como dos diferentes ratios entre población autóctona y levadura seleccionada 1:100 (relación óptima), y 1:10 (relación en condiciones difíciles). La población autóctona se simula utilizando una cepa de levadura con bajos requerimientos nutritivos, elevada resistencia al  $\text{SO}_2$ , fase de latencia muy corta y presencia de factor competitivo (*killer*). Esta levadura está marcada genéticamente con

una resistencia a antibiótico de manera que es posible realizar su seguimiento mediante cultivo en placa. Se toman muestras el quinto y décimo día después de iniciada la fermentación. Todos los ensayos se realizan por duplicado.

Como cabría esperar, a 25 g/hL se observan los mayores rangos de implantación. De esta manera a la dosis elevada resulta imperceptible la diferencia de ratio 1:10 o 1:100. Con la dosis de 15 g/hL los resultados de implantación son inferiores y no del todo satisfactorios, estando por debajo del nivel considerado como aceptable (85% de implantación). Para la relación 1:10 se observan porcentajes de implantación escasos para la mayoría de las cepas. Sin embargo, una de las cepas ensayadas registra un grado de implantación superior en relación 1:10 que la observada en la relación 1:100. Esta cepa presenta unos requerimientos nutricionales excepcionalmente bajos que, en casos de elevada competitividad, pueden desembocar en una predominancia clara de esta cepa a final de fermentación.

El éxito de una siembra con levaduras seleccionadas depende estrechamente del contenido inicial de la microbiota autóctona, así como de la dosis de utilización. •

<sup>1</sup> Laboratorio de Enología, Departamento de Tecnología de Alimentos, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid ([jsuarezlepe@tca.etsia.upm.es](mailto:jsuarezlepe@tca.etsia.upm.es))

<sup>2</sup> Lallemand ([enavascues@jet.es](mailto:enavascues@jet.es))

# Efecto de distintos parámetros químicos en la manifestación del carácter floculante de levaduras vínicas

B. Simón, M.C. Fajardo, N. Luna y P. Hidalgo

La presencia del carácter floculante en cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* constituye una propiedad tecnológica de gran interés, especialmente en la elaboración de vinos espumosos por el método tradicional, ya que la capacidad que manifiestan las células de levadura para agregarse espontáneamente, permite una rápida sedimentación de las mismas en el medio. Esto conlleva a facilitar las operaciones de removido y degüelle, pudiendo reducir los costes de producción en este tipo de vinificación particular.

Merece una especial atención considerar que la floculación es una característica intrínseca de la pared celular de las levaduras y que se encuentra bajo el control de factores genéticos y ambientales (Suzzi *et al.*, 1997).

En el presente trabajo se estudia y evalúa en 11 cepas de levadura floculantes pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*, el efecto que individualmente ejercen distintos valores de parámetros químicos: pH (3 y 6), sacarosa, glucosa, fructosa y manosa (0,001 M y 1 M), etanol (5,5 % vol. y 11,0 % vol.), glicerol (5,0 g/L y 10,0 g/L) y cloruro cálcico (0,001 M

y 1 M), sobre su capacidad de formar flóculos, respecto a un control estándar establecido, así como de poner en evidencia las condiciones más apropiadas para la manifestación de los mismos y sus implicaciones enológicas.

Los resultados obtenidos muestran una tendencia general de comportamiento en la mayoría de las cepas ensayadas de presentar una disminución en la capacidad de flocular a los valores de pH y concentraciones de azúcares y cloruro cálcico más elevados entre los elegidos en este estudio, tendiendo por el contrario a verse favorecida por valores de pH más ácidos, bajas concentraciones de azúcares y cloruro cálcico, así como por la presencia de glicerol y principalmente de etanol en el medio. Ahora bien, es importante destacar que en las manifestaciones de la capacidad floculante de las levaduras mencionadas, existe un carácter marcadamente dependiente de la cepa estudiada. •

## Bibliografía

Suzzi, G., Romano, P., Sora, S.: "Flocculation expression in a strain of wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*", *Ann Microbiol Enzimol* 1997; 47: 53-62.

# Formación de tiramina por las bacterias lácticas del vino. Purificación y caracterización del enzima tirosina descarboxilasa de las cepas implicadas

---

Victoria Moreno-Arribas<sup>1</sup> y Aline Lonvaud-Funel

**E**n los alimentos fermentados, como es el vino, la formación de aminas biógenas tiene lugar, principalmente, por la presencia de bacterias lácticas que producen enzimas biodegradativas capaces de descarboxilar los aminoácidos precursores correspondientes. Las aminas que más frecuentemente se encuentran en el vino son la histamina, tiramina, putrescina (1,4-diaminobutano), cadaverina (1,5-diaminopentano) y feniletilamina. La mayoría de los trabajos realizados en el vino hasta la fecha actual, se han referido al estudio de la producción de histamina (Coton *et al.*, 1998). Con respecto al enzima tirosina descarboxilasa (TDC), implicado en la formación de tiramina, las investigaciones se han limitado a la TDC de la bacteria *Enterococcus faecalis* (Borrensen *et al.*, 1990).

En este trabajo se han estudiado las condiciones de producción de tiramina en el vino, considerándose los siguientes aspectos:

- Producción de aminas biógenas por las bacterias lácticas durante la vinificación
- Aislamiento e identificación de cepas de bacterias lácticas productoras de tiramina en el vino
- Estudio de las condiciones de producción de tiramina por las cepas implicadas, en medios de cultivo y en vinos
- Actividad tirosina descarboxilasa de *Lactobacillus brevis*. Purificación y caracterización del enzima.

Los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento del enzima tirosina descarboxilasa y proporcionan información relevante para controlar la producción de tiramina por las bacterias lácticas del vino. •

## Bibliografía

- Coton *et al.*: *J Appl Microbiol* 1998; 84: 143-151.  
Borrensen *et al.*: *Biochim Biophys. Acta* 1990; 393: 108-115.

# Influencia de la cepa de levadura en el contenido de aminas biógenas en los vinos

Diego Torrea Goñi, Teresa Garde Cerdán y Carmen Ancín Azpilicueta

La presencia de aminas en el vino, en elevadas concentraciones, puede provocar impacto negativo en el aroma<sup>1</sup> y en algunos casos efectos tóxicos en el consumidor.<sup>2</sup> Varios factores influyen en el contenido de aminas en el vino, entre ellos la cepa de levadura y la composición aminoacídica del mosto.<sup>3</sup> El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Na33, D47 y K1M) en la concentración de aminas biógenas en vinos rosados. Asimismo, se analizó la relación entre la concentración de estas aminas y la utilización de sus aminoácidos precursores durante la fermentación. Como muestra control se utilizó vino rosado procedente de mosto fermentado con las levaduras indígenas. Los resultados muestran, que dependiendo de la

cepa de levadura que condujo el proceso fermentativo, hubo una ligera diferencia en el contenido de aminas biógenas en los vinos (tabla 1). Sin embargo, en ningún caso se alcanzaron concentraciones suficientes para afectar al aroma del producto o para provocar toxicidad. No se encontró relación entre el contenido de aminas biógenas en el vino y la utilización de los aminoácidos precursores durante la fermentación. •

## Bibliografía

- <sup>1</sup> Lehtonen, P.: *Am J Enol Vitic* 1996; 47: 127-132.
- <sup>2</sup> Radler, F., Fäth K.P.: Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine, En: J. Rantz, ed.: American Society for Enology and Viticulture, Davis, California, 1991: 185-195.
- <sup>3</sup> Vázquez, M.B.: Tesis, Universidad del País Vasco, San Sebastián, 1996.

**Tabla 1:** Concentración de aminas en los vinos. Los resultados se muestran en mg/L y se dan con su desviación típica

	Control	Na33	D47	K1M
Putrescina	11 536 ± 523	8751 ± 288	11 977 ± 515	10 224 ± 865
Espermina	27 ± 3	24 ± 4	92 ± 3	164 ± 8
Fe + Esd <sup>b</sup>	99 ± 8	58 ± 4	234 ± 24	158 ± 15
Histamina	428 ± 34	406 ± 17	436 ± 37	514 ± 31
Tiramina	224 ± 14	227 ± 24	a	101 ± 11
Dimetilamina	279 ± 28	270 ± 11	172 ± 16	276 ± 18
Etilamina	438 ± 32	419 ± 13	965 ± 39	700 ± 13
Isopropilamina	a	a	81 ± 2	99 ± 4
Pirrolidina	240 ± 16	170 ± 9	341 ± 16	472 ± 10

<sup>a</sup> no detectado; <sup>b</sup> feniletilamina + espermidina

# Producción de aminas biogénicas por bacterias lácticas de origen enológico

J.M. Landete, S. Ferrer e I. Pardo

Las aminas biogénicas son bases orgánicas de bajo peso molecular que poseen actividad biológica en los animales. En los alimentos fermentados, como es el caso del vino, son los microorganismos (bacterias lácticas y levaduras) los que pueden formar éstas sustancias por descarboxilación de los aminoácidos presentes en la materia prima.

Las aminas biogénicas más destacables por sus efectos sobre la salud humana y por su abundancia en los vinos y mostos son: histamina, tiramina, feniletilamina, cadaverina, putrescina y agmatina. En este trabajo se han caracterizado más de 600 cepas de bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus*) procedentes de mostos y vinos de varias zonas geográficas según su capacidad o incapacidad para producir estos compuestos. El ensayo de las actividades aminobiogénicas se realizó en primer lugar mediante un método de detección en placa. Los resultados obtenidos fueron:

- 1) Las cepas del género *Lactobacillus* son las que presentan un mayor porcentaje de cepas productoras de aminas biogénicas.
- 2) La amina más producida por todos los géneros y en especial los lactobacilos, es la tiramina.
- 3) Todas las aminas biogénicas, con la ex-

cepción de la agmatina, se producen en mayor cantidad cuando las cepas se cultivan en condiciones de aerobiosis.

- 4) Las cepas de los géneros *Pediococcus* y *Leuconostoc* apenas producían aminas biogénicas detectables por este método.
- 5) Existen diferencias en la capacidad de generar aminas entre cepas aisladas de distintas zonas geográficas.
- 6) Se ha observado una correlación entre la producción de tiramina y feniletilamina.
- 7) Se ha puesto de manifiesto que el piridoxal es un cofactor que potencia la actividad descarboxilasa.
- 8) Se ha detectado un pequeño número de cepas productoras de histamina. Esto puede deberse a que existen pocas cepas o bien a que los niveles de histamina que producen son indetectables por este método.

Igualmente se ha modificado un método enzimático, previamente descrito, que permitía cuantificar la capacidad de producción de histamina. Las modificaciones introducidas permiten aumentar la sensibilidad del método tanto en medios sintéticos como en el mosto. Con este método se estudió la influencia del pH, del nivel del precursor y del medio de cultivo sintético o natural en la producción de esta amina biógena. •

Departamento de Microbiología y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Valencia, Burjassot, Valencia (Jose.M.Landete@uv.es)

Este trabajo está integrado dentro del proyecto de investigación AGL2000-0827-C02-01 subvencionado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología.

# Estudio de la microbiota láctica durante la vinificación mediante hibridación *in situ*

L. Blasco, S. Ferrer e I. Pardo

Se han desarrollado una serie de sondas específicas para hibridación *in situ* de bacterias lácticas propias del vino, que permiten identificar la microbiota de este medio y de este modo controlar la evolución de las especies a lo largo de la vinificación. Estas sondas fueron diseñadas a nivel de especie o de género contra regiones concretas del rRNA 16S, y se empleó la fijación y permeabilización en porta y el marcaje con distintos fluorocromos para su visualización en microscopio de epifluorescencia.

Para probar las sondas se eligieron las especies de bacterias lácticas más representativas de ese hábitat: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Oenococcus oeni*, *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus parvulus*. Se ha comprobado que las sondas no producen reacciones cruzadas con otras especies o géneros presentes en muestras de vino.

Se ha demostrado que las sondas desarrolladas son específicas para las bacterias ensayadas, que no producen ruido de fondo ni tinciones inespecíficas y que permiten la identificación y recuento de poblaciones mixtas.

El número de bacterias por mL en vinos durante la fermentación es muy inferior al que se requiere para una visualización representativa de la población (aproximadamente  $10^8$  células/mL). Por esta causa la técnica de hibridación en porta resultaba inadecuada en

este tipo de muestras. Para solventar el problema se optó por concentrar los microorganismos realizando una filtración de un volumen mayor de mosto o vino sobre un filtro de policarbonato y realizando la fijación, permeabilización e hibridación sobre este filtro. Se comprobó mediante tinción con DAPI y mediante hibridación con la sonda universal EUB 338 que la retención de microorganismos sobre los filtros es próxima al 100%, es decir que no se pierden células con los lavados.

Se han comparado las técnicas de hibridación *in situ* en porta y en filtros de policarbonato, observándose que en ésta última la distribución de las células es más homogénea.

Aunque ambas técnicas permiten la identificación y la cuantificación directa de las bacterias a partir de medios naturales, la hibridación en filtro mejora notablemente la visualización y recuento de microorganismos por la disposición de estos en un único plano.

Igualmente, se puso a punto un sistema rápido para evaluar la viabilidad de la microbiota láctica en vino. Se basa en la utilización de yoduro de propidio que tiñe las células con la membrana dañada (muertas) de color rojo y el SYTO9 (LIVE/DEAD®) que tiñe las células vivas de color verde.

Esta metodología facilita enormemente el conocimiento del estado microbiológico del vino, disminuyendo enormemente el tiempo necesario para conocer el número de microorganismos viables y totales. •

# Incremento de la acidez de vinos mediante la inoculación de bacterias lácticas

---

P. Val, S. Ferrer e I. Pardo

La composición química de la uva ha ido evolucionando a lo largo del tiempo como consecuencia del cambio climático y de las prácticas viticulturales. Una de las consecuencias ha sido el progresivo descenso de la acidez de los mostos en las regiones de clima cálido. Este hecho resulta perjudicial sobre todo para la elaboración de vinos jóvenes que deben tener un alto contenido en ácidos. Para tratar de paliar el problema de la baja acidez hemos desarrollado una estrategia en la cual se utilizan levaduras y bacterias lácticas seleccionadas, para promover la acidificación biológica. La selección de las levaduras se realizó en base a su pertenencia a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, a su velocidad de fermentación, capacidad de agotamiento de azúcares, incapacidad para degradar ácidos orgánicos presentes en el mosto y a su capacidad para producir ácidos málico y/o succínico.

Nuestro trabajo se centró fundamentalmente en el proceso de selección y mejora de bacterias lácticas. El procedimiento de selección se aplicó a 394 cepas bacterianas ais-

ladas procedentes de distintas zonas vitivinícolas de clima cálido y los criterios de selección utilizados fueron: la posesión de un metabolismo homoláctico a fin de incrementar el contenido en ácido láctico (pero no de ácido acético en mosto), elevada producción de ácido láctico, buen crecimiento en mosto, incapacidad para la degradación de ácidos del vino, resistencia al anhídrido sulfuroso y bajas producciones de acetoína y de ácido acético.

Se han llevado a cabo una serie de experiencias en las que se han inoculado mostos con cepas seleccionada de levaduras y bacterias, observándose que algunas combinaciones de microorganismos permiten aumentar la acidez total al mantenerse o aumentar la cantidad de ácido málico y aumentar la cantidad de ácido láctico. Igualmente, se están desarrollando cepas de bacterias lácticas deficientes en actividad maloláctica que puedan utilizarse como generadoras de ácido láctico a partir de azúcares pero que no degraden el ácido málico del mosto. •

# Inducción de la fermentación maloláctica por *Oenococcus oeni* y su efecto sobre el metabolismo de azúcares y ácidos orgánicos

---

L. Polo, I. Pardo y S. Ferrer

La inducción de la fermentación maloláctica (FML) mediante inoculación con cepas de *Oenococcus oeni* seleccionadas es una práctica cada vez más utilizada en la producción de vinos tintos de calidad. La elección de cepas adecuadas de esta especie requiere la caracterización metabólica, el estudio de su cinética de crecimiento en vino y de su contribución a las características organolépticas del mismo. Si el objetivo de esta selección es la comercialización a gran escala de las cepas, se han de estudiar estos aspectos en diferentes tipos de vinos de orígenes geográficos muy diferentes.

En el presente trabajo se ha determinado la capacidad metabólica de cultivos iniciadores de *O. oeni* sobre azúcares y ácidos orgánicos, tanto en medio sintético como en vinos blancos y tintos de vinos de 5 países europeos: Austria, España, Francia, Italia y Portugal. Se han utilizado cepas previamente seleccionadas como adecuadas para ser cultivos iniciadores provenientes de colecciones, así como cepas nuevamente aisladas de las propias bodegas en las que se han realizado los ensayos. Dichas vinificaciones han sido hechas a distintos niveles: nanovinificaciones (2 litros), microvinificaciones (16 litros), y vinificaciones industriales (desde barricas de 225 litros hasta depósitos de 500 hL, dependiendo de cada tipo de vino). Las nanovifika-

ciones fueron hechas en el laboratorio, las microvinificaciones en laboratorio o bodega, y las vinificaciones industriales en bodega.

Las conclusiones más importantes son que la degradación del ácido cítrico depende de la cepa y condiciones del medio o del vino, el ácido tartárico no es atacado en ningún caso por las cepas de *O. oeni* estudiadas. La actividad maloláctica es muy buena, habiendo sido posible realizar la FML en todos los casos, incluso en vinos difíciles o temperaturas muy bajas (10-12 °C). La producción de ácido acético es reducida, e incluso algunas cepas sintetizan muy poco de este ácido. El metabolismo de los azúcares, especialmente de las pentosas, es limitado en el vino y mayor en medio sintético; en cualquier caso, también depende de las condiciones y la cepa. No se han detectado variaciones significativas en las concentraciones de glicerol y etanol en ningún caso.

Como valoración global de la inoculación directa con las bacterias ensayadas, la FML ha sido posible en todos los casos, y normalmente en poco tiempo. La implantación de los cultivos iniciadores ha sido buena, habiendo colonizado el vino la cepa inoculada. Se ha contribuido a mejorar la calidad de los vinos (en especial en lo relativo a aromas), e incluso en algún caso la inoculación de estos cultivos ha impedido la producción de aminas

biógenas por parte de las bacterias autóctonas del vino.

Como resultado de este proyecto se han seleccionado 8 cepas de *O. oeni* por ser las

que poseían un metabolismo más seguro y adecuado y por desarrollarse en mejores condiciones en la mayoría de los vinos ensayados. •

# El diseño de experiencias como herramienta para evaluar parámetros enológicos: II. Variables microbiológicas en los compuestos neutros y ácidos

---

J. Navarro, C. Otero y T. Huerta

La valoración de un vino depende principalmente de su calidad. Los factores que provocan desviaciones o que permiten alcanzar ésta son los que definen mayoritariamente los problemas que surgen en la industria enológica.

En este sentido se ha encaminado la investigación científica, permitiendo avances tecnológicos que se han plasmado en los procesos de producción intentando obtener así una mayor calidad y tipificación de los productos.

Resulta, por lo tanto, vital el estudio de todos aquellos factores, normalmente numerosos que puede afectar a la calidad, atendiendo a la problemática concreta que plantea cada región vitivinícola.

Para ello tradicionalmente se ha enfocado los estudios a ir observando uno a uno de forma secuencial los efectos de cada factor. Esta práctica experimental resulta desaconsejable cuando se estudian un número de factores elevados, por ello se suele recurrir a las técnicas de diseño de experiencias, cuyo soporte estadístico es el análisis de la varianza.

Los planes factoriales equilibrados constituyen los diseños más sencillos y ampliamente usados. En particular los planes  $2^K$ , en la

que todos los factores K son estudiados a dos niveles y que manteniendo la ortogonalidad en todas sus combinaciones, nos permiten determinar los efectos simples y las interacciones de todos sus factores.

El uso de levaduras seleccionadas en fermentaciones controladas hace viables productos de elevada calidad, frente a otros métodos más tradicionales de fermentaciones sin control levaduriforme realizadas por cepas salvajes.

En este trabajo se pretende contribuir en la elección racional de estas levaduras, realizando un estudio basado en su influencia en la acidez y en la producción de glicerol y etanol.

Para ello se lleva a cabo un diseño  $2^K$  por duplicado de 32 microvinificaciones con 4 levaduras aisladas de mostos de las denominaciones de origen de la Comunidad Valenciana, de las cuales tres son de alto poder fermentativo del género *Saccharomyces* y una de bajo poder fermentativo, *Kloeckera apiculata*, de este modo se podrán observar las propiedades y facultades que aporta cada una de las levaduras, que le hagan ser seleccionadas para la elaboración de vinos, con la intención de que estas características sean reflejadas en el producto final. •

# El diseño de experiencias como herramienta para evaluar parámetros enológicos:

## I. Variables microbiológicas en la fracción volátil

---

C. Otero, J. Navarro y T. Huerta

Los problemas que se plantean en cualquier tipo de industria, y en concreto en la industria enológica afectan principalmente a la evaluación de la calidad del producto.

El conocimiento científico de los factores y parámetros que influyen en la calidad de un vino es fundamental para que éste pueda ser transformado y mejorado de acuerdo con las exigencias del mercado.

Por esta razón, surge la necesidad de plantear un diseño de experiencias válido que nos permita evaluar diferentes características enológicas sin tener que recurrir al enfoque tradicional, el cual consiste en hacer pruebas modificando cada vez un solo factor.

El diseño de un experimento consiste en los pasos previos a su realización, dirigidos a asegurar que los datos se obtengan de tal modo que permitan realizar un análisis objetivo encaminado a efectuar generalizaciones válidas con respecto al problema planteado.

El diseño de experimentos está basado en planes factoriales equilibrados, cuyo soporte estadístico es el análisis de la varianza.

Para llevar a cabo este estudio se ha realizado un diseño factorial con 4 variables a dos niveles, cada una de las cuales representa un tipo de levadura, empleándose para ello 3 levaduras de alto poder fermentativo del género *Saccharomyces* y otra cepa perteneciente al género *Kloeckera*. De este diseño obtenemos 16 fermentaciones diferentes por duplicado que nos permiten estudiar tanto los efectos simples que producen cada una de las levaduras por separado, así como las interacciones que aparecen cuando el proceso fermentativo lo realizan especies diferentes.

Con el fin de discernir si la influencia de las levaduras es determinante en la producción de los compuestos orgánicos volátiles, se realizó un análisis de la varianza en el cual se pone de manifiesto cual de los analitos depende significativamente del tipo de inóculo realizado o bien determinar si alguna de las levaduras introducen cambios importantes en el perfil aromático del vino. •

# Excreción de aminoácidos en distintas condiciones de crianza biológica

J.C. Mauricio, E. Valero, T. Berlanga, C. Millán y J.M. Ortega

El proceso de crianza biológica para la producción del vino fino consiste en un particular cultivo semicontinuo, en el que levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* están inmovilizadas formando un velo de flor sobre la superficie del vino. Estas levaduras que tienen un metabolismo oxidativo consumen rápidamente el oxígeno disuelto del vino y dificultan la solubilización del oxígeno del aire, lo que consigue un ambiente reductor. Nosotros hemos sugerido que en estas condiciones, la cadena respiratoria de transporte de electrones debe de estar limitada, viéndose favorecidas las reacciones metabólicas de reducción acopladas a la oxidación de los coenzimas NADH y NADPH.

En este trabajo, se ha cuantificado por HPLC la concentración de aminoácidos mayoritarios y de los excretados al vino por un cultivo de células de una raza de flor de *S. cerevisiae* raza *capensis* cultivada en forma de velo durante 9 meses en dos tipos de vinos: vino joven y vino agotado por envejecimiento. El cultivo con vino joven se realizó en tres condiciones: anaerobiosis, semianaerobiosis y semiaerobiosis. El vino agotado se obtuvo por crecimiento y retiradas sucesivas del velo de flor hasta que éste dejó de formarse y se utilizó directamente y adicionado de 11 mM de L-prolina o ácido L-glutámico o amonio en semiaerobiosis.

La fuente principal de nitrógeno del vino joven para las levaduras de flor fue la L-prolina (11 mM), seguida por la L-fenilalanina (1,8 mM), por el contrario en el vino agotado los compuestos nitrogenados mayoritarios fueron: la L-fenilalanina (0,91 mM) y la L-cisteína (0,95 mM). La mayor formación de velo se observó en la crianza con vino joven y en semiaerobiosis, seguida de la semianaerobiosis y de la anaerobiosis. En el vino agotado no hubo formación de velo, sólo se observó un pequeño anillo. Cuando se le adicionó amonio, ácido L-glutámico o L-prolina, se formó un velo de flor menor que el formado en el vino joven. Esto hace suponer que la no formación de velo se debe a una deficiencia de la fuente de nitrógeno y quizás de algún factor de crecimiento.

En las determinadas condiciones ensayadas se ha observado una excreción de ciertos aminoácidos como L-prolina, L-treonina, L-triptófano, y de los aminoácidos azufrados L-metionina y L-cisteína. La biosíntesis de *novo* de estos aminoácidos implica un balance positivo en la reoxidación de los coenzimas NADH y NADPH, lo que permite el mantenimiento en equilibrio del potencial de oxidorreducción celular en un medio no fermentable (vino) cuando el oxígeno se encuentra limitado. •

**Tabla 1: Resultados**

	<b>L-Pro (mM)</b>	<b>L-Phe (mM)</b>	<b>L-Thr (mM)</b>	<b>L-Trp (mM)</b>	<b>L-Met (mM)</b>	<b>L-Cys (mM)</b>
Vino joven	10,8 ± 0,47	1,77 ± 0,13	0,40 ± 0,02	0,15 ± 0,05	0,05 ± 0,00	0,21 ± 0,03
Semiaerobiosis	0,21 ± 0,02	0,92 ± 0,11	0,42 ± 0,06	0,02 ± 0,00	0,10 ± 0,01	1,05 ± 0,42
Semianaerobiosis	5,60 ± 0,31	0,65 ± 0,13	0,49 ± 0,04	0,23 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,27 ± 0,04
Anaerobiosis	15,5 ± 2,46	2,19 ± 0,08	0,63 ± 0,09	0,49 ± 0,06	0,07 ± 0,02	0,78 ± 0,07
Vino agotado	0,22 ± 0,02	0,91 ± 0,07	0,28 ± 0,00	0,17 ± 0,11	0,03 ± 0,01	0,95 ± 0,01
Control	0,28 ± 0,01	0,37 ± 0,05	0,60 ± 0,03	0,28 ± 0,19	0,05 ± 0,01	1,01 ± 0,17
+ L-Pro (11 mM)	4,93 ± 0,69	0,34 ± 0,03	0,59 ± 0,08	0,63 ± 0,13	0,07 ± 0,01	1,12 ± 0,16
+ L-Glu (11 mM)	0,14 ± 0,01	0,47 ± 0,12	0,72 ± 0,04	1,65 ± 0,23	0,10 ± 0,00	2,03 ± 0,92
+ L-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (11mM)	0,34 ± 0,02	0,32 ± 1,00	0,55 ± 0,01	0,30 ± 0,19	0,07 ± 0,01	1,05 ± 0,02

# Influencia de cepas *killer* de *Saccharomyces cerevisiae* en fermentaciones de mosto

---

Manuel Ramírez,<sup>1</sup> Francisco Pérez,<sup>3</sup> José A. Regodón,<sup>3</sup> María L. Álvarez,<sup>2</sup> Emiliano Zamora<sup>2</sup> y Concepción de Miguel<sup>3</sup>

**S**e presenta un estudio sobre el efecto de cepas *killer* de *Saccharomyces cerevisiae* sobre cepas sensibles durante la fermentación de mosto utilizando un nuevo método para seguir la evolución de las poblaciones de levaduras (detección de un marcador cromosómico de resistencia a cicloheximida). La capacidad de las levaduras *killer* para eliminar las levaduras sensibles depende de la proporción inicial de levaduras *killer*, de la susceptibilidad de las cepas sensibles, y del tratamiento del mosto. En mosto filtrado estéril, una proporción inicial del 2-6% de levaduras *killer* puede retrasar la fermentación

y eliminar las levaduras sensibles isogénicas. Cuando coexisten levaduras no isogénicas, es necesario una proporción más variable de levaduras *killer* para conseguir el mismo efecto. Las partículas que permanecen en suspensión tras el desfangado del mosto disminuyen el efecto de la toxina *killer*. La adición de bentonita elimina el retraso de fermentación y la supresión de las levaduras sensibles; sin embargo, la adición de activador de fermentación con paredes de levaduras no tiene el mismo efecto, aunque disminuye el retraso en el inicio de fermentación. •

---

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Badajoz ([mramirez@unex.es](mailto:mramirez@unex.es))

<sup>2</sup> Estación Enológica de Almendralejo, Consejería de Agricultura y Medio Ambiente, Almendralejo

<sup>3</sup> Departamento de Biología y Producción de los Vegetales, Universidad de Extremadura, Badajoz

# Factor *killer* en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* procedentes de vinificaciones espontáneas (1994-2000) en la DOC Rioja. Consideraciones sobre su influencia en la fermentación

S. Epifanio,<sup>1</sup> P. Garijo,<sup>1</sup> R. López,<sup>1</sup> P. Santamaría,<sup>1</sup> A.R. Gutiérrez<sup>2</sup> y A. Palacios<sup>2</sup>

**E**n este trabajo se estudia el fenotipo respecto al carácter *killer* en 2190 levaduras aisladas a partir de fermentaciones espontáneas en la DOC Rioja. El número de bodegas estudiadas fueron 15, de las cuales 14 eran instalaciones comerciales caracterizadas por no haberse practicado nunca inoculaciones con cepas exógenas. En ellas se hizo un seguimiento durante 4 años (1997-2000). El número 15 corresponde a la bodega experimental del CIDA, donde si se han practicado inoculaciones puntuales con cepas comerciales dotadas de fenotipo *killer* o neutro, en depósitos diferentes a los estudiados. En esta bodega los estudios se realizaron durante 5 años (1994-1998).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la importancia real del carácter *killer* en la vinificación: presencia y evolución de los diferentes fenotipos durante la fermentación, influencia de la tecnología de vinificación sobre este carácter y modificación de la flora espontánea de una bodega debida a inoculaciones con cepas *killer*. Todo ello con el fin de valorar la gran importancia que se concede actualmente al factor *killer* en los programas de selección de levaduras para su posterior comercialización.

Los resultados de este trabajo indicaron que la distribución del carácter *killer* está ligada a la zona de producción y a la tecnología de elaboración empleada: las únicas cepas *killer* las encontramos en Rioja Baja, mientras que en vinificaciones por maceración carbóni-

ca prácticamente el 100% de las levaduras son sensibles. Se ha observado además que cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con diferentes fenotipos coexisten en diferentes etapas de la fermentación y que el fenotipo dominante varía en función del año estudiado, detectándose que las cepas sensibles son capaces no sólo de mantener su presencia sino incluso de incrementarla hasta hacerse dominantes en el medio, debido quizás a su mejor adaptación al mismo. Estos datos cuestionan la gran importancia que hasta ahora se ha dado al carácter *killer* en los programas de selección de levaduras, puesto que el fenotipo *killer* podría no aportar una ventaja en la vinificación dependiendo de múltiples factores.

En la bodega del CIDA se ha podido ver como a pesar de haberse practicado inoculaciones con cepas *killer* en depósitos próximos a los estudiados, el desarrollo de fermentaciones espontáneas se ha llevado a cabo sin presencia de la cepa sembrada y con cepas autóctonas de fenotipo sensible, lo que indica que el temor de algunos enólogos sobre la modificación de la flora sensible de la bodega tras la siembra con cepas *killer*, no debe ser la razón para no practicar la inoculación cuando sea necesario.

Como conclusión se podría decir que el carácter *killer* de las levaduras que participan en la fermentación podría tener menor importancia tecnológica de la que hasta ahora se le ha concedido. •

<sup>1</sup> Centro de Investigación y Desarrollo Agrario (CIDA) de La Rioja, Logroño ([cida@larioja.org](mailto:cida@larioja.org))

<sup>2</sup> Departamento de Agricultura y Alimentación, Complejo Científico Tecnológico, Universidad de La Rioja ([ana-rosa.gutierrez@daa.unirioja.es](mailto:ana-rosa.gutierrez@daa.unirioja.es))

# Estudio ecológico en una bodega de nueva implantación durante cinco vendimias consecutivas

G. Beltran, M. Novo, M.J. Torija, M. Poblet, N. Rozès, J.M. Guillamón y A. Mas

La transformación del mosto en vino es un proceso espontáneo llevado a cabo por las levaduras, principalmente por la especie *Saccharomyces cerevisiae*. El origen de estas levaduras vínicas sigue siendo hoy en día una cuestión controvertida. Tradicionalmente se asumía que todas las especies de importancia enológica provenían de la superficie de la uva. Estudios posteriores han demostrado que sólo algunas especies de no-*Saccharomyces* están presentes en la superficie de ésta. Mientras que la especie de mayor importancia enológica, *Saccharomyces cerevisiae*, es muy difícil aislarla en la naturaleza, llegando al mosto con todo el tratamiento mecánico de la vendimia. La controversia se debe a que recientes estudios han demostrado que las uvas dañadas y pasificadas contienen una rica población de microorganismos, entre ellos *S. cerevisiae*, y que estas bayas serían la principal fuente de levaduras en fermentaciones espontáneas.

En el presente estudio se ha realizado un seguimiento de las levaduras responsables de fermentaciones espontáneas, tanto en blanco (xarel·lo) como en tinto (garnacha). Todas las vinificaciones se llevaron a cabo espontáneamente en una bodega nueva durante los 5 primeros años de vendimia (1995-2000). No obstante, en el funcionamiento general de la bodega se inoculaba con diferen-

tes inóculos comerciales. Para la identificación y caracterización de las levaduras se han utilizado técnicas de biología molecular, como son el análisis de restricción (RFLP) del mtDNA y del rDNA.

Al tratarse de una bodega nueva se eliminó, al menos durante el primer año, la posible aportación de levaduras por parte de los equipos empleados en la vinificación, de manera que todas las especies encontradas eran cepas salvajes provenientes del propio mosto. En las posteriores vendimias nos encontramos con:

- Levaduras autóctonas: algunas ya identificadas con anterioridad y otras nuevas.
- Levaduras comerciales utilizadas en la bodega en otros depósitos.

Se ha podido observar que a pesar de que a partir del segundo año el número de levaduras autóctonas nuevas se reduce considerablemente, siempre se sigue presentando alguna. Así mismo, la variabilidad total se va reduciendo, con tendencia a imponerse un reducido número de levaduras comerciales que han pasado a ser residentes habituales en bodega. Finalmente, la contaminación desde los otros depósitos inoculados, es reducida pero significativa. •

# Desarrollo de técnicas moleculares de análisis de bacterias acéticas

---

Ángel González, Montse Poblet, Nicolás Rozès, Jose Manuel Guillamón y Albert Mas

Las bacterias acéticas, microorganismos gramnegativos y aerobios estrictos, son capaces de metabolizar tanto glucosa, como fructosa y etanol. Sin embargo, en condiciones de vinificación estos compuestos no son oxidados completamente hasta dióxido de carbono y agua, acumulándose en el medio diferentes catabolitos, siendo el mayoritario el ácido acético, que es la causa más frecuente de disminución de calidad en los vinos.

Esto hace que exista una necesidad de controlar la población y, hasta el momento, las técnicas microbiológicas clásicas no son ni concluyentes a nivel de cepa ni lo suficientemente rápidas. Hasta el momento se ha puesto a punto una técnica para la identificación de bacterias acéticas a nivel de especie (PCR-RFLP del rDNA 16S, Poblet *et al.*, 2000 y Ruiz *et al.*, 2000). En la actualidad el grupo investigador está desarrollando técnicas para el análisis de dichos microorganismos a nivel de cepa, ya que esto permitiría hacer un seguimiento ecológico de los diferentes proce-

sos en los que las bacterias acéticas intervienen. Las técnicas que se están desarrollando para analizar la bacterias acéticas a nivel de cepa son: ERIC, REP y AFLP.

Para comprobar la efectividad de las diferentes técnicas se utilizan unas 30 cepas de colección pertenecientes a todas las especies de bacterias acéticas descritas. Además de estas cepas de referencia se realizarán ensayos con un número similar de cepas de nuestra propia colección, aisladas en procesos industriales. De esta forma se podrá controlar de forma rápida y eficaz la presencia de las diferentes especies a lo largo de las fermentaciones alcohólica y maloláctica, así como determinar la cepa que se impone en cada uno de los procesos, lo cual sería de gran interés para la industria enológica. •

## Bibliografía

- M. Poblet, N. Rozès, J.M. Guillamón, A. Mas: *Lett Appl Microbiol* 2000; 30: 1-7.  
A. Ruiz, M. Poblet, A. Mas, J.M. Guillamón: *Int J Syst Evol Microbiol* 2000; 50: 1981-1987.

# Estudio del efecto de nuevos fungicidas sobre la dinámica poblacional de *Saccharomyces uvarum* en mosto variedad airén

M.A. García,<sup>1</sup> J. Oliva,<sup>1</sup> A. Barba,<sup>1</sup> M.A. Cámara<sup>1</sup> y F. Pardo<sup>2</sup>

La evolución de la flora levaduriforme, autóctona o inoculada, durante la fermentación esta influenciada por diversos factores, entre otros los tratamientos fitosanitarios. Los residuos de plaguicidas, en general, y de fungicidas, en particular, pueden alterar las rutas bioquímicas de la fermentación debido al efecto de los mismos sobre las levaduras. Mayoritariamente, la acción de estos productos sobre la población levaduriforme se produce a nivel de la síntesis de esteroides o inhibiendo la respiración o fermentación.

En este trabajo se estudia la influencia de los residuos de tres fungicidas (azoxystrobin, kresoxim-metil y quinoxifén), de reciente utilización en el viñedo de la DO Jumilla, sobre la evolución de la cinética fermentativa en vinificaciones inoculadas con *Saccharomyces uvarum*.

El estudio se llevó a cabo en mosto blanco (variedad airén) al que se sometió a un clarificado con filtro de placas (2-3 mm) a escala laboratorio y posteriormente una filtración amicrobica bajo vacío con filtros Millipore de 0,45 mm para obtener mosto estéril. Éste, se introdujo, sin sulfitar, y a razón de 1,5 L en recipientes de vidrio de 2 L de capacidad. La inoculación del mosto estéril se realizó a ra-

zón de 30 g/hL con un cultivo puro de *Saccharomyces uvarum* (UVAFERM UVA, Agrovín, Ciudad Real), también se añadió 20 g/hL de nutriente. Los tres fungicidas estudiados se adicionaron por separado y a dos dosis (1 y 5 ppm).

Durante la fermentación se realizó un seguimiento diario de la densidad y del recuento del número de levaduras viables. Para el recuento se utilizó como medio de cultivo YGC-agar y las placas fueron incubadas a 25 °C durante 72 horas.

De los resultados obtenidos se desprende que la presencia de residuos de los fungicidas estudiados, a las dosis utilizadas, no afecta de manera significativa la fermentación, ya que ni la inhiben ni la retrasan en el tiempo. Sin embargo, si se aprecia un efecto biocida inicial para los tres productos, que no persiste a lo largo de la fermentación. Estando este efecto más desarrollado para quinoxifén y menos para kresoxim-metil. La dosis no tiene una influencia clara en el mayor o menor efecto biocida.

La densidad final es, en todos los casos, adecuada para garantizar que no se produzcan refermentaciones durante la conservación del vino. •

<sup>1</sup> Departamento de Química Agrícola, Geología y Edafología, Facultad de Química, Universidad de Murcia (josoliva@um.es)

<sup>2</sup> Bodegas San Isidro (BSI) Jumilla, Murcia

# Evaluación del proceso autolítico de las levaduras utilizando técnicas químicas y de microscopía

---

*A.J. Martínez-Rodríguez, A.V. Carrascosa y M.C. Polo*

La composición y calidad de los vinos espumosos elaborados por el método tradicional está estrechamente relacionada con el proceso de autólisis de las levaduras que tiene lugar durante el envejecimiento de este tipo de vinos. Durante la autólisis se producen importantes cambios químicos y morfológicos en las células debidos a la participación de diversos enzimas. Una de las consecuencias de esta actividad enzimática, es la formación de poros en la pared celular de un tamaño suficiente para que puedan pasar al ambiente extracelular un gran número de compuestos y enzimas. Los compuestos nitrogenados se encuentran entre los mayoritarios de los que se excretan durante la autólisis y han sido objeto de estudio por diferentes autores.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos del estudio del proceso de autólisis, indirectamente a través del análisis de los compuestos nitrogenados liberados al medio extracelular y directamente mediante la observación estructural y ultraestructural de las levaduras utilizando microscopía óptica y electrónica. En el medio vínico modelo utilizado en este estudio, la mayor parte del proceso de autólisis tiene lugar en las primeras 24 horas de incubación a 30 °C. Durante el estudio analítico de los autolisados, se ha podido comprobar que hay una liberación de pépti-

dos y proteínas que son parcialmente hidrolizados en compuestos menos polimerizados. La mayor parte de los compuestos presentes en los autolisados son péptidos. El análisis microscópico utilizando la técnica interferencial de Nomarsky ha permitido comprobar que después de 24 horas de autólisis inducida el volumen de las levaduras es mucho menor, debido a la solubilización del contenido citoplasmático. En un gran número de células es posible observar también un incremento en el tamaño de la vacuola, que llega a ocupar prácticamente todo el volumen del citoplasma. El análisis ultraestructural utilizando microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas (LTSEM) nos ha permitido observar que producto de la autólisis aparecen en la pared celular de las levaduras numerosas arrugas y pliegues, en su mayor parte longitudinales. Las imágenes obtenidas de levaduras que se han fracturado durante la preparación para el análisis microscópico muestran la presencia de células vacías, en las que se ha solubilizado la mayor parte del contenido citoplasmático producto de la autólisis. Estos resultados indican que la mayor parte del proceso autolítico tiene lugar después de 24 horas de incubación en el medio vínico utilizado y coinciden con los obtenidos mediante el estudio analítico de los autolisados. •

# Resistencia de bacterias lácticas seleccionadas a procesos de congelación y liofilización

*M.C. Masqué,<sup>1</sup> R. Carbó,<sup>2</sup> S. Burón<sup>2</sup> y S. Rico<sup>1</sup>*

La fermentación maloláctica (FML) es una transformación realizada por bacterias lácticas, que supone la descarboxilación del ácido málico a ácido láctico. Los vinos resultantes se caracterizan por ser menos ácidos, presentar mayor estabilidad microbiológica y una mayor calidad organoléptica. Pero el vino no siempre constituye un medio favorable para el crecimiento de las bacterias, por lo que a veces es difícil que se realice dicha transformación. Una práctica habitual supone la inducción de la fermentación inoculando cultivos iniciadores seleccionados. De entre los cultivos iniciadores, se ha demostrado que las cepas autóctonas ofrecen mayores garantías de alcanzar los objetivos de estabilidad y calidad sensorial deseados.

El trabajo que se presenta tiene como objetivo seleccionar bacterias lácticas que presenten un buen comportamiento frente a la liofilización y que mantengan las buenas características enológicas que tenían antes de ser liofilizadas.

Se parte de 8 cepas lácticas seleccionadas en estudios previos por su capacidad de realizar la FML a elevadas graduaciones alcohólicas, pH bajos y concentraciones de sulfuroso elevado sin producir incrementos de acidez volátil ni aminas biógenas.

El proceso de liofilización se realiza inicialmente con cultivos en MRS al que se adicio-

na un 15% de glicerol, posteriormente se ve la necesidad de ir disminuyendo el agente crioprotector hasta que se llega a eliminar totalmente. Para mejorar el aspecto del liofilizado obtenido se ensaya exitosamente sustituir el medio sintético por solución salina, lavando previamente las células con la misma solución.

Durante el proceso de liofilización se realizan recuentos de células viables en placa en antes y después de la congelación y posterior liofilización y, se observa que se produce una pequeña pérdida de viabilidad que para algunas cepas llega a dos unidades logarítmicas como máximo. Así pues, en general, las cepas ensayadas toleran bien las distintas operaciones realizadas durante la liofilización.

Las bacterias liofilizadas se siembran directamente en vino, y se estudia tanto la supervivencia como la actividad maloláctica a lo largo de 20 días de ensayo. Se comparan estos dos parámetros con el comportamiento que presentan estas mismas cepas sin liofilizar.

Se observa que la degradación de ácido málico es inferior y más lenta para la mayoría de las cepas liofilizadas. De las 8 ensayadas sólo 3 han realizado la FML en los 15-20 días. El resto de cepas, que sin liofilizar presentaban un buen comportamiento, a los 15 días a penas habían iniciado la degradación de ácido málico. La población viable de bac-

<sup>1</sup> Estación de Viticultura y Enología de Reus (INCAVI), Reus ([incavi.reus@troc.es](mailto:incavi.reus@troc.es))

<sup>2</sup> Escuela Superior de Agricultura de Barcelona (UPC), Barcelona ([rosa.carbo@upc.es](mailto:rosa.carbo@upc.es))

Este trabajo se ha realizado dentro del marco del proyecto CICYT Ali96-0682.

terias tiene un comportamiento similar al observado en ensayos con cultivos frescos. Parece pues que, aún cuando las bacterias liofilizadas mantienen bien la capacidad de supervivencia en el vino, necesitan un tiempo

de adaptación superior para realizar la FML con una eficacia similar a la que presentaban antes de ser liofilizadas. Estos resultados nos indican la necesidad de una adaptación previa para alguna de las cepas. •

# Modificación de las proteínas y polipéptidos de vino tinto por *Oenococcus oeni* en condiciones de estrés

---

M.C. Manca de Nadra,<sup>1</sup> M.E. Farías,<sup>1</sup> E. Pueyo<sup>2</sup> y M.C. Polo<sup>2</sup>

Se ha detectado un máximo de síntesis de exoproteasa por *Oenococcus oeni* X<sub>2</sub>L en tampón citrato, pH 5,0 con SO<sub>2</sub> o SO<sub>2</sub> + etanol, en presencia de la fracción nitrogenada macromolecular de un vino tinto como sustrato. Teniendo en cuenta la disminución del número de células (dos unidades logarítmicas) en el tampón más los aditivos, el máximo de producción de exoproteasa (mM de aminoácidos x 10<sup>7</sup> células) se alcanzó en presencia de SO<sub>2</sub> + etanol (de 0,037 a 4,970 mM x 10<sup>7</sup> células después de 4 h de ayuno).

En las dos primeras horas de ayuno, la

velocidad de producción del enzima fue mayor en presencia de SO<sub>2</sub> y de SO<sub>2</sub> + etanol. Del estudio de los cromatogramas obtenidos por HPLC de la fracción peptídica, se ha comprobado que el péptido de tiempo de retención 47 min, disminuye en relación directa con el tiempo de incubación de *Oenococcus oeni* independientemente de las condiciones de estrés, sin embargo en las dos primeras horas de incubación en tampón + SO<sub>2</sub> + etanol este pico disminuye marcadamente permaneciendo en la misma concentración en las dos horas siguientes. •

---

<sup>1</sup> Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán y CERELA, Tucumán, Argentina

<sup>2</sup> Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Madrid ([mcpolo@ifi.csic.es](mailto:mcpolo@ifi.csic.es))

# Estudio molecular de la biota levaduriforme en una bodega de la DO Utiel-Requena

M. Villa,<sup>1</sup> C. Belloch,<sup>1</sup> F. Uruburu<sup>1</sup> y A. Querol<sup>2</sup>

Tradicionalmente, el vino se elabora por fermentación natural llevada a cabo por levaduras originales presentes en los racimos y en el propio sistema de la bodega. En España, como en muchos otros países, se intenta evolucionar hacia una fermentación dirigida de los mostos utilizando levaduras seleccionadas que, al proceder normalmente de otros ecosistemas, pueden sufrir problemas de aclimatación y no llegan a desplazar a la flora autóctona. Así pues, es necesario realizar un estudio de implantación de las cepas comerciales que se pretende utilizar en las bodegas, determinar qué levadura es la más adecuada y, en el caso de que las levaduras comerciales no lleven a cabo la fermentación adecuadamente será necesario realizar una selección de cepas en base a las características enológicas que determine la bodega dependiendo de los vinos que se vayan a elaborar.

Para diferenciar la levadura inoculada del resto de las levaduras presentes durante la fermentación, las técnicas de biología molecular se presentan como una alternativa a la metodología tradicional, como el método desarrollado por el grupo de Querol, *et.al.* (1996), basado en un análisis de restricción del DNA mitocondrial (mtDNA), sin necesidad de purificar el mtDNA (Querol *et.al.*, 1992b). Este método se ha aplicado tanto a la caracterización de levaduras vínicas seleccionadas como al seguimiento de levaduras a lo largo

de procesos industriales (Querol *et.al.*, 1992c). Es un método rápido de identificación de levaduras presentes en los mostos (Guillamón *et.al.*, 1998).

En el presente trabajo, se realizaron fermentaciones controladas con levadura inoculada y fermentaciones espontáneas a modo de control con distintas variedades de uva de vinos blancos y tintos. Después se procedió al aislamiento de las levaduras a partir de los vinos elaborados, tomando distintas muestras a lo largo de la fermentación. El siguiente paso fue la identificación de las levaduras aisladas mediante RFLP del producto de amplificación de la zona ITS-5.8S rRNA. Posteriormente, las levaduras identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* se caracterizaron molecularmente mediante RFLP del mtDNA. Utilizando la caracterización molecular a nivel de cepa se intentó calcular el porcentaje de implantación de levaduras comerciales en las condiciones de vinificación utilizadas en la bodega.

La técnica de RFLP rDNA permite diferenciar las especies de *Saccharomyces cerevisiae* de las que no lo son; pero no nos permite constatar que todas las especies *Saccharomyces cerevisiae* sean la misma cepa y que se correspondan con la levadura inoculada, por lo que recurrimos a la técnica de mtDNA que permite diferenciar a nivel de cepa y así, poder seguir el proceso de implantación de las levaduras comerciales. •

<sup>1</sup> Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Burjassot, Valencia (cect@uv.es, mercedes.villa@uv.es)

<sup>2</sup> Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA-CSIC), Burjassot, Valencia