



**LEVADURAS AUTOCTONAS AISLADAS
EN VINOS DE LA COMARCA DE
LAUJAR DE ANDARAX (ALMERIA).
SU INFLUENCIA EN LA CALIDAD.**

**Memoria que presenta para aspirar al grado
de Doctor en Farmacia, el licenciado
*Francisco Martín-Lagos López.***

Granada, Diciembre de 1999.

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

FACULTAD DE FARMACIA



DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL

Prof. Dra.
H. López G^a de la Serrana

Prof. Dr.
M. Olalla Herrera

Licenciado: ***Francisco Martín-Lagos López***
Aspirante al grado en Doctor en Farmacia.

DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y

BROMATOLOGIA

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE GRANADA



Directora: Mª DEL CARMEN LÓPEZ MARTÍNEZ

CERTIFICO que el presente trabajo ha sido
realizado por D. Francisco Martín-Lagos López, en el
Laboratorio del Departamento de Nutrición y Bromatología
de la Facultad de Farmacia de Granada

Granada, Diciembre de 1999.

AGRADECIMIENTOS

Al presentar esta Tesis Doctoral, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas.

A la Dra. Herminia López García de la Serrana, directora de este trabajo, ya que sin su especial ayuda y disponibilidad no hubiese sido posible su realización.

Al Dr. Manuel Olalla Herrera, director de este trabajo, por haberme enseñado a desenvolverme en la investigación con sus enseñanzas y su constante estímulo, por la inestimable ayuda y dedicación que siempre ha tenido conmigo.

A la Cooperativa Bodegas Valle Laujar y especialmente a su Gerente D. Gabriel Bosquet por su cooperación y ayuda que han permitido el desarrollo de esta Tesis.

Al Ministerio de Educación y Ciencia que, en cierta medida, ha colaborado en la realización de este Proyecto.

A la Colección Española de Cultivos Tipo por su colaboración en la verificación de algunos de los resultados de tipaje de levaduras.

Al Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada por todos estos años de colaboración.

A mi familia, por su apoyo incondicional para la realización de esta Tesis, su paciencia y confianza.

Por último, a todas aquellas personas, que sin aparecer aquí reflejadas, han contribuído de alguna forma a la realización de esta Tesis Doctoral.

A todos, gracias.

ÍNDICE

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| INTRODUCCIÓN..... | 15 |
| I.- GENERALIDADES..... | 17 |
| I.A.- Antecedentes Históricos De La Viticultura Alpujarreña..... | 19 |
| I.B.- Estudio Del Medio..... | 23 |
| I.B.1.- Situación geográfica..... | 27 |
| I.B.2.- Climatología..... | 28 |
| I.B.3.- Estudio Edáfico..... | 33 |
| I.B.4.- Estudio Agroeconómico..... | 42 |
| II.- PROCESO DE VINIFICACIÓN EN LA ZONA..... | 47 |
| II.A.- La Vid En La Zona En Estudio..... | 48 |
| II.A.1.- Características del viñedo..... | 48 |
| II.A.2.- Descripción de variedades..... | 52 |
| II.A.3.- Técnicas tradicionales de cultivo..... | 57 |
| II.A.4.- Proceso de maduración de la uva..... | 59 |
| II.B.- Obtención Y Características Del Mosto..... | 62 |
| II.C.- Técnicas de Vinificación en la Zona. | 63 |
| II.C.1.- Vino tradicional..... | 63 |
| II.C.2.- Vinos actuales..... | 65 |
| III.- FACTORES MICROBIOLÓGICOS..... | 68 |
| III.A.- Antecedentes Históricos..... | 68 |
| III.B.- Características Generales De Las Levaduras..... | 70 |
| III.B.1.- Características morfológicas..... | 70 |
| III.B.2.- Clasificación de las levaduras..... | 71 |
| III.B.3.- Citología..... | 74 |
| III.B.4.- Reproducción..... | 76 |
| III.B.5.- Nutrición y Metabolismo..... | 77 |
| III.C.- Aplicaciones Nutricionales De Las Levaduras..... | 84 |
| III.D.- Condiciones Generales Para El Cultivo De Levaduras..... | 85 |
| III.E.- Técnicas De Aislamiento..... | 87 |
| III.E.1.- Generalidades..... | 87 |
| III.E.2.- Identificación Taxonómica De Las Levaduras Aisladas..... | 90 |
| III.E.3.- Otras Técnicas Modernas Identificación..... | 97 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| OBJETIVOS DEL PROYECTO DE TESIS DOCTORAL..... | 99 |
| PARTE EXPERIMENTAL..... | 103 |
| I.- PLAN DE TRABAJO..... | 105 |
| II.- TÉCNICAS ANALÍTICAS..... | 106 |
| II.A.- Parámetros Físico-Químicos..... | 106 |
| II.B.- Ácidos Orgánicos Y Fermentación Maloláctica..... | 114 |
| II.B.1.- Determinación Individual De Ácidos Orgánicos Por HPLC..... | 114 |
| II.B.2.- Determinación Enzimática De Ácido Máfico Y Láctico..... | 118 |
| II.C. Alcoholes, Aldehídos Y Esteres..... | 120 |
| II.C.1.- Cromatografía De Gases Con Detector FID..... | 120 |
| II.C.2.- Cromatografía De Gases Acoplada A Un Espectrofotómetro De Masas..... | 122 |
| II.D.- Determinación De Elementos Minerales Por Espectrofotometría Atómica..... | 124 |
| III.- ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO..... | 127 |
| III.A.- Control Microbiológico..... | 127 |
| III.A.1.- Recuento de mohos levaduras y bacterias ácidas..... | 128 |
| III.A.2.- Recuento de bacterias totales..... | 128 |
| III.A.3.- Recuento de bacterias acidófilas..... | 128 |
| III.B.- Técnicas De Aislamiento Y Caracterización De Levaduras | 129 |
| Identificación Taxonómica De Las Levaduras Aisladas..... | 132 |
| Características Morfológicas De Las Células..... | 132 |
| Características De Los Cultivos..... | 133 |
| Características Fisiológicas Y Bioquímicas..... | 134 |
| Sistemas De Identificación API..... | 137 |
| Interpretación De Los Resultados..... | 140 |
| RESULTADOS..... | 141 |
| I.- CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS..... | 143 |
| II.- ESTUDIO MICROBIOLÓGICO..... | 151 |
| DISCUSIÓN DE RESULTADOS..... | 161 |
| CONCLUSIONES..... | 221 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 231 |
| ANEXOS..... | 259 |

INTRODUCCIÓN

I.- GENERALIDADES

La historia del vino es inseparable de la historia del hombre. Se han encontrado hasta 40 variedades de la vid anteriores a la aparición del "homo" incluso en paralelos en los que hoy resulta difícil, dada su climatología, pensar en su existencia.

El conocimiento de esta planta y el consumo de su zumo fermentado probablemente tenga su origen en los países ribereños del Mar Negro y de Cáucaso. Se sabe que ya era cultivada en la edad de bronce (3000-1500 años a.C.), en Egipto y las islas del mar Egeo, y a partir de la edad del hierro (1500 a 1000 años a.C.) en Italia y otras regiones europeas (Hugh, 1986).

Es un elemento que aparece inmerso en casi todas las culturas, así, el Génesis habla de su utilización y Moisés, posteriormente, señala normas de cultivo y recolección. La cultura egipcia lo atribuía a Osiris y los griegos a Dionisio; además, se han encontrado poemas indios que hablan de él, y en China, se conservan normas escritas para su elaboración unos 2000 años antes de nuestra era. (Andrieu y col., 1987).

Durante la dominación griega (1000 años a.C.), se expandió su utilización, y se puede decir que llegó por primera vez a países como Francia e Italia. (Johnson, 1977).

Los romanos, ya obtuvieron a partir de sus vinos, famosos caldos (Palermo, Faustino, etc.) que, a manera de los orientales, le solían mezclar sustancias diversas: brea, miel, mirra, etc.; llevaron a cavo la plantación de viñedos de cierta envergadura; se les atribuye la primera clasificación de las variedades de uva, concretamente Plinio en el siglo

I, describe con bastante exactitud 91 variedades de uva y 50 clases de vinos y además parece ser que realizaban el envejecimiento del vino.

Posteriormente, el Cristianismo favoreció la difusión del cultivo de la vid, no sólo por su necesidad para la celebración de la misa, sino también o como consecuencia de ser dueños de los viñedos más importantes de Europa. Sin embargo tras la caída del imperio romano, la viticultura, sufre un gradual retroceso, y durante la Edad Media, son los monasterios los encargados del cultivo de la vid y la elaboración del vino. Fue Carlomagno el que impulsó la viticultura en el valle del Rhin y en Francia, donde desde muy antiguo ha sido una actividad muy floreciente. En el siglo XVIII debemos destacar a un monje Benedictino, don Perignon, en la abadía de Haut Villers, de la región de la Champaña francesa, que descubre el Champagne.

Aproximadamente hacia 1870, algunas especies americanas fueron plantadas en los jardines botánicos de Francia e Inglaterra, y accidentalmente, introdujeron la filoxera en Europa. Enfermedad producida por un áfido, cuya picadura, provoca una hipertrofia de los tejidos de las raicillas deformándose y pudriéndose, lo que determina la muerte de la cepa. Estos estragos, obligaron a importar cepas californianas resistentes (*Vitis rupestris*) a las que se les injerta la antigua *Vitis vinifera*.

Hoy día, la vid se ha extendido por las zonas templadas de toda la tierra, y si bien las zonas vinícolas más antiguas e importantes están en los países mediterráneos y en Alemania, Austria, Hungría y Portugal, son también grandes productores países tales como USA, URSS, Argentina, Chile y Turquía (González, 1973).

En España, el cultivo de la vid era conocido hacia el siglo VII antes de J.C. por los Tartesos.

Durante la dominación romana, los vinos de las comarcas Bética y Tarraconense eran objeto de una activa exportación (hasta 20 millones de ánforas con destino a la Italia Imperial), se creó el cargo de procurador encargado de extender el cultivo de la vid y los temas vitivinícolas merecieron el interés de diversos autores. Así Columela, en el siglo I, en su tratado agrícola "De Re Rustica", instruye sobre la plantación de la vid y su cultivo, forma de preparar la vendimia, vinificación, corrección de mostos y otras técnicas de bodega y habla de las cepas aclimatadas en Asta Regia (zona próxima al actual Jerez).

San Isidoro (Siglo IV) se refiere en sus etimologías a las variedades de uva que se cultivaban en Andalucía citando al vino como bebida usual de los visigodos.

Resulta muy significativo el periodo histórico de la dominación árabe, en el cual el consumo de vino queda prohibido por la religión islámica; pero se mantuvo el cultivo de la vid, dedicando una gran parte para "uva de boca", y el resto para la obtención de alcohol etílico (éste se empleaba en las campañas guerreras).

Pero la expansión del viñedo, alcanza un gran desarrollo en la Reconquista gracias a la labor de los monjes que en Abadías y Monasterios cultivaban las tierras y aplicando las mejores técnicas de cultivo y elaboración obtenían caldos afamados (vinos del Priorato).

Cuando los colonizadores españoles llegaron a América, encontraron unos arbustos parecidos a las vides europeas, pero que allí crecían salvajes y cuyo fruto era amargo. Hernán Cortés, ordena a cada español, plantar 10 cepas de " Vitis vinifera " por cada indio que tuviera en su dominio y la adaptación de aquellas vides a aquellas tierras dio origen al tipo de cepa todavía conocida allí como "cepa criolla" (Johnson, 1977).

El siglo XIX hace su aparición la filoxera que asola también las viñas españolas; pero a partir de los injertos, empieza de nuevo el desarrollo de la industria del vino y es en la segunda mitad de este siglo XX cuando se empieza a exigir calidades.

I.A.- Antecedentes Históricos De La Viticultura Alpujarreña

Laujar de Andarax está entre Sierra Nevada y Sierra de Gádor. En las estribaciones de la Sierra Madre, a 921 m de altitud, en el fértil valle que forman las legendarias Montañas del Sol y del Aire, al pie del Cerro del Almirez (2,591 m de altura); a 69 Km. de Almería, la capital; a 150 de Granada a cuyo reino perteneció hasta el año 1833, que se creó la provincia de Almería, a 40 km. de Adra; el puerto de mar más cercano, por donde desembarcó Tubal, el primer poblador de España y embarcó Boabdil el último Sultán de Granada tras ochocientos años de dominación sarracena (Bosque, 1984).

Al pié mismo de la Sierra de Gador, entorno a sus yacimientos mineros surge la denominada Cultura de los Millares (2400-200 a.C.), y más adelante entre el 1900 y el 1800 a.C. la Cultura del Argar en la zona costera del Bajo Almanzora en la provincia de Almería.

Más importante en el mundo del vino sea quizá la presencia de colonias fenicias en las proximidades, como son Abdera (Adra), Sex (Motril) y Sexi (Almuñécar), ya que

aunque hay autores que consideran la vid, espontánea en España, siendo conocida y utilizada por los pueblos primitivos, su cultivo y elaboración de los primeros vinos llegaron a través de los fenicios y los griegos (Hidalgo, 1993).

Existe una clara presencia del paso de los romanos, tanto en la costa, como en el interior, como así lo demuestran los hallazgos del cortijo de Bordomarela en Torvizcón, si bien no se tiene certeza si estos asentamientos se dedicaban a la agricultura a si sólo tenían una orientación minera (Trillo, 1992).

No está muy claro el punto de la Historia en que se introdujo la vid en la comarca. La aparición de un lagar romano en Molvizar indica la presencia del cultivo en la Hispania Romana. Por otra parte, existen documentos en los que se hace referencia a la viña en el reparto del territorio durante la colonización castellana, tras la expulsión definitiva de los moriscos, en el siglo XVI, lo que hace pensar que durante el paréntesis histórico de la presencia musulmana en la comarca, la vid permaneció presente en la zona (Herrera, 1984).

Tras la rebelión mudéjar de 1499-1500 y, para paliar la crisis demográfica, la Corona autoriza en 1508 la repoblación de los lugares vacíos de moriscos, concediendo exenciones fiscales (Carrascosa, 1992), a pesar de lo cual muchas de las alquerías no fueron repobladas hasta fechas muy tardías. Así, en 1512 solo aparecen ocupadas Jorairatar, Almegíjar, Cojayar, Torvizcón, Albuñol, Détiar y Murtas (Malpica Cuello, 1988).

Más ciertas son las referencias de su expansión, que comienza en el siglo XVIII, hasta alcanzar un máximo a mediados del siglo XIX (coincidiendo con el nivel más alto de población desde los moros) cuando se convierte en el principal cultivo en La Contraviesa, orientado a la exportación. Se combinaba la producción de vino (zonas alta y media de la sierra) con la de pasas, en la parte más cálida y soleada de la región.

El historiador de las Guerras de Granada, Luis del Mármol, en 1571, la describe así: “Esta Taa de Andarax es la mejor tierra de toda la Alpujarra, y así lo significa el nombre árabe, que quiere decir “la Era de la Vida”, porque es muy fértil de pan de toda suerte, abundante yerba para los ganados, el cielo y el suelo muy saludable y templado, y tiene muchas fuentes de agua fresca y muy delgada, con las cuales se riegan hermosas arboledas por extremo linda sy sabrosas, y especialmente la cría de la seda es mucha y muy buena”.

En el 1752, el sabio P. Pedro Murillo Velarde, S.J. en su célebre Geografía Histórica Universal, dice “Laujar es uno de los pueblos más principales, en los mapas lo ponen con el nombre antiguo de Andarax que significa Era de la Vida, por lo delicioso y alegre de aquel sitio, es muy abundante de frutas, de Trigo, Cebada, Maíz, Cáñamo, Lino, Mijo, Centeno, Aceite, Seda, Vino, Higos, Almendras, Limones, Naranjas y otros frutos; Legumbres y Hortalizas. Tiene bastante ganado de lana, de que se hacen buenos paños. Hay pescado regalado y caballos generosos. Coje parte de la Sierra Nevada y una vega, llana, hermosa y abundante, que la fertiliza el riego, de la mucha y hermosa agua que hay. Tiene un Río mediano y muchas Fuentes, Arroyos y Acequias, muchas arboladas y Huertos, el Cielo es alegre” (Navarro, 1979).

En las laderas bajas, la uva moscatel se exportaba a Málaga. La vendimia de la ladera media se vinificaba, exportando a Gibraltar, Algeciras y Málaga, o se destilaba, con destino al encabezamiento de los vinos de Jerez. La producción de la parte más septentrional (menor riqueza en azúcar, consecuencia del clima y por lo tanto alto riesgo de picado en el vino obtenido por su bajo grado alcohólico) se transformaba en aguardiente, para consumo interior de la comarca. El licor era objeto de trueque con otros municipios de Andalucía Oriental.

Este desarrollo se ve interrumpido por la Filoxera, que devasta la práctica totalidad de viñedos a finales del siglo XIX, en torno a 1.884.

En la reconstrucción escalonada del viñedo tras la filoxera, desde 1.910 a 1.950, las nuevas plantaciones sustituyeron en parte a las arrasadas por la plaga, pero también se talaron bosques, en busca de tierras vírgenes, ascendiendo por la ladera norte hasta coronar la sierra. De aquellas masas de bosque mediterráneo sólo queda el alcornocal de Haza del Lino (no intacto) y manchas aisladas.

En los años sesenta se producen cambios importantes en La Contraviesa (núcleo vitícola de la comarca). La apertura de España conduce a un flujo de población hacia fuera de la región, normalmente temporal. Se encuentra trabajo en Suecia, Alemania y Barcelona. En esta época comienza a desarrollarse la horticultura intensiva sobre enarenados en Campo Dalías, que hasta entonces sólo conocía los pastos de la trashumancia. En los setenta, la zona absorbe gran parte de la mano de obra de la vecina Contraviesa. Por otra parte, los avances tecnológicos y la nueva filosofía de la revolución verde encuentran mal campo de aplicación en las tierras alpujarreñas, donde

no es posible la mecanización ni el uso intensivo de fertilizantes por sus condiciones geográficas y sus bajas precipitaciones, limitándose mucho la producción en contra de lo que sucede en otras comarcas cercanas (García-Valderrama, 1997).

La cierta fama conseguida entre las provincias orientales de Andalucía (junto al vino de Málaga), pelagra hoy mientras no se proteja de alguna manera su producción, y un acusado minifundismo, consecuencia de una drástica reestructuración de la propiedad, iniciado en dos fases, la primera con la llegada de la Filoxera y la segunda en los años setenta, en los que la escasez de mano de obra y la pérdida de competitividad ocasionó un nuevo fraccionamiento de la propiedad. La caótica reconstrucción de los viñedos durante el tercer tercio del siglo XX dio lugar a una mezcla de variedades dentro de las propias parcelas, continuando con lo que había existido antes de la filoxera, que imposibilita una adecuada organización de la vendimia. La consecuencia inmediata es una sobremaduración generalizada de los frutos (recolección cuando la mayoría de variedades más tardías alcanzan su máximo contenido en azúcar) (Martos, 1997).

Además, de su situación geográfica y su orografía, hereda una mala infraestructura en las comunicaciones, lo que ha dificultado tradicionalmente sus relaciones con el exterior y ha propiciado el aislamiento y una economía de la subsistencia, que en el caso del vino se manifiesta con una bodega en cada cortijo.

Como ya se ha comentado, la vitivinicultura se encuentra presente en prácticamente todos los términos municipales de la comarca, aunque en la actualidad las plantaciones existentes en algunos de ellos son anecdóticas. Esta desaparición de grandes zonas de viñedos de vinificación, en su mayor parte de la zona de Granada se debe fundamentalmente a las siguientes razones (Antequera, 1997):

- Falta de mano de obra debida al despoblamiento importante de las zonas rurales.
- Bajos rendimientos del viñedo debido al envejecimiento y a la baja fertilidad de las tierras, unidos a los altos costes de explotación de muchos de ellos por falta de mecanización, fuertes pendientes y marcos de plantación no mecanizables, haciendo su viabilidad imposible.
- Aparición de cultivos subvencionados como el almendro.
- Disminución de la demanda de los vinos tradicionales.

Por lo que respecta al futuro vitivinícola de la comarca hemos de comentar que los puntos sobre los que debería basar la viticultura de la comarca son la calidad, la conservación del medio ambiente y la rentabilidad de la explotación.

En cuanto a la calidad, hemos de recordar al hablar de productos agroalimentarios que existe cada vez mas una unificación de los gustos a causa de la globalización de la economía y de la actuación de las grandes empresas multinacionales (Caldentey y col., 1998). En la Alpujarra el vino es un producto no bien definido, al obtenerse a partir de numerosas variedades que se encuentran entremezcladas, a diferencia de los vinos perfectamente definidos y estandarizados, que son los que en la actualidad demanda el mercado. De una manera creciente, el vino es un producto de lujo, que se consume en la actualidad en ocasiones especiales o en sector de la hostelería.

Por su parte, la viticultura tradicional de la Alpujarra se ha caracterizado por ser extremadamente respetuosa con el medio ambiente. El empleo de abonado en verde y la lucha contra la escorrentía han sido practicas habituales que en la actualidad están es desuso por falta de mano de obra. Asimismo, dentro de las medidas medioambientales a tomar serían la recuperación de las variedades autóctonas. Estas permiten la elaboración de vinos con personalidad propia distinguiéndose del resto de sus competidores (Rosua, 1997).

Finalmente, en cuanto a la rentabilidad de la explotación es muy importante destacar que aquellos terrenos en los que la mecanización sea imposible, el viñedo está condenado a la desaparición. Una plantación de estas características es inviable económicamente, por lo menos el mantenimiento del suelo. Es por esto que no resulta comprensible que hoy día se estén poniendo plantaciones en marcos o pendientes que imposibiliten la entrada de una máquina.

I.B.- ESTUDIO DEL MEDIO

En un primer estudio de los factores que intervienen en la producción vitícola, podemos distinguir los de carácter permanente (aquellos que dependen exclusivamente del medio o se fijan de una vez para siempre al hacer la plantación), de los que al no serlo se clasifican de culturales, pudiéndose en este segundo caso, de forma continua y variable estimular y corregir situaciones que pueden presentarse (Hidalgo, 1979).

Un conocimiento previo del medio y de su hábitat, nos permitirá acercarnos paulatinamente a la temática de investigación que nos proponemos desarrollar y a los objetivos de la misma.

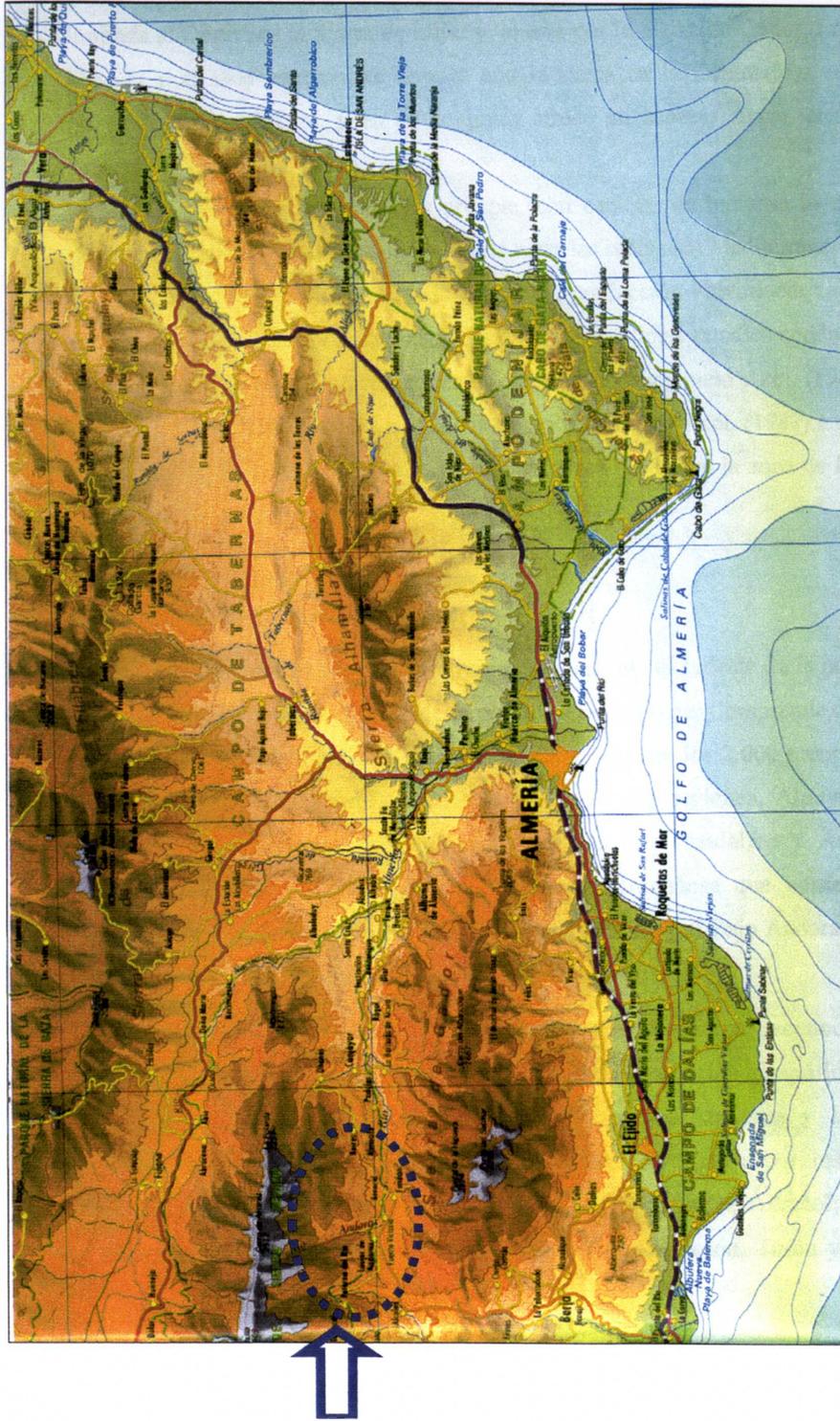
La zona de estudio, **La Alpujarra** (Figura nº 1).

Etimológicamente parece ser que no existe un acuerdo total sobre el origen de la palabra Alpujarras o Alpujarra. Según Enriquez de Jorquera, Alpujarras viene de "Abuxarras" y significa la rencillosa y pendenciera. Según otros autores (Romey y Mr. de Sacy) recogidos por Herrera Puga (1984) el nombre que corrompido hoy, se dice Alpujarras, fue dado a esta montaña por los árabes por Suar el Kaisi y otros revoltosos de Andalucía Oriental, que levantaron por las serranías de Granada algunas fortalezas llamadas Albordjela (castillo de los aliados), de cuyo nombre ha venido a formarse el de Alpujarra. Xerif Aledrix y Conde han conjeturado mejor llamarla Alpujarras por Al Bug Scharra, que se interpreta por sierra de yerba o pastos. Existiendo otras teorías con muy poco fundamento en opinión de Herrera Puga (1984).

Sin embargo geográficamente la Alpujarra forma una unidad bien definida: situada al sur de Sierra Nevada, desciende hasta el mar Mediterráneo y queda limitada al Oeste por la Sierra de Lújar y, al este por la Sierra de Gádor. Entre Sierra Nevada y el Mediterráneo, se levanta aún la sierra de la Contraviesa con alturas próximas a los 1200 m. y en su conjunto ofrece un aspecto suave, con cumbres redondeadas (Bosque, 1984).

Es una región montañosa y abrupta, con carácter de inmensa ladera que va desde las cumbres más altas de la Península hasta las costas del Mediterráneo.

Como factores bióticos que inciden en la producción vitivinícola, tenemos, los climáticos y los edáficos (Hidalgo, 1979). Entre los múltiples estudios conducentes a la determinación de estos factores, podemos citar, los de Figueruelo y col. (1987), los de Gutiérrez y col. (1987) sobre los viñedos canarios, Navarro y col. (1987) en el Campo de Cartagena, Povedo (1988) en la Rioja Baja, Diez (1986) en la zona de Méntrida y los ya citados de Hidalgo (1979).



DESCRIPCION GEOGRAFICA DE LA ZONA

I.B.1.- Situación geográfica.

La Alpujarra es una comarca montañosa situada al sudeste de la provincia de Granada, que se extiende a parte de la provincia de Almería. Comprende casi toda la vertiente sur de Sierra Nevada, con cumbres que superan los 2.000 metros, hasta la costa mediterránea. Geográficamente se divide en dos regiones, Alpujarra Alta y Alpujarra Baja, separadas por los cauces de los ríos Guadalfeo y Andarax. La Alpujarra Baja es recorrida por una alineación montañosa que bordea la costa granadina y almeriense entre el valle bajo del Guadalfeo y el Bajo Andarax: sierra de Lújar al oeste, Contraviesa en el centro y Gádor al este.

Las dos únicas zonas que en la actualidad se encuentran reconocidas por la administración como zonas vitivinícolas con derecho a mención geográfica dentro de la Alpujarra son los Vinos de la Tierra Contraviesa-Alpujarra y la Comarca Vitivinícola de Laujar. La primera de éstas está constituida por los siguientes términos municipales de la provincia de Granada: Albondón, Albuñol, Almegijar, Cádiar, Lobras, Murtas, Polopos, Rubite, Sorvilán, Torvizcón, Turón y Ugíjar. La segunda de las zonas comprende los municipios de Alcolea, Fondón y Laujar de la provincia de Almería.

Administrativamente, (comarca 09 según el M.A.P.A.) comprende los términos municipales de Almegijar (Notaez), Alpujarra de la Sierra (Yegen, Mecina-Bombarón y Golco), Bérchules (Alcutar), Bubión, Busquistar, Cádiar (Yator y Narila), Cañar, Capileira, Carataunas, Cástaras (Nieves), Juviles, Lanjarón, Lobras (Timar), La Tahá (Pitres, Mecina-Fondales, Ferreirola y Capileirilla), Murtas (Mecina Tedel y Cajayar), Nevada (Laroles, Mairena y Picena), Órgiva (Alcázar, Fregenite, Bayacas, Tíjola, Tablones y Las Barreras), Pampaneira, Pórtugos, Soportújar, Torvizcón, Trevélez, Turón, Ugíjar (Cherin y Jorairatar) y Valor (Mecina Alfahar y Nechite). Esto se corresponde con la vertiente norte del río Guadalfeo y la falda noroeste de la Sierra de Contraviesa, es decir, abarca la Alpujarra Alta y parte de la Alpujarra Baja.

Tradicionalmente la denominada Baja Alpujarra, concentra casi todo el viñedo provincial (el 85%), y ocupa la falda sur de la Contraviesa hasta el Mediterráneo. La zona se conoce por Costa-Albondón (parte de la comarca 08 según el M.A.P.A.) y comprende los términos municipales siguientes: Albondón, Albuñol, Sorvilán y Polopos.

La comarca alto Andarax (06 según el M.A.P.A.), en la provincia de Almería, pertenece a La Alpujarra en su totalidad, y pueden considerarse, asimismo, incluidos dentro de la región en estudio, algunos municipios de las comarcas Nacimiento y Campo de Dalías.

Debe indicarse que algunos municipios no debieran incluirse completamente en la comarca, sino que sólo algunas de sus tierras presentan los rasgos físicos y geográficos que definen a La Alpujarra.

El viñedo de la Comarca Vitivinícola de Laujar se encuentra encajado entre Sierra Nevada y la Sierra de Gádor, principalmente en la parte alta del río Andarax, a unos 950 m. De altitud sobre el nivel del mar, en una gran llanura formada por material de depósito con escasa pedregosidad y donde coexisten cerca de 400 Has. De viñedo con otros cultivos, entre los que destacan los almendros, el olivar y cultivos hortícolas. La viña comparte con los almendros las zonas menos fértiles, llegando a ascender ligeramente por las estribaciones de las sierras colindantes. Dentro de esta Comarca Vitivinícola existe una segunda zona de viñedo en el término municipal de Alcolea, fuera del Glacis de Laujar, de menor importancia.

I.B.2.- Climatología.

La zona de estudio, climatológicamente, corresponde a una zona de alta montaña (1040 m. sobre el nivel del mar).

Tabla 1 (LUCDEME, 1986 y Datos de la Comisaria de Aguas del Sur de España, recogidos por Lescurre, 1999): Datos meteorológicos de la zona a lo largo de los años.

| Estación Meteorológica | Periodo | Coordenadas | | |
|---------------------------|---------|-------------|----------|-------------|
| | | Latitud | Longitud | Altitud (m) |
| Alcolea (Alc.) | 1950-75 | 36° 58´ | 00°44´ E | 0739 |
| Laujar (Lau.) | 1955-79 | 37° 00´ | 00°48´ E | 0921 |
| Laujar* (Lau.*) | 1938-96 | 37° 00´ | 00°48´ E | 0921 |
| Laujar "Monterrey" (Mon.) | 1944-80 | 37° 01´ | 00°47´ E | 1222 |
| Pradillos (Pra) | 1944-63 | 36° 56´ | 00°45´ E | 1100 |

* Comisaria de Aguas del Sur de España.

Tabla 2: Medias (°C) y desviaciones típicas de las temperaturas máximas absolutas mensuales

| | E | F | M | A | M | J | J | A | S | O | N | D |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Lau | 17.1 | 18.6 | 20.6 | 22.5 | 26.5 | 29.8 | 32.7 | 32.3 | 29.0 | 24.2 | 18.9 | 17.7 |
| | 2.2 | 3.0 | 2.1 | 2.7 | 2.5 | 2.4 | 1.7 | 1.8 | 2.7 | 2.6 | 2.3 | 3.2 |
| Lau* | 17.7 | 19.3 | 21.5 | 22.6 | 26.7 | 30.1 | 33.6 | 33.2 | 29.5 | 25.2 | 20.8 | 18.0 |
| | 2.1 | 3.0 | 2.9 | 3.1 | 2.9 | 2.9 | 3.2 | 2.5 | 3.2 | 2.9 | 3.1 | 2.9 |
| Mon | 17.7 | 17.6 | 19.7 | 20.7 | 25.3 | 29.6 | 33.5 | 33.0 | 28.6 | 24.0 | 19.7 | 17.4 |
| | 2.3 | 3.9 | 2.6 | 2.6 | 3.6 | 2.3 | 2.2 | 2.0 | 2.5 | 2.4 | 2.9 | 2.9 |

* Comisaria de Aguas del Sur de España.

Tabla 3: Medias (°C) y desviaciones típicas de las medias de las temperaturas máximas mensuales.

| | E | F | M | A | M | J | J | A | S | O | N | D |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Lau | 11.8 | 12.6 | 14.8 | 16.2 | 20.4 | 23.7 | 28.5 | 28.3 | 24.7 | 18.8 | 14.1 | 11.8 |
| | 2.1 | 2.6 | 2.8 | 2.2 | 1.9 | 1.8 | 1.7 | 1.4 | 2.1 | 1.9 | 1.9 | 2.3 |
| Lau* | 11.4 | 12.7 | 14.8 | 16.6 | 20.5 | 24.3 | 28.9 | 28.5 | 25.0 | 19.5 | 15.1 | 12.0 |
| | 1.9 | 2.6 | 2.4 | 2.1 | 2.3 | 2.5 | 2.2 | 2.7 | 2.3 | 2.4 | 2.0 | 2.4 |
| Mon | 10.4 | 11.1 | 12.4 | 14.2 | 18.5 | 23.3 | 28.1 | 21.4 | 23.5 | 17.8 | 13.6 | 10.8 |
| | 1.8 | 2.4 | 1.7 | 1.9 | 2.6 | 1.9 | 1.4 | 1.4 | 2.4 | 2.1 | 2.4 | 2.1 |

* Comisaria de Aguas del Sur de España.

Tabla 4: Temperatura media mensual de las medias (°C).

| | E | F | M | A | M | J | J | A | S | O | N | D |
|-------------|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| Alc. | 8.4 | 9.1 | 11.4 | 13.6 | 17.1 | 20.8 | 24.8 | 24.8 | 21.4 | 16.4 | 12.0 | 9.0 |
| Lau. | 7.9 | 8.6 | 10.2 | 11.8 | 15.6 | 18.8 | 23.3 | 23.3 | 20.1 | 14.8 | 10.5 | 8.0 |
| Lau* | 7.3 | 8.1 | 10.0 | 11.8 | 15.4 | 19.4 | 23.2 | 23.2 | 19.6 | 15.0 | 11.0 | 7.9 |
| Mon. | 6.3 | 6.8 | 8.0 | 9.9 | 13.5 | 17.8 | 22.3 | 22.3 | 18.3 | 13.3 | 9.3 | 6.8 |
| Pra. | 6.6 | 7.4 | 9.5 | 11.7 | 15.4 | 19.3 | 23.4 | 23.4 | 19.7 | 14.6 | 10.2 | 7.3 |

* Comisaria de Aguas del Sur de España.

Tabla 5: Media (°C) y desviación típica de las medias de las temperaturas mínimas mensuales.

| | E | F | M | A | M | J | J | A | S | O | N | D |
|-------------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|-----|-----|
| Lau | 4.0 | 4.6 | 5.6 | 7.4 | 10.9 | 14.0 | 18.0 | 18.2 | 15.5 | 10.8 | 7.0 | 4.2 |
| | 1.9 | 1.8 | 1.7 | 2.0 | 2.0 | 1.8 | 2.0 | 2.2 | 2.2 | 2.3 | 2.2 | 1.9 |
| Lau* | 2.9 | 3.4 | 5.0 | 6.9 | 10.3 | 14.1 | 17.5 | 17.2 | 14.5 | 10.4 | 6.6 | 3.6 |
| | 2.2 | 2.2 | 1.8 | 2.0 | 2.1 | 2.1 | 1.9 | 3.2 | 2.3 | 2.1 | 2.0 | 1.9 |
| Mon | 2.2 | 2.4 | 3.7 | 5.7 | 8.6 | 10.3 | 16.5 | 16.6 | 13.2 | 8.7 | 4.9 | 2.8 |
| | 1.1 | 1.9 | 1.6 | 1.9 | 2.6 | 1.8 | 1.8 | 1.7 | 2.2 | 1.7 | 2.1 | 1.3 |

* Comisaria de Aguas del Sur de España.

Tabla 6: Media (°C) y desviación típica de las medias de las temperaturas absolutas mensuales.

| | E | F | M | A | M | J | J | A | S | O | N | D |
|--------------|------|------|------|-----|-----|-----|------|------|------|-----|-----|------|
| Lau. | 0.1 | 0.1 | 1.3 | 3.0 | 6.0 | 9.4 | 14.4 | 14.7 | 11.9 | 7.0 | 3.4 | 0.2 |
| | 3.0 | 2.6 | 2.0 | 2.7 | 2.5 | 2.3 | 2.3 | 2.3 | 2.5 | 2.9 | 2.4 | 2.1 |
| Lau.* | -1.4 | -1.2 | 0.6 | 2.3 | 5.7 | 9.3 | 13.6 | 14.2 | 10.5 | 6.2 | 2.0 | -0.6 |
| | 3.1 | 3.2 | 2.3 | 2.5 | 3.4 | 2.2 | 3.3 | 2.9 | 3.1 | 2.9 | 2.7 | 2.7 |
| Mon. | -2.1 | -1.0 | -0.5 | 0.7 | 3.3 | 6.8 | 11.9 | 11.8 | 8.3 | 3.7 | 0.3 | -0.8 |
| | 2.8 | 2.3 | 1.9 | 1.8 | 2.4 | 2.2 | 2.0 | 2.6 | 2.4 | 2.6 | 1.6 | 1.7 |

* Comisaria de Aguas del Sur de España.

Tablas 7 y 8: Pluviometría media y evapotranspiración potencial media mensual.

| Pluviometría media | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|------|------|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|------|
| | E | F | M | A | M | J | J | A | S | O | N | D |
| Alc. | 48.9 | 38.0 | 58.8 | 53.7 | 25.6 | 13.2 | 4.3 | 5.0 | 21.5 | 53.4 | 28.4 | 35.0 |
| Lau. | 63.1 | 62.4 | 67.3 | 63.3 | 36.1 | 12.7 | 4.6 | 6.2 | 24.8 | 63.6 | 59.9 | 92.3 |
| Mon. | 73.4 | 78.7 | 80.0 | 62.1 | 41.0 | 16.6 | 6.1 | 10.3 | 22.4 | 68.8 | 68.9 | 86.5 |
| Para. | 63.0 | 66.3 | 78.1 | 50.7 | 42.2 | 7.6 | 2.3 | 12.0 | 21.0 | 60.7 | 57.0 | 87.9 |

| Evapotranspiración potencial media mensual | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------------|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|----|----|----|----|
| | E | F | M | A | M | J | J | A | S | O | N | D |
| Alc. | 18 | 20 | 35 | 50 | 81 | 112 | 151 | 142 | 98 | 60 | 32 | 19 |
| Lau. | 19 | 21 | 34 | 45 | 75 | 100 | 139 | 130 | 92 | 55 | 29 | 19 |
| Mon. | 17 | 18 | 28 | 40 | 67 | 97 | 134 | 125 | 85 | 52 | 28 | 18 |
| Para. | 15 | 18 | 31 | 45 | 75 | 105 | 141 | 132 | 90 | 55 | 29 | 17 |

La distribución estacional de las precipitaciones que ocurren a finales de otoño o durante el invierno, hace que el suelo durante esta época presente una buena reserva de agua, mientras que la ausencia de precipitaciones en los meses estivales y la elevada evapotranspiración potencial, consecuencia del efecto combinado de la falta de lluvia y elevadas temperaturas, ocasionan en el suelo un profundo déficit que se refleja en la distribución de la vegetación y uso del suelo.

Una característica peculiar de la zona, es la no existencia de correlación entre la precipitación y la altura.

Según el índice de aridez de Martonne (1925) la zona de estudio con un valor de $I=22.1$ le correspondería un clima tipo de cultivo de secano y olivares.

En cuanto a las temperaturas, la distribución estacional hace que existan dos periodos muy contrastados, uno que corresponde a la época invernal (diciembre, enero y

febrero) en que las temperaturas son bajas y hay exceso de agua en el suelo; otro estival (junio, julio y agosto) con temperaturas altas y un prolongado déficit de agua en el suelo, lo que hace que se desarrolle una vegetación muy específica capaz de aguantar estas oscilaciones.

I.B.3.- Estudio Edáfico

La Contraviesa ha sido tradicionalmente, con un subsuelo pizarroso que ha marcado los límites del cultivo frente al carácter calizo de las sierras de Lújar y Gádor (Roca, 1993).

La meteorización de las pizarras ha originado una capa de limos que conforma el suelo de La Contraviesa, de espesor medio. Esta capa arable fluye lentamente por las laderas de la sierra dando lugar a formas redondeadas. Aunque el suelo contiene escasa materia orgánica, la higroscopicidad de sus materiales, alimentada por una alta humedad relativa en el ambiente, así como la riqueza mineral del sustrato, ha permitido que el hombre se hiciera con la tierra cultivando sobre pendientes de hasta el 100%, en sistemas agrícolas muy diversificados en la producción, según la diferente cota, suelo y microclima de sus parcelas, aprovechando en todo caso las posibilidades del entorno físico y bajo el principio clásico de autoabastecimiento, hoy reemplazado conceptualmente por la diversificación del riesgo en las empresas agrarias, que siguen dependiendo totalmente del entorno físico (principalmente clima), frente a la fuerte modificación del medio que en la costa almeriense limítrofe con La Alpujarra por el sudeste (Campo Dalías) se viene efectuando, intensificando los sistemas productivos mediante la incorporación de altos inputs obteniéndose altos niveles de rentabilidad (Aguilar y col., 1984).

Las sierras de Lújar y Gádor (de formas más abruptas y escarpadas) son de mayor altura media que La Contraviesa y naturaleza caliza y dolomítica, separadas físicamente de esta última por zonas de debilidad que han sido aprovechadas para el establecimiento de las comunicaciones entre sus poblaciones, dispersadas por las sierras.

Litológicamente, la mayor parte del territorio alpujarreño está constituido por rocas metamórficas (calcoesquistos) y sedimentos marinos (pizarras alternando con

cuarcitas masivas, arenas, arenas finas y limos calizos marinos y dolomías o calizas dolomíticas).

Geológicamente, la comarca presenta una gran complejidad tectónica y estratigráfica, pero a grandes rasgos puede decirse que se encuentra constituida fundamentalmente por materiales paleozoicos (principalmente en la parte correspondiente a Sierra Nevada, o lo que es lo mismo, a la Alta Alpujarra). Existen, asimismo, masas aisladas de afloramientos enógenos en torno a Sierra Nevada, Órgiva y Ugíjar. Los materiales cuaternarios se distribuyen de acuerdo con los factores morfológicos y las características sedimentarias del territorio. No tienen demasiada importancia en la comarca los sedimentos aluviales recientes (Aguilar, 1989).

Nódulos calizos que pueden originar un horizonte petrocálcico. Pueden presentarse con aportes secundarios de carbonato cálcico o totalmente descarbonatados.

Los Alfisols son suelos muy desarrollados con un perfil tipo A/B_t/C. Existe un horizonte subsuperficial de acumulación de arcilla iluviada. En general se han desarrollado sobre materiales calizos. Algunos suelos han sufrido un proceso de enrojecimiento por la deshidratación de óxidos de hierro. En general son terrenos con buena dotación de elementos minerales, profundos, y con capacidad de producción bastante elevada.

Como resumen, los caracteres edáficos de los terrenos soporte de mayor parte del viñedo comarcal definen (simplificando) dos tipos de suelo en La Alpujarra:

- Suelo pardo sobre roca metamórfica. Es el suelo de La Contraviesa. Su horizonte superior, de unos 15 cm, es de textura franco-arenosa. Bajo éste suele aparecer un horizonte de color pardo-claro de textura más franca (limosa) con mayor capacidad de retención de agua (aunque baja en cualquier caso). La ligera diferencia de textura entre ambos estratos resulta beneficiosa en su almacenamiento, siempre que el hombre no actúe en exceso sobre la estructura del medio. La roca madre subyace más o menos alterada (la pizarra presenta facilidad de descomposición, renovando continuamente el suelo). Posee un carácter moderadamente ácido (pH 6 en superficie y algo superior en horizontes inferiores). Son terrenos pobres en materia orgánica (horizonte de humus poco desarrollado o inexistente), y escasos en macroelementos. Su pobreza en nitrógeno es un factor positivo para la calidad potencial de los vinos.

- Suelo pardo-calizo sobre material no consolidado. Se trata de suelo con un horizonte superficial constituido por un mull cálcico pardo o pardo-oscuro, de consistencia media. Posee carbonato cálcico en todo su perfil, que en estratos inferiores se presenta en texturas francas o franco-arenosas. Su pH es ligeramente alcalino (pH 7,5-8).

El espesor de los suelos alpujarreños varía considerablemente, de suelos casi inexistentes en los que aflora la roca madre hasta otros en los que ésta aparece (muy degradada) por debajo de 1 m de profundidad. Es usual la presencia de elementos gruesos (lastras de pizarra). Siendo suelos ligeros, poco consistentes, y con un contenido en materia orgánica casi nulo o nulo, su capacidad de retención de agua es muy baja. Las fuertes pendientes a las que se ve sometida la mayor parte del suelo agrícola unido a las lluvias torrenciales provocan una pérdida de tierra anual estimada a 70 Tm/Ha, lo que resulta dramático en la comarca.

En cuanto al suelo dedicado a viñedo en la zona (Figura nº 2) y siguiendo los estudios del LUCDEME 1043 (Berja), fundamentalmente, corresponde a tres tipos:

A. Regosoles Margalicos. Son suelos que aunque no están recogidos, como tales, en la clasificación de la FAO, tienen unas características muy especiales que lo hacen situarse entre Regosoles y Vertisoles.

En la zona de estudio, se encuentran en terrenos llanos, pero fundamentalmente socavados, con un drenaje impedido motivado por el material de partida; sin piedras ni afloramientos rocosos.

El perfil en general, tiene una coloración muy homogénea, pardo-amarillenta, como consecuencia de que es la misma marga la que aflora en superficie; puntualmente, están dedicados al cultivo de viñas o almendros, pero la mayor parte soporta una vegetación xerofítica.

Son suelos muy pobres en macronutrientes, así como en materia orgánica, cuyo contenido no llega al 1 por 100; la capacidad de cambio, por tanto, también es baja y el complejo de cambio está siempre saturado en calcio.

B. Nitrosoles Eutricos. Estos suelos ocupan las partes más bajas de las pequeñas pendientes. Son suelos muy profundos, con los horizontes eluviales decapitados por la erosión, lo que hace que el horizonte argílico aflore en superficie.

Presentan una textura franco-arcillo-arenosa de manera muy uniforme en todo el perfil, con una estructura igualmente uniforme, excepto en el horizonte superficial, donde es más fina debida al laboreo actual. Dado que este horizonte es muy pobre en materia orgánica, los contenidos son siempre inferiores al 1 por 100, y ésta no tiene prácticamente influencia sobre su estructura.

La pobreza en materia orgánica, así como las relativamente bajas cantidades de arcilla, hacen que la capacidad de cambio catiónico sea media, de manera que no se sobrepasa, en ningún caso, los 10 meq/100 g. El grado de saturación del complejo de cambio es siempre del 100 por 100, con el calcio como catión dominante.

La reacción es francamente alcalina, con valores cercanos a 8 en todo el perfil, excepto en los horizontes superficiales, donde apenas supera el valor 7, si bien el contenido en carbonatos es nulo en todo el perfil.

La capacidad de retención de agua es pequeña, y más si consideramos la profundidad del suelo, esto es debido a que la diferencia entre las cantidades de agua retenida a 1/3 y 15 atm. es escasa como consecuencia de la fuerte retención ejercida sobre la arcilla.

C. Cambisoles Cálculos. Generalmente, se encuentran situados en posiciones fisiográficas de ladera, aunque no faltan los ubicados en terrenos llanos.

La pedregosidad, así como la rocosidad, son frecuentemente escasas; su utilización está basada, principalmente, en el cultivo de almendros y viñas. Son suelos relativamente profundos, de textura franca y que, en general, tienen un buen drenaje, con una capacidad de retención de agua útil que está en función de la profundidad.

El contenido en materia orgánica es de mediano a alto, si lo comparamos con los demás suelos de la zona, con la particularidad de que no desciende fuertemente con la profundidad; el grado de descomposición de esta materia orgánica es alto, lo que se refleja por la relación C/N cerca de 10.

La capacidad de cambio, directamente relacionada con las cantidades de materia orgánica y arcilla, oscila dentro de amplios límites, según los perfiles; el complejo de cambio está totalmente saturado, siempre con el calcio como catión saturante.

El pH de estos suelos es francamente alcalino, próximo a 8; tiene un contenido en carbonatos que siempre aumenta con la profundidad; las cantidades de macronutrientes existentes, son bajas.

Tabla 9: Constantes vitícolas que permiten determinar la vocación vitícola del medio:

| Estación meteorológica | Temperatura media anual (°C) | Precipitación anual (mm) | Evapotranspiración Potencial (Mm) | Índice de humedad P/E.V.P. | Tipo agroclimático | |
|------------------------|------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|----------------------------|--------------------|------|
| | | | | | Inv. | Ver. |
| Alcolea | 15.7 | 322.7 | 816.0 | 0.395 | Av | M |
| Laujar | 14.4 | 556.3 | 758.8 | 0.733 | Ci | M |
| Monterrey | 12.9 | 614.2 | 709.3 | 0.866 | Av | M |
| Pradillo | 14.0 | 546.1 | 752.2 | 0.726 | Av | M |

Asimismo, en la tabla siguiente, (Tabla 10), se hace una estimación del periodo activo de vegetación, siendo este el tiempo durante el cual la temperatura media del aire es igual o superior al cero vegetativo. Este último es un hecho variable según los años y la variedad de vid cultivada pero como cifra media se puede establecer en +10 °C, para la determinación del periodo activo de vegetación.

Cero de vegetación = 10 °C

Temperatura activa = $T_a \geq 10$ °C

Temperatura eficaz = $T_e = T_a - 10$ °C

Tabla 10: Estimación del periodo activo de vegetación.

| <i>Estación meteorológica</i> | <i>Iniciación</i> | <i>Terminación</i> | <i>Días de duración</i> |
|-------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------------|
| Alcolea | 25 de Febrero | 5 de Diciembre | 282 |
| Laujar | 10 de Marzo | 20 de Noviembre | 254 |
| Monterrey | 15 de Abril | 10 de Noviembre | 178 |
| Pradillo | 21 de Marzo | 15 de Noviembre | 238 |

De la Tabla 10 se puede destacar que la vid en las zonas más altas reduce su periodo activo de vegetación a 178 días, desde la mitad de Abril hasta la primera quincena de Noviembre. Es lógico pensar que las fechas pueden variar ligeramente, en función de factores tales como la fecha de la poda, condiciones climáticas del año, variedad, estado nutricional y sanitario, orientación de la parcela, edad de la plantación, etc.

El índice establecido por Winkler (1984) y ampliamente utilizado en viticultura, se determina como el sumatorio de las temperaturas eficaces durante el periodo transcurrido desde abril a octubre, ambos incluidos. Al aplicar este mismo se observa como, tres de las cinco regiones establecidas por este autor podemos encontrarlas en la Comarca Vitivinícola de Laujar. Los valores del índice de Winkler en las diferentes estaciones meteorológicas serían 2110° para Alcolea, 1768° para Laujar, 1453° en Monterrey y finalmente 1762° en Pradillo.

En la siguiente tabla, (Tabla 11), se expresan la caracterización de Winkler para estas tres regiones, así como las variedades adecuadas para la obtención de vinos de calidad, conforme a las necesidades térmicas según Fregoni y Minguez (Hidalgo, 1993).

Introducción

| Región | I_u | Caracterización | Varietades tintas | Varietades blancas |
|--------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| II | 1371.8°- 1649.6° | Los valles pueden producir la mayoría de las clases de vinos buenos comunes. Los viñedos menos productivos de las laderas no pueden competir con el cultivo de la uva para vinos comunes, por sus bajos rendimientos, pero sin embargo pueden producir vinos finos. | Cavernet franc, Cavernet Sauvignon, Gamacha, Merlot, Petite Sirah, Pinot noir, Sirah, Tempranillo, etc. | Aligote Burger, Chardonnay, French Colombard, Gray Riesling, Parrallada, Pinot blanc, Riesling, Xarello, etc. |
| III | 1649.6°- 1926.8° | El clima cálido favorece la producción de uva de alto contenido en azúcar, algunas veces con muy poco ácido, como puede ocurrir en las más cálidas. No se producen vinos secos de máxima calidad, ya que los vinos mejor equilibrados pueden obtenerse en las regiones I y II. Pueden producirse excelentes vinos dulces naturales. En los suelos más fértiles pueden producirse buenos vinos comunes. | Cavernet Sauvignon, Cariñena, Gamacha, Merlot, Monastrel, Petite Sirah, Tempranillo, Tinta Madêira, Zinfandel, etc. | Emerald Riesling, French Colombard, Gray Riesling, Parrallada, Pedro Ximénez, Pinot blanc, Sauvignon blanc, Riesling, Viura, Xarello, etc. |
| IV | 1926.8°- 2204.0° | Son posibles los vinos naturales dulces, pero en los años cálidos los frutos de variedades más aceptables, tienden a ser de baja acidez. Los vinos blancos comunes y tintos de mesa son satisfactorios si se producen de variedades con acidez alta. Es zona de posible riego. | Alcático, Cavernet franc, Cavernet Sauvignon, Cariñena, Gamacha, Monastrel, Sotizao, Tempranillo, Valdepeñas, etc. | Burger, Chenin blanc, French Colombard, Grillo, Malvasía blanca, Moscatel blanco, Palomino, Pedro Ximénez, Perevella, Xarello, etc. |

Tabla 11: Caracterización de Winkler.

I.B.4.- Estudio Agroeconómico

En el paisaje alpujarreño, se destacan aparte de las masas forestales combinadas con pequeños huertos y pastizales de la Alta Alpujarra, las manchas arbóreas de alcornoques y encinas junto con almendrales, higueras y viñas en el Monte bajo.

Conforme se va descendiendo de altitud, las especies arbustivas propias del sotobosque de los carrascales o encinares van dominando en terrenos nunca roturados, junto a retamales, romeros, tomillos, cantuesos, jaraestepas, aulagas, etc.

En 1973, García Manrique en sus “Estudios geográficos” sobre el viñedo en la costa alpujarreña, explica que el viñedo se localiza en un núcleo principal, constituido por los municipios de Albodón, Albuñol, Sorvilán y Murtas, ocupando una extensión de 3.700 Has aproximadamente, tendiendo a expandirse a la parte alta de La Contraviesa, en su vertiente sur. Bordeando este núcleo, una zona periférica agrupa alguna extensión destinada a este cultivo, pero de menor importancia. En la zona media de La Contraviesa, Polopos, Rubite y Lújar en el sur dedican algo más de 700 Has a la vid. En la vertiente este son 177 Has las censadas en la época (Turón y Jorairatar). En la vertiente norte de la sierra, Torvizcón, Cádiar, Lobras, Cástaras y Almegijar agrupan 1.100 Has. El total de viñedo en aquellos años, cuya vendimia se destinaba a la elaboración del llamado Vino Costa, tradicionalmente rosado, ocupaba una extensión en La Contraviesa de algo más de 5.700 Has.

Fuera de este entorno, sólo en el valle de Andarax se censaba alguna superficie de viñedo (unas 130 Has), fundamentalmente en Laujar de Andarax, cuya producción (en su mayor parte) era enviada a las bodegas de Albondón, centro vinícola de la comarca.

Según el Censo Agrario de 1989, la comarca posee una superficie agrícola total de 269.082 Has, siendo el 42,3% la correspondiente a la provincia de Granada, y el 57,7% a la provincia de Almería. Las tierras labradas suponen un 16,7% del total. Esta proporción media aumenta en La Alpujarra granadina hasta un 25,2% del total de su superficie agrícola. Teniendo en cuenta que sólo el 6% de ésta es mecanizable, este valor puede considerarse muy elevado. Los pastos permanentes se concentran en la falda sur de Sierra Nevada hasta los ríos Guadalfeo y Andarax, así como las especies arbóreas forestales. Estas representan, respectivamente, el 18,2% y el 33,4% del total.

En la siguiente tabla, elaborada sumando los valores correspondientes a cada municipio, se exponen los resultados obtenidos.

Tabla 12: Superficie total de las explotaciones agrícolas, tierras labradas, tierras para pastos permanentes y otras tierras (Ha)

| Provincia | Total | Tierras labradas | Pastos permanentes | Especies arb. forestales | Otras |
|---------------|---------|------------------|--------------------|--------------------------|--------|
| Granada | 113.828 | 28.675 | 16.629 | 32.872 | 35.652 |
| Almería | 155.254 | 16.122 | 32.420 | 56.922 | 49.790 |
| Total comarca | 269.082 | 44.797 | 49.049 | 89.794 | 85.442 |

Fuente. Censo Agrario, 1989. Tomo IV. Resultados Comarcales y Municipales

Según el Anuario de Estadística Agraria del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación de 1997 (datos de 1995), los datos provinciales respecto al total regional, eran los siguientes:

Tabla 13: Hectáreas de viñedo y Hectolitros de vino de mesa.

| | Viñedo (hectáreas) | | Vino de mesa (hectolitros) | |
|-----------|--------------------|---------------------|----------------------------|----------------|
| | Uva de Mesa | Uva de Vinificación | Blanco | Tinto y Rosado |
| Almería | 3043 | 944 | ----- | 6660 |
| Andalucía | 7161 | 44311 | 104728 | 130774 |

Fuente: Anuario de Estadística Agraria del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación de 1997.

Por otra parte, según la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía en su Anuario Estadístico de 1997 (datos de 1996), la producción de vino tintos en la provincia de Almería era de 25452 HI y 72870 HI de mosto.

El aprovechamiento de las tierras labradas se establece a continuación en la Tabla 14. Es de destacar la importancia de los cultivos leñosos en los sistemas agrícolas, representando el 87,8% del total de la superficie labrada en la comarca (igual proporción para ambas provincias). La superficie de cultivos herbáceos mostrada en la tabla incluye barbechos y huertos familiares.

Tabla 14: Aprovechamiento de las tierras labradas (Ha)

| Provincia | Total | Tierras labradas | Pastos permanentes |
|---------------|-------|------------------|--------------------|
| Granada | 3.366 | 25.274 | 30 |
| Almería | 2.161 | 14.584 | 85 |
| Total comarca | 5.527 | 39.858 | 115 |

Fuente. Censo Agrario, 1989. Tomo IV. Resultados Comarcales y Municipales

En cuanto a la superficie media de las explotaciones en la comarca, ésta es de 3,5 Has. En la Tabla 15, que se expone a continuación, se refleja el número de éstas en función de su tamaño. Debe indicarse que más del 85% de las mismas tienen menos de 5 Has, y que sólo el 2,1% superan las 20 Has. Dado el carácter extensivo de la Agricultura alpujarreña, marcado por un entorno físico difícilmente modificable, explotaciones de menos de 15-20 Has pueden considerarse minifundios.

Tabla 15: Número de explotaciones según superficie agrícola utilizada (SAU *), (Ha)

| Provincia | Nº explotaciones con SAU | 0≤S<5 | 5≤S<10 | 10≤S<20 | 20≤S<50 | S≥50 |
|---------------|--------------------------|--------|--------|---------|---------|------|
| Granada | 9,358 | 7,533 | 1,059 | 540 | 176 | 50 |
| Almería | 8,576 | 7,738 | 488 | 204 | 91 | 55 |
| Total comarca | 17,934 | 15,271 | 1,547 | 744 | 267 | 105 |

Fuente. Censo Agrario, 1989. Tomo IV. Resultados Comarcales y Municipales

* Tierras labradas más las tierras para pastos permanentes. Las tierras labradas incluyen las destinadas a cultivos herbáceos, barbechos, huertos familiares y las dedicadas a cultivos leñosos

La distribución de cultivos determina una subdivisión en la región, según los diferentes usos que se da a la tierra y el grado de actuación sobre el medio biofísico.

La agricultura de La Alpujarra Alta, tradicionalmente algo más intensiva (por la mayor disponibilidad de agua) está dedicada a la producción ganadera y hortícola según se acerca a los valles eje de la comarca. En el este, tocando la provincia de Almería, las plantaciones frutales puestas en regadío ocupan una amplia extensión.

La Baja Alpujarra presenta sistemas más extensivos, con producción de secano en la mayoría de sus tierras labradas. Sólo en el sudoeste aparecen explotaciones puestas en regadío, con producción hortícola de importancia. Hoy se detecta un incremento notable en la intensificación de los sistemas en torno a Albuñol con una alta superficie de invernadero (en las zonas más bajas y de menor pendiente, aunque a veces incluso se construyen en terrazas). Las laderas sur de La Contraviesa combinan almendro, viñedo, higueras y olivar con herbáceos forrajeros en secano y tomate, ajo y judías verdes en pequeños huertos de regadío (aunque la sequía prolongada desde hace unos años ha hecho que desaparezcan muchos regadíos tradicionales, siendo en la actualidad meramente testimoniales). En general no puede decirse que la distribución del almendro se establezca en función del riesgo de heladas (dependiente de la cota altimétrica). La realidad es que almendros e higueras comparten paisaje en toda La Contraviesa, destinándose estas últimas, de menor importancia económica, a terrenos marginales (son poco exigentes), combinándose en muchos casos con almendros. Lo cierto es que la diversificación a la que los sistemas agrícolas se ven sometidos hace muy difícil encontrar un paisaje monocultivo (Martos, 1997).

La economía de autoabastecimiento que caracteriza a la comarca ha conducido a la existencia de una bodega casi en cada familia en las zonas donde se ha cultivado el viñedo tradicionalmente. La Alpujarra es una zona consumidora de sus propios vinos en la que el mercado interior ha sido tradicionalmente muy activo. La capacidad media de una bodega familiar oscila en torno a 200 arrobas (una arroba equivale a 16 litros).

Como características generales es destacable la existencia de un elevado número de instalaciones de pequeño volumen, y bajo grado de integración horizontal, desde hace muy pocos años incrementado con el nacimiento de dos Sociedades Cooperativas Andaluzas, una en la comarca Contraviesa-Alpujarra y otra en Laujar.

El catastro vitícola y vinícola no considera bodega aquella cuya capacidad sea inferior a 100 HI. Está claro que en La Alpujarra, la inmensa mayoría se queda en el tintero, pero es muy difícil cuantificarlas por no existir registro alguno de las mismas. Nos atreveremos a afirmar que existen más de 1000 bodegas familiares sólo en La Contraviesa, que producen por término medio en torno a 3000 l de vino al año para consumo propio.

Según el catastro vitícola y vinícola de Almería de 1979, la distribución del número de bodegas por municipios según su capacidad se expone en la Tabla 16. Se censaban 8 bodegas en los municipios que constituyen hoy la comarca, de los cuales, el 87,5% eran de capacidad inferior a 250 HI (instalaciones de pequeño volumen) y ninguna bodega superaba los 500 HI (Antequera, 1997).

Por municipios, casi toda la producción se concentra en Laujar de Andarax con el 87,5% de las bodegas censadas, entre ellas las de mayor capacidad. No se registraban bodegas en Alcolea.

Tabla 16: Producción de vino por municipios

| Municipio | Capacidad (HI) | | |
|-------------------|----------------|--------------|-----------------|
| | De 100 a 249 | De 250 a 499 | Total municipio |
| Alcolea | - | - | - |
| Fondón | 1 | - | 1 |
| Laujar de Andarax | 6 | 1 | 7 |
| Total comarca | 7 | 1 | 8 |

En cuanto a la personalidad jurídica de la titularidad de las bodegas, según el catastro, ninguna tenía entidad asociativa.

Las ocho bodegas censadas por el catastro suponen el 30% del total de bodegas provincial.

En la actualidad, la única bodega con registro de embotellado es la Sociedad Cooperativa Andaluza de reciente creación localizada en Laujar de Andarax. La

proporción de vino embotellado en Laujar la obtendremos suponiendo una producción de uva en la zona de dos millones de kilos al año (y obviando cualquier movimiento de entrada/salida del producto), con un rendimiento aproximado del 60%, de donde resulta una producción de vino de algo más de un millón de litros. Para una producción anual de en torno a trescientos mil litros de vino con destino a embotellado, el porcentaje resulta del 25% (Gutiérrez, 1997).

II.- PROCESO DE VINIFICACIÓN EN LA ZONA

La Vid (Vitis vinifera)

Los individuos de la familia Vitaceas son arbustos con tallo vivaz y leñoso, trepadores.

Zarcillos opuestos a las hojas. Hojas alternas y generalmente con estípulas. Flores pequeñas, regulares, y en general, hermafroditas. Estambres opuestos a los pétalos. Discos nectaríferos. Pistilo con dos carpelos, generalmente bilobulados. Inflorescencia en racimo compuesto. Fruto en baya. Semilla con textura dura y gruesa.

Dependiendo de la clasificación botánica adoptada, la familia Vitaceas tiene de 10 a 16 géneros distintos (Martínez de Toda, 1987).

La especie *Vitis vinifera L.*, es un arbusto sarmentoso, trepador, provisto de zarcillos opuestos a las hojas, las cuales son alternas, dentadas en el limbo, pecioladas, palmatilobuladas, acorazonadas en la base y la nervadura del limbo formada por cinco nerviaciones dispuestas radialmente. Las flores son regulares, pequeñas, de color verde y olorosas, dispuestas en densos panículos, ocupan la misma posición que los zarcillos, opuestos a las hojas (Larrea, 1983).

Abandonada a sí misma, adquiere gran desarrollo y produce excesiva madera, con perjuicio de la cantidad y calidad de la cosecha.

Las partes leñosas de la cepa almacenan reservas nutritivas durante el invierno, que utilizarán más tarde cuando la falta de hojas prive a la planta de la actividad fotosintética o si sus necesidades son tan grandes que la actividad normal de una viña es incapaz de satisfacerla.

En primavera, los botones empiezan a desarrollarse y las escamas que las protegen se separan apareciendo una borra. Poco después aparece la foliación: se forman las hojas, los pámpanos se alargan y aparecen los racimos de flores, cierna o apertura de la flor, por

caída de su capuchón o corola e inmediatamente, la fecundación, que es por lo general cruzada, pese al hermafroditismo de las flores de la *Vitis vinifera*, pues no suelen madurar simultáneamente los óvulos y el polen de una flor.

El ovario fecundado va engrosando, aunque permanezca verde por contener clorofila y la pulpa se enriquece de sustancias ácidas. Al cabo de varias semanas el fruto detiene su crecimiento y empiezan a formarse las pepitas y llega el envero o cambio de color de las uvas para posteriormente entrar en la fase de maduración.

El fruto de la vid, la uva, es una baya oligosperma, carnosa y succulenta, que se presenta en infrutescencias típicas de racimos de racimos.

La viticultura española está en proceso de remodelación a través de los planes de reestructuración, reconversión y ordenación varietal del viñedo. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, ha clasificado las variedades en: "Preferentes" o "Recomendadas", "Autorizadas" y "Temporalmente autorizadas" (Reglero, 1987).

A su vez la ORDEN 11/XII/1986 da relación de las denominadas "Regiones vitivinícolas".

Con la Orden de 25 de enero de 1994, por la que se actualizan los anexos de la Orden de 6 de octubre de 1992, en relación con la utilización de nombres geográficos y de la mención "vino de la tierra" en la designación de los vinos de mesa, se define la comarca vitícola Contraviesa-Alpujarra, que acoge a los siguientes municipios de la provincia de Granada: Albondón, Albuñol, Almegíjar, Cádiar, Cástaras, Lobras, Murtas, Polopos, Rubite, Sorvilán, Torvizcón, Turón y Ugíjar. La misma Orden incluye entre "Otras comarcas con derecho a la utilización de mención geográfica en los vinos de mesa" a la comarca vitícola Laujar, que engloba a los municipios Alcolea, Fondón y Laujar de Andarax, de la provincia de Almería. Estos dos polos vitícolas en La Alpujarra serán el objeto de estudio que se desarrolla.

II.A.- La Vid En La Zona En Estudio

II.A.1.- Características del viñedo

Superficie del viñedo

Antes de establecer cifras referentes a la superficie que se dedica a viñedo se indicará que la zona se encuentra en continua evolución, realizándose nuevas

plantaciones, y existe, además, bastante superficie no declarada. Los datos de que se dispone deberán actualizarse.

Los datos procedentes del catastro vitícola de 1979 de Almería para los municipios incluidos en esta comarca, actualmente con derecho a la utilización de mención geográfica en los vinos de mesa, quedan reflejados en la tabla que se expone a continuación, recogiendo únicamente las superficies destinadas a uva para vinificación. Según esta fuente, Laujar de Andarax agrupa al 85% del viñedo comarcal.

Tabla 17: Superficie destinada a uva de vinificación

| Municipio | Superficie (Ha) |
|-------------------|-----------------|
| Alcolea | 7 |
| Fondón | 63 |
| Laujar de Andarax | 394 |
| Total | 464 |

Esta superficie representa el 67% de la superficie total destinada a viñedo en la comarca (el resto corresponde a uva de mesa). Por otra parte supone el 40% de la superficie total de viñedo de uva de transformación en la provincia de Almería.

Del Censo Agrario de 1989 se recogen para los mismos municipios las siguientes superficies de viñedo:

Tabla 18: Superficie de viñedo

| Municipio | Superficie (Ha) |
|-------------------|-----------------|
| Alcolea | 16 |
| Fondón | 20 |
| Laujar de Andarax | 228 |
| Total | 264 |

Se detecta una fuerte reducción en la superficie censada que no se corresponde con la situación actual. La caída de la uva de mesa en Almería ha desembocado en la comarca en un incremento de la superficie de uva para vinificación, que estimamos ronda las 400 Has.

La intensidad del cultivo de la vid (porcentaje de viñedo respecto al total de la superficie labrada) es de casi el 30% según el catastro de 1979. Si sólo se contempla la superficie de viña de uva de transformación, esta intensidad se reduce al 20%.

Según la misma fuente, el número total de parcelas en la comarca era (en 1979) de 1.184 Has. De ellas, la mayor, en Laujar de Andarax, no supera 15 Has.

La mayor superficie (36,2%) se concentra en parcelas de 1 a 3,5 Has, estando más del 50% de la superficie distribuida en parcelas de menos de 1 Ha. La parcela moda es de menos de 0,25 Has.

Tabla 19: Asociación de la vid con otros cultivos en la comarca de Laujar.

| Municipio | Cultivo único | Asociado con leñosos | Asociado con herbáceos |
|-------------------|---------------|-------------------------|---------------------------|
| Alcolea | 100,0 | - | - |
| Fondón | 97,4 | 2,4 | 0,2 |
| Laujar de Andarax | 97,6 | 1,6 | 0,8 |
| Resumen comarca | 97,6 | 1,8 | 0,6 |

Según el catastro vitícola y vinícola de 1979, el cultivo de la vid se asocia con otros sólo en un 2,4% de la superficie en contraste con la comarca Contraviesa-Alpujarra, donde la asociación está presente en el 64,2% de la superficie vitícola.

Edad de las plantaciones

Para esta comarca, y según censa el catastro de 1979 de Almería, la distribución de la superficie de viñedo por períodos de plantación se recoge en la Tabla 20, expuesta a continuación. Obsérvese cómo el viñedo es más joven en esta comarca. El grueso de

las plantaciones se realizó entre los años 1946-1960 (casi el 50% de la superficie actual). Por otra parte, el 25,9% de la superficie corresponde a plantaciones de menos de 30 años. En cualquier caso, los datos están sujetos a actualización.

Tabla 20: Superficie de viñedo por periodos de plantación

| Período de plantación | Superficie (%) |
|-----------------------|----------------|
| Hasta 1930 | 7,1 |
| 1931-1935 | 6,4 |
| 1936-1940 | 4,5 |
| 1941-1945 | 7,0 |
| 1946-1950 | 12,7 |
| 1951-1955 | 18,6 |
| 1956-1960 | 17,5 |
| 1961-1965 | 8,7 |
| 1966-1970 | 8,5 |
| 1971-1977 | 8,7 |

Según datos de Lescure (1999), en los informes para la obtención de la mención de vino de la tierra y basándose en una encuesta realizada a los agricultores de la zona, la edad del viñedo era: 20% entre 1-5 años, 13% entre 5-10 años, 32% entre 10-20 años, 20 % entre 20-40 años y un 5% con más de 40 años.

Portainjertos

Sin lugar a dudas, *Rupestris de Lot* es el patrón mayoritario (presente en más del 60% de la superficie de viñedo de Laujar). El éxito de este portainjertos americano radica en su buena capacidad de exploración del suelo hacia estratos profundos, ofreciendo una buena respuesta ante períodos prolongados de sequía. Por otra parte, este patrón es el recomendado en suelos pizarrosos cuando el contenido en calizas no supera el 25%.

Aunque se ha venido diciendo que Rupestris de Lot favorece la tendencia al corrimiento de la flor (sobre todo en variedades como Garnacha y Moscatel), lo cierto es que esto no sucede en terrenos pobres, y siempre puede ser corregido con la poda. El problema fundamental es de adaptación del patrón, siendo en este caso la afinidad una cuestión secundaria. Así se explica el éxito de este portainjertos en la comarca.

Como decíamos anteriormente, los patrones presentes en la comarca Laujar (según el catastro) son Rupestris de Lot (63,3%), Souderc 161-49 (19,1%), Ripario Gloria de Montpellier (11,3%), Couderc 3.309 (4,9%), Millardet 420-A (0,6%) y otros, escasamente representados.

Variedades de viníferas

La Orden de 25 de enero de 1994, por la que se actualizan los anexos de la Orden de 6 de octubre de 1992, en relación con la utilización de nombres geográficos y de la mención “Vino de la Tierra” en la designación de los vinos de mesa, define como variedades principales en la comarca vitícola Laujar la variedad Jaén Blanco como principal.

Tradicionalmente, la elección de variedades se ha realizado con el único criterio de máxima producción (variedades productivas que se adaptasen bien al entorno). En ningún caso se seleccionaban variedades atendiendo a la calidad de sus mostos.

En cuanto a la comarca vitícola Laujar, con derecho a mención geográfica, las variedades censadas son, según el catastro vitícola y vinícola de 1979 de Almería, las siguientes, expuestas con el porcentaje de superficie ocupada respecto al total de viñedo (uva de mesa y de transformación).

Tabla 21: Superficie de viñedo en función de la variedad plantada.

| Variedad | Superficie (%) |
|-------------|----------------|
| Jaén Blanco | 63,8 |
| Macabeo | 31,5 |
| Tempranillo | 1,1 |
| Jaén Tinto | 0,2 |

| | |
|----------------------|-----|
| Otras (*) | 0,2 |
| Mezcla de variedades | 0,3 |
| Sin injertar | 2,9 |

* Calagraño y Moscatel de Málaga, fundamentalmente

La multitud de variedades en Laujar, que no se recogen adecuadamente en el catastro, y mucho menos en la Orden Ministerial que define a la comarca, debería llevar a un replanteamiento de las variedades principales establecidas en esta última (que únicamente hace referencia a Jaén Blanco)

Según Lescurre (1999) los últimos datos realizados para *Iniciativas Leader* en la zona de estudio de la presente tesis, Laujar de Andarax, (Figura nº 3), confirman como variedad y patrón más frecuentes, la Jaén Blanco y el Rupestris respectivamente, pero, ya aparece un 6% del total como monovarietales y un 31% de las plantaciones se han realizado a partir de material certificado (un 67 % de material obtenido del terreno) y en un 100% se cultiva como cultivo único y en secano el 89% (sólo un 7% se riega por inundación).

Basándose en los trabajos de López y col. (1997), García y col. (1990), Lescure (1999) y los datos suministrados por la propia Asociación de Cosecheros y Productores de vino de la zona.

Jaén Blanco

La primera referencia bibliográfica data de 1513 (Alonso Herrera). Roxas Clemente la incluye en la Sección Primera, Tribu IV: *Jaenes (Duracinae)*. Siendo variedad preferente en la Comunidad Autónoma de Andalucía, tuvo una gran importancia en Jaén, Almería, Córdoba, Sevilla y Granada antes de la filoxera. Su extensión actual en Andalucía se concentra en más del 80% en La Alpujarra vitícola.

Jaén Blanco produce racimos grandes, de compacidad media y con un número muy elevado de bayas. Los granos son de tamaño medio, piel delgada, pulpa no coloreada y mediano rendimiento de mosto. Sin sabores particulares, su sabor se clasifica como neutro.

Fenológicamente, la variedad alcanza tardíamente el envero, presentando una maduración difícil que depende de las condiciones del medio en que se desarrolla.



Figura 3: Variedades más frecuentes en la zona objeto de estudio

Es una variedad resistente a la sequía y soporta medianamente la clorosis férrica. En cuanto a los factores bióticos es nula su resistencia a *Plasmopara vitícola* (mildiu), *Uncinula necator* (Oidio) y *Botritis cinerea*.

Los rendimientos obtenidos con esta variedad pueden considerarse medios (relativamente con otras variedades, en las condiciones de la comarca, aunque muy inferiores a los alcanzados en otras regiones vitícolas). La riqueza en azúcar de su mosto es media, dependiendo del grado de maduración, pudiendo alcanzar un alto valor en estado de sobremaduración. La acidez es baja aunque en la región en estudio se consigue un valor superior al medido para la misma variedad en otras condiciones, obteniéndose mostos equilibrados.

Agronómicamente, su resistencia a la sequía y su sensibilidad a la podredumbre la hacen indicada para terrenos ligeros, francos o franco-arenosos. De ella se ha dicho que es la variedad que mejor sufre los cambios bruscos de temperatura (según ocurre en los veranos alpujarreños). En cuanto a la poda, se adapta bien a los distintos sistemas, aunque la poda redonda o en pulgares es la más adecuada.

Existen diversas opiniones en cuanto a su valor enológico. La calidad de sus vinos depende, claro está, del grado de madurez que pueda alcanzar. Tradicionalmente se la ha destinado en la comarca a la producción de aguardiente, obteniéndose un producto de mucha calidad. Sin embargo, los vinos monovarietales obtenidos de ésta eran en 1910 para Viala y Vermorel mediocres, ásperos y poco agradables para consumir puros al ser variedad tardía y de maduración difícil.

Tempranillo

Variedad así denominada por Simón de Roxas Clemente (que la incluye en la Tribu I de la Sección Primera en la clasificación recogida en su “Ensayo sobre las variedades de la vid común que vegetan en Andalucía”, en 1807) entre los Listanes o Forenses.

Tempranillo o Cencibel es una variedad tinta riojana cuya presencia en Andalucía es muy pequeña (sólo censada en muy pequeña proporción en Granada, introducida como variedad mejorante, de la que no se tiene constancia de su presencia antes de la filoxera). Autorizada por el Consejo Regulador de Rioja, es para Larrea

Redondo (1974) la base de los vinos riojanos. Es variedad autorizada para vinificación en la Comunidad Autónoma de Andalucía.

De racimo colgante de tamaño medio y compacidad media, más bien cónico, presenta bayas de tamaño pequeño y piel gruesa, epidermos de color azul-negro y pulpa no coloreada. No presenta sabores particulares.

Tempranillo es una variedad de recolección bastante precoz, adelantando su madurez unos 15 días a Garnacha Tinta (según Larrea Redondo, 1978). Madura mejor cuando está en ladera que en terreno bajo.

Los rendimientos obtenidos con esta variedad pueden considerarse medios (relativamente con otras variedades, en las condiciones de la comarca). La riqueza en azúcar de su mosto es alta y su acidez media.

Agronómicamente se comporta bien en la mayoría de los terrenos, y es altamente resistente al frío. Se adapta bien a la poda corta.

En cuanto a su valor enológico, produce mostos de color intenso bien equilibrados. Aristoy Cencillo (1976) afirma que presentan un bajo contenido en oxidasas obteniéndose vinos de gran aroma, bien grado alcohólico y bastante color, siendo éste muy estable. Tempranillo está considerada entre las mejores variedades tintas españolas.

Jaén Tinto

Simón de Roxas Clemente la contempla en la Tribu IV de la Sección Primera en su clasificación (“Ensayo sobre variedades de la vid común que vegetan en Andalucía”, 1807) como Jaén Negro de Granada o *Crescencii*.

No se dispone de datos acerca de la variedad que no sean procedentes de los propios agricultores de la comarca. Éstos afirman que es variedad muy productiva y bien adaptada a las condiciones físicas de la comarca, lo que para ellos resulta suficiente. Su piel es fina, de color castaño-oxidado, y su pulpa no coloreada. De grano esférico y tamaño medio, es, para los viticultores, buena de comer.

Agronómicamente, según se ha apuntado, su comportamiento es bueno en la zona, no presentando problemas de plagas o enfermedades.

En cuanto a su valor enológico, la mezcla con otras variedades en la elaboración de tintos y rosados no permiten separar sus características, no contando en el momento con valores de riqueza en azúcar y acidez atribuibles a la variedad.

II.A.3.- Técnicas tradicionales de cultivo

La formación en pie alto está presente en el 34,5% de la superficie de la comarca, según se censa en el catastro vitícola y vinícola de Almería de 1979, ajustándose a la proporción de uva de mesa (33%). No obstante, debe decirse que no todo el viñedo así formado se destina a tal fin, siendo frecuente, asimismo, formación en pie bajo con variedades de uva-fruta.

El marco real es el de mayor presencia en Laujar, como se muestra en la Tabla siguiente siendo prácticamente inexistentes las plantaciones en línea (explicable por las buenas condiciones físicas del entorno).

Tabla 22: Técnicas de cultivo por municipios

| Municipio | Pie bajo | | Pie alto |
|-------------------|------------|-------------|----------|
| | Marco real | Tresbolillo | |
| Alcolea | 28,8 | 7,9 | 63,3 |
| Fondón | 23,6 | - | 76,4 |
| Laujar de Andarax | 79,1 | 5,1 | 15,8 |
| Resumen comarca | 61,8 | 3,7 | 34,5 |

Existe alguna parcela en Laujar de Andarax en la que se está ensayando la disposición del cultivo en espaldera. Debe decirse a este respecto que en esta comarca es indicada a priori la realización de este tipo de poda, ya que las condiciones del terreno lo permiten y es acorde con el grado de intensificación de las explotaciones en la zona. No obstante habrá que esperar resultados (la plantación en cuestión no tiene más de dos años). Sería necesaria, en cualquier caso, una adecuada formación de los podadores, pues este sistema requiere cierta especialización.

El Valle del Alto Andarax contrasta fuertemente con las duras condiciones físicas alpujarreñas. Constituye una llanura con cierta disponibilidad de agua procedente de la sierra, lo que da lugar a sistemas agrícolas bien planificados en muchos de los cuales es posible el riego. Esto da lugar a una mayor intensificación de los cultivos, que si bien son mayoritariamente almendros, viñas e higueras, nada tienen que ver con lo expuesto en las generalidades de la agricultura en La Alpujarra.

Una hectárea de viñedo posee en torno a los 3000 pies. Aunque no se dispone de datos acerca del modo en que se efectuaron las plantaciones más antiguas existen motivos para sospechar que fueron realizadas del mismo modo que en la vecina Contraviesa.

La mayor parte de las viñas presenta una poda en cabeza más alta que la realizada en la comarca Contraviesa-Alpujarra, argumentando los agricultores que el viento en Laujar no es tan limitante como en la otra zona. Es también frecuente la formación en vaso en las plantaciones más jóvenes.

El grado de mecanización del cultivo es muy alto, según se ha dicho anteriormente. El laboreo se realiza con tractores en la práctica totalidad de las explotaciones. Los agricultores realizan varios pases de cultivador cruzados a lo largo del año y no se realizan labores profundas. Es frecuente el desyerbado químico en los pies para evitar la cava manual (reduciendo costes de esta forma). La poda de viñas se realiza en enero. No es práctica habitual la poda en verde.

En cuanto a la fertilización, la búsqueda de una alta productividad unida al bajo coste del abono inorgánico y a una climatología benigna da lugar a un exceso de abonado nitrogenado. El abono suele ser complejo, aportándose al mismo tiempo fósforo y potasio en abundancia ante el desconocimiento de la riqueza mineral del sistema edáfico y de sus posibles carencias consecuencia de la extracción anual del cultivo. La “lejanía” de los laboratorios oficiales no propicia la iniciativa de los agricultores para realizar análisis químico de sus suelos, de los que existe un desconocimiento real, preocupante en este caso por el grado de intensificación de los sistemas agrícolas en la comarca. Debe decirse además que la mayoría de los agricultores no buscan la calidad de sus caldos, sino maximizar su producción de uva, a pesar de que muchos de ellos elaboran sus propios vinos.

No existen graves problemas de plagas y enfermedades en la comarca que dificulten el desarrollo normal del cultivo. Como ocurre en toda La Alpujarra, la alta diversificación de la Agricultura y las características climáticas no favorecen su proliferación. No es frecuente la aplicación de agentes fitosanitarios, aunque se lucha de forma preventiva contra el Oidio con tratamiento de azufre.

El rendimiento medio del cultivo oscila en torno a los 5000-6000 kg./Ha. No obstante, depende, por supuesto de la edad del viñedo, la variedad, la técnica de cultivo y la climatología del año. Potencialmente puede llegarse a los 9000 mg/Ha, y hay pocas viñas a las que se le vendimie menos de 3000 kg./Ha.

II.A.4.- Proceso de maduración de la uva

La evolución de la uva se divide en cuatro periodos (Peynaud, 1989; Mareca, 1980; Vogt, 1984):

1.- El periodo **herbáceo** que va desde el cuajado, hasta el envero, momento en que la uva cambia de color. Durante este periodo, la uva es verde, coloreada por la clorofila, y presenta una consistencia dura. Sólo contiene 20 g. de azúcares por Kilo y casi otro tanto de acidez.

2.- El **envero** que corresponde a la época fisiológica de la coloración de la uva. Al mismo tiempo el grano engorda y adquiere elasticidad. El fenómeno es muy brusco. El azúcar de las uvas aumenta de modo repentino.

3.- El periodo de la **maduración** que comprende desde el envero al estado de madurez. Durante los cuarenta o cincuenta días que dura, la uva sigue engordando, acumula azúcar y va perdiendo acidez.

4.- La **sobremaduración** sucede a la maduración cuando la uva permanece mucho tiempo en la cepa. El fruto vive de sus reservas, pierde agua y su zumo se concentra.

Durante la maduración, el grano de uva sufre una serie de cambios físicos y químicos muy importantes.

a.- **Cambios físicos.**- Siempre que las condiciones climáticas sean favorables, hay un aporte de agua continuo hacia el fruto. El principal cambio, es el aumento de peso y volumen de las bayas, con una disminución de la rigidez de la piel y de la pulpa, y el consiguiente aumento del porcentaje de pulpa.

b.- **Cambios químicos.**- Son cuantitativamente distintos en las diferentes partes del fruto, pero, cualitativamente bastante parecidos.

- Almacenamiento de azúcares.- La brusca aparición de azúcares a partir del envero se explica por la migración repentina de las reservas de la cepa (hojas y partes leñosas de la vid) que son transferidas al fruto, por un aporte diario debido a la actividad fotosintética de las hojas durante toda la fase de maduración. Esta última actividad, por tanto, dependerá de la climatología, y así que la calidad de una cosecha estará en función del soleado de los meses de Agosto y Septiembre.

- Disminución de la acidez.- La composición ácida de la uva ha sido aceptada como el factor más importante que determina la calidad de sus productos derivados, especialmente del vino. Se produce una progresiva disminución de la acidez, debido que al engrosarse el grano, ésta se diluye por un aporte continuo de agua intracelular y por otro lado los ácidos málico y tartárico pasan a anhídrido carbónico y agua, dicha combustión viene condicionada por la temperatura. Además el ácido málico se transforma en azúcar al final de la fermentación.

También los iones potasio, calcio y magnesio al incorporarse formando tartratos y bitartratos, modulan el fenómeno del movimiento del agua.

La evolución del valor de PFO (polifenoloxidasas), fundamentalmente de la Tirosinasa, nos revela una actividad alta al inicio de la maduración que decrece en plena maduración y vuelve a ser ascendente en sobremaduración. Por lo tanto, una vendimia "verde" presentará inestabilidad oxidásica ante polifenoles lo mismo que una vendimia sobremadura. Sin embargo, el sustrato polifenólico de vendimia verde es bajo y el efecto oxidásico patente, mientras que en uva sobremadura la actitud de deterioro oxidásico de polifenoles puede ser inapreciable.

Respecto al aroma y la maduración, se opina que la uva a media maduración presenta un valor aromático superior al presentado en sobremaduración. Sin embargo en materia de aromas, no se sabe mucho y se admite que las uvas a mayores graduaciones glucométricas pueden presentar una olfacción directa pobre pero puede generar en fermentación aromas de fruto por actuación ante precursores de aromas que no tienen valor olfativo en el mosto.

La materia polifenólica total presenta un valor ascendente en maduración, asimilable al de la riqueza glucométrica. Sin embargo, los Antocianos presentan un valor creciente rápido al inicio de la maduración para después estabilizarse y decaer en sobremaduración. Los flavonoides formados al principio son los de manifiesto color amarillo acumulándose después los incoloros que se vuelven amarillos al oxidarse.

A su vez la maduración supone no sólo una acumulación progresiva de polifenoles sino que éstos van presentándose con peso molecular mayor, excepto en sobremaduración en que pueden existir degradaciones. Interesa conocer, no sólo el contenido en polifenoles, sino también su estado de condensación.

Se produce un ascenso del contenido en nitrógeno total de la uva y un cambio cualitativo desde forma amoniacal en envero a proteínas en la maduración con fuerte incremento de prolina, arginina y treonina. Después, al fermentar, desaparece rápidamente el nitrógeno amoniacal, decaen los aminoácidos, péptidos y proteínas y no tanto la prolina que es absorbida por la levadura y finalmente sintetizada por ésta y cedida, resultando como balance, un leve descenso.

Entre los factores que afectan a la madurez, y por tanto a la calidad del producto obtenido, se pueden distinguir (Cabezudo y col., 1988 y 1992; Barros, 1986):

a.- Los no controlables una vez que se ha plantado el viñedo, y que son: variedad, tipo de portainjerto, edad del viñedo, orientación, densidad del marco, condiciones climáticas y ciertas características del suelo.

b.- Los "controlables", en mayor o menor grado, entre los que cabe citar: insolación, humedad del suelo, condiciones de cultivo, nutrición mineral, fertilización, etc.

Así, los factores climatológicos y el momento de recolección de la uva, juegan un papel muy importante en el metabolismo de los fenoles. Una temperatura demasiado elevada produce combustión de azúcares y por lo tanto, no hay acumulación de pigmentos. Si las temperaturas nocturnas eran similares a las diurnas, las uvas tintas adquirirían mayor coloración, por el contrario una temperatura diurna de 35 °C no les era favorable y por último el contenido en polifenoles depende de la pluviometría, cuanto más lluvioso es el año menor será el contenido polifenólico.

También se ha señalado, que en los suelos ricos en nutrientes minerales disponibles y con suficiente reserva de humedad, pueden obtenerse elevados rendimientos, aunque la calidad de los vinos deja mucho que desear si se compara con la obtenida en zonas con suelos pobres. Si el nivel de humedad es alto durante la maduración, las uvas son más ricas en ácido tartárico que si la humedad del suelo es baja. Los suelos arcillosos producen en general uvas más ácidas y menos delicadas, ricas en pigmentos y taninos, en tanto ciertas variedades cultivadas en suelos calizos poseen un mayor contenido de componentes volátiles (Amerine y Ough, 1976).

Recientemente, para la determinación de la madurez de la uva, se utilizan los índices tecnológicos de madurez, en los que además de la cantidad de azúcares y la acidez total, se determinan, el pH, compuestos fenólicos, terpenos, ácido tartárico y ácido málico. Para realizar con rapidez estos análisis, se han puesto a punto métodos especiales, como es un ensayo rápido de determinación de terpenos volátiles y de sus precursores, debido a Dimitriades y Williams (1984).

La fecha de vendimia ha sido tradicionalmente a mediados de octubre, antes que en La Contraviesa. Como en esta comarca, tampoco se realiza un seguimiento de la maduración en función de la variedad. La recolección es indiscriminada, mezclando variedades tintas y blancas para obtención de vino rosado, aunque una mayor planificación en las plantaciones coloca a esta comarca en mejor disposición para el establecimiento de una vendimia racional. La cooperativa de la comarca, para la elaboración de vinos blancos y tintos está iniciando en la zona una distinción por variedades. Aunque con una andadura corta y algunos problemas técnicos, se propone establecer un control sobre la maduración de las variedades que le interesan, para establecer en función de éstas, el momento idóneo de vendimia de cara a la obtención de vinos afrutados de menor grado alcohólico que el rosado típico de Laujar. Pero esto no es lo tradicional. Lo cierto es que una sobremaduración en el momento de cortar los racimos ha sido lo buscado por los viticultores, siempre con objeto de alcanzar el máximo grado alcohólico, por motivos culturales y como protección de sus vinos ante el desconocimiento de las técnicas enológicas de conservación (Belitz y Grosch, 1985).

El transporte de la vendimia al lagar se realiza en remolques de forma generalizada.

II.B.- Obtención Y Características Del Mosto

Una vez cortados los racimos, se transporta lo más rápidamente posible para evitar el aplastamiento y el amontonamiento y se liberan con la mayor rapidez posible de escobajos, es lo que se conoce como desrasponado, desgranado o despalillado de las uvas. Luego se estrujan, muchas veces, las máquinas despalilladoras, están asociadas a las estrujadoras.

Un buen **despalillado** no debe dejar las uvas sin desgranar, debe separar la totalidad de los escobajos, no arrancando los pedicelos ni golpeando o aplastando los

pedúnculos y los escobajos evacuados no deben ser impregnados del jugo. El despallador como la estrujadora debe respetar los tejidos del racimo.

El **estrujado** consiste en romper el hollejo de la uva de modo que libere la pulpa y el zumo, puede ser más o menos intenso según que el hollejo sea simplemente aplastado o triturado. El modo de estrujado, repercute sobre toda la vinificación. En todos los casos, el estrujado, debe hacerse sin laminado de las pieles, trituración de las pepitas ni dilaceración de los raspones.

Existe una estrujadora-despalladora centrífuga que dan un rendimiento importante de trabajo, pero ejercen una acción muy brutal sobre las uvas.

A continuación se **presan** en lagares mecánicos, en ocasiones, de funcionamiento continuo como prensas de huso o de tornillo, prensa hidráulica, prensa neumática, etc. en los que se separa el jugo de la uva o mosto de la masa de uvas o bagazo.

Según la forma de obtención, se pueden distinguir tres tipos de mosto:

- **Mosto flor.**- El mosto fluye sin ejercer presión.
- **Mosto de prensado.**- Se obtiene por prensado de la masa de uva.
- **Mosto de extracción.**- Se hace un esponjado del bagazo y se vuelve a prensar.

II.C.- Técnicas de Vinificación en la Zona.

Están basadas en los datos aportados por la Asociación de Cosecheros de la zona y la Dirección Técnica de la Cooperativa “Valle de Laujar”.

II.C.1.- Vino tradicional

La producción de este tipo de vino ha quedado reducida a pequeñas bodegas familiares que no comercializan, al menos teóricamente, su producción. No obstante comentaremos algunos aspectos relativos a la metodología enológica.

El vino tradicional, es un vino rosado pálido consecuencia de una vinificación en blanco (y aquí difiere del tipo Costa en la que se ha practicado en ocasiones una maceración parcial) y de una proporción varietal blanca/tinta del orden de 2:1 (variedades blancas:tintas). La riqueza varietal en la zona, siendo grande, es sensiblemente inferior a la de Contraviesa.

La vendimia, sobremadura, se incorpora al lagar en remolque. Indicaremos en este punto, que en la actualidad, las bodegas familiares no suelen tener lagar. El

tratamiento mecánico del producto suele realizarse en un lagar común, propiedad de un particular, que realiza el servicio a cada bodeguero. No se realiza despalillado ni estrujado, ni separación de calidades por prensadas. El rendimiento del prensado no supera el 65%. No se realizan controles al mosto distintos de su riqueza en azúcar en ocasiones muy excepcionales.

El mosto es posteriormente transportado a depósitos de cemento (generalmente sin recubrimiento de uso alimentario) sin tratamiento previo de sulfitado o desfangado, por lo que una cierta maceración es inevitable. Las bajas temperaturas (a pesar de que la vendimia suele adelantarse a ésta) ralentizan el arranque de la fermentación con los consiguientes peligros que esto conlleva, y es común que ésta no llegue a completarse. El vino queda algo azucarado y está muy expuesto al picado acético.

El contacto del vino con las lías es casi permanente. No suele practicarse trasiego alguno o, si se realiza, es tardío (“el vino debe estar en contacto con las madres”). Así, no es de extrañar la presencia de olor a sulfhídrico.

En cuanto a la conservación del producto acabado, la quema de pajuelas de azufre en unos casos y la adición de metasulfito potásico en la dosis indicada por el farmacéutico del lugar en otros hacen del sulfitado una práctica difícilmente controlable por el pequeño bodeguero, que no realiza control analítico alguno sobre su producto.

No se realizan controles de acidez. Siendo la acidez potencial de los mostos (relación medio físico-variedad) inferior a la propiciada en La Contraviesa, no es un sabor primario demandado por el consumidor de este vino, que, no obstante, queda desprotegido de alteraciones microbiológicas.

El producto no suele someterse a crianza en madera. Tampoco se realiza clarificación distinta de la precipitación y decantación natural en función de la temperatura según la estación, no se estabiliza el vino.

Una tendencia a ampliar el mercado ha dirigido la producción de vino hacia otros tipos, de muy distintas características al tradicional. Ahora bien, esta nueva tendencia ha desplazado totalmente al vino tradicional con el nacimiento de una Sociedad Cooperativa Andaluza que procesa la mayor parte de la producción comarcal, siendo la producción del rosado tradicional casi testimonial. Estos nuevos vinos, blanco, rosado y tinto, buscan en un menor grado alcohólico y mediante aplicación de moderna

tecnología una mayor juventud en los caldos, en base a los aromas primarios de origen varietal, haciéndolos más ligeros.

II.C.2.- Vinos actuales

En el caso de la vinificación en blanco (blanco y rosado), el prensado del producto se realiza inmediatamente. La operación de prensado incrementa su rendimiento en este tipo de productos, debido a que quien los elabora dispone normalmente de equipos más potentes. No es generalizado distinguir calidades por prensadas, aunque se realiza en algunas bodegas ocasionalmente.

El mosto se transporta a pocillos de decantación donde, tras un ligero sulfitado tiene lugar el desfangado. Esto es lo deseable, pero no es común por la carencia de instalaciones en la mayoría de las bodegas, que trabajan con el equipamiento tradicional, aunque poco a poco lo van adaptando a las nuevas exigencias. La sulfitación se realiza empleando metasulfito potásico, y excepcionalmente (sólo la Cooperativa de reciente creación) en forma de anhídrido sulfuroso líquido (gas licuado).

El control analítico de los mostos, como en el rosado tradicional, se reduce generalmente al empleo de un pesamostos como indicador de la riqueza en azúcar. En algunas bodegas se llega a medir el pH con un pH-metro de bolsillo, tomando como indicación para la corrección de acidez este parámetro, que de hacerse (no es necesario todos los años) se realiza con ácido tartárico en dosis no superior a la establecida por la legislación

La fermentación tiende a realizarse en depósitos de acero inoxidable, de capacidad variable, aunque superior a las cubas troncocónicas de roble o castaño tradicionales. No obstante, sigue siendo común la fermentación en madera. Las diferencias en los vinos debidas al material del envase son importantes. Se va extendiendo el empleo de levaduras seleccionadas para acelerar el comienzo de la fermentación. En cuanto al control de la temperatura, sólo la Cooperativa puede realizarlo, por disponer de la tecnología adecuada. El resto de las bodegas, sin tener capacidad para ello, no suelen necesitarlo en la mayoría de los casos debido a que la fermentación se realiza en depósitos de pequeño volumen y las temperaturas exteriores son bajas en la época en que ocurre el proceso fermentativo. En cualquier caso, en un

vino blanco o rosado que se quiera mantener joven, la fermentación no debiera ocurrir por encima de 16-18°C. Pero en pequeños envases, en el microclima de las bodegas, no se suele superar mucho esta temperatura, y existen otras cuestiones prioritarias de cara a una inversión, y otros factores limitantes en lo que se refiere al mantenimiento de carácter afrutado.

Finalizado el proceso biológico, en el vino ya seco tiene lugar una clarificación espontánea, tanto más eficaz cuanto menor es el recipiente vinario, y siempre que no se hallen presentes coloides protectores, procedentes sobre todo de vendimias podridas, lo que no suele ser el caso en la comarca. Cuando se trata de grandes volúmenes es recomendable el encolado y/o la estabilización física de los vinos. En instalaciones de cierta importancia se está extendiendo el empleo de bentonita como coadyuvante de la clarificación y estabilización previa del vino blanco sobre todo. Más raro es su empleo en rosado ante el miedo de la ligera pérdida de color que el tratamiento puede ocasionar. Posteriormente, el vino es trasegado y sulfitado. Un retraso en el primer trasiego puede ocasionar olores desagradables de peligrosa y costosa corrección. No es común el empleo de otras técnicas estabilizadoras de los vinos.

En cuanto a la vinificación en tinto se distingue de la de blanco en el proceso de maceración de los orujos en los estadios previos y paralelos a la fermentación, del que depende la intensidad colorante del producto final que es uno de los parámetros más importantes en el producto.

La vendimia, despalillada y estrujada, debe ser sulfitada ligeramente e introducida en los dispositivos de encubado, que no son otros que las propias cubas troncocónicas de madera de roble o castaño tradicionales o más modernamente de acero inoxidable. En cualquier caso se trata siempre de envases abiertos con sombrero flotante y encubados cortos. El seguimiento de la intensidad colorante es cualitativo. Aunque son deseables algunos remontados, su ejecución no suele realizarse, por carencia de equipos para ello. En el descube hay quien separa el “vino de yema” como calidad distinta del de prensa, aunque no es lo habitual. El vino que procede del prensado posterior de los orujos (aproximadamente un 15% del total, dependiendo del tipo de prensa) proporciona color y cuerpo, lo que es necesario en muchas ocasiones. Si es más común una evolución de la fermentación por separado, mezclándose los productos una vez acabados en proporción que depende de la calidad por separado de los mismos.

No se realizan seguimientos de la fermentación maloláctica. Aunque lo normal es que se produzca, es presumible que como consecuencia del método de encubado y el sulfitado al finalizar la fermentación, normalmente enérgico por miedo a alteraciones, la retrase considerablemente en algunas ocasiones, o incluso nunca llegue a producirse. No suelen emplearse clarificantes en tinto. El desconocimiento de técnicas específicas por los bodegueros y el miedo a la pérdida de color son las principales razones.

La conservación de los vinos (tintos, rosados y blancos) se realiza en los propios depósitos de fermentación hasta su embotellado. En ocasiones se trasvasa a barricas donde se conserva durante algunos meses. No existe experiencia sobre el comportamiento en madera de estos vinos. Previo al embotellado, sólo una bodega (la Cooperativa) aplica refrigeración-filtración.

III.- FACTORES MICROBIOLÓGICOS

III.A.- Antecedentes Históricos

Es mas o menos cierto, que el vino, al igual que la cerveza, tuvo su origen cuando el hombre comenzó a domesticar las cosechas, y experimentó la necesidad de almacenarlas. En el caso de las uvas, las fermentaciones se desarrollaron de forma espontánea, dando lugar a un producto con propiedades estimulantes y vigorizantes, pero también es cierto que el producto obtenido no era siempre muy apetitoso. Con el paso del tiempo el hombre comenzó a dominar el cultivo de la vid y ciertas etapas de la tecnología del vino. A lo largo de los siglos, la etapa fundamental que constituye la fermentación alcohólica del jugo de la uva permaneció sin explicación y, por tanto, sin control. Por esto en la Edad Media los vinos se completaban con miel, especias o pimienta, para atenuar ciertos defectos de la fermentación (Duteurtre, 1990).

La enología neta nace con los primeros descubrimientos del mundo microbiano. A mediados del siglo XVII el holandés Antonio Van Leeuwenhoek, ayudado por un microscopio rudimentario construido por el mismo, observó los microorganismos que se encuentran presentes en el mosto de uva en fermentación, reconociendo la naturaleza organizada de los mismos. Dos siglos más tarde el francés Desmazières, con una mejor técnica microscópica confirma el hasta ese momento silenciado descubrimiento del holandés. Posteriormente a que la ecuación de la fermentación alcohólica fuera establecida por Lavoisier y Gay Lussac, C. Cagnard-Latour, Th. Schwann y F. Kützing demostraron de forma independiente que la levadura que aparece durante la fermentación alcohólica era una planta microscópica y que la conversión de los azúcares en alcohol etílico y dióxido de carbono era una función fisiológica de la célula de levadura. De esta forma, cuando Pasteur aborda el tema, a mediados del S. XIX, en solo cuatro años descubre las fermentaciones alcohólica y láctica, demuestra la correlación estructura-función, etc. En 1857, Pasteur enunció su teoría vitalista de la fermentación, según la cual, ésta se realizaba en el interior de células vivas; llegó por primera vez a la obtención de cultivos de levaduras diferentes, estableciendo el origen y ciclo de algunas de éstas en la naturaleza, demostrando su ausencia en la superficie de uvas verdes, y en cambio, su presencia cuando están maduras, adheridas a través de la pruina, capa cerosa

que rodea al grano de uva maduro. Finalmente, establece el origen bacteriano de algunas de las enfermedades del vino (Stanier y col., 1991).

Posteriormente otros autores profundizan en el estudio de las levaduras como grupo autónomo taxonómicamente estable. Entre estos, destacar al danés Hansen que establece los fundamentos de la taxonomía de las levaduras, fija las técnicas de aislamiento y la determinación de los caracteres fisiológicos y morfológicos, criterios taxonómicos y sistemáticos de clasificación. El francés Guilliermond es el iniciador de la citología de los organismos unicelulares en estado de vida libre y, describe la estructura interna de la célula. Por último, hemos de mencionar al danés Winge por su contribución al estudio de la genética de las levaduras.

A partir de las experiencias de Müller-Thurgau, que pone a fermentar un mismo mosto estéril con solo levadura elíptica, y aparte, con una mezcla de elíptica y apiculada, se comprueba en los fermentados resultantes la acción depresiva de la levadura apiculada sobre la elíptica, proponiendo en consecuencia el alejamiento de la apiculada del proceso fermentativo. Se vislumbra a partir de este momento el concepto de fermentación pura. Esta técnica, unida al uso más racional de anhídrido sulfuroso que se venía aplicando de forma empírica, perfilan nuevas modalidades fermentativas determinadas por factores biológicos

Parece ser que fue en Perugia (Italia) y, gracias a la tenacidad de Gino de Rossi, discípulo de Roux y colaborador de Castelli, donde nace la microbiología enológica. Estos autores, en un trabajo iniciado en 1933 sobre un mosto de la Umbria, establecen las directrices y técnicas a seguir en la toma de muestras, momentos en los que han de realizarse los bancos de diluciones, criterios taxonómicos y sistemática aplicable a la clasificación de las cepas aisladas. A partir de este trabajo, Castelli y sus colaboradores comienzan con el estudio de la flora levaduriforme de todas las regiones de Italia e Israel (Iñigo, 1984)

El estudio de los agentes fermentativos de los mostos de uva españoles se inició en La Mancha (Castelli y col., 1957) y ha sido continuado durante las décadas posteriores hasta poseer en la actualidad conocimiento de la flora levaduriforme de la totalidad de las Denominaciones de Origen de España.

Las levaduras presentan un papel muy relevante en la calidad del vino. Es por esto que, la identificación y clasificación de las especies de levaduras que intervienen en las fermentaciones espontáneas de los mostos, permite conocer las posibilidades

enológicas reales que tiene el vino. Así, como hemos comentado, diferentes estudios sobre la caracterización de la flora levaduriforme fermentativa han sido realizados en numerosas partes del mundo, así como en España (Quesada y col., 1992). Actualmente se conoce de manera precisa las especies de levaduras predominantes en cada etapa de la fermentación, pero esta distribución es potencialmente distinta según las zonas vitivinícolas (Briones y col., 1995). Como comentamos, no cabe duda que la flora levaduriforme presenta gran importancia en la calidad final de un vino. Hansen, de la Cervecería Carlsberg, fue el primero, en 1884, en observar la ventaja de emplear cepas de levaduras puras. La cerveza resultante se presentaba notablemente mejorada, siendo esta técnica generalizada a partir de entonces en cervecería.

En enología, esta práctica fue preconizada por Georges Jacquemin que comerciaba cerca de Nancy, a principios de siglo, de extractos líquidos obtenidos a partir de cepas de levaduras aisladas de “grands crus”. En su libro *Las fermentaciones racionales* (1900), preconiza el empleo de levaduras seleccionadas y piensa que, si una levadura no puede transformar un vino ordinario (corriente) en un “gran vino”, una levadura bien seleccionada mejora la calidad media de un vino y hace que el trabajo del vinificador sea menos aleatorio. El interés de seleccionar las levaduras es por tanto evidente en el enólogo (Lemaesquier y col. 1995).

III.B.- Características Generales De Las Levaduras

El término levadura, al igual que sucede con el término moho, se emplea de forma habitual, si bien su definición resulta difícil de precisar. Se puede referir a aquellos hongos que, generalmente no son filamentosos, sino unicelulares y de forma ovoide o esferoide, y que se reproducen por gemación o por fisión. (Mossel y col., 1985).

Como hemos comentado, las levaduras son hongos unicelulares durante todo o parte de su ciclo vegetativo. Aproximadamente 7000 años a.C. ya se producía cerveza en Sumeria. El vino se producía en Asiria en el 3500 a.C. y en la antigua Roma existían entorno a 250 panaderías alrededor del 100 a.C. Asimismo, la leche ha sido transformada en Kefyr y Koumiss empleando especies pertenecientes al género *Kluyveromyces* en Asia durante cientos de años (Kurtzman y col., 1998).

III.B.1.- Características morfológicas: Como ya hemos dicho, la mayoría de las levaduras son hongos microscópicos que no forman micelio, y por lo tanto, se presentan

como células sencillas. Por lo que respecta a la morfología de estos microorganismos, pueden presentar forma redondeada, ovoidea o elongada, siendo relativamente constante para la misma especie. No obstante, en numerosas ocasiones, para describir la forma vegetativa de las levaduras se emplean los términos de esférica, ovoide, alargada, cilíndrica, triangular e incluso alargada, constituyendo un verdadero micelio o un falso micelio. Podemos asimismo afirmar que existen formas celulares características, como por ejemplo, las levaduras del género *Dekkera* (forma imperfecta: *Brettanomyces*). Las levaduras pertenecientes a este género tienen células ojivales: redondeadas por un extremo y puntiagudas por el otro.

Por lo que respecta al tamaño de las células, éste puede variar mucho según las distintas especies. De esta forma, por lo que respecta a la anchura el rango oscila de 1 a 10 μm , mientras que el mismo es de 2-3 μm a 20-50 μm para la longitud.

Las levaduras se encuentran encuadradas dentro de las Eucariotas puesto que presentan un núcleo diferenciado y orgánulos subcelulares como pueden ser el retículo endoplásmico y las mitocondrias. Dentro de su estructura, las partes que pueden ser observadas son la pared celular, el citoplasma, las vacuolas de agua, los glóbulos de grasa, y los gránulos (metacromáticos, de albúmina o de almidón). Para la observación del núcleo son necesarias técnicas de tinción especiales.

III.B.2.- Clasificación de las levaduras: Desde un punto de vista taxonómico, es un grupo de microorganismos muy heterogéneo, que ya en 1984 comprendía 60 géneros y unas 500 especies (Kreger-Van Rij, 1984), y que en la última revisión engloba 100 géneros que contienen alrededor de 700 especies (Kurtzman y col., 1998).

La clasificación de las levaduras según, Barnett y col. (1990), puede observarse en la el siguiente esquema, si bien, según ya se ha expuesto, la última de las revisiones llevadas a cabo ha modificado la misma. La nueva, que no definitiva, de estas clasificaciones se puede encontrar en el Anexo 1 y 2.

Clasificación de las levaduras (Barnett y col., 1990)

Fungi (Reino)

Eumycota (División)

Ascomycotina (Subdivisión)

Hemiascomycetales (Clase)

Endomycetales (Orden)

Spermaphthoraceae (Familia)

Sacchromycetae (Subfamilia)

Nadsonioideae (Subfamilia)

Lipomycetoideae (Subfamilia)

Saccharomycetoideae (Subfamilia)

Basidiomycotina (Subdivisión)

Ustilaginales (Orden)

Filobasidiaceae (Familia)

Tremellales (Orden)

Tremellaceae (Familia)

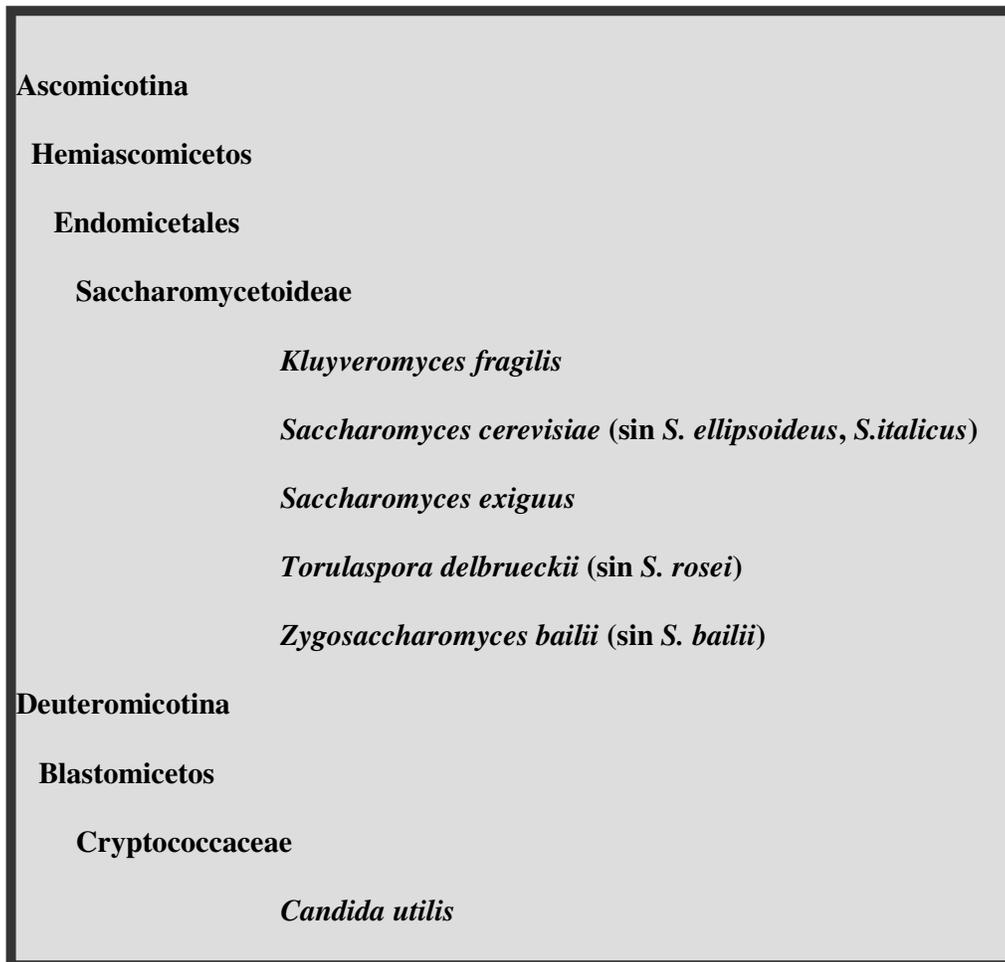
Deuteromycotina (Subdivisión)

Blastomyces (Clase)

Cryptococaceae (Familia)

Sporobolomycetaceae (Familia)

En el siguiente esquema se exponen las principales especies de levaduras así como algunos de sus sinónimos más importantes:



Las levaduras pertenecen a dos tipos de hongos que se diferencian por su aptitud para formar o no esporas de origen sexual. El primero de estos grupos está constituido por los Ascomicetos (subdivisión Ascomycotina, levaduras verdaderas o levaduras asporógenas). Un segundo grupo es el representado por los Deuteromicetos (subdivisión Fungi Imperfecti o Deuteromycotina, levaduras falsas o levaduras esporógenas).

La clasificación de las levaduras atendiendo a esta característica se detalla a continuación, de acuerdo con lo establecido por N.J.W. Kreger van Rij (1984).

Levaduras ascospógenas

| | | |
|------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| F. Spermophthoraceae | | <i>G. Metchnikowia</i> |
| F. Saccharomycetaceae | Subf. Schizosaccharomycetoideae | <i>G. Schizosaccharomyces</i> |
| | Subf. Nadsonoideae | <i>G. Hanseniaspora</i> <i>G. Saccharomycodes</i> |
| | Subf. Saccharomycetoideae | <i>G. Debaryomyces</i> <i>G. Dekkera</i> <i>G. Hansenula</i> <i>G. Kluyveromyces</i> <i>G. Pichia</i> <i>G. Saccharomyces</i> <i>G. Torulaspora</i> <i>G. Zygosaccharomyces</i> |

Levaduras no ascospógenas: Levaduras imperfectas

| | | |
|---------------------------|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| F. Cryptococcaceae | | <i>G. Brettanomyces</i> <i>G. Candida</i> <i>G. Cryptococcus</i> <i>G. Kloeckera</i> <i>G. Rhodotorula</i> |
|---------------------------|--|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

III.B.3.- Citología: La morfología celular, la formación de una cápsula de polisacáridos, la ausencia o presencia de vacuolas, de glóbulos lipídicos y el desarrollo de mitocondrias, dependen de las condiciones físico-químicas y de la edad del cultivo. Esto condiciona que, a la hora de estudiar las características celulares, se tenga que hacer siempre en cultivos recientes, realizados en idéntico medio de cultivo y con

iguales condiciones de temperatura y humedad.

En el citoplasma, además de los orgánulos celulares, pueden encontrarse ribosomas, enzimas, polifosfatos, glucógeno y trealosa. El glucógeno, que puede constituir hasta un 12% en peso seco de las células, se acumula durante la fase estacionaria, cuando el nitrógeno se vuelve limitante y aún queda glucosa en el medio. La trealosa es otro hidrato de carbono de reserva que puede representar hasta el 16% del extracto seco de las células. Ambos compuestos pueden llegar a alcanzar conjuntamente hasta un 20% del extracto seco de las células, proporcionando energía a las mismas durante las fases de adaptación o de esporulación así como, presentan un importante papel en la osmotolerancia.

El número de cromosomas puede variar con la especie, así *Hansenula holstii* posee tres mientras que *Hansenula anomala* posee solamente dos.

La membrana citoplasmática se constituye de tres capas: las capas externa e interna presentan constitución proteica mientras que la capa central es lipoprotéica. Las primeras participan en la entrada y salida de solutos y en las reacciones enzimáticas, de forma que únicamente las moléculas de agua difunden pasivamente y los solutos se intercambian bien por difusión facilitada, bien transporte activo.

Por lo que respecta a la pared celular, ésta es rígida y por tanto la responsable de la forma de la célula. Cuando la multiplicación vegetativa se lleva a cabo, tras la separación de las células, se produce una cicatriz de gemación sobre la célula madre y de una cicatriz de nacimiento sobre la yema (Beling, 1972). Esta pared celular está constituida por tres capas, y aproximadamente un 1% de la misma por quitina, que se destina esencialmente a las cicatrices de gemación.

En cuanto a la existencia de una cápsula, esta se encuentra verificada en algunas levaduras. Unas veces puede tratarse de una cápsula de fosfomanano soluble en agua (*Hansenula*, *Pichia*), en otros casos la cápsula puede estar constituida por manano, mas o menos ramificado, (*Rhodotorula*) o bien ésta puede ser de heteropolisacáridos (*Criptococcus*).

Finalmente, hemos de destacar que también se han observado en algunas cepas de *Saccharomyces* estructuras proteicas de tipo filamentoso que podrían desempeñar algún papel en la floculación.

III.B.4.- Reproducción: De forma general, en los organismos unicelulares, el crecimiento se corresponde con el aumento del número de individuos; y por tanto está ligado a la reproducción. La reproducción vegetativa de las levaduras se realiza generalmente por gemación, si bien también es cierto que, en determinadas condiciones ambientales, las levaduras esporógenas pueden reproducirse por vía sexual.

En la modalidad de reproducción por gemación no se suelen formar yemas sobre el mismo lugar (salvo en la gemación bipolar); por tanto, el número de yemas por célula es limitado. El examen de una población de levaduras en fase de crecimiento estacionario muestra que la mayoría de las células no tienen cicatrices de gemación, una minoría presenta de 1 a 6 incluso de 12 a 15. Si las condiciones del medio son favorables, el tiempo de generación de *Saccharomyces cerevisiae* es de 1.5 a 2 horas. Así pues, una célula puede formar 43 yemas.

Como hemos comentado, las levaduras se incluyen dentro de los Eucariotas y por tanto presentan las características de la división meiótica: fusión de los dos núcleos haploides, formación de un núcleo diploide, reducción cromosómica, formación de núcleos haploides. La persistencia de la membrana nuclear durante la división conduce a una estructura en 4 lóbulos alrededor de los cuales se forma una pared que entraña la rotura de la membrana celular y la individualización de las esporas.

En el caso de muchas levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, las esporas solamente se liberan tras la germinación. Ésta origina la rotura mecánica de la célula que contiene el asca. En otros casos se produce la autólisis de la pared del asca.

Por lo que respecta a las condiciones en las que las levaduras realizan la esporulación, existen ciertas levaduras esporógenas que son capaces de producir esporas en prácticamente cualquier medio, mientras que, por el contrario, otras necesitan condiciones de crecimiento o de esporulación muy concretas. Si no se dan estas condiciones, una levadura esporógena puede multiplicarse de forma indefinida por vía vegetativa.

Los factores que pueden influir sobre la esporulación son muy diversos:

- Heterotalismo: La esporulación solo tiene lugar si existe unión de tipos sexuales compatibles.
- Composición del medio: *Saccharomyces cerevisiae* requiere para llevar a cabo la esporulación una fuente de carbono no fermentable, un contenido mínimo de nitrógeno, y una buena aireación. Se recomienda la utilización del medio de Mc

Clary. El medio Gorodkova resulta muy adecuado para las especies del género *Debaryomyces* y el agar-extracto de levadura y de malta para las especies pertenecientes al género *Pichia* y *Hansenula*.

- Reducción de la concentración de oxígeno disuelto: permite estimular la formación de esporas en algunas especies de *Hanseniaspora*.
- La temperatura: puesto que la mayor parte de las especies de levadura esporógenas esporulan entre 18 y 25 °C, mientras que los valores de 12 a 15 °C son los favorables para *Metschnikowia*.

El tiempo que se necesita para que se produzca la esporulación de un cultivo varía mucho de unas especies a otras e incluso entre las cepas de una misma especie, por lo que es necesario hacer un seguimiento durante bastantes semanas.

III.B.5.- Nutrición y Metabolismo: Atendiendo a los factores nutricionales y metabólicos, se ha de destacar en primer lugar que, a diferencia de otros seres microscópicos, las necesidades nutritivas de las levaduras son mínimas. De hecho, muchas especies de levaduras son capaces de sintetizar una gran variedad de sustancias esenciales para el crecimiento, incluidos aminoácidos, carbohidratos y vitaminas. Dado que emplean muy ampliamente fuentes de nitrógeno simples, solamente requieren una concentración del mismo muy baja (en torno a 0.2 a 0.5 mg/L) para crecer. Podemos destacar además, que las levaduras son organismos xerófilos, es decir, son organismos capacitados para el crecimiento en condiciones de a_w es inferior a 0.85.

En relación con el metabolismo glucídico, lo primero que hemos de mencionar es que todas las levaduras son capaces de emplear la glucosa y la fructosa. Por otro lado, en cuanto a los di, tri o polisacáridos, no son fermentados mas que después de ser hidrolizados en el exterior o el interior de las células. La hidrólisis de la sacarosa para dar glucosa y fructosa es realizada por la invertasa extracelular mientras que la rafinosa es débilmente hidrolizada por esta misma enzima en fructosa y melobiosa. Esta última no es un sustrato que, concretamente, pueda ser utilizado por las cepas de *S. cerevisiae*. La glucosa y la fructosa penetran en el interior de la célula por difusión facilitada pero únicamente después de fosforiladas. La concentración intracelular de la invertasa es relativamente estable mientras que la actividad externa puede variar por un factor de 1000 en función de las condiciones del cultivo.

La maltosa puede desempeñar un papel muy importante en los fenómenos de osmotolerancia. El metabolismo de la maltosa necesita tres factores para la fermentación de la maltosa: maltosa-permeasa, α -glucosidasa y gen de regulación. Las dos enzimas son inducidas por la maltosa y sufren la represión catabólica por la glucosa.

Las levaduras pueden fermentar otros azúcares como la galactosa, trealosa y α -metil-glucósido, entre otros, según las especies.

Las hexosas intracelulares se integran en la ruta de la glicolisis después de la fosforilación por dos hexoquinasas y una glucoquinasa.

Como consecuencia del metabolismo de las levaduras en el mosto, el componente mayoritario producido es el etanol o alcohol etílico. Junto a éste, los vinos contienen un cierto número de otros mono y polialcoholes. Tales sustancias se encuentran originalmente en la uva o se forman en el vino durante la fermentación.

Estos otros alcoholes consecuencia de este metabolismo encontramos, en su mayor parte monoalcoholes, moléculas desde uno hasta doce átomos de carbono, la mayor parte alifática, pero también aromáticas. Son primarios y su concentración conjunta, aparte el etanol, no llega a un gramo por litro.

Los polialcoholes originados son un diol, un triol y tres hexalcoholes. La presencia de dos de ellos supera el gramo por litro; uno, la glicerina, es el componente más abundante en los vinos después del etanol.

A los monoalcoholes de más de dos átomos de carbono, se llama alcoholes superiores y, conjuntamente, aceite de fusel.

Todos estos monoalcoholes contenidos en los vinos son, sin excepción, líquidos incoloros. Su movilidad así como sus olores: el metanol es casi inodoro, el 1-propanol tiene un olor dulzón agradable, el n-butanol posee un olor duro y penetrante y el 2- fenil etanol exhala un aroma muy pegajoso parecido al de la rosa. Los polialcoholes son más viscosos y tienen poco o ningún olor, y los azúcares polialcoholes con 6 átomos de carbono son sólidos a la temperatura ambiente.

Como comentamos el etanol es el producto principal del proceso microbiano, correspondiente al metabolismo de las levaduras. Se produce a partir de las hexosas a partes iguales (glucosa y fructosa) presentes en el mosto (Figura nº 4).

De manera semejante a como el ácido pirúvico es el precursor del etanol, igual ocurre con todos los alcoholes superiores. Al cetoácido, se llega de manera más abundante por condensaciones diversas de derivados del ácido pirúvico y, en general,

metabolitos intermedios de la fermentación alcohólica; después de la condensación, puede haber reacciones diversas intramoleculares, descarboxilaciones y reacciones redox.

Al alfacetoácido, también se puede llegar desde un alfaaminoácido como consecuencia de una de las vías de asimilación del nitrógeno. Levaduras y bacterias necesitan imprescindiblemente aminoácidos en su nutrición. Hay alcoholes superiores de los que no se conoce más precursor que el aminoácido correspondiente, como fenilalanina, tirosina y triptófano; por el contrario, no se conocen aminoácidos en relación con algún otro alcohol, así el caso del 1-propanol. El isovaleraldehído puede proceder o no de leucina e isoleucina.

El etanol es el producto más relevante de la fermentación de los hidratos de carbono (hexosas), aunque también se produce en pequeñas cantidades, por descomposición del ácido L-málico mediante la levadura *Schizosaccharomyces sp.* Las pérdidas principales, aparte las causadas por evaporación, se deben a la acción de las bacterias aerobias y de las acéticas. A causa del embarrilamiento y otras manipulaciones, la pérdida de alcohol por evaporación es de 0.2 aproximadamente.

Se le da atención especial, además de por ser el componente más abundante de los vinos después del agua, por sus propiedades fisiológicas, por su intervención química y fisicoquímica en el medio respecto a los restantes componentes y por su acción microstática frente al desarrollo de microorganismos así como por su importancia económica (comercio a granel).

Un fenómeno de gran importancia, es que al aparecer el alcohol después de la fermentación, se modifican las características químicas y fisicoquímicas del medio:

- Precipitación del Bitartrato K y del Tartrato neutro de Ca, por disminución de la solubilidad.
- Facilita la vinificación en tinto por favorecer la extracción (disolución) de las materias colorantes de las materias sólidas de la vendimia.
- Todo vino es dispersión coloidal de algún componente y en el estado coloidal del vino, en los fenómenos evolutivos que terminan en enturbiamiento y sedimentación y en los tratamientos fisicoquímicos de clarificación mediante adición de productos coloidales, la presencia de alcohol (su graduación) incide. El disolvente y dispersante, ha pasado de ser agua, a una mezcla hidroalcohólica al 10-15 %.

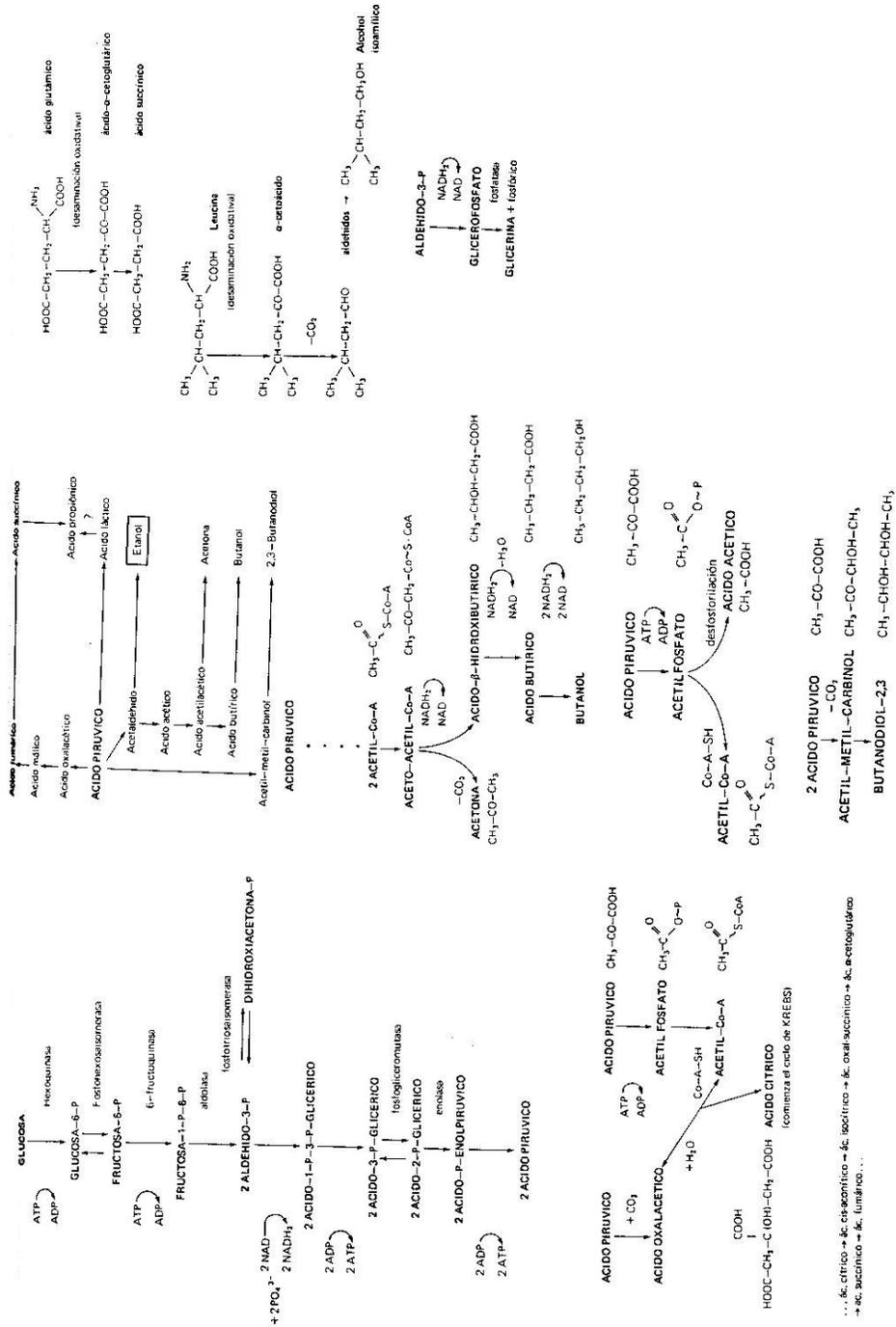


Figura 4: Esquema general de los procesos fermentativos (Usseglio- Tomasset, 1998)

El alcohol metílico, existe siempre en los vinos en dosis que varían de 36 a 350 mg/l. Se forma durante la fermentación pero sin relación alguna con ella, por hidrólisis de las pectinas (pectinas solubles y protopectinas) de la uva. Por el contrario, una fermentación alcohólica pura de la sacarosa, no deja ningún vestigio. La glicina, no es tampoco fuente de metanol, aunque teóricamente, sea posible.

Se sabe que la pectina pura está compuesta por una cadena de núcleos galacturónicos, llamadas "ácido péctico", esterificada por el alcohol metílico; la fermentación se acompaña siempre de una hidrólisis y de una insolubilización del ácido péctico. Las enzimas poligalacturonasas, polimetilgalacturonasas y la transeeliminasa parten las cadenas de pectinas.

La tasa de metanol, se da en función de la importancia de la maceración de las partes sólidas de la vendimia, los vinos tintos, tienen más que los rosados y éstos, más que los blancos.

Los monoalcoholes, presentan toxicidad que va en aumento al subir el número de átomos de carbono (así, el isoamílico es 18 veces más tóxico que el metanol).

La toxicidad del metanol se considera de forma especial debido al fraude de los llamados licores compuestos (por mezcla de sus componentes y no por destilación de mostos naturales fermentados). El metanol se oxida en el hígado por acción de una catalasa a metanal y posteriormente termina la oxidación en ácido fórmico. Esta terminación es altamente tóxica, pues el metanoico bloquea la vitamina B₁₂, afectando al nervio óptico y produciendo ceguera permanente antes de llegar a la dosis mortal. El metabolismo es más lento que el del etanol, las alteraciones, se notan pasadas las doce a veinticuatro horas, y consiste en dolores violentos de vientre, vómitos, borrachera tranquila sin alteraciones psíquicas. Después de 48 horas, queda en el organismo un 30 %. Legalmente, se limita la presencia de metanol en los vinos hasta 0.5 g/l.

Por lo que respecta al metabolismo nitrogenado y, como ya hemos comentado, las necesidades del mismo en el medio son mínimas para el desarrollo de las levaduras. Sin embargo, no todas las levaduras pueden emplear las fuentes de nitrógeno mineral. Por ejemplo, *Candida utilis* asimila los nitratos mientras que *Saccharomyces cerevisiae* es incapaz de hacerlo. Un hecho de sobra conocido es que las levaduras que utilizan los nitratos también utilizan los nitritos pero no al contrario. Entre las fuentes de nitrógeno orgánico, los aminoácidos podrán ser empleados fundamentalmente en función de las

capacidades de desaminación que presentan las levaduras. Por poner un ejemplo, los ácidos aspártico y glutámico y sus aminas constituyen una buena fuente de nitrógeno para el crecimiento levaduriforme. Un hecho destacable es que este crecimiento es mayor en presencia de aminoácidos o de sales de amonio que con péptidos.

En relación con las necesidades de aireación que presentan las levaduras se ha de comentar que la respiración u oxidación de los substratos carbonados tiene lugar a través de las rutas metabólicas oxidativas como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos o el ciclo de Krebs. Junto a la cadena respiratoria, constituyen la principal fuente de energía de las células en la generación de ATP. El oxígeno es necesario para la síntesis de ácidos grasos insaturados y esteroides. La fosforilación oxidativa cesa cuando la proporción de ácidos grasos en la membrana mitocondrial es inferior al 20 %.

Cuando en el medio de desarrollo de las levaduras se produce una deplección en la concentración de oxígeno, llegando a la ausencia de oxígeno, las levaduras han de emplear la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas para la oxidación de las hexosas. Las dos últimas etapas de este ciclo implican la descarboxilación del piruvato en acetaldehído y la reducción de este último en etanol. Esta vía representa el 95 % de la glicólisis en *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis*.

La vía de las hexosas monofosfato es importante porque genera la coenzima reducida que será empleada en la respiración aerobia para la síntesis de ATP. Dependiendo de las condiciones del cultivo esta vía puede llegar a representar del 6 al 30% de la glicólisis en el caso de *Saccharomyces cerevisiae* o del 30 al 50% en *Candida utilis*.

Es interesante destacar que las diferencias en la velocidad de consumo de glucosa que se observan en condiciones aerobias y anaerobias han llevado a considerar que la respiración aerobia de la glucosa inhibe la fermentación, fenómeno conocido desde hace mucho tiempo como *efecto Pasteur* (Delia-Dupuy y col., 1996). El proceso opuesto, es decir, fermentación de la glucosa en anaerobiosis más rápida que la respiración, que se puede observar en algunas levaduras se llama *efecto Custers*.

Cuando la concentración del medio en CO₂ llega a saturación, el crecimiento de las levaduras puede resultar parcialmente inhibido, por lo que resulta adecuada una buena aireación a fin de eliminar este.

En otro sentido, hemos de mencionar que desde hace ya algún tiempo se conoce la capacidad de producir SO₂ por parte de las levaduras, a partir de sulfato, azufre o

aminoácidos azufrados (Rankine y col., 1969). Se observó como ciertas cepas de levaduras eran capaces de producir mas de 130 $\mu\text{g/mL}$ de SO_2 en caldos de fermentación. La mayor o menor formación de SO_2 por las levaduras depende de numerosos factores tales como el pH, la tensión de oxígeno, la temperatura, la composición del medio y de la cepa que se esté considerando. Desde el punto de vista enológico, esta formación de SO_2 podría ser perjudicial para los caldos obtenidos, si bien es cierto, que las cantidades de SO_2 producidas por las levaduras no llegan a sobrepasar los límites establecidos en la legislación y que pueden llegar a estabilizar ciertos vinos blancos (Suzzi y col., 1985), siendo por tanto beneficiosas para estos.

En cuanto a la producción de etanol, como se ha expuesto anteriormente, el principal producto que se obtiene de la fermentación es el etanol. Este mismo producto, a ciertas concentraciones inhibe el crecimiento de las levaduras. Es por esto que se han descrito diferentes técnicas para determinar la tolerancia frente al etanol de distintas cepas de levaduras. En un primer momento, y para algunos autores la tolerancia al etanol sería la concentración de éste que inhibe el crecimiento después de 72 horas de incubación a 30 °C. Mas tarde se propuso emplear la medida del flujo de protones que entran o salen de la célula mientras que otros autores consideraron mas adecuado cuantificar la acidificación extracelular.

Como resulta lógico pensar, las levaduras que se emplean en destilería son mas tolerantes al etanol que las utilizadas en cervecería. El acumulo de etanol en el medio se traduce en un aumento en el contenido de esteroides y en ácidos grasos insaturados de las membranas. Por esto, se piensa que la membrana citoplasmática debería ser el punto clave de las interacciones entre levaduras y etanol, pudiendo inhibir éste algunos de los sistemas de transporte membranario.

Otro aspecto relacionado con las levaduras es la floculación, este es un importante fenómeno en cervecería, pero también afecta a las levaduras del vino y de destilería. Los agregados que se forman durante este proceso pueden contener cientos de células y entonces el fenómeno de transferencia de materia cobra gran importancia, por lo que las levaduras no deben flocular durante el proceso fermentativo. Los mecanismos que intervienen en el proceso de floculación resultan aún difíciles de explicar. Los componentes del mosto de cerveza serían estimulantes según algunos autores mientras que para otros serían inhibidores o incluso indiferentes. No solamente es éste el caso

para los azúcares y los aminoácidos, sino también para las sales, cuyo resultado depende de su naturaleza y de su concentración.

III.C.- Aplicaciones nutricionales de las levaduras

Las levaduras son objeto de un creciente interés en el campo de los alimentos por su aportación en el aspecto nutritivo y aromático (Dziezak, 1987). Las levaduras pueden emplearse en numerosos procesos industriales tales como la producción de bebidas alcohólicas y varios productos relacionados con el metabolismo de estas. La última clasificación comprendía enzimas, vitaminas, polisacáridos capsulares, carotenoides, alcoholes polihídricos, lípidos glucolípidos, ácido cítrico, etanol, dióxido de carbono y finalmente, compuestos sintetizados por introducción de DNA recombinante en las levaduras. Algunos de estos productos se obtienen con fines comerciales mientras que otros presentan un valor biotecnológico potencialmente interesante. La incorporación de estos microorganismos a la industria posee un interés creciente, por ejemplo, en 1984, las levaduras sintetizaban un 87% más de etanol que la síntesis química. En la Tabla 23 se muestra la utilización y posibilidades de utilización de algunas levaduras en alimentación, bebidas e industrias de fermentación. Ciertas enzimas de las levaduras han sido empleados ampliamente por la industria. Como ejemplo se puede citar la invertasa de *Kluyveromyces marxianus* (sin. *K. fragilis*, *Candida kefyr*, *C. pseudotropicalis*, *C. macedoniensis*), *Saccharomyces carlsbergensis* (= *S. pastorianus*) y *Saccharomyces cerevisiae* para la manufactura del jamón y en confitería; el enzima β -galactosidasa de *K. marxianus* o *K. lactis* para la producción de sirope para leche y α -galactosidasa de *S. pastorianus* para la cristalización del azúcar de remolacha.

Como se observa, las fermentaciones producidas por levaduras intervienen en la elaboración de alimentos como el pan, la cerveza, los diferentes tipos de vino, el vinagre, los diferentes tipos de quesos de maduración externa, cultivándose también para obtener enzimas y otros tipos de alimentos. En un extremo opuesto, las levaduras son perjudiciales cuando producen la alteración de los zumos de frutas, de los jarabes, de las melazas, de la miel, las carnes, vino, cerveza y otros muchos alimentos. En los procesos fermentativos que se basan en la utilización de las levaduras se utilizan principalmente tres especies: *Saccharomyces cerevisiae* (cervecería, vinificación, destilería y panificación)(también las levaduras del género *Dekkera* (forma imperfecta:

Brettanomyces) se utilizan en algunos países para la producción de cerveza rubia), *Candida utilis* y *Kluyveromyces fragilis* (Levadura-alimento). En la vinificación se emplean muchas otras especies. (ICMSF, 1983).

Tabla 23: Utilización presente y potencial de las levaduras.

| Aplicación | Levadura |
|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Fermentación de la cerveza | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| Pan | <i>S. cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces exigius</i> , “ <i>Saccharomyces rosei</i> ” |
| D-arabitol | <i>Candida diddensiae</i> |
| Emulsificante | <i>Candida lipolytica</i> |
| Fermentación de etanol | <i>S. cerevisiae</i> |
| Alimentación de peces y pollos | <i>Phaffia rhodozyma</i> |
| Fermentación de leche y lactosa | <i>Candida pseudotropicalis</i> , “ <i>Kluyveromyces fragilis</i> ”, <i>Kluyveromyces lactis</i> |
| Fermentación de cerveza Lager | “ <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> ” (= <i>S. Pastorianus</i>) |
| Manitol (humectante) | “ <i>Torulopsis mannitofaciens</i> ” |
| Shoyu, Miso | <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> |
| Fermentación del vino | <i>S. cerevisiae</i> |
| Xilitol (edulcorante) | “ <i>Torulopsis candida</i> ” |
| Fermentación de la D-Xilosa | <i>Candida shehatae</i> , <i>Pachysolen tannophilus</i> , <i>Pichia stripitis</i> , <i>Pichia segobiensis</i> |

III.D.- Condiciones Generales Para El Cultivo De Levaduras

Los medios de cultivo que hemos de emplear para que el desarrollo de las levaduras sea eficiente son muy similares a los de los hongos y diferentes de los medios bacteriológicos en ciertos aspectos, debido a las diferentes necesidades del crecimiento. Por citar algunos ejemplos, el pH óptimo de la mayoría de las levaduras es mucho más bajo que el de las bacterias en general. Asimismo, las levaduras poseen mayor facilidad para crecer en medios de cultivo con sales inorgánicas mediante la adición de carbohidratos como fuente de energía.

Puesto que la mayoría de las levaduras son mesófilas, los medios selectivos o de enriquecimiento empleados se suelen incubar a temperaturas que oscilan entre los 20 y los 28 °C. Para el aislamiento de especies psicrófilas se requieren temperaturas algo más bajas (15 °C) mientras que para el caso de levaduras asociadas a fuentes de sangre caliente, se requieren temperaturas más altas (30–37 °C). Según establecen Van der Walt y Yarrow (1984), los métodos para el aislamiento de levaduras serían los siguientes:

- Aislamiento basado en el empleo de medios ácidos (pH 3.5–5.0).
- Aislamiento basado en el uso de medios con elevada concentración de azúcares.
- Aislamiento por uso de antibióticos y otros compuestos inhibidores.
- Aislamiento mediante técnicas de filtración por membrana.
- Purificación y mantenimiento de cultivos celulares.

Por lo que respecta al aislamiento basado en el empleo de medios ácidos (pH 3.5–5.0), para acidificar el medio se prefiere de forma general el empleo de ácido clorhídrico, o fosfórico. El empleo de ácidos orgánicos tales como el ácido acético, no suele ser recomendable para aislamiento puesto que a pH 3.5–4.0 estos ácidos solamente se encuentran parcialmente disociados, y las altas concentraciones de ácido sin disociar poseen un efecto inhibitorio sobre la mayor parte de las levaduras. Se emplea un medio sólido para aislamiento directo: cuando las levaduras están presentes en alto número, deben ser aisladas por siembra directa del material problema o con suspensiones del material, normalmente sobre agar YM (agar-extracto de levadura y extracto de malta), sobre agar extracto de malta o sobre agar YPD. Como el agar sufre hidrólisis cuando se esteriliza en autoclave a pH 3.5–4.0, es necesario añadirle un volumen predeterminado de HCl 1N tras la esterilización, cuando el medio se ha mantenido a 45 °C. Después de realizar una rápida mezcla, el medio se vierte en las placas Petri.

Por su parte, Mossel (1985) el medio que recomienda debe emplearse para el recuento de mohos y levaduras es el agar-extracto de levadura-glucosa-oxitettraciclinagenticina. En el caso de las levaduras osmófilas, el medio de elección para este autor sería el agar extracto de levadura 60% de fructosa en peso, con una $a_w = 0.83$. Este medio debe ser incubado durante alrededor de dos semanas a unos 25 °C, por lo que tiene que ser protegido de la deshidratación colocando las placas de Petri en cajas de metal que puedan cerrarse adecuadamente.

Por su parte, Berenger (1992) recomienda para el recuento de hongos y levaduras en alimentos, la siembra en masa en agar-extracto de levadura-glucosa-oxitetraciclina (OGYE).

Como vemos, existen muchos medios que pueden utilizarse tanto para el cultivo de mohos como para el de las levaduras. Entre los más frecuentemente empleados podemos destacar los siguientes:

- **Agar extracto de malta**, para el aislamiento, recuento y cultivo de mohos y levaduras. El pH puede ser de 5.4 ó de 3.5, según la finalidad del medio.
- El **agar Czapek-Dox** y el **agar patata glucosa** son medios de uso general para el cultivo de mohos y levaduras.
- **Agar levadura sal de Davis**, para el recuento de mohos y levaduras. El **agar extracto de levadura amortiguado** es una versión más sencilla de este medio, que puede adquirirse de forma deshidratada.
- En los recuentos de levaduras realizados investigación clínica, se emplea el **agar Sabouraud**.
- **Agar YM** (Wickerham, 1951), contiene extracto de levadura, extracto de malta, peptona, dextrosa y agua. Es un medio de cultivo que se recomienda en general para trabajo con levaduras. EL pH aproximado es de 5.3.
- **Agar YPD** (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%, agar 2%).
- **Agar MYPD** (extracto de levadura 0.3%, peptona 0.5%, glucosa 1%, extracto de malta 0.3%, agar 2%), medio recomendado para la conservación de cepas.

Como hemos comentado, el pH de estos medios puede rebajarse hasta 3.5 para inhibir el crecimiento bacteriano. Como otra posibilidad, aparte de la acidificación, los medios pueden hacerse selectivos frente a las bacterias si, justamente antes de llenar las placas, se les añaden soluciones estériles de penicilina y estreptomycin hasta alcanzar unas concentraciones finales de 20 y 40 unidades por mL respectivamente. (Harrigan y col., 1979).

III.E.- TÉCNICAS DE AISLAMIENTO

III.E.1.- Generalidades

De sobra es conocido que la fermentación alcohólica es un proceso del que son responsables las levaduras provenientes de la flora epifítica de la uva, o bien puede ser

llevado a cabo mediante la inoculación de <starters> de levaduras seleccionadas (Cuinier, 1991; Delteil, 1992). En la actualidad existe una tendencia a realizar fermentaciones controladas, empleando levaduras seleccionadas para mejorar la calidad de los vinos y evitar, de esta forma, variaciones debidas al crecimiento de microorganismos silvestres no deseables (Delfini y Bardi, 1990; Giudizi y Zambonelli, 1992; Melero, 1992; Suárez, 1990). Para este fin, a pesar de la existencia de levaduras seleccionadas comerciales, es preferible el empleo de levaduras autóctonas seleccionadas. (Suárez e Iñigo, 1990; Melero, 1992). A modo de ejemplo citaremos a Regodón Mateos y col. (1996) que, seleccionando 12 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* procedentes de mostos y vinos extremeños y, tras realizar vinificaciones experimentales con las mismas y realizar análisis de los vinos concluyen que la mayoría de las cepas seleccionadas produjeron vinos mas apreciados que los realizados mediante levaduras comerciales estudiadas.

Mediante el prensado de la uva para la obtención del mosto, las levaduras van a pasar al mismo iniciándose de esta forma el proceso transformador de mosto en vino. Este es un proceso dinámico, de forma que, al comienzo de la fermentación van a ser numerosas las diferentes especies de levaduras presentes en el mosto, para, a lo largo del proceso ir disminuyendo el número de las mismas hasta llegar, en la fase postfermentativa a predominar una/s especie/s. La evolución que se produce en la flora blastomicética es debida a cambios en el medio de desarrollo (Ruiz y col., 1986). Los aislamientos que se realizan para llevar a cabo la identificación de la flora levaduriforme de un mosto determinado se han de efectuar en tres momentos muy bien definidos del proceso fermentativo:

En la **primera fase** el elevado número de especies presentes en el medio van a desarrollarse de forma activa al tiempo que mediante este desarrollo inician la fermentación. El primero de los aislamientos mencionados, se ha de efectuar durante este **Periodo de Inducción o Fase I**, cuando el desprendimiento de anhídrido carbónico no es perceptible. En este momento, las condiciones del medio prácticamente no se modifican para una serie de parámetros tales como el pH y los nutrientes. Sin embargo, y de una forma muy rápida, la concentración de oxígeno en el mosto disminuye a causa del consumo celular.

El medio anaerobio inhibe el crecimiento de las especies oxidativas, favoreciéndose por el contrario el de las especies de menor poder fermentativo. Dentro

de estas no es raro obtener aislamientos de *Kloeckera apiculata*, *Torulopsis stellata* y *K. veronae*. Como especie de alto poder fermentativo más representativa que se aísla de forma habitual también en esta fase cabe destacar a *Sacch. cerevisiae*.

Un **segundo análisis** del mosto, del contenido levaduriforme de éste, se ha de realizar cuando se encuentra en **Fermentación Tumultuosa (Fase II)** y el desprendimiento de CO₂ es máximo. En este momento la temperatura del mosto crece de forma considerable, y la velocidad fermentativa es máxima.

En esta fase no se suele encontrar un predominio claro entre las especies de alto y bajo poder fermentativo. Sin embargo, ya a este nivel si se origina una importante disminución de la diversidad de especies que permanecen viables en el mosto. Generalmente, aparecen en este momento especies de poder fermentativo intermedio del tipo *Sacch. rosei*, *Sacch. uvarum* y *K. veronae*. De idéntica forma que en la primera fase, la especie de alto poder fermentativo predominante es *Sacch. cerevisiae*. El desarrollo del proceso fermentativo hace que la concentración de alcohol vaya incrementándose. Este aumento del grado alcohólico origina una disminución de la multiplicación celular y suprime las levaduras poco tolerantes al mismo (Sánchez Infante y col., 1985).

Finalmente un **tercer aislamiento** se ha de realizar en la fase post fermentación tumultuosa que se corresponde con el descenso en la intensidad fermentativa (**Fermentación lenta o Fase III**). La fermentación se hace lenta, y una patente disminución en el desprendimiento de CO₂ nos indica el inicio de esta tercera fase. En este momento, la concentración de etanol suele ser muy elevada, los nutrientes escasos y el pH bastante bajo.

En estas condiciones el número de especies que son capaces de sobrevivir en el mosto-vino es mínimo, no resultando extraño que las especies aisladas en esta fase se reduzcan a una sola especie predominante, generalmente *Saccharomyces cerevisiae*, quien finalmente es la responsable de terminar la fermentación.

Por último, hemos de mencionar que, en el caso de que los mostos presenten velos blastomicéticos superficiales, después de terminada la fermentación alcohólica, se ha de realizar un **cuarto análisis** de la flora levaduriforme presente en los mismos.

III.E.2.- Identificación Taxonómica De Las Levaduras Aisladas

Como sucede en la mayor parte de los campos de la ciencia, los conocimientos se van modificando con el paso de los años. Esto hace que, los criterios taxonómicos empleados para la clasificación de las levaduras hayan variado de forma considerable desde sus inicios hasta la actualidad. Así, existen especies de levadura cuya nomenclatura ha cambiado hasta tres o cuatro veces en los últimos cincuenta años, han sido incluidas/excluidas en diferentes géneros, han surgido y desaparecido géneros y especies, etc. Asimismo estas modificaciones dificultan enormemente la investigación ya que es preciso renovar constantemente los conocimientos. Actualmente es aceptado por la mayor parte de los especialistas en levaduras, y así lo hacen constar en sus publicaciones, que los criterios taxonómicos empleados por la Escuela Holandesa, son los más completos. La clasificación vigente es la de Krutzman y col. (1998), aunque es preciso tener en cuenta los criterios taxonómicos de autores tales como Lodder (1970), Barnett y Pankhurst (1974), Barnett y col. (1983), Kreger van Rij (1984).

La extremada simplicidad de estos microorganismos a nivel estructural y anatómico hace que la clasificación en base a estas características resulte imposible. Este hecho a forzado a los taxónomos a buscar otros tipos de propiedades (bioquímicas, fisiológicas, ecológicas, genéticas) para añadir a los datos estructurales (Stanier, 1991). En un principio las claves identificativas prestaban especial atención a la identificación de las levaduras realizada en base a las características morfológicas y de cultivo, a la producción de artrosporas y balistosporas.

Como hemos comentado, a medida que avanzó la investigación y el número de especies conocidas, las propiedades enzimáticas y bioquímicas cobraron un mayor valor taxonómico (Martins y col., 1990).

Las pruebas que habían que realizarse hasta la completa identificación de especies en 1970 eran 78 (11 pruebas fermentativas, 54 de asimilación y las restantes de aspecto y reproducción). En la última revisión (1998), el número de pruebas que se realizan son 75 (7 fermentativas y el resto englobadas en asimilación y otras características, con grandes diferencias respecto a las realizadas en 1970).

Para poder eliminar, en cierta medida, el tedioso trabajo que supone la realización de estas pruebas, ha surgido en los últimos años toda una serie de métodos de identificación rápida de microorganismos basadas en metodologías empleadas en bacteriología; éstas fueron propuestas para la identificación de especies de levaduras

patógenas y su exactitud respecto a los métodos propuestos por Lodder ha sido ampliamente probada. Estos métodos han sido evaluados por diferentes autores como así reflejan en sus publicaciones, obteniendo resultados satisfactorios (Couto y col., 1996; Van der Kuhle y col., 1998; Deak y col., 1998; Torok y col., 1991; Rohm y col., 1990). Concretamente en el campo enológico su empleo ha sido realizado, entre otros, por Cuinier y Leveau (1979) y Lafon-Lafourcade y Jeyeux (1979) que han empleado el método conocido como API 20 C, que se basa en fermentación y asimilación de carbohidratos. Sin embargo, como factor negativo hemos de comentar que presentan pequeñas discrepancias respecto a los métodos convencionales. Esto hace que, a pesar de obtener resultados bastante satisfactorios, la mayoría de los autores recomiende el uso de estos métodos para obtener una información previa sobre las posibles cepas identificadas, empleándose posteriormente algunas pruebas convencionales discriminatorias. Dentro de estos métodos se encuentran los denominados Sistemas de identificación API. Dentro de este trabajo, además de las mencionadas pruebas “tradicionales” realizadas, se emplearon una serie de métodos API, consistentes en micrométodos para la determinación de actividades enzimáticas.

Estos métodos presentan las siguientes ventajas frente a los tradicionales:

- Posibilidad de determinación de numerosas actividades en periodos de tiempo muy breves.
- Fácil realización de los mismos, fácil manejo y limpieza del material.
- Requerimientos mínimos de materiales y aparataje.
- Reproducibilidad elevada.

El empleo de estos sistemas de identificación de enzimas en especies de levaduras se ha llevado a cabo más recientemente por autores tales como Bravo Abad y col., (1985); Deak y col., (1998); Rohm y col., (1990); Torok y col., (1991); Couto y col., (1996); Van der Aa Kuhle y col., (1998).

En 1985, Bravo Abad y col., plantean como existe una gran cantidad de especies de levaduras, que a pesar de presentar un escaso o incluso nulo poder fermentativo, se encuentran en elevada frecuencia relativa a lo largo del curso fermentativo. Por otro lado, del análisis microbiológico de la flora blastomicética de la fruta o terrenos se obtiene la misma conclusión. Finalmente, los estudios realizados sobre cinéticas de crecimiento de levadura y actividad proteásica demuestran como esta actividad es muy elevada en especies de levadura con bajo y medio poder fermentativo en tanto que no se

pudo detectar en las especies de alto poder fermentativo. Aplican en su estudio estos autores los sistemas Rapid ID 32 A y API ZYM a 22 especies de levaduras aisladas de las diferentes fases del proceso fermentativo pertenecientes a la colección de cultivos puros de levaduras del Instituto de Fermentaciones Industriales. Las especies que estudian se muestran en la Tabla 24.

Estos autores afirman que estas pruebas suministran una información previa sobre la actividad enzimática de los microorganismos ensayados, al facilitar datos aprovechables con fines taxonómicos e información sobre la actividad en el sustrato estudiado. Se ponen en evidencia unas actividades enzimáticas diferenciales entre especies de bajo o nulo poder fermentativo y especies de medio y alto poder fermentativo.

A continuación se detallan cada uno de estos métodos empleados en nuestro estudio:

Se empleó el sistema **API ZYM** (Ref. 25200 BioMérieux). Éste es en un micrométodo semicuantitativo para la investigación de actividades enzimáticas aplicable a todos los medios: tejidos, células, fluidos biológicos, microorganismos, etc. Mediante este sistema se pueden determinar rápida y simultáneamente diecinueve actividades enzimáticas a partir de cantidades muy pequeñas de muestra. Se presenta como una galería de veinte microcubetas cuyo fondo está constituido por un soporte especialmente preparado para contener el sustrato enzimático tamponado. Este soporte está destinado a favorecer el contacto entre el enzima y el sustrato, generalmente insoluble. Este sistema no presenta la precisión de las determinaciones espectrofotométricas para cada enzima sino que se destina para detectar la existencia de actividad enzimática de un extracto complejo no purificado. Este método no puede sustituir tampoco las técnicas de separación electroforéticas sino que, puede orientar a estas dando en un principio y en estado bruto el espectro de actividades enzimáticas de la muestra objeto de estudio.

La galería API ZYM está compuesta por veinte cúpulas especialmente adaptadas al estudio de actividades enzimáticas. Poseen en su parte inferior una trama inerte fibrosa donde se encuentran los sustratos sintéticos. Este soporte favorece las reacciones enzimáticas incluso si los sustratos son insolubles.

Tabla 24: Especies de levaduras investigadas por Bravo Abad y col. Mediante el sistema API ZYM y API ID32C.

| Nº | Especie de levadura | Poder fermentativo ¹ | Frecuencia en mosto |
|----|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| 1 | <i>Candida mycoderma</i> | 0.0-0.3 | 3.4 |
| 2 | <i>Criptococcus laurentii</i> | 0.0 | 0.2 |
| 3 | <i>Debaryomyces hansenii</i> | 0.0 | 2.0 |
| 4 | <i>Pichia membranaefaciens</i> | 0.0-2.5 | 0.6-3.0 |
| 5 | <i>Rhodotorula glutinis</i> | 0.0 | 0.5 |
| 6 | <i>Candida pulcherrima</i> | 0.5-2.0 | 2.0 |
| 7 | <i>Candida guilliermondii</i> | 0.2-2.0 | 1.5 |
| 8 | <i>Hansenula subpelliculosa</i> | 2.0-4.0 | 1.0 |
| 9 | <i>Kloeckera apiculata</i> | 1.2-3.0 | 50 |
| 10 | <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> | 2.5-3.5 | 18 |
| 11 | <i>Torulopsis bacillaris</i> | 8-10 | 16 |
| 12 | <i>Torulaspota rosei</i> | 6-10 | 50 |
| 13 | <i>Zygosaccharomyces veronae</i> | 7-10 | 25 |
| 14 | <i>Hansenula anomala</i> | 5-7 | 0.6 |
| 15 | <i>Zygosaccharomyces acidifaciens</i> | 7-8 | 0.7 |
| 16 | <i>Saccharomyces ellipsoideus</i> | 8-19 | 100 |
| 17 | <i>Saccharomyces ludwigii</i> | 8-14 | 1.8 |
| 18 | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> | 13-15 | 1.5 |
| 19 | <i>Saccharomyces rouxii</i> | 10-18 | 20 |
| 20 | <i>Saccharomyces beticus</i> | 13-18 | 10 |
| 21 | <i>Saccharomyces cheresiensis</i> | 13-18 | 25 |
| 22 | <i>Saccharomyces montuliensis</i> | 12-16 | 1 |

¹ El Poder fermentativo viene expresado en %V/V etanol.

Los enzimas investigados por el API ZYM son: Fosfatasa alcalina, Esterasa (C 4), Esterasa lipasa (C 8), Lipasa (C 14), Leucina arilamilasa, Valina arilamilasa, Cistina arilamilasa, Tripsina, α -qimotripsina, Fosfatasa ácida, Naftol-AS-BI-Fosfohidrolasa, α -galactosidasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, N-Acetil- β -glucosaminidasa, α -manosidasa y α -fucosidasa.

Se empleó también el Sistema de **API Rapid ID32A** (Ref. 32300 BioMérieux). Éste está concebido para la determinación de bacterias anaerobias empleando test enzimáticos miniaturizados y estandarizados así como una base de datos específica.

La utilización de este método, que en un principio se encuentra diseñado para bacterias anaerobias, para la determinación de actividades enzimáticas en levaduras se debe a su empleo por otros autores y a que proporciona información importante a cerca de la capacidad metabólica de estas.

Por lo que respecta a la composición de la galería Rapid ID32 A, posee 32 cúpulas de las que 29 se utilizan como cúpulas test que contienen el medio deshidratado. Después de cuatro horas de incubación en anaerobiosis a la temperatura de crecimiento óptimo de las levaduras ensayadas (20-28 °C) la lectura de los resultados se realiza de forma visual.

Las pruebas enzimáticas que pueden ser realizadas mediante este sistema son las siguientes: Ureasa, Arginina dihidrolasa, α -Galactosidasa, β -Galactosidasa, β -Galactosidasa 6 fosfato, α -Glucosidasa, β -Glucosidasa, α -Arabinosidasa, β -Glucuronidasa, β -N-Acetil-Glucosaminidasa, Fermentación de manosa, Fermentación de rafinosa, Ac. Glutámico Descarboxilasa, α -Fucosidasa, Reducción de Nitratos, Producción de Indol, Fosfatasa alcalina, Arginina arilamidasa, Prolina arilamidasa, Leucil glicina arilamidasa, Fenilalanina arilamidasa, Leucina arilamidasa, Ácido Prioglutámico arilamidasa, Tirosina arilamidasa, Alanina arilamidasa, Glicina arilamidasa, Histidina arilamidasa, Glutamil Ac. Glutámico arilamidasa y Serina arilamidasa

Una vez realizada la investigación de las actividades de las diferentes especies de levaduras aisladas, los resultados que a través de este sistema obtengamos, serán contrastados con los obtenidos por otros autores y serán guardados a fin de ir creando una base de datos que nos permita en cualquier momento realizar una primera aproximación a cualquier cepa desconocida.

Finalmente, se empleó así mismo el sistema de identificación de levaduras **API ID32 C** (Ref. 32200 de BioMérieux). Este es un sistema de identificación de levaduras compuesto por test de asimilación estandarizados y miniaturizados, así como una base de datos especialmente adaptada.

El número de especies de levadura que puede ser identificado mediante este sistema es de 63, en su mayoría pertenecen al género *Candida*, aunque también se pueden identificar especies de los géneros *Cryptococcus*, *Kloeckera*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Saccharomyces* así como *Geotrichum spp*, *Sporobolomyces spp* y *Zygosaccharomyces spp*. Este sistema ha sido empleado, por ejemplo, por Lorenzo Gómez y col. (1992) para la determinación de las levaduras autóctonas presentes en vinos blancos afrutados de Andalucía Occidental.

La galería ID 32 C esta constituida por 32 cúpulas cada una de las cuales posee un sustrato carbonado en forma deshidratada. La levadura que pretendemos testar se ha de poner en suspensión en un medio sintético semisólido. Después de 24-48 horas de incubación, el crecimiento en cada cúpula puede ser leído de manera visual. La identificación puede ser llevada a cabo mediante el ID 32 C Index o bien mediante los programas de identificación correspondientes.

Los sustratos que son testados mediante este sistema son los siguientes: Sorbitol, D-Xilosa, Ribosa, Glicerol, Ramnosa, Palatinosa, Eritritol, Melobiosa, Glucuronato, Melezitosa, Gluconato, Levulinato, Glucosa, Sorbosa, Glucosamina, Galactosa, Actidiona (= Cicloheximida), Sacarosa, N-Acetil-Glucosamina, DL-Lactato, L-Arabinosa, Celobiosa, Rafinosa, Maltosa, Trealosa, 2-Ceto-Gluconato, α -Metil-D-Glucosido, Manitol, Lactosa, Inositol

Como se puede observar, las reacciones que se llevan a cabo son similares a aquellas realizadas al seguir la técnica “tradicional” de determinación de levaduras pero mucho más escuetas. Por ello, este sistema no permite determinar todas las especies presentes en los mostos pero si posibilita una primera aproximación a las mismas.

En este trabajo se ha empleado como base el sistema de clasificación propuesto por Kurtzman y col. (1998) que representa la nueva revisión de los sistemas de clasificación de levaduras propuestos en su día por Lodder y col. (1958), Lodder (1970) Barnett y col. (1979) y Barnett y col. (1983) Kreger van Rij (1984).

III.E.3.- Otras Técnicas Modernas de Identificación

Una vez realizados los métodos de identificación clásicos así como los sistemas API, se llega a la identificación de cada uno de los aislamientos. Para verificar o contrastar los resultados consideramos adecuado la realización de alguno de los métodos que en la actualidad y, en un futuro marcaran la pauta en los estudios de identificación y clasificación de las especies de levaduras y en concreto aquellos que están presentes en los mostos y uvas.

Estos métodos se basan en la identificación de las levaduras atendiendo a sus características genéticas (Hidalgo y col., 1998; Alonso y col., 1994; Versavaud y col., 1993), a su contenido en ácidos grasos de cadena larga (Loureiro y col., 1998), sus ácidos grasos libres (Rozés y col., 1991), etc. Son numerosas las técnicas que se han desarrollado en este sentido intentando todas ellas una mayor seguridad en las determinaciones así como una mayor rapidez al realizar las mismas. El método empleado para verificación en este estudio ha sido descrito por numerosos autores como válido para tipaje de levaduras. A continuación se describe muy brevemente el mismo:

Se utiliza una técnica molecular consistente en amplificar regiones concretas del DNA ribosomal, empleando para ello una técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Estos fragmentos así amplificados son digeridos mediante las siguientes endonucleasas de restricción: *Hinf I*, *Hae III* y *Cfo I*. A través del análisis comparativo de éstos con los patrones de restricción de cepas tipo de especies conocidas, es posible determinar el género y especie de levadura problema. Mediante esta técnica se ha podido determinar como, los productos de PCR y los pesos de los fragmentos de restricción de cepas de la misma especie obtenidos mediante las endonucleasas citadas, corresponden a pesos moleculares prácticamente idénticos. De ahí la utilización de esta técnica para la identificación de levaduras. Entre otros, Alonso Hernández y col., (1994) afirman que el análisis de patrones de restricción del DNA mitocondrial resulta interesante para poder evaluar el interés enológico de las levaduras autóctonas de cara a una selección de las mismas.

OBJETIVOS

Objetivos

El presente trabajo de investigación se encuadra dentro de un amplio estudio que sobre caracterización de vinos lleva a cabo el Departamento de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Granada. Hemos de destacar que en este estudio se han aislado e identificado las levaduras autóctonas presentes tanto en uvas como en mostos de una comarca cuyos caldos llevan la Denominación de Vinos de la Tierra.

Los objetivos que nos marcamos al inicio de esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

- 1.- Caracterizar y tipificar los vinos producidos en la zona vitivinícola denominada Valle de Laujar de Almería.
- 2.- Establecer criterios que permitan un control de calidad lo más exhaustivo posible de dichos caldos.
- 3.- Contribuir al desarrollo económico de la zona objeto de estudio mediante la aplicación de nuevas tecnologías agroalimentarias.
- 4.- Estudio de las aptitudes de vinificación de nuevas variedades de viníferas introducidas en la zona.
- 5.- Determinar la posible relación que pueda existir entre las cepas identificadas y diferentes índices de calidad del vino.

6.- Puesta a punto y aplicación de técnicas de aislamiento e identificación de levaduras, así como de técnicas analíticas (HPLC, CG, etc.) aplicadas al control de calidad de los vinos producidos.

7.- Aislamiento y tipificación de la flora levaduriforme autóctona presente tanto en uvas como en mostos en las tres etapas de fermentación.

8.- Determinar la posible relación que pueda existir entre las diferentes especies de levaduras identificadas a lo largo de éste estudio y diferentes índices de calidad del vino.

Parte Experimental

I.- PLAN DE TRABAJO

Según los antecedentes bibliográficos consultados y siguiendo los criterios de importancia, eficacia y técnicas analíticas desarrollados en la Introducción; en el presente capítulo, se han considerado:

Los estudios encaminados a la determinación de los parámetros que permitan una adecuada caracterización de las uvas, mostos y vinos producidos en la zona y, a la vez, poner de manifiesto la influencia que ciertos factores como el clima y/o tecnología tienen en dicha composición y su influencia en la calidad de los mismos.

De las cuatro principales variables estudiadas en bibliografía: variedad de uva, zona geográfica de cultivo, año de vendimia y bodega elaboradora. En este estudio, se consideran la primera y tercera variable, al ser las otras dos constantes.

Vendimias: Se recogieron muestras durante tres campañas vinícolas consecutivas: 1996-97, 1997-98 y 1998-99.

Muestras:

A. Uvas y Mostos

Las muestras fueron recogidas en la Cooperativa Valle de Laujar, de las uvas para vinificación y fueron seleccionadas al azar durante los días de vendimia de entre las partidas que llegaban siguiendo el sistema general de seleccionar la raíz cuadrada de las cajas a estudiar (FAO, 1989; Amerine y col., 1976) y recogiendo una muestra similar de cada una de ellas.

Para el estudio de las variedades experimentales, el muestreo, fue a partir de los cultivos existentes en el Campo Experimental con que cuenta la Cooperativa Valle de Laujar.

Las muestras de uva, fueron estrujadas en su totalidad con una lona (tela de saco) y apretando fuertemente (Amerine y col., 1976), siendo posteriormente congeladas. Para su análisis, se descongelaban y tras alcanzar la temperatura ambiente, se centrifugaba y se analizaban inmediatamente.

Las muestras de mostos, fueron obtenidas siguiendo las técnicas normales de vinificación de la zona (despalillado, estrujado, sulfitación, etc.).

Se tomaron muestras de:

A.1 Variedades autóctonas de la zona: Jaén Blanco, Bobal, Tempranillo.

A.2. Variedades en fase de experimentación en la zona: Macabeo, Viura, Monastrell, Cavernet Sauvignon, Jaén Tinto, Syrah; Garnacha, Prieto Picuda, Colombard, Sauvignon Blanc, Vermentino.

Dichas muestras de uva se recogieron para las variedades autóctonas según criterios de homogeneidad de los lotes enviados por los socios a la Cooperativa (sistema general de selección de la raíz cuadrada de las cajas a estudiar (FAO, 1989; Amerine y col., 1976)), y para el estudio de las variedades experimentales, a partir de los cultivos existentes en el Campo Experimental con que cuenta la Cooperativa Valle de Laujar.

B. Vinos

Las muestras, cuando no estaban embotelladas, fueron recogidas en la bodega a partir de recipientes o toneles pequeños y por lo tanto homogéneos. En los casos en que hubo que introducir el recipiente de muestreo, se realizó con lastre para evitar la recogida de la parte superior.

Se tomaron muestras de: Bobal, Rosado, Jaén Blanco, Tempranillo, Macabeo, mezcla de variedades blancas y tintas.

Validación Estadística de los Métodos

Los Métodos Analíticos, han sido evaluados mediante un tratamiento estadístico básico según Stiel, R.G., 1982; American Chemical Society's Committee on Environmental Improvement (ACS, 1990); Martín, 1989; Miller, 1988; Cuadros, 1995 y Pomeranz, 1994.

II.- TÉCNICAS ANALÍTICAS

II.A.- Parámetros Físico-Químicos

1. Calibrado

Para el calibrado de las uvas, al no existir una norma específica en nuestra Legislación, en este trabajo se determinaron el peso, longitud y grosor de las mismas.

Material: Balanza analítica electrónica (Mettler AE200). Pié de rey.

Técnica: Para determinación del peso se tomaron 20 frutos representativos de cada racimo, pesándose por separado y realizando la media entre los pesos obtenidos.

Para la determinación del grosor y la longitud se seleccionaron 20 frutos representativos por racimo realizando posteriormente las medias de los resultados obtenidos.

2. pH

Referencia: Reglamento 2676 UE (1990).

Material: pH METER Type PHM 26 (Radiometer Copenhagen). Electrodo combinado de vidrio CRISON.

Técnica: Para el análisis, se introduce un electrodo en la muestra y se lee directamente el valor de pH a una temperatura de 20 °C.

3. Grado Brix

Referencia: Reglamento 2676 UE (1990).

Material: Refractómetro de Abbe, con circulación de agua y termómetro incorporado.

Técnica: Medida refractométrica del mosto centrifugado y filtrado.

4. Acidez Total

Referencia: Modificación del Método Oficial Español (BOE 1977), de la AOAC (1990) y de la UE (1990), consistente en la determinación a pH=8.2 a diferencia de los métodos oficiales que indican a pH=7.0, dado que de esta manera se incluyen los ácidos débiles (acético, etc.).

5. Acidez Volátil

Referencia: UE (1990) y de la AOAC (1990).

Método A.

Material: Aparato de destilación en corriente de vapor de agua "Cazanave-Farré" que consta de matraz generador de vapor, borbotador introducido dentro del generador de vapor y refrigerante.

Reactivos: Acido tartárico cristalizado. Solución de NaOH 0,1N de factor conocido. Fenolftaleina. Acido clorhídrico. Solución de Iodo 0,01N. Engrudo de almidón 5 g/l. Solución saturada de borato sódico.

Validación: Hemos obtenido los siguientes resultados estadísticos tras la realización de la prueba diez veces con un mismo vino de los analizados y en las mismas condiciones:

| S | E.R. (%) | D.E.R. |
|----------|-----------------|---------------|
| 0,039 | 4,3 | 6,1 |

La precisión del método se realizó por el método de las Recuperaciones:

| CONC. INIC. | CONC. AÑADIDA | CONC. OBTEN. | % RECUP. |
|--------------------|----------------------|---------------------|-----------------|
| 0,64 g/l | 1,05 g/l | 1,62 g/l | 97,0 % |
| 0,64 g/l | 2,10 g/l | 2,66 g/l | 96,4 % |

Método B.

Material: Equipo destilador para determinaciones enológicas ALCODEST 4000637 SELECTA.

Validación: Normas UNE 50081-1; 50082-1; 61010-1.

6. Acidez Fija

Referencia: Técnica Oficial Española, (BOE 1977).

7. Masa Volumétrica Y Densidad Relativa

Referencia: Método picnométrico. Método Oficial Español (BOE 1977) y Reglamento 2676/90 de la UE.

Material: Kitasato. Equipo de vacío. Baño Termostático "Fuera Borda" SELECTA. Termómetro graduado. Balanza Monoplate METTLER AE200. Picnómetro POBEL.

8. Nitrógeno Total

Referencia: AOAC (1998). Reglamento 2676/90 UE.

Fundamento: Método Kjeldahl (digestión previa de la muestra con H₂SO₄ y catalizador. Destilación tras dilución y alcalinización de la muestra con NaOH 33%, recogida del nitrógeno en ácido Bórico 4% para su posterior valoración con HCl 0.1N.

Material: Matraces Kjeldahl. Digestor Bloc Digest 12 de Selecta. Destilador automatico B 316 de Büchi.

9. Grado Alcohólico

Referencia: Método Oficial Español (BOE 1977), Reglamento 2676/90 UE. Destilación del vino mediante una suspensión de hidróxido de calcio y posterior determinación del grado alcohólico en el destilado.

Método A.

Material: Aparato de destilación que consta de: Matraz de destilación con boca esmerilada. Codo. Refrigerante. Matraz aforado de 250cc. Pipa. Alcohómetro. Termómetro. Probeta.

Reactivo: Lechada de cal.

Validación: Se realizó 12 veces la prueba en una misma muestra de las analizadas, obteniendo los siguientes resultados:

| S | E.R. (%) | D.E.R. |
|-------|----------|--------|
| 0,193 | 0,98 | 1,55 |

Método B.

Material: Equipo destilador para determinaciones enológicas ALCODEST 4000637 SELECTA.

Validación: Normas UNE 50081-1; 50082-1; 61010-1.

10. Azúcares Reductores

Referencia: Método Oficial Español (BOE 1979). Normativa 2676 UE (1990). Defecación plúmbica y valoración de los azúcares reductores por una disolución cuproalcalina.

Material: Erlenmeyer de 300cc con boca esmerilada. Refrigerante de reflujo. Material para filtración y volumetría. Baño de agua

Reactivos: Carbonato de calcio. Solución de NaOH 1N. Solución de acetato neutro de plomo (aproximadamente saturada). Solución cuproalcalina (50 g de ácido cítrico, 25 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 388 g de carbonato sódico en 1 litro de disolución). Yoduro potásico al 30%. Acido sulfúrico al 25% (v/v). Engrudo de almidón (5 g/l). Tiosulfato sódico 0,1N. Solución de azúcar invertido (5 g/l)

Validación: Se realizo 10 veces la prueba con una misma muestra de las estudiadas, obteniéndose los siguientes resultados:

| S | E.R. (%) | D.E.R. |
|-------|----------|--------|
| 0,150 | 3,2 | 4,5 |

11. Anhídrido Sulfuroso.

Referencia: Método Ripper doble, Método Oficial Español (BOE 1977), UE (Reglamento 2676/90).

Reactivos: NaOH 4N. H_2SO_4 1/10. Engrudo de almidón. Solución de Iodo N/20. Tiosulfato sódico N/100. EDTA sal disódica.

Validación: Determinando 10 veces el anhídrido sulfuroso total en un mismo vino de las muestras analizadas y haciendo el tratamiento estadístico básico, obtenemos:

| S | E.R. (%) | D.E.R. |
|-------|----------|--------|
| 0,867 | 1,679 | 2,324 |

12. Determinación De D-Glucosa y D-Fructosa.

Referencia: Determinación enzimática según Reglamento 2676 UE (1990).

Material: Espectrofotómetro de doble haz VIS-UV PERKIN-ELMER 551S. Cubetas de cuarzo de 1 cm de recorrido. Micropipetas Digital BRAND.

Reactivos: Test-combinación Boehringer-Manheim, conteniendo: *Frasco 1, con aproximadamente 5 g de mezcla de tampón trietanolamina pH=7.6; 64 mg de NADPH; 160 mg de ATP, sulfato de magnesio y estabilizadores. Se reconstituye, disolviéndolo en 27 ml de agua bidestilada. *Frasco 2, con 0.7 ml de suspensión enzimática compuesta aproximadamente 200 U de hexokinasa; aprox. 100 U de glucosa-6-fosfato-

deshidrogenasa. Se emplea sin diluir. *Frasco 3, con 0.7 ml de fosfoglucoasa-isomerasa, aprox. 490 U. Se emplea sin diluir.

Método de Determinación: Longitud de Onda.- 340 nm. Cubeta de cuarzo.- 1 cm de espesor. Temperatura.- 20-25 °C. Volumen del test.- 3.02 ml. (D-Glucosa), 3.04 (D-Fructosa). Medida frente al agua. Solución de prueba.- De 4 a 100 µg de D-Glucosa + D-Fructosa / cubeta (en 0.10-2.00 ml de volumen de prueba).

Preparación de la Muestra: En la cubeta, la cantidad de azúcar (D-glucosa + D-fructosa) debe oscilar entre 4 µg y 50 µg. La solución de muestra debe diluirse de manera que la concentración de azúcar oscile entre 0.04 y 0.5 g/l. En nuestras muestras, en general dichas diluciones, han sido de 1/5 para vinos. Previamente, se filtran los mostos turbios y vinos alternativamente aclarados con reactivos Carrez (I y II).

Validación del Método: A fin de determinar la exactitud del método, se efectuó la determinación de concentraciones de un patrón (P) y una muestra de las analizadas (M), utilizando 1 ml. de muestra en cada caso, para posteriormente, determinar la concentración de la muestra formada por 0.5 ml de cada una de las dos anteriores.

La exactitud, calculada por diferencia entre la concentración teórica obtenida a partir de P y M y la encontrada experimentalmente, ha sido expresada como porcenTaje Recuperación.

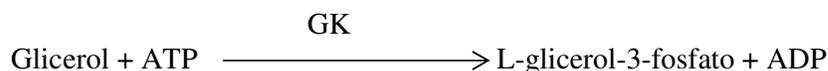
Validación del Método

| | Glu (g/l) | Fru (g/l) | % Rec. |
|-----------|------------------|------------------|---------------|
| P (1ml) | 0.140 | 0.221 | ----- |
| M (1ml) | 0.084 | 0.529 | ----- |
| P (0.5ml) | 0.116 | | 103.6 |
| + | | | |
| M (0.5ml) | 0.396 | | 105.6 |

13. Glicerina

Fundamento: Determinación enzimática.

El glicerol es fosforilado por el ATP pasando a L-glicerol-3-fosfato en una reacción catalizada por la glicerolkinasa (GK).



El ADP formado es reconvertido por el fosfoenolpiruvato (PEP) con la ayuda de la piruvatokinasa (PK) en ATP con formación de piruvato.



En presencia de lactato-deshidrogenasa (L-LDH) el piruvato es reducido a L-lactato con la oxidación de NADH a NAD⁺.



La cantidad de NADH oxidada, es proporcional a la cantidad de glicerol. El NADH, es determinado por medio de la absorción a 340 nm.

Material y Aparatos: Espectrofotómetro de doble haz VIS-UV PERKIN-ELMER 551S. Cubetas de cuarzo. Micropipetas BRAND.

Preparación de la muestra: Las muestras de vino no se sometieron a ningún tratamiento, salvo su dilución con agua hasta una concentración entre 0.03 y 0.4 g/l (3 µg y 40 µg en cubeta), que aplicado a nuestros vinos nos dio un factor de dilución de 20, existiendo tres muestras con un factor de dilución de 50.

Test de Combinación: Se utilizó un test de Boehringer para determinación de Glicerol.

Método de Determinación: Longitud de onda: 340 nm. Cubeta de cuarzo: 1 cm de espesor. Temperatura: 20-25° C Volumen de test: 3.02 ml. Medida frente a agua. Solución de prueba: 3-40 µg glicerol/cubeta (en 0.1-2.0 ml de volumen de prueba).

Validación del Método: Se realizó un estudio de recuperaciones mediante la determinación de la concentración de un estándar y una muestra utilizando 1 ml prueba y de la mezcla de 0.5 ml de cada uno de ellos. Expresando la diferencia como % de Recuperación se obtienen los siguientes valores:

| Muestra | A | C. Teórica (g/l) | C. Hallada (g/l) | Recuper. % |
|-----------------------|-------|------------------|------------------|------------|
| St (1ml) | 0.888 | ----- | 0.392 | ----- |
| M1 (1ml) | 0.816 | ----- | 0.360 | ----- |
| M2 (1ml) | 0.711 | ----- | 0.314 | ----- |
| St + M1 (0.5ml+0.5ml) | 0.832 | 0.376 | 0.367 | 97.6 |
| St + M2 (0.5ml+0.5ml) | 0.774 | 0.353 | 0.342 | 96.3 |

14. Características Cromáticas

14.1. Método De Las Coordenadas Triestimulares

Referencia: Método espectrofotométrico mediante el cual calculamos los valores triestimulares y los coeficientes tricromáticos necesarios para especificar el color en los términos de la C.I.E.

UE, Reglamento 2676/90, Método Oficial Español (BOE 1981), con modificación de las coordenadas del iluminante C.

Material: Espectrofotómetro PERKIN-ELMER 551S UV/VIS. Cubeta de cuarzo de 1 cm de espesor.

Técnica: Antes de su determinación, centrifugamos el vino y eliminamos el anhídrido carbónico, si fuera necesario, por agitación con vacío parcial. Medimos la absorbancia a 625, 550, 495 y 445 nm frente a agua destilada.

Expresión de los Resultados: La Luminosidad Relativa viene dada por el valor de Y expresado en % (negro Y%= 0, incoloro Y%=100).

La Cromaticidad se expresa por la longitud de onda dominante y la pureza. La primera viene dada por el valor de corte del spectrum locus S en la línea de unión del iluminante C con el punto O de coordenadas del vino, mientras que la segunda se calcula mediante la expresión $(CO/OS) 100$.

14.2 Espacio Cielab

Referencia: CIE (1974 y 1978).

Expresión de los Resultados: $L^* = 24,99 Y^{1/3} - 16$. $a^* = 107,7 [(1,02 X)^{1/3} - Y^{1/3}]$.
 $b^* = 43,09 [Y^{1/3} - (0,8467 Z)^{1/3}]$. $c^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$. $H^* = \arctg (b^*/a^*)$. $S^* = c^*/L^*$

15. Polifenoles

15.1. Índice De Folin-Ciocalteu

Referencia: UE, Reglamento 2676/90.

Fundamento: Oxidación del conjunto de compuestos fenólicos del vino mediante el reactivo Folin-Ciocalteu, el cual se reduce por la oxidación de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno y molibdeno.

Dicha coloración azul presenta una absorción máxima en torno a los 750 nm la cual es proporcional al % de compuestos fenólicos.

Reactivos: Reactivo Folin-Ciocalteu MERCK. Na_2CO_3 en solución al 20%

Técnica: En un matraz de 100 ml, ponemos 1ml de vino tinto diluido 1/5, añadiendo 5 ml del reactivo Folin-Ciocalteu, 20 ml de la disolución de Na_2CO_3 y enrasamos con agua destilada, homogeneizamos, esperamos 30 minutos hasta que la reacción se estabilice y medimos la absorbancia frente a agua a 750 nm.

Si el vino es blanco, se opera de igual manera pero sin diluir la muestra.

Cálculos: El resultado se expresa como índice al multiplicar la absorbancia por 100 en el caso de vinos tintos diluidos 1/5 (o por el factor correspondiente a la dilución empleada) y por 20 si el vino es blanco.

15.2. Polifenoles Totales

Referencia: Con el reactivo de Folin-Ciocalteu, siguiendo el método seguido por Singleton y Rossi (1965), citado por Amerine y col. (1970).

Fundamento: Se realiza una recta de calibrado con una disolución reserva de Acido Gálico de 0,5 g/l, a partir de la cual, se preparan muestras de 50, 100, 150, 250 y 500 mg/l en dicho ácido.

Siguiendo la técnica descrita en el apartado anterior, calculamos las absorbancias de las distintas disoluciones patrón para a continuación, y mediante la ecuación de la recta de calibrado, determinar la concentración en polifenoles totales de los distintos vinos expresados como ácido gálico.

II.B.- Acidos Orgánicos Y Fermentación Maloláctica

II.B.1.- Determinación Individual De Ácidos Orgánicos Por HPLC

El método utilizado ha sido la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, usando un detector de UV/VIS de longitud variable.

Material y Aparatos: Cromatógrafo líquido Konik-500-A series que consta de: Detector UV/V Uvis 200. Integrador HP 3394 HEWLETT PACKARD. Columna de fase reversa LICHROSPHER RP-18.

Reactivos: Solución de ácidos orgánicos obtenidos a partir de productos MERCK en disolución hidroalcohólica de 13 ° (v/v) y en agua destilada con un rango de concentración entre 0.75 y 12 g/l. Solución acuosa de KH_2PO_4 al 2%, ajustando el pH a

2.2 con H_3PO_4 . Tampón fosfato potásico de pH=8.0. Agua milli-Q acidulada con Acido Sulfúrico a pH a 2.2.

Se ensayaron los siguientes métodos:

Método A

Condiciones de Trabajo: Fase móvil.- Tampón Fosfato (Solución acuosa de KH_2PO_4 al 2%, ajustando el pH a 2.2 con H_3PO_4). Flujo.-1 ml/min. Temperatura.- 40 °C. Detector UV a 214 nm.

Preparación de las muestras: Los vinos, se pasan previamente por un Cartucho Sep-Pak C_{18} (Waters) acondicionados con 2-3 ml de MeOH y 5-10 ml de agua. Se diluye 1ml de vino con 3 ml de Tampón fosfato potásico de pH=8.0, se pasa 1ml de dicha muestra diluida y 1 ml del tampón fosfato, se mezclan ambas eluidos y se inyecta 10 μ l mediante una jeringa Hamilton previa filtración por una membrana millipore de 0.45 μ l.

Método B

Condiciones de Trabajo: Fase móvil.- Agua mili Q acidulada con Acido Sulfúrico a pH a 2.2 . Flujo.-0.6 ml/min. Temperatura.- 40 °C. Detector UV a 214 nm.

Preparación de las muestras: Los vinos, se pasan previamente por un Cartucho Sep-Pak C_{18} (Waters) acondicionados con 10 ml de MeOH y 10 ml de agua. Se pasan 8ml de muestra despreciándose los 3 primeros y de los restantes, se inyectan 10 μ l mediante una jeringa Hamilton previa filtración por una membrana millipore de 0.45 μ l.

De ambos métodos, se optó por este segundo dado los mejores resultados obtenidos en su validación analítica, su mejor adaptación al análisis de mostos, y la menor agresión a que se somete el HPLC al evitar la utilización de tampones.

La identificación de los componentes, se realiza de acuerdo con sus tiempos de retención.

Para ello, la muestra se inyecta 10 veces en el cromatógrafo, los tiempos, aparecen recogidos en la siguiente tabla (Tabla 25):

| Acido | t_r (media) | σ_{n-1} |
|-----------|---------------|----------------|
| Tartárico | 1.95 | 0.0109 |
| Málico | 2.41 | 0.0114 |
| Láctico | 2.94 | 0.0167 |

La Figura 5 muestra el cromatograma correspondiente a una de estas soluciones.

La cuantificación se ha realizado por el cálculo de la ecuación de las rectas de calibrado obtenidas a partir de las disoluciones patrón.

Validación del Método: La validación de la técnica analítica propuesta para la determinación por HPLC de ácidos orgánicos no volátiles se realiza mediante el estudio de Reproducibilidad y por el método de la adición conocida (una muestra de vino es adicionada de cantidades conocidas de cada uno de los ácidos orgánicos). Los resultados están recogidos en las tablas adjuntas:

Tabla 26: Estudio de Reproducibilidad

| <i>Ácido</i> | Area Media | σ_{n-1} | E.R. (%) |
|------------------|-------------------|----------------------------------|-----------------|
| Tartárico | 235364 | 2456.8 | 1.09 |
| Málico | 56342 | 564.7 | 0.89 |
| Láctico | 73667 | 768.9 | 1.11 |

Tabla 27: Porcentajes de Recuperación obtenidos en el estudio de exactitud.

| Ácido | C. Inicial (g/L) | C. Añadida (g/L) | C. Encontrada (g/L) | % Recuperación |
|------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------|
| Tartárico | 3.94 | 1.00 | 5.01 | 101.4 |
| | | 2.00 | 6.06 | 102.0 |
| Málico | 1.37 | 1.00 | 2.33 | 98,5 |
| | | 2.00 | 3.31 | 98.2 |
| Láctico | 2.91 | 1.00 | 4.03 | 103.0 |
| | | 2.00 | 5.38 | 109.6 |

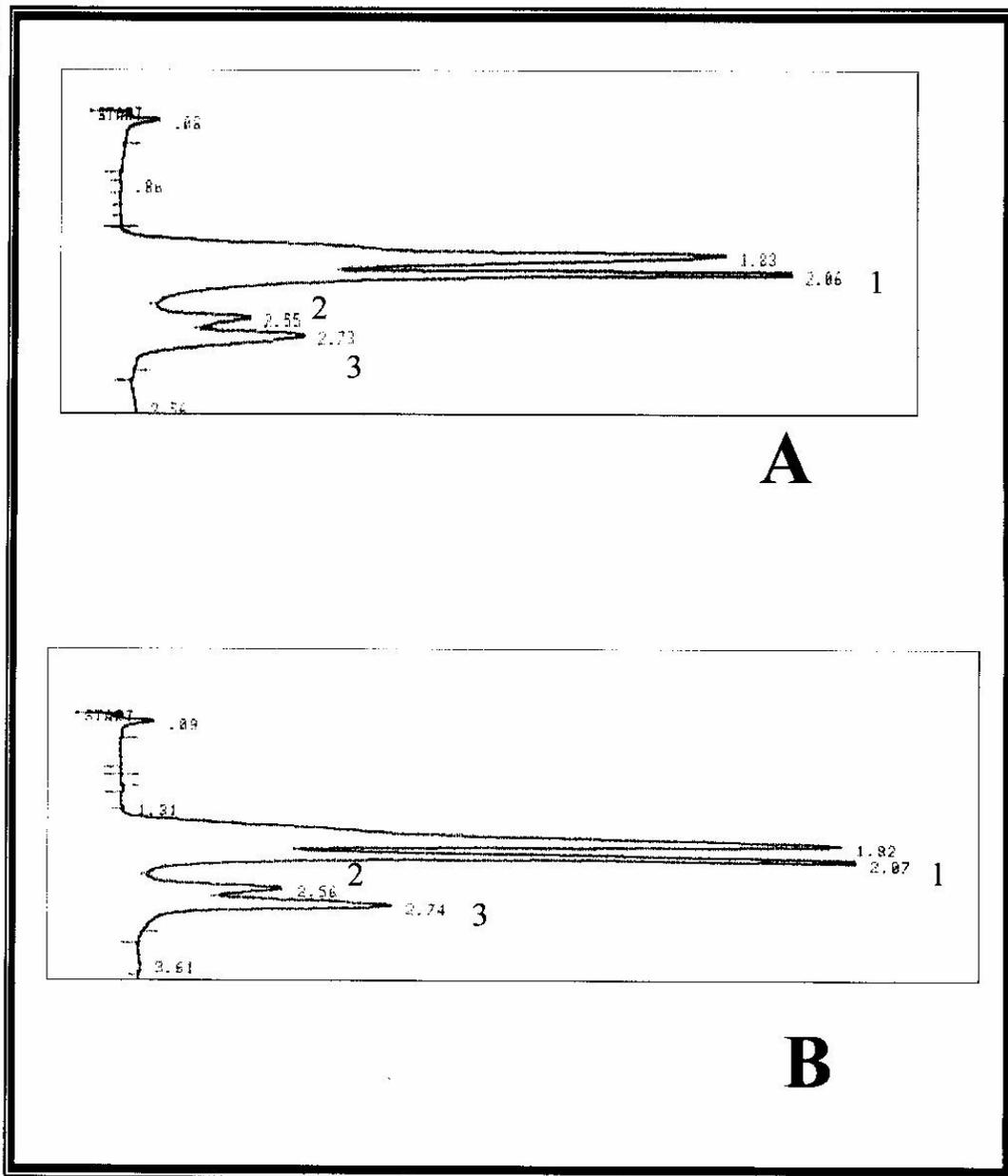


Figura 5 . Cromatograma obtenido por HPLC para la cuantificación de acidos orgánicos (1. Tartarico, 2. Málico y 3. Láctico) correspondiente a dos muestras de vino A(Cabernet-Saivignon) y B (Viura) en las condiciones indicadas

II.B.2.- Determinación Enzimática De Acido Málico Y Láctico.

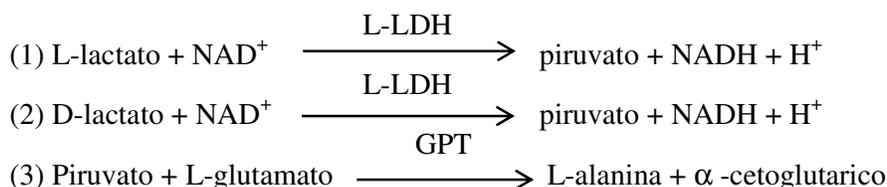
II.B.2.1.- Acido Láctico

Referencia: Determinación enzimática. Método referencia Reglamento de la UE nº 2676/1990.

Fundamento: En presencia de NAD, el ácido láctico total (L-lactato y D-Lactato) se oxida a piruvato en una reacción catalizada por L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) y D-Lactato deshidrogenasa (D-LDH).

El equilibrio de la reacción está desplazado en el sentido del lactato. La eliminación del piruvato del medio de reacción desplaza el equilibrio hacia la formación de piruvato.

En presencia de L-glutamato, el piruvato se transforma en L-alanina en una reacción catalizada por la glutamato-piruvato-transaminasa (GPT).



La formación de NADH, medida por el aumento de la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm, es proporcional a la cantidad de lactato presente.

El ácido L-láctico puede determinarse individualmente mediante las reacciones (1) y (3). El ácido D-Láctico puede determinarse individualmente mediante las reacciones (2) y (3).

Material y Aparatos: Espectrofotómetro de doble haz VIS-UV PERKIN-ELMER 551S. Cubetas de cuarzo. Micropipetas BRAND.

Test de Combinación: Se utilizó un test Boehringer de determinación de Acido Láctico (Ref. 112821).

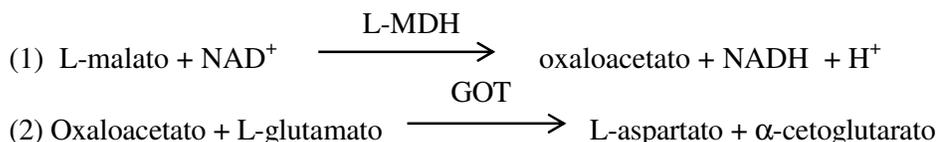
Preparación de la muestra: El análisis se realiza directamente sin decoloración o diluyendo convenientemente. Es necesario ajustar el pH de la muestra a 8-10 añadiendo hidróxido sódico o potásico.

II.B.2.2.- Acido L-Málico

Referencia: Determinación enzimática. Método referencia Reglamento de la UE nº 2676/1990.

Fundamento: En presencia de NAD, el ácido L-málico (L-malato) se oxida en oxalacetato en una reacción catalizada por la L-malato-deshidrogenasa (L-MDH).

El equilibrio de la reacción está desplazado en el sentido del malato. La eliminación del oxaloacetato del medio reactivo desplaza el equilibrio de la reacción hacia la formación de oxalacetato. En presencia de L-glutamato, el oxalacetato, se transforma en L-aspartato, reacción catalizada por el glutamato-oxalacetato-transaminasa (GOT).



La formación de NADH, medida por el aumento de la absorbancia a la longitud de onda de 340 nm, es proporcional a la cantidad de L-malato presente.

Material y Aparatos: Espectrofotómetro de doble haz VIS-UV PERKIN-ELMER 551S. Cubetas de cuarzo. Micropipetas BRAND.

Test de Combinación: Se utilizó un test Boehringer de determinación de Acido L- Málico (Ref. 139068).

Preparación de la muestra: La medida se realiza directamente sin decoloración o diluyendo la muestra hasta una concentración aproximada de 0.04 a 0.2 g/L. Además, es necesario ajustar el pH a 8-10 adicionando hidróxido sódico e incubando durante 30 minutos.

En nuestras muestras, la dilución varió en función del análisis de mostos, vinos antes o tras sufrir la fermentación maloláctica.

II.C. Alcoholes, Aldehidos Y Esteres

II.C.1.- Cromatografía De Gases Con Detector FID

Se han determinado un total de 11 compuestos volátiles, responsables del aroma, entre alcoholes, aldehidos y ésteres.

Los ésteres analizados han sido el acetato de etilo, lactato de etilo, propionato de etilo y acetato de metilo. Entre los alcoholes se han determinado el n-propanol, n-butanol, isobutanol, metanol y alcohol isoamílico. También se ha analizado por esta técnica el acetaldehído.

Fundamento: Se ha determinado simultáneamente el contenido de estos componentes mediante la cromatografía de gases.

Material y Aparatos: Cromatógrafo de gases HEWLETT PACKARD 5890 A. Integrador HEWLETT PACKARD 3390 A. Microjeringa HAMILTON. Gases portadores: N₂ e Hidrógeno y Aire comprimido. Columnas de vidrio para cromatografía de gases. CARBOPACK - B 80/120 (TEKNOKROMA).

Reactivos: Se emplean disoluciones patrón constituidas a partir de los distintos componentes a determinar, preparados por pesada en disolución hidralcohólica de 13°. Los reactivos empleados son de pureza suficiente para cromatografía gaseosa, y las concentraciones utilizadas están en función del valor medio de los vinos analizados, determinado por pinchada previa.

Condiciones cromatográficas: Inyector.- 2001 C. Tiempo inicial.- 0. Rate.- 31/min. Nitrógeno.- 30 ml/min. Aire.- 350-400 ml/hora. Detector.- 250° C. T^a Inicial.- 651 C. T^a Final.- 120°C. durante 10 minutos. Hidrógeno.-35 ml/h

Procedimiento: En primer lugar se procedió a determinar, aproximadamente, la concentración de dichas sustancias en nuestros vinos, e identificar los correspondientes picos del cromatograma.

La identificación se ha realizado de acuerdo con los tiempos de retención (Tabla 28) y por adición de componentes puros y mediante disoluciones patrón de concentración conocida se realizó las rectas de calibración.

Tabla 28: Tiempos de retención de componentes volátiles.

| Componente | tr | σ_{n-1} |
|---------------------|-------|----------------|
| Metanol | 3.70 | 0.023 |
| Acetaldehido | 4.82 | 0.028 |
| n-propanol | 15.64 | 0.038 |
| Ac. Metilo | 17.52 | 0.039 |
| Terbutanol | 19.50 | 0.039 |
| Acetato De Etilo | 23.65 | 0.051 |
| Isobutanol | 25.03 | 0.048 |
| n-butanol | 26.82 | 0.044 |
| 2 y 3-metil-butanol | 31.81 | 0.057 |

Una vez determinadas las rectas de calibrado, aplicamos la ecuación a las distintas áreas obtenidas en el cromatograma, obteniendo su concentración en g/l.

Preparación de la muestra: Para no alterar el sistema de inyección debido a los componentes no volátiles (azúcares, sales, etc.), sometimos la muestra a una destilación previa, enrasando a la concentración inicial e inyectando directamente 0.6 μ l de destilado.

Validación del Método: Se realizó a través del estudio de la reproducibilidad, mediante inyección de 10 destilados de un mismo vino.

Tabla 29: Resultados obtenidos para los diferentes compuestos volátiles.

| COMPONENTE | AREA MEDIA | DESVIACION ESTANDAR | COEFICIENTE VARIACION (%) |
|----------------------------|------------|---------------------|---------------------------|
| METANOL | 927472.4 | 39869.21 | 4,31 |
| ACETALDEHIDO | 1301337.6 | 667955.86 | 5,13 |
| ACETATO DE METILO | 105733.3 | 3734.91 | 3,53 |
| n-PROPANOL | 544369.2 | 22592.1 | 4,15 |
| ACETATO DE ETILO | 3698760.1 | 104118.24 | 2,81 |
| ISOBUTANOL | 688061.8 | 17309.57 | 2,52 |
| n-BUTANOL | 3698760.1 | 104118.24 | 2,81 |
| 2 y 3-METIL-BUTANOL | 580993.5 | 9541.12 | 1,64 |

II.C.2.-Cromatografía De Gases Acoplada A Un Espectrofotómetro De Masas

Fundamento:. A fin de comprobar el perfil aromático de los principales vinos producidos en la zona, las muestras más significativas se analizaron mediante CG/EM.

En la figura 6 aparece el espectro correspondiente a los tres tipos de vinos de mayor producción en la Cooperativa objeto de estudio.

Preparación de la Muestra: Se realiza una extracción (por triplicado) de los compuestos aromáticas mediante una mezcla pentano/diclorometano 60/40 y heptanol como patrón interno

Se deseca la fase orgánica con Sulfato Sódico Anhidro, para por último, concentrar la muestra mediante corriente de Nitrógeno.

Condiciones cromatográficas: Gas portador: Helio 0.5 mL/min.; T^a inicial: 50 °C; Tiempo inicial: 10 min.; Rampa: 2 °C/min; T^a final: 240 °C; T^a inyector y detector: 250 °C.

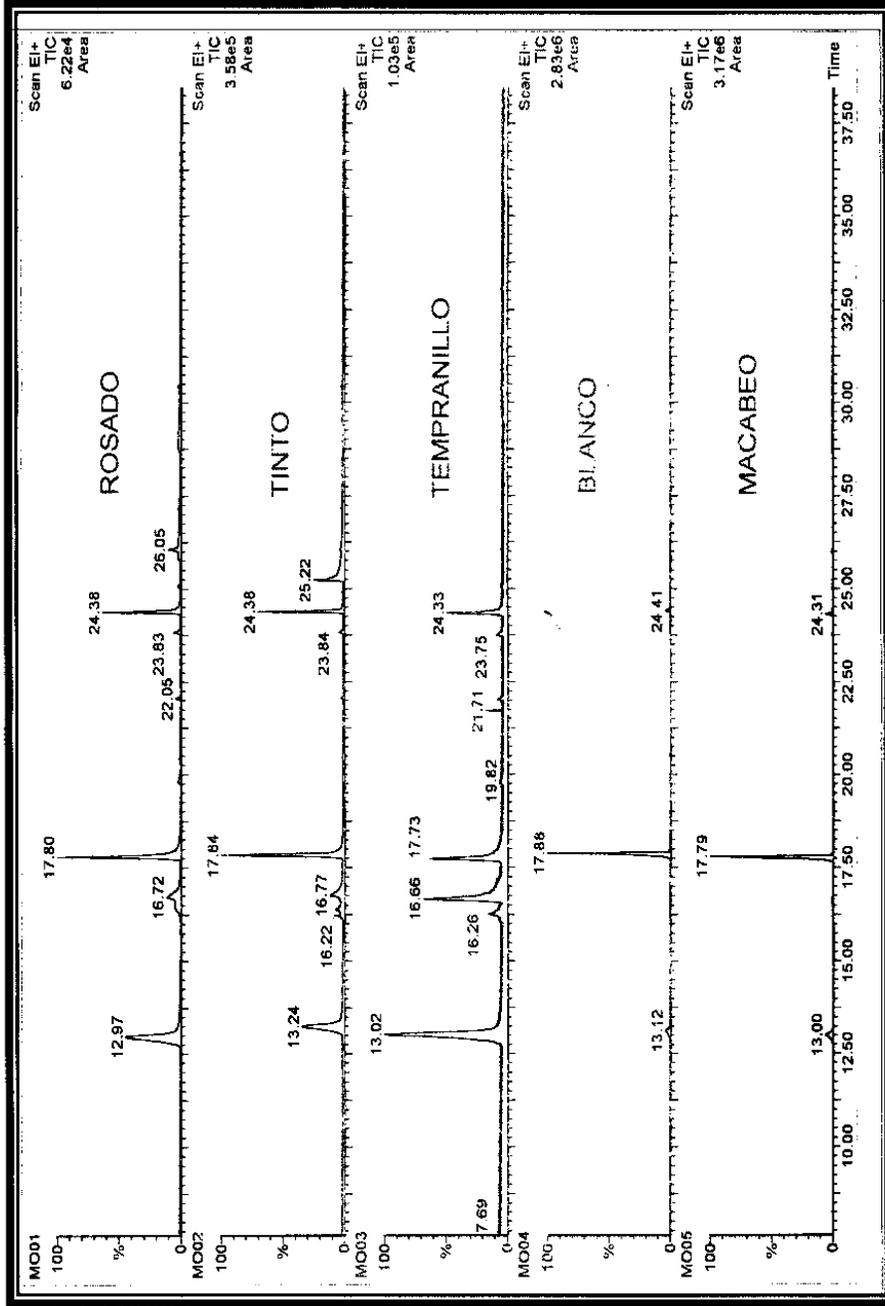


Fig. 7 Espectro de masas aplicado a los distintos tipos de vinos con mayor producción en la Bodega objeto de estudio

II.D.- Determinación De Elementos Minerales Por Espectrofotometría Atómica

Los metales cuantificados por esta técnica han sido el sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro, cobre.

Referencia. Método de referencia del Reglamento CEE (1991), al que se han realizado algunas modificaciones en lo referente a la preparación de la muestra.

Fundamento. La determinación de los distintos metales se ha llevado a cabo por Espectroscopía de Absorción Atómica, a excepción del sodio y el potasio que lo han sido por Emisión Atómica, al presentar estos límites de detección más bajos e intervalos de linealidad mayores.

Reactivos.- Disoluciones estándar de Na, K, Ca, Mg, Fe y Cu (1.00±0.002 g) Tritisol (Merck). Acido nítrico 65%, Suprapure (Merck). Todas las disoluciones han sido preparadas con agua desionizada (18 MΩcm, resistividad específica), obtenida mediante purificación de agua destilada a través de un sistema Milli-Q de Millipore mod. RO15 (Millipore), inmediatamente antes de su uso. Todo el material ha sido lavado con HNO₃ 6N y con agua bidestilada desionizada, repetidas veces antes de su uso.

Aparatos- Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer mod. 1100 B (Perkin-Elmer corp., Norwalk, CT 06856) equipado con corrector de fondo de deuterio. Lámparas de cátodo de hueco de Ca, Mg, Fe y Cu (Perkin-Elmer). Bloque de digestión multiplazas con control de temperatura Selecta (J. P. Selecta, S.A., Barcelona). Tubos Pyrex de tamaño apropiado.

PROCEDIMIENTO

Preparación de la muestra Para la determinación de elementos minerales, hemos llevado a cabo una mineralización previa de la muestra con objeto de eliminar las interferencias de matriz producidas por el etanol y compuestos orgánicos presentes en vinos. Para realizar dicha mineralización, adicionamos 1 ml de HNO₃ concentrado a 5 ml de muestra y calentamos a 60° C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo aumentamos la temperatura hasta 120° C, manteniéndola así durante 60 minutos. Una vez enfriada la muestra enrasamos a 10 ml con agua bidestilada desionizada.

*Calibración*_Se han usado las soluciones patrón de los distintos metales, para preparar, mediante diluciones adecuadas, las soluciones de trabajo necesarias para

la elaboración de las rectas de calibrado y la comprobación del método (adición estándar).

Validación del método

A fin de validar el método propuesto se han evaluado las siguientes características analíticas:

Limite de detección de acuerdo con los indicadores de la IUPAC (Long y Winefordner, 1983).

Sensibilidad, expresada como la concentración del elemento que genera una señal analítica de 0.0044 unidades de absorbancia.

Exactitud, mediante ensayos de recuperación sobre las muestras problema, adicionando cantidades conocidas de analito (Horwitz y col. 1980), y puesto que no se dispone de un material de referencia certificado, se ha preparado uno en el laboratorio, cuya composición refleja la matriz de la muestra a analizar.

Este material presenta la composición media de un vino: Alcohol absoluto..10 ml.; Glucosa .. 150 mg.; Glicerol... 500 mg; Acido cítrico...20 mg; Acido tartárico... 200 mg. Dihidrógeno fosfato amónico.... 35 mg y Agua c.s.p. 100 ml. (Olalla y col. 1993 y Cabrera y col. 1997).

Precisión, comprobada a partir de 10 determinaciones sucesivas en una misma muestra, expresando la repetibilidad de las mismas mediante el coeficiente de variación. El estudio se ha realizado sobre 6 muestras diferentes elegidas al azar.

Selectividad, evaluada mediante la aplicación del método de las adiciones estándar a 5 muestras distintas.

Los resultados obtenidos, aparecen recogidos en la siguiente tabla, poniendo de manifiesto la validez del método propuesto, puesto que resultan apropiados para el rango de concentraciones de estos elementos en las muestras problema (Horwitz, 1990; Pomeranz y Meloan, 1994). En el método de adiciones estándar, el rango de pendientes patrón/adición, en todos los casos, ha resultado muy próximo a la unidad (Cuadros y col. 1995) por lo que el poder obviarlo facilita de forma considerable las determinaciones.

Validación del Método utilizado en la determinación de minerales por Espectroscopia Atómica

| Elemento | Limite Detección (mg/L) | Sensibilidad | Exactitud (%) | Precisión (C.V.%) | Radio pendientes Patrones/adición |
|-----------------|------------------------------------|---------------------|--------------------------|------------------------------|----------------------------------------------|
| Sodio | 0.0002 | 0.012 | 101.6 ± 0.3 | 1.0 | 0.996-0.999 |
| Potasio | 0.0005 | 0.083 | 101.2 ± 0.4 | 0.72 | 0.998-1.000 |
| Calcio | 0.0020 | 0.092 | 98.6 ± 0.2 | 2.3 | 0.997-0.999 |
| Magnesio | 0.0080 | 0.0078 | 98.0 ± 0.5 | 3.5 | 0.998-1.100 |
| Hierro | 0.0040 | 0.10 | 98.5 ± 0.7 | 4.1 | 0.996-1.100 |
| Cobre | 0.0020 | 0.077 | 99.0 ± 0.5 | 3.0 | 0.998-1.000 |

III.- ANALISIS MICROBIOLÓGICO

III.A.- Control Microbiológico

Para este tipo de análisis, se ha seguido el método de *filtración por membrana* (MF) Millipore.

Fundamento: Se hace pasar la muestra de vino o mosto a través de un filtro de membrana microporosa (tamaño de poro 0.45 μm), en cuya superficie quedan retenidos los microorganismos. Membrana que es incubada en un medio de cultivo adecuado a la temperatura y durante el tiempo necesario para posteriormente recontar directamente las colonias sobre la superficie de la membrana.

Material. **Sistema MicrofilTM** de Filtración de Membrana (Ref. MIHABG072) que consta de: Embudos portafiltros 100 ml. estériles de polietileno, membranas estériles S-Pak tipo HA de 0.45 μm en envase individual de color negro y blancas (HAWG047 S1) y soporte de filtración de acero inoxidable con sistema de elevación de membrana. Bomba manual de vacío. Cajas de Petri con cartones absorbentes estériles (PD10047 S5) y medios de cultivo en ampollas de plástico individuales (2 ml) de Millipore.

Preparación de la muestra: Para vinos, filtración directa de 100 ml. de muestra mientras que para las muestras de mosto, se realizó una dilución al 50% con solución salina estéril, tamponada a pH neutro. Esta solución tampón está constituida mediante Solución A (Solución de fosfato monopotásico dihidrogenado en agua ajustando el pH a 7.2 mediante sosa) y Solución B (Solución de cloruro magnésico en agua).

Técnica: Se flamea la superficie del soporte de acero Microfil durante 3 segundos, se coloca la membrana S-Pak y el embudo ambos estériles, se vierte la muestra y se aplica vacío. Una vez filtrado, se extrae la membrana y se coloca la placa Petri con el medio líquido, se invierte la caja (para evitar que el vapor condensado caiga sobre la superficie de la membrana) incubándose la temperatura indicada en cada análisis.

Se extrae la placa Petri de la estufa incubadora y se cuentan las colonias que presenten el aspecto característico de cada tipo de microorganismo.

Muestras: Se analizaron muestras de vino de las variedades Jaén Blanco, Bobal, Tempranillo, Macabeo, Rosado.

III.A.1.- Recuento de mohos levaduras y bacterias ácidas

III.A.1.1.- Medio Wallerstein Nutrient Broth de Millipore (MX00WN2)

Formula por litro de agua purificada: Casitone 5.0g. Extracto de levadura 4.0g. Dextrosa 50g. Fosfato Monopotásico 0.55g. Cloruro Potásico 0.425g. Cloruro Cálcico 0.125g. Sulfato Magnésico 0.125g. Cloruro Férrico 0.0025g. Sulfato de Manganeso 0.0025g. Verde de Bromocresol 0.0022g.

Tipo de Microorganismos: Recuento de mohos, levaduras y bacterias ácidas. pH 5.5. ± 0.2 a 8°C.

Condiciones de cultivo: 48-72h a 25° (levaduras), 30° C (bacterias).

Características de la lectura: Los mohos forman colonias filamentosas blancas, verdes o marrones-negruzcas. Las levaduras forman colonias blancas abovedadas brillantes y no filamentosas que pueden volverse verdes con el tiempo.

III.A.1.2.- Medio Yeast and Mold de Millipore (MX00YM2)

Formula por litro de agua purificada: Extracto de levadura 3.0g. Extracto de Malta 3.0g. Peptona 5.0g. Dextrosa 10.0g.

Tipo de Microorganismos: Mohos, levaduras y otros microorganismos ácidos. pH 4.6 ± 0.3 a 25°C.

Condiciones de Cultivo: 40-72h a 25-30° C.

Condiciones de Lectura: Similares al WL Diferencial Broth.

III.A.2.- Recuento de bacterias totales

Medio Wallerstein Diferencial Broth de Millipore (MX00WD2)

Tipo de Microorganismos: Recuento de bacterias totales. El medio inhibe los mohos y levaduras. pH 5.5.

Condiciones de cultivo: 48-72h a 25-30° C.

Características de la lectura: Las bacterias forman colonias azules de pequeño tamaño.

III.A.3.- Recuento de bacterias acidófilas

Medio Caldo Tomato Juice de Millipore (MX00TJ2)

Tipo de Microorganismos: Recuento de bacterias acidófilas (especialmente *Lactobacillus acidophilus*). El medio inhibe las bacterias no acidófilas. pH $6.7 \pm$

Condiciones de cultivo: 48h a 28-32 °C. Si no hay crecimiento, incubar otras 48h a 20 °C.

Características de la lectura: Las bacterias forman colonias blancas.

III. B.- Técnicas De Aislamiento Y Caracterización De Levaduras

Muestreo

En total, a lo largo de este trabajo, un total de 260 aislamientos de levaduras se realizaron. De estos, los aislamientos realizados en las uvas resultaron ser un total de 55, de los cuales, 15 correspondieron a la variedad Macabeo, 20 a la variedad Tempranillo, 10 a Jaén Blanco y 10 a Bobal. Por lo que respecta a los mostos, un total de 205 cultivos puros fueron obtenidos. De la primera fase del proceso fermentativo se obtuvieron 50 cultivos puros, 90 en fase de fermentación tumultuosa y los 70 restantes de la fase de fermentación lenta. La distribución de estas muestras se observa en la a continuación:

Distribución de las muestras de levaduras aisladas en mostos, en función de la variedad de uva a partir de la que estos fueron obtenidos y la fase fermentativa:

| Número De Aislamientos | | | | |
|-------------------------------|------------|----------------|----------------|----------------|
| VARIEDAD | UVA | 1ª FASE | 2ª FASE | 3ª FASE |
| MACABEO | 15 | 30 | 20 | - |
| TEMPRANILLO | 20 | - | - | 20 |
| MONASTRELL | - | - | 20 | 20 |
| JAÉN BLANCO | 10 | | 30 | 20 |
| BOBAL | 10 | 20 | 20 | 10 |

Uvas

Para el aislamiento de las levaduras presentes en la superficie de las uvas, se tomaron muestras de uvas al azar en el momento previo a la vendimia.

Para ello, en cada uno de los muestreos llevados a cabo, se tomaron tres cepas al azar de cada una de las variedades a estudiar, de las que se seleccionó un racimo significativo y se guardaron en bolsas de plástico herméticamente cerradas, transportándolas inmediatamente al laboratorio. (Angulo y col., 1993). En cada bolsa se consignaron los datos identificativos correspondientes: fecha de recogida y variedad.

De cada una de las variedades objeto de estudio se eligieron 25 uvas que fueron suspendidas en 125 mL de agua de peptona y posteriormente se llevaron a incubación a 28 °C durante 24-48 horas. Transcurrido este tiempo, mediante un procedimiento de diluciones seriadas, las levaduras fueron sembradas en el medio de cultivo agar YPD (Salvadores y col., 1993) e YM agar, incubando a 28 °C durante 48-72 Horas. Las colonias se seleccionaron en base a las siguientes características de crecimiento en medio sólido: color, elevación, formación de películas, margen, producción de pigmentos difusibles al medio, superficie, tamaño y textura.

Mostos

En cuanto a la toma de muestras del mosto, siempre se ha efectuado en la bodega, en recipiente de plástico estéril de 100 mL, con ayuda de un sacamuestras, introduciendo éste aproximadamente a la mitad del volumen del mosto en la cuba de fermentación. Cada muestra es identificada mediante fecha, variedad de la uva y fase fermentativa (inicio, fermentación tumultuosa o final).

Las muestras son así transportadas inmediatamente al laboratorio en recipientes refrigerados, tomando las precauciones debidas para que exista un completo aislamiento del ambiente exterior. Estas muestras son rápidamente procesadas a fin de que la natural evolución de las mismas no pueda interferir en el proceso de aislamiento, sobre todo durante las primeras fase del proceso fermentativo.

Cada una de las muestras de mosto se ha de agitar de forma adecuada, a fin de poder obtener una homogeneidad de las células en el líquido y de esta forma conseguir resultados fiables.

A continuación se empleó la técnica de las diluciones sucesivas de Koch y Hansen (Ribereau-Gayon y col., 1980) utilizándose las diluciones entre 10^{-4} - 10^{-8} en agua de peptona y sembrándose por extensión alícuotas de 0.1 mL en placas de Petri con medio agar YPD (Salvadores y col., 1993; Regodón Mateos y col., 1996). No se adicionaron al medio sustancias inhibitoras para otros microorganismos para no alterar, en la medida de lo posible, las proporciones relativas de las especies de levaduras autóctonas en el mosto.

Las distintas colonias que se obtuvieron en el primer cultivo fueron aisladas, después de 2-3 días de incubación a 28 °C, en base a sus características diferenciales a simple vista (color, elevación, formación de películas, margen, producción de

pigmentos difusibles al medio, superficie, tamaño y textura), siendo posteriormente realizadas resiembras sucesivas a fin de obtener cultivos puros.

Debido a la cantidad de medios que son usualmente empleados por diferentes autores para este propósito se realizaron pruebas con diferentes medios de cultivo a fin de determinar si este aspecto era limitante en la obtención de las diferentes colonias. El resultado obtenido fue, en nuestro caso, la elección del denominado agar YPD. Este medio no lleva difenilo ni propionato para limitar el desarrollo de hongos, puesto que, siguiendo otros autores, tras 2-3 días de incubación, el desarrollo levaduriforme es adecuado para poder llevar a cabo los aislamientos mientras que el micelio de los hongos no es lo suficientemente importante como para limitarnos la toma de muestras de las colonias (Mulet, 1990).

Posteriormente, las colonias así aisladas se sembraron por duplicado en tubos inclinados con el medio MYPD conservándose estos a 4 °C. Uno de estos tubos servirá para ser utilizado en los diferentes test identificativos, el otro para conservación. Estas levaduras fueron resembradas cada seis meses en MYPD a fin de mantener la viabilidad de las mismas.

Material

El material empleado es el habitual en laboratorio de microbiología general. A continuación se destacan algunos de los materiales empleados: Microscopio óptico PLEUGER GIRALT XSZ-107 con objetivos x4, x10, x40 y x100. Estufa de cultivo SELECTA Mod. 207. Estufa para desecación y esterilización con termostato de seguridad SELECTA Mod. CONTERM. Agitador magnético AGIMATIC-N SELECTA. Incubador refrigerado Mod. PRESBATEM de SELECTA. Autoclave SELECTA Mod. 437-G. Balanzas METTLER PE 3000 Y METTLER AE200. Pipetas de embolo Mod. TYP DIGITAL 200-1000 µL de BRAND. Tapones SERO-TAP de SELECTA, diámetros 14-16 mm, 17-18 mm y 19-20 mm. Tubos de ensayo de diferentes diámetros. Placas de Petri estériles desechables. Asas y puntas de platino. Escobillones estériles. Medios de cultivo preparados a partir de bases deshidratadas de MERK, DIFCO, OXOID Y BIOKAR DIAGNOSTICS. Etc.

Identificación Taxonómica De Las Levaduras Aisladas

Como ya se ha comentado, las pruebas ensayadas en este trabajo, fueron las descritas por autores tales como Kreger van Rij, Lodder, Barnet etc., en base a la metodología empleada por estos y a la capacidad de realización de las mismas. Estas pruebas fueron las siguientes:

Características Morfológicas De Las Células

Las características buscadas son las siguientes:

- **Tamaño y Forma de las células:** apiculada, esférica, ovoide... Se realizan preparaciones en fresco suspendiendo una porción del cultivo de levaduras de 48 horas a 28°C, en una gota de agua. Se añade una gota pequeña de lugol y se cubre con un cubreobjetos. Se examina por observación microscópica a 1000 aumentos. En lugar de lugol se puede emplear azul de metileno.

- **Reproducción vegetativa:** Para la observación de la reproducción asexual se emplea el mismo método de observación descrito anteriormente. Las levaduras se multiplican de forma asexual mediante:
 - * Gemación: formación de yemas o blastos bien unipolar, bipolar o multilateralmente
 - * Escisión: formación de un tabique transversal.
 - * Combinación de ambos procedimientos.

- **Formación de micelio o pseudomicelio:** La técnica que se ha de llevar a cabo para a realización de esta prueba es la que sigue: En el interior de una placa Petri estéril se ha de introducir una varilla de vidrio en forma de “U”, y sobre ésta un portaobjetos. Se prepara agar malta (o cualquiera de los agar patata) que, fundido, se extiende sobre el portaobjetos y, una vez ha solidificado se siembra en línea con la levadura objeto de estudio. A continuación se pone un cubreobjetos de forma que quede la mitad del portaobjetos cubierto y la otra mitad sin cubrir. Para evitar que durante la incubación se pueda secar el agar, se ha de cubrir el fondo de la placa Petri con agua estéril. A continuación se lleva a estufa donde permanece durante 4-5 días a 28 °C para observarlo transcurrido este tiempo al microscopio óptico con pocos aumentos. (Harrigan y col., 1979).

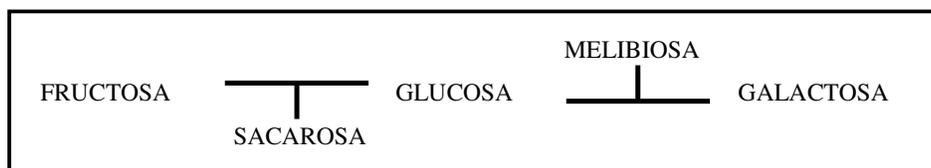
Características De Los Cultivos

- **Crecimiento en medio sólido:** El crecimiento que las levaduras presentan en medio sólido, la morfología de sus colonias, varía de unas especies a otras, siendo este uno de los parámetros que nos permiten distinguir taxonómicamente las especies unas de otras. Una vez transcurrido el periodo de incubación en medio YPD a 28 °C durante varios días, los factores que se han de tener en cuenta son los siguientes: borde (puede ser con flecos, entero, liso, lobulado, ondulado, recortado, rizado, etc.), color (amarillo, beige, blanco, marrón, naranja, rojo, etc.), elevación (ya sea abultada, plana, etc.), superficie (verrugosa, brillante, estriada, hirsuta, lisa, opaca, peluda, rugosa, etc.), textura (mucoide o viscosa, butirosa, compacta, etc.).
- **Crecimiento en medio líquido:** la realización de esta prueba tiene como fin poder determinar el tipo de crecimiento que presentan las diferentes levaduras objeto de estudio en medio líquido. Se apuntará la presencia de sedimento, turbidez del medio, velo y anillo. La aparición de velo (película en la superficie del medio líquido) se debe a la demanda o necesidad de oxígeno por parte de las levaduras, si bien pueden presentar velo los cultivos tanto de levaduras fermentadoras como no fermentadoras. El medio elegido para esta prueba es el denominado GYPW que a continuación se detalla para 1 L de medio: Extracto de levadura 5 g, Peptona 10 g, Glucosa 20 g, Agua 1 L.
- **Formación de ascosporas:** Como ya se ha indicado, la forma “normal” o habitual de reproducción de las levaduras es mediante gemación. Sin embargo, algunos géneros de levaduras presentan la capacidad reproducción en medios pobres en nutrientes, mediante la formación de ascosporas.. Una célula de levadura forma una costra a su alrededor (asca) y se multiplica en su interior en varias células (esporas) a costa de ella. La esporulación se induce cultivando la levadura sobre un medio rico en nutrientes y con glucosa como fuente de energía o medio de pre-esporulación (Glucosa 5%, Extracto de levadura 1%, Peptona 3%, Agar 2%), en el que permanece durante dos días a 28 °C, pasando a continuación a otro medio de cultivo, medio de esporulación (Glucosa 0.1 %, Extracto de levadura 0.25%, Acetato potásico 1%, Agar 2 %), pobre en nutrientes y glucosa, con acetato potásico, en el que permanece durante cinco días a 28 °C. Pasado el periodo de incubación en el segundo medio, se realiza una preparación con fijación y tinción de las esporas,

seguida de observación a 1000 aumentos (con aceite de inmersión). En caso de que la levadura no esporule, dejaremos el cultivo a temperatura ambiente durante algunas semanas (4-6 semanas) e iremos observando si pasado este tiempo ha esporulado o no.

Características Fisiológicas Y Bioquímicas

- **Fermentación de carbohidratos:** La levadura se siembra en medio líquido, la baja concentración de oxígeno en el fondo del tubo hace que, si la levadura es fermentativa, emplee el azúcar en estudio formando etanol y CO₂. Se siembra la levadura en tubos (con tubos invertidos Durham) que contengan caldos para la fermentación de carbohidratos. Debe emplearse un control que no contenga carbohidrato, ya que el contenido en trealosa de algunas tandas de extracto de levadura puede ser lo suficientemente elevado como para que tenga lugar una fermentación detectable con las levaduras que fermentan esta sustancia (Harrigan y col., 1979). Los azúcares empleados son glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, trealosa, celobiosa, melezitosa y rafinosa. El medio de fermentación contiene Extracto de levadura al 0.5%, Azúcar a examen al 2% (excepto Rafinosa al 4 %) y Agua destilada 100 mL. Éste se reparte en tubos de ensayo, que poseen en su interior una campana Durham, a razón de 10 mL en cada uno, esterilizándose a 0.5 atmósferas durante 15 minutos. Los tubos se siembran con la levadura a estudio, incubándose a 28 °C y se observan durante 28 días. El gas resultante de la fermentación, caso que esta se produzca, sería recogido en la campana Durham. En el caso de la rafinosa, al estar compuesto por tres hexosas:



La fermentación puede ser 1/3, si queda melibiosa o sacarosa en el medio, 2/3 si queda galactosa libre o completa, si no hay restos de azúcares.

Para su comprobación, se llevan a cabo las siguientes pruebas:

- * **Presencia de azúcares reductores:** 1 mL del líquido fermentado se mezcla con 5 mL del reactivo de Luff en un tubo de ensayo y se calienta a ebullición.

Si el azúcar reductor se encuentra en el medio este se pondrá de color verde, en caso contrario seguirá azul.

- * *Presencia de glucosa:* 1 mL del líquido fermentado se mezcla con 2 mL de HCl (1:10) en tubos de ensayo. Se calienta al baño María, se añade una gota de naranja de metilo y se neutraliza con carbonato sódico gota a gota. La presencia de glucosa se detecta con una tira de papel indicador de esta sustancia.
- * *Presencia de fructosa:* 1 mL del líquido fermentado se mezcla con 0.5 mL de reactivo metilindol y 3 mL de HCl (conc). Si la fructosa se encuentra en el medio el color naranja pasa a rojo.

| Azúcar reductor | Glucosa | Fructosa | Fermentación |
|------------------------|----------------|-----------------|--------------------------|
| + | + | - | 1/3 (Residual Melibiosa) |
| - | + | + | 1/3 (Residual Sacarosa) |
| + | - | - | 2/3 (Residual Galactosa) |
| - | - | - | Completa |

- *Asimilación de azúcares:* Esta prueba se realiza con aquellas cepas que no han fermentado los azúcares a examen, ya que toda cepa que fermenta un azúcar determinado, es capaz de asimilarlo. Se trata de conocer qué cepas son capaces de metabolizarlo únicamente por vía oxidativa. El método en el que se emplean medios de cultivo líquidos fue descrito por Wickerham y Burton en 1948. Los resultados pueden mejorar si se agita durante la incubación. Únicamente pueden ser empleados reactivos de muy alta pureza puesto que pequeñas impurezas pueden estar presentes y falsear los resultados (por ejemplo D-glucosa en la maltosa o D-galactosa en L-arabinosa). Tanto el medio de asimilación de azúcares como el testigo se reparten a razón de 10 mL por tubo y se esterilizan a 1 atmósfera durante 15 minutos. Los medios se siembran con la levadura objeto de estudio y se incuban a 28 °C. Durante un mes se observan estos, comparando el testigo con los medios que contienen azúcar. Algunos autores mantienen el test durante tres semanas, otros durante cuatro. Estos largos periodos de incubación permiten a la levadura adaptarse a emplear ciertos compuestos. Tubo positivo será aquel que presenta una turbidez superior al testigo. Los azúcares ensayados son los siguientes: almidón soluble, celobiosa, D-xilosa, galactosa, glucosa, L-arabinosa, L-ramnosa, L-sorbosa, lactosa,

maltosa, melibiosa, rafinosa, sacarosa y trealosa. El medio de asimilación contiene Yeast Nitrogen Base al 0.67%, Azúcar a examen al 1% y Agua destilada 100 mL. Por otra parte, el medio testigo posee Yeast Nitrogen Base al 0.67% y Agua destilada 100 ml

- **Asimilación de nitratos:** Esta prueba se realiza para conocer si una cepa es capaz de emplear nitrato como única fuente de nitrógeno. La metodología para llevarla a cabo es igual a la empleada para la asimilación de azúcares. La composición del medio de asimilación sería: Yeast Carbon Base al 1.17%, Nitrato potásico al 0.78% y Agua destilada 100 mL. El medio testigo tendría: Yeast Carbon Base al 1.17% y Agua destilada 100 mL

- **Desarrollo en presencia de etanol:** Esta prueba tiene como finalidad conocer si una cepa es capaz de emplear el etanol como única fuente de carbono. La metodología es igual a la de asimilación de azúcares pero con la salvedad que en esta ocasión la esterilización del medio ha de realizarse mediante filtración. La levadura que se va a estudiar se siembra muy ligeramente un tubo de medio con etanol, sembrando al mismo tiempo otro tubo de medio sin etanol. Ambos se incuban a 28 °C durante un periodo de hasta tres semanas, examinándolos con frecuencia para observar el crecimiento. El medio de asimilación contiene Yeast Nitrogen Base al 0.67%, un 3% de Etanol y 100 mL de Agua destilada. El medio testigo posee Yeast Nitrogen Base 0.67% y 100 mL de Agua destilada.

- **Hidrólisis de la arbutina:** La realización de esta prueba permite conocer si la cepa de levadura que estamos ensayando posee actividad β -glucosidasa. En caso de que así sea, la levadura será capaz de hidrolizar la arbutina (hidroquinona β -D-glucopiranosido), liberando al medio la hidroquinona libre. Se produce en el medio una coloración parda-obscura por reacción de la hidroquinona con la sal férrica soluble que incorpora el medio. Para la preparación del medio de cultivo, se funde este y se incorpora la arbutina. Una vez se alcanzan los 40-45 °C se añaden al medio unas gotas de cloruro férrico al 25 % estéril. Agitando se ha de verter en placas de Petri estéril donde enfría. Se siembra en estría la cepa objeto de estudio y se lleva a incubar a 28 °C durante 2-7 días. Al mismo tiempo una de las placas con el medio de cultivo, que no ha sido sembrada, se ha de incubar, a fin de servir de control o

blanco para comparación con las sembradas con las levaduras. Si las levaduras dan positiva esta prueba, pasado el periodo de incubación podremos observar una coloración marron-parda en el medio.

- ❑ **Resistencia a la actidiona (Cicloheximida):** Se siembra la levadura en Y.N.B. (Yeast Nitrogen Base), esterilizada por filtración, conteniendo un 0.5% de glucosa y 100 µg de actidiona por mL. Se incuba a 25 °C durante 4 semanas, examinándolo semanalmente para observar el crecimiento. Si se produce un crecimiento bueno en la primera semana, se deduce que la resistencia es elevada. Si al cabo de 3 o 4 semanas el crecimiento es escaso o nulo, se deduce que la sensibilidad es alta.
- ❑ **Crecimiento a 37 °C** en medio de cultivo YPD agar. La mayoría de las especies de levaduras presentan una temperatura óptima de crecimiento entre 20 y 28 °C. Una placa con agar YPD se inocula con células pertenecientes a un cultivo joven y se incuban a la temperatura indicada durante cuatro días hasta su lectura.
- ❑ **Resistencia a las altas presiones osmóticas:** Crecimiento en medio con glucosa al 50% y 60%. Las levaduras que provienen de substratos ricos en azúcar o sales suelen presentar resistencia a las altas presiones osmóticas. Muchas especies de levadura crecen bien a concentraciones de glucosa del 40% en peso mientras que son pocas las que lo hacen a concentraciones del orden de 50-70%. La capacidad de crecer a elevadas concentraciones de azúcar se determina generalmente en medios agarizados que contengan 50% y 60% de glucosa. Los citados medios de cultivo tienden rápidamente a deshidratarse por lo que se recomienda realizar el cultivo con las placas en bolsas de plástico herméticamente cerradas o bien precintándolas mediante una cinta adhesiva (si bien esta segunda opción podría tener un efecto adverso en el crecimiento al impedirse la aireación).

Sistemas De Identificación API

Por lo que respecta al sistema **API ZYM**, la composición de los reactivos a emplear se describe a continuación: **ZYM A** (Tri-hidroxi-metil-amino-metano: 250 g.; Ácido clorhídrico al 37%: 110 mL; Lauril sulfato: 100 g.; Agua destilada: csp 1000 mL)(Ref. 70480 BioMérieux), **ZYM B** (Fast Blue BB: 3.5 g.; 2-metoxi-etanol: csp 1000mL)(Ref 70480 BioMérieux).

La preparación de la muestra en el API ZYM consiste en diluir la misma en un volumen de, al menos, 2 mL de agua destilada o de medio acuoso no tamponado (por ejemplo suero fisiológico). Para los microorganismos se ha de preparar una suspensión de densidad óptica determinada (Tubo 5-6 de la escala de McFarland (Ref.70900 BioMérieux)) en agua destilada o en medio isotónico a partir de un aislamiento en medio sólido de un cultivo puro o de un depósito de centrifugación de un cultivo en medio líquido. Es muy importante para la obtención de resultados reproducibles que las cepas a comparar hayan sido cultivadas en un mismo medio, que las suspensiones hayan sido hechas en el mismo líquido y que presenten la misma densidad óptica. Esta técnica permite poner en evidencia los enzimas inducibles pudiendo ser detectados añadiendo al medio de cultivo el/los inductores correspondientes.

Una vez preparada la muestra se reparte esta en las cúpulas de la galería poniendo con la pipeta 65 µL por cúpula. Se pone a incubar a la temperatura óptima durante algunas horas (en nuestro caso 4 horas a 28-30 °C). Las condiciones de tiempo y temperatura pueden variar en función del tipo de muestra pero han de ser idénticas en el marco de un trabajo dado.

Después de incubar, y para la lectura de la galería, se añade una gota de reactivo ZYM A y una gota de ZYM B en cada cúpula. El hecho de poner una gota de un agente tensoactivo (ZYM A) permite facilitar la solubilización del reactivo ZYM B en el medio. De otra forma podría formarse un precipitado alterándose la reacción. Se ha de dejar desarrollar la coloración durante cinco minutos y a continuación exponer la galería una decena de segundos a la luz de una lámpara de alta potencia (1000 W) situada a una distancia de 10 cm, con el fin de eliminar el fondo amarillo debido al exceso de Fast Blue BB que no ha reaccionado y volver de esta forma incoloras las reacciones negativas. Una exposición prolongada a la luz solar posee el mismo efecto.

Para la toma de resultados se efectúa la lectura y anotación de los mismos de 0 a 5 según la ficha correspondiente suministrada por el fabricante. El valor 0 corresponde a una reacción negativa y el 5 a una reacción de intensidad de intensidad máxima.

Por su parte, para realizar el Sistema *API ID32 A*, los medios y reactivos que se emplearon para la realización de la prueba fueron: **Reactivo JAMES** (Compuesto J 2183 0.5 g, HCl csp 100 mL)(Ref 70540 BioMérieux), **Reactivo NIT 1** (Ácido sulfanílico 0.8 g, Ácido acético 100 mL)(Ref. 70440 BioMérieux), **Reactivo NIT 2** (N-N-dimetil-1-naftilamina 0.6 g, Ácido acético 5N 100 mL)(Ref. 70450 BioMérieux) y

Reactivo FB (Fast Blue BB 0.35 g, Solventes orgánicos 100 mL)(Ref. 70560 BioMérieux).

Para la preparación de la muestra, se tomaron colonias que se encontraban en MYPD y se resembraron en YPD, incubando a 28 °C durante 24-48 horas. Para preparar el inóculo, se abre una ampolla de Suspension Medium o bien se prepara un tubo con 2 mL de agua destilada estéril sin aditivo. Mediante un escobillón estéril se recoge el cultivo y se realiza una suspensión que presente una turbidez igual al patrón 4 de McFarland. Para la inoculación de la galería basta con dispensar una vez homogeneizada la suspensión 55 µL de esta por cúpula. El test denominado URE se ha de cubrir con una o dos gotas de aceite de parafina. Una vez realizado el inóculo se cierra con tapa la galería y se lleva a incubar durante cuatro horas a 28-30 °C. Para llevar a cabo la lectura de la galería, se revelan todas las reacciones de la fila 0. Para ello, el test NIT se ha de añadir una gota de NIT 1 y NIT 2; para el test IND se añade una gota del reactivo JAMES; finalmente para los test del PAL a SerA se añade una gota de reactivo FB. La lectura de los resultados se realiza tras cinco minutos (no pasar de diez minutos).

Finalmente, para llevar a cabo la identificación mediante el sistema *API ID32 C*, se empleó la siguiente técnica:

Previo a la preparación del inóculo se resembraron las levaduras a identificar desde el medio de conservación a medio YPD y se incubaron durante 24-48 horas hasta obtener un crecimiento importante.

Para preparar el inóculo se emplearon ampollas de Suspension Medium (Ref. 70600 BioMérieux). Se tomaron una o varias colonias del medio preparado anteriormente y se realizó una suspensión con las mismas en Suspension Medium hasta obtener una turbidez igual al patrón 2 de McFarland. A continuación se transfieren 250 µL de la suspensión precedente a una ampolla de C Medium (BioMérieux).

Para llevar a cabo la inoculación en las galerías, una vez homogeneizada la suspensión en C Medium, se dispensan 135 µL por cúpula. La galería se cubre mediante la tapa correspondiente y se lleva a estufa de incubación durante 24-48 horas a 28 °C. Pasado este tiempo se realiza lectura visual comparando con el control y anotándose como positivos aquellas cúpulas en las que aparece turbidez.

A continuación, los resultados obtenidos se han de contrastar con los recogidos en la base de datos que incorpora el Kit.

Interpretación De Los Resultados

Una vez concluidas las pruebas mencionadas se comparan los resultados obtenidos con las claves de identificación taxonómicas descritas por Kurtzman, C.P. (1998) deduciéndose de estas el nombre o los posibles nombres de las cepas estudiadas.

Resultados

I.- CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS

| UVAS | Bobal | Cavernet | Jaén Blanco | Tempranillo | Macabeo | Blancas (Mezcla) | Tintas (Mezcla) |
|-------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Diámetro (cm) | 5.32 ± 0.10 | 3.43 ± 0.15 | 5.14 ± 0.14 | 4.81 ± 0.09 | 5.49 ± 0.12 | - | - |
| Longitud (cm) | 1.56 ± 0.12 | 1.01 ± 0.09 | 1.53 ± 0.13 | 1.45 ± 0.11 | 1.59 ± 0.10 | - | - |
| Peso (g/100 granos uvas) | 245.0 ± 8.2 | 93.0 ± 9.6 | 213.0 ± 9.5 | 172.0 ± 8.4 | 213.0 ± 3.5 | 202.0 ± 5.7 | 177.0 ± 10.0 |
| Rendimiento (%) | 47.08 ± 2.82 | 57.56 ± 4.57 | 48.11 ± 3.76 | 60.21 ± 3.21 | 53.04 ± 2.86 | 49.23 ± 5.7 | 45.04 ± 4.77 |
| Acidez Total (g/L tartárico) | 4.84 ± 0.31 | 5.90 ± 0.26 | 3.97 ± 0.20 | 4.27 ± 0.27 | 4.05 ± 0.18 | 4.83 ± 0.36 | 5.71 ± 0.31 |
| pH | 4.8 ± 0.1 | 3.3 ± 0.3 | 3.7 ± 0.2 | 3.9 ± 0.2 | 3.8 ± 0.1 | 3.6 ± 0.2 | 3.7 ± 0.2 |
| Densidad (g/cc) | 1.11568 ± 0.00172 | 1.10253 ± 0.00131 | 1.08258 ± 0.00098 | 1.09095 ± 0.00153 | 1.08487 ± 0.00129 | 1.09762 ± 0.00184 | 1.07827 ± 0.00106 |
| Azúcares Totales (g/l) | 217.3 ± 10.3 | 255.4 ± 12.6 | 191.9 ± 9.8 | 244.0 ± 11.2 | 196.5 ± 10.8 | 220.6 ± 10.5 | 186.3 ± 12.6 |
| Glucosa (g/l) | 161.36 ± 0.52 | 120.60 ± 1.55 | 123.76 ± 2.10 | 137.86 ± 1.26 | 108.98 ± 0.91 | 121.23 ± 1.41 | 120.17 ± 2.04 |
| Fructosa (g/l) | 127.22 ± 1.67 | 113.00 ± 1.23 | 109.84 ± 0.75 | 118.53 ± 1.93 | 89.29 ± 1.58 | 108.14 ± 2.11 | 97.38 ± 1.29 |
| Glu/Fru | 1.268 ± 0.086 | 1.070 ± 0.094 | 1.127 ± 0.066 | 1.160 ± 0.081 | 1.220 ± 0.072 | 1.121 ± 0.090 | 1.234 ± 0.074 |
| Nitrógeno (mg/100 ml) | 60.37 ± 5.92 | 90.55 ± 7.36 | 105.64 ± 6.59 | 75.46 ± 9.23 | 90.55 ± 6.34 | 78.70 ± 5.19 | 77.40 ± 7.95 |

Tabla 31: Resumen estadístico de los resultados obtenidos tras el estudio de los principales parámetros fisicoquímicos en uvas de la zona (n=6).

| Estudio de Madurez | | | | | | | |
|-------------------------------------|---------------|-----------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Prieto Picuda | Sauvignon Blanc | Garnacha | Viura | Colombard | Syrah | Vermentino |
| Azúcares totales (g/l) | 225.0 ± 10.8 | 220.0 ± 12.6 | 205.0 ± 9.8 | 205.0 ± 10.3 | 205.0 ± 11.0 | 210.0 ± 10.7 | 210.0 ± 10.5 |
| Acidez Total (g/L tartárico) | 4.65 ± 0.21 | 7.12 ± 0.19 | 4.87 ± 0.30 | 5.17 ± 0.26 | 5.18 ± 0.22 | 5.18 ± 0.38 | 5.55 ± 0.33 |

Tabla 32: Estudio complementario de madurez en otras uvas estudiadas en la Comarca vitícola de Laujar (Almería)

| MOSTOS | Bobal | Jaén Tinto | Jaén Blanco | Tempranillo | Macabeo | Monastrell | Blancas | Tintas |
|-------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| pH | 3.4 ± 0.1 | 3.4 ± 0.1 | 3.6 ± 0.2 | 3.4 ± 0.1 | 3.3 ± 0.2 | 4.4 ± 0.3 | 4.3 ± 0.3 | 4.4 ± 0.2 |
| Acidez Total (g/L tartárico) | 7.29 ± 0.45 | 5.76 ± 0.26 | 4.13 ± 0.28 | 7.85 ± 0.40 | 4.93 ± 0.35 | 3.42 ± 0.33 | 3.40 ± 0.38 | 3.90 ± 0.42 |
| Densidad (g/cc) | 1.10030 ± 0.00095 | 1.11849 ± 0.00174 | 1.10523 ± 0.00168 | 1.08248 ± 0.00103 | 1.08696 ± 0.00181 | 1.09348 ± 0.00101 | 1.09269 ± 0.00076 | 1.09797 ± 0.00187 |
| Sulfuroso libre (mg/L) | 12.8 ± 0.5 | 3.2 ± 0.7 | 10.1 ± 0.7 | 12.8 ± 0.8 | 9.6 ± 0.5 | 9.5 ± 0.6 | 8.7 ± 0.6 | 9.0 ± 0.4 |
| Sulfuroso comb. (mg/L) | 51.2 ± 0.6 | 51.2 ± 0.5 | 54.3 ± 0.6 | 57.6 ± 0.8 | 28.8 ± 0.7 | 30.7 ± 0.4 | 60.1 ± 0.5 | 35.4 ± 0.5 |
| Azucares Totales (g/L) | 182.3 ± 9.5 | 273.2 ± 14.2 | 197.0 ± 11.7 | 214.8 ± 8.9 | 214.8 ± 15.4 | 182.0 ± 10.4 | 214.8 ± 12.1 | 226.4 ± 9.8 |
| Polif. Totales (g/L) | 246.0 ± 16.0 | 1072.0 ± 12.9 | 411.5 ± 14.3 | 442.7 ± 9.8 | 247.3 ± 17.5 | 398.2 ± 11.4 | 163.0 ± 12.8 | 491.0 ± 15.5 |
| Indice F. C. | 1.93 ± 0.1 | 20.9 ± 0.5 | 22.12 ± 0.5 | 17.9 ± 0.4 | 3.88 ± 0.1 | 18.26 ± 0.3 | 7.4 ± 0.3 | 9.1 ± 0.2 |

Tabla 33: Resultados obtenidos tras el estudio de los principales parámetros fisicoquímicos en mostos de la zona

| VINOS | Bobal | Rosado | Jaén blanco | Tempranillo | Macabeo | Blanco | Tinto |
|-------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------------------|----------------------|-------------------|
| Acidez Total (g/L tartárico) | 6.37 ± 0.39 | 6.21 ± 2.51 | 6.31 ± 1.14 | 6.94 ± 0.93 | 6.88 ± 0.62 | 5.87 ± 1.10 | 5.69 ± 0.71 |
| pH | 3.58 ± 0.06 | 3.42 ± 0.16 | 3.31 ± 0.10 | 3.19 ± 0.12 | 3.19 ± 0.12 | 3.44 ± 0.16 | 3.52 ± 0.10 |
| Densidad (g/cc) | 0.97327 ± 0.00290 | 0.98761 ± 0.00162 | 0.98906 ± 0.00158 | 0.98916 ± 0.00112 | 0.99192 ± 9.6x10 ⁻⁴ | 0.98879 ± 0.00302 | 0.90086 ± 0.00152 |
| Sulfuroso libre (mg/L) | 15.80 ± 4.72 | 6.20 ± 3.81 | 16.98 ± 5.63 | 26.90 ± 6.61 | 9.6 ± 4.17 | 15.36 ± 5.06 | 18.55 ± 6.33 |
| Sulfuroso comb. (mg/L) | 110.13 ± 12.55 | 65.37 ± 7.04 | 92.84 ± 9.06 | 127.31 ± 6.12 | 28.80 ± 8.85 | 34.56 ± 7.14 | 56.80 ± 9.02 |
| Acidez volátil (g/L acético) | 0.39 ± 0.15 | 0.52 ± 0.09 | 0.38 ± 0.10 | 0.45 ± 0.12 | 0.22 ± 0.07 | 0.34 ± 0.18 | 0.43 ± 0.11 |
| Acidez Fija (g/L tartárico) | 5.88 ± 0.16 | 5.56 ± 0.25 | 5.83 ± 0.19 | 6.38 ± 0.33 | 6.60 ± 0.21 | 5.44 ± 0.19 | 5.45 ± 0.12 |
| Azúcares Red. (g/L) | 2.05 ± 0.57 | 2.31 ± 0.35 | 1.70 ± 0.28 | 1.85 ± 0.90 | 1.96 ± 0.32 | 1.74 ± 0.50 | 1.81 ± 0.47 |
| Glucosa | 0.07 ± 0.02 | 0.08 ± 0.01 | 0.12 ± 0.02 | 0.09 ± 0.02 | 0.07 ± 0.01 | 0.09 ± 0.01 | 0.10 ± 0.02 |
| Fructosa | 0.13 ± 0.026 | 0.12 ± 0.034 | 0.20 ± 0.049 | 0.132 ± 0.066 | 0.16 ± 0.050 | 0.18 ± 0.047 | 0.17 ± 0.044 |
| Glu/Fru | 0.55 ± 0.05 | 0.64 ± 0.09 | 0.63 ± 0.06 | 0.65 ± 0.08 | 0.64 ± 0.08 | 0.62 ± 0.09 | 0.61 ± 0.09 |
| Glicerina (g/L) | 7.60 ± 0.48 | 7.50 ± 0.42 | 7.32 ± 0.50 | 7.12 ± 0.51 | 6.26 ± 0.39 | 7.00 ± 0.53 | 7.21 ± 0.40 |
| Grado Alcohólico (G.L.) | 13.04 ± 0.11 | 13.15 ± 0.31 | 11.70 ± 0.25 | 11.47 ± 0.39 | 12.44 ± 0.33 | 11.91 ± 0.20 | 12.30 ± 0.40 |

Tabla 34: Resultados obtenidos tras el estudio de los principales parámetros fisicoquímicos en vinos de la zona.

Indices Cromáticos

| VINOS | Bobal | Rosado | Jaén blanco | Tempranillo | Macabeo |
|------------------------------|--------------|---------------|--------------------|--------------------|----------------|
| Long. Onda Dom (nm). | 686.4 | 619.0 | 565.6 | 686.4 | 569.6 |
| Pureza (%) | 14.06 | 31.43 | 9.26 | 19.44 | 6.66 |
| Lumin. Relativ | 19.78 | 33.59 | 92.44 | 22.02 | 95.74 |
| C (croma) | 17.47 | 43.097 | 8.031 | 16.83 | 4.802 |
| L (claridad) | 51.57 | 64.62 | 97.30 | 66.64 | 97.70 |
| a | 17.45 | 34.74 | -0.969 | 16.15 | -0.431 |
| b | 3.86 | 16.67 | 7.972 | 4.73 | 4.783 |
| H (tono) | 15.83 | 22.76 | 83.069 | 16.33 | 84.85 |
| S (saturación) | 0.339 | 0.567 | 0.0825 | 0.253 | 0.049 |
| Polif. Totales (mg/L) | 1725.6 | 624.2 | 279.7 | 1516.4 | 341.7 |

Tabla 35: Indices cromáticos

| Acidos Orgánicos Individuales | | | |
|--------------------------------------|----------------------|-------------------------|--------------------------|
| | Ac. Tartárico | Ac. Málico (g/L) | Ac. Láctico (g/L) |
| Bobal | 3.85 | 1.24 | 1.22 |
| J.Blanco | 5.11 | 1.44 | 0.80 |
| Macabeo | 5.76 | 0.89 | 0.64 |
| Tempranillo | 3.76 | 2.15 | 1.11 |
| Rosado | 3.69 | 1.39 | 1.10 |
| Prieto Picuda | 6.50 | 0.41 | 1.04 |
| Sauvignon Blanc | 3.30 | 0.59 | 1.16 |
| Garnacha | 6.80 | 0.80 | 1.14 |
| Viura | 3.14 | 1.11 | 1.16 |
| Colombard | 5.70 | 1.74 | 1.02 |
| Syrah | 6.30 | 1.15 | 0.93 |
| Vermentino | 5.8 | 0.96 | 1.10 |

Tabla 36: Resumen estadístico de los valores obtenidos en el estudio específico de la fermentación maloláctica.

| Alcoholes, Aldehidos y Esteres | | | | | | | |
|---------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Bobal | Rosado | Jaén Blanco | Tempranillo | Macabeo | Blanco | Tinto |
| Acetaldehido | 94.5 | 72.7 | 66.8 | 87.6 | 47.4 | 82.4 | 76.4 |
| Acetato de Metilo | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Acetato de Etilo | 63.1 | 77.7 | 103.6 | 107.4 | 61.4 | 94.3 | 106.7 |
| Metanol | 67.2 | 60.3 | 59.5 | 62.4 | 24.3 | 43.1 | 74.2 |
| Propanol | 24.2 | 25.8 | 31.7 | 22.4 | 23.8 | 24.3 | 23.8 |
| Isobutanol | 34.7 | 23.2 | 30.7 | 29.4 | 39.7 | 30.1 | 49.3 |
| Butanol | 4.8×10^{-3} | 4.2×10^{-3} | 4.3×10^{-3} | 5.0×10^{-3} | 4.1×10^{-3} | 4.5×10^{-3} | 4.7×10^{-3} |
| Isoamilicos | 187.4 | 164.3 | 155.1 | 137.9 | 144.9 | 143.7 | ----- |

Tabla 37: Resumen estadístico de los resultados obtenidos tras el estudio de alcoholes, aldehidos y ésteres, expresados en mg/l.??

| | Mostos (mg/L) | | Vinos (mg/L) | | | | | |
|-----------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|
| | | | Blancos | | Rosados | | Tintos | |
| | $x \pm \sigma_{n-1}$ | Rango |
| Sodio | 14.0 ± 4.1 | 13.7-28.7 | 16.94 ± 0.38 | 16.00-17.03 | 16.27 ± 0.36 | 15.84-16.69 | 10.92 ± 1.70 | 6.72-11.12 |
| Potasio | 863.2 ± 276.3 | 447.5-1390 | 546.70 ± 52.7 | 442.5-590.8 | 499.6 ± 38.4 | 423.2-533.6 | 648.7 ± 37.75 | 574.8-682.6 |
| Calcio | 168.7 ± 23.2 | 149.9-216.0 | 82.3 ± 23.8 | 45.6-106.0 | 47.8 ± 26.3 | 22.3-98.6 | 81.50 ± 28.13 | 29.2-113.8 |
| Magnesio | 52.8 ± 9.1 | 40.0-66.5 | 55.18 ± 7.04 | 40.31-62.27 | 49.52 ± 5.35 | 41.13-59.25 | 56.45 ± 2.18 | 52.14-58.56 |
| Hierro | 1.66 ± 0.57 | 1.00-3.00 | 2.40 ± 0.01 | 2.38-2.41 | 2.54 ± 0.62 | 1.42-3.77 | 3.92 ± 0.94 | 1.79-4.65 |

Tabla 38: Contenido de Na, K, Ca, Mg y Fe en los vinos analizados

II.- ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

Los resultados obtenidos en el análisis microbiológico de los vinos estudiados durante la presente Tesis Doctoral, se expresan a continuación en forma de tablas donde aparecen las medias de los valores obtenidos para cada vino a lo largo de diferentes muestreos.

Tabla 39: Análisis microbiológico de vinos

| VINO | BACTERIAS TOTALES/100 mL | BACTERIAS ACIDÓFILAS/100mL |
|-------------|--------------------------|----------------------------|
| Jaén Blanco | 200 | 100 |
| Bobal | 15 | <10 |
| Tempranillo | 820 | 500 |
| Macabeo | <10 | <10 |
| Rosado | <10 | <10 |

Por lo que respecta a los resultados obtenidos en el aislamiento y caracterización de la flora autóctona presente en las uvas y mostos pertenecientes a la Cooperativa vitivinícola Bodegas Valle de Laujar, a continuación se expresan en forma de tablas.

Tabla 40: Especies de levaduras que fueron aisladas en las muestras de uvas y porcentaje de cada una de ellas en el total de los aislamientos.

| ESPECIE AISLADA | PORCENTAJE (%) |
|------------------------------|----------------|
| <i>Candida valida</i> | 9.09 |
| <i>Candida stellata</i> | 29.09 |
| <i>Kloeckera apiculata</i> | 23.64 |
| <i>Pichia anomala</i> | 3.63 |
| <i>Rhodotorula glutinis</i> | 32.73 |
| <i>Trichosporon cutaneum</i> | 1.82 |

Por su parte, en la siguiente tabla (Tabla 41) se muestran los resultados obtenidos en los aislamientos realizados en los mostos, así como los porcentajes de participación de cada especie en las diferentes fases fermentativas. Destacar que, puesto que en ningún caso se produjeron velos superficiales tras la fase de fermentación lenta, no hubo de realizarse toma de muestras de los mismos y por tanto no se aislaron levaduras en ese momento.

Tabla 41: Porcentaje de aislamiento de levaduras en mostos.

| ESPECIE AISLADA | 1ª FASE (%) | 2ª FASE (%) | 3ª FASE (%) |
|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 18 | 88.8 | 100 |
| <i>Kloeckera apiculata</i> | 52 | 11.2 | - |
| <i>Candida stellata</i> | 22 | - | - |
| <i>Pichia anomala</i> | 2 | - | - |
| <i>Rhodotorula glutinis</i> | 6 | - | - |

A continuación se presentan los resultados que se han obtenido para la determinación de cada una de las especies aisladas en el presente trabajo.

***Rhodotorula glutinis*:** La especie *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) F.C. Harrison (1928) presenta dos variedades: *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) F.C. Harrison var. *glutinis* (1958) y *Rhodotorula glutinis* var. *dairenensis*. La variedad *R. glutinis* var. *dairenensis* es similar a *R. glutinis* var. *glutinis* excepto que asimila los nitratos débilmente, no asimila el 2-Ceto-D-Gluconato y requiere Tiamina para su crecimiento. El análisis de secuencias de nucleótidos indica que la variedad *dairenensis* presenta unas relaciones filogenéticas más cercanas a *R. mucilaginosa* que a la variedad *glutinis*.

Las características del crecimiento en agar extracto de malta al 5% son las siguientes: tras un mes de incubación a 25 °C, la morfología celular es igual a la que presenta en extracto de malta excepto que la células pueden ser mas alargadas. El cultivo en línea se presenta de color rojo-coral a asalmonado o ligeramente anaranjado. La superficie varia de lisa, frecuentemente con finas estriaciones transversales, a arrugada. El aspecto es de muy brillante a semibrillante. La textura varia de mucosa a ligeramente dura. La sección

transversal es desde plana a algo convexa y el borde va de irregular a entero, a menudo con un pseudomicelio rudimentario.

Las pruebas de fermentación son siempre negativas en esta especie. Por el contrario, las pruebas de asimilación originan los siguientes resultados:

Tabla 42: Pruebas de asimilación en *Rhodotorula glutinis*.

| | | | | | |
|-----------------|---|------------------------|---|-----------------------------|-----|
| Glucosa | + | D-Xilosa | v | D-Manitol | v |
| Galactosa | v | L-Arabinosa | v | D-Glucitol | v |
| L-Sorbosa | v | D-Arabinosa | v | α -Metil-D-Glucósido | v |
| Sacarosa | + | D-Ribosa | v | Salicilina | +/w |
| Maltosa | + | L-Ramnosa | v | D-Gluconato | + |
| Celobiosa | v | D-Glucosamina | - | DL-Lactato | v |
| Trealosa | + | N-Acetil-D-Glucosamina | - | Succinato | + |
| Lactosa | - | Metanol | - | Citrato | v |
| Melobiosa | - | Etanol | v | Inositol | - |
| Rafinosa | v | Glicerol | v | Hexadecano | + |
| Melezitosa | + | Eritritol | - | Nitrato | + |
| Inulina | - | Ribitol | v | Crecimiento sin vitaminas | v |
| Almidón soluble | - | Galactitol | v | | |

Tabla 43: Test de asimilación adicionales y otras características en *Rhodotorula glutinis*.

| | | | |
|---------------------------------------------|---|--------------------------|-----------|
| 2-Ceto-D-Gluconato | v | Ureasa | + |
| 5-Ceto-D-Gluconato | - | Licuefacción de gelatina | - |
| D-Glucuronato | - | Crecimiento sin Tiamina | v |
| 50% (p/p) Glucosa-Agar Extracto de levadura | - | Crecimiento a 37 °C | + |
| 10% NaCl/5% Glucosa | w | Co-Q | 10 |
| Formación de Almidón | - | Mol% G+C | 60.0-61.2 |

***Pichia anomala*:** *Pichia anomala* (E.C. Hansen) Kurtzman (1984a) se presenta en forma anamórfica como *Candida pelliculosa* Redaelli. Uno de sus sinónimos mas importantes es *Hansenula anomala*, con el que suele encontrarse en numerosas publicaciones.

Su crecimiento en agar extracto de malta al 5% después de tres días de incubación a 25 °C origina células de esféricas a elongadas, que aparecen aisladas, en parejas o en pequeños grupos. El crecimiento es butiroso y de color débilmente tostado.

El crecimiento en superficie en los medios de asimilación se realiza con formación de películas en algunas cepas y cuando estas se forman varían desde delgadas y lisas a gruesas y arrugadas.

Por lo que respecta a la formación de ascosporas, *P. anomala* es heterotálica, pero la forma ascosporógena diploide se aísla de forma habitual en la naturaleza. Las células diploides se convierten directamente en ascas y forman de una a cuatro ascosporas en forma de sombrero. Las ascosporas pueden observarse en agar extracto de malta al 5% y agar V8, entre otros medios, tras 3-10 días de incubación a 25 °C. Las características fermentativas de esta especie se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 44: Pruebas de Fermentación en *P. anomala*.

| | | | |
|-----------|---|----------|-----|
| Glucosa | + | Rafinosa | w/- |
| Galactosa | v | Trealosa | - |
| Sacarosa | + | Lactosa | - |
| Maltosa | v | | |

Tabla 45: Pruebas de Asimilación en *P. anomala*.

| | | | | | |
|-----------------|---|------------------------|---|---------------------------|---|
| Glucosa | + | D-Xilosa | v | D-Manitol | + |
| Galactosa | v | L-Arabinosa | v | D-Glucitol | + |
| L-Sorbosa | - | D-Arabinosa | - | α-Metil-D-Glucósido | + |
| Sacarosa | + | D-Ribosa | v | Salicilina | + |
| Maltosa | + | L-Ramnosa | - | D-Gluconato | v |
| Celobiosa | + | D-Glucosamina | - | DL-Lactato | + |
| Trealosa | + | N-Acetil-D-Glucosamina | - | Succinato | + |
| Lactosa | - | Metanol | - | Citrato | + |
| Melobiosa | - | Etanol | + | Inositol | - |
| Rafinosa | + | Glicerol | + | Hexadecano | - |
| Melezitosa | + | Eritritol | + | Nitrato | + |
| Inulina | - | Ribitol | v | Crecimiento sin vitaminas | + |
| Almidón soluble | + | Galactitol | - | | |

Tabla 46: Test de asimilación adicionales y otras características de crecimiento en *P. anomala*

| | | | |
|----------------------|---|-----------------------------|-----------|
| 2-Ceto-D-Gluconato | - | Licuefacción de la gelatina | - |
| 5-Ceto-D-Gluconato | - | Crecimiento a 37 °C | v |
| 10% NaCl/5% Glucosa | v | Co-Q | 7 |
| Formación de Almidón | - | Mol% G+C | 35.9-36.6 |

Candida stellata: *Candida stellata* (Kroemer & Krumbholz) S.A. Meyer & Yarrow (Yarrow and Meyer 1978) presenta como sinónimos mas importantes los de *Torulopsis stellata*, *Saccharomyces bacillaris* y *Torulopsis bacillaris*. Su crecimiento en el medio Glucosa-Extracto de levadura- Peptona, después de 3 días de incubación a 25 °C, origina células desde globosas a ovoideas. Estas aparecen aisladas o en parejas. Las características de fermentación se presentan en la siguiente tabla (Tabla 47):

Tabla 47: Pruebas de Fermentación en *C. stellata*

| | | | |
|-----------|---|----------|-----|
| Glucosa | + | Lactosa | - |
| Galactosa | - | Rafinosa | +/l |
| Sacarosa | + | Trealosa | - |
| Maltosa | - | | |

Tabla 48: Pruebas de asimilación en *C. stellata*

| | | | | | |
|-----------------|-----|------------------------|---|-----------------------------|---|
| Glucosa | + | D-Xilosa | - | D-Manitol | - |
| Galactosa | - | L-Arabinosa | - | D-Glucitol | - |
| L-Sorbosa | -/l | D-Arabinosa | - | α -Metil-D-Glucósido | - |
| Sacarosa | + | D-Ribosa | - | Salicilina | - |
| Maltosa | - | L-Ramnosa | - | D-Gluconato | - |
| Celobiosa | - | D-Glucosamina | - | DL-Lactato | - |
| Trealosa | - | N-Acetil-D-Glucosamina | n | Succinato | - |
| Lactosa | - | Metanol | - | Citrato | - |
| Melobiosa | - | Etanol | - | Inositol | - |
| Rafinosa | + | Glicerol | - | Hexadecano | n |
| Melezitosa | - | Eritritol | - | Nitrato | - |
| Inulina | - | Ribitol | - | Crecimiento sin vitaminas | - |
| Almidón soluble | - | Galactitol | - | | |

Tabla 49: Test de asimilación adicionales y otras características de crecimiento

| | | | |
|--------------------|---|----------------------------|------|
| 2-Ceto-D-Gluconato | - | D-Glucosamina ¹ | - |
| 5-Ceto-D-Gluconato | - | 50% Glucosa | +/l |
| D-Glucuronato | - | 10% NaCl/5% Glucosa | n |
| Xilitol | - | Formación de Almidón | - |
| L-Arabinitol | - | Ureasa | - |
| Arbutina | - | Crecimiento sin Biotina | - |
| Propano 1, 2 diol | - | Crecimiento sin Piridoxina | + |
| Butano 2, 3 diol | - | 0.01% Cicloheximida | - |
| Nitrito | - | Crecimiento a 30 °C | + |
| Cadaverina | - | Crecimiento a 35 °C | v |
| Creatinina | - | Crecimiento a 37 °C | - |
| L-Lisina | + | Co-Q | 8 |
| Etilamina | - | Mol% G+C | 42.0 |

¹ Utilización de D-Glucosamina como fuente de nitrógeno.

Saccharomyces cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen (1883), presenta como forma anamorfica a *Candida robusta*. Presenta mas de 95 sinónimos entre los que destacan *Saccharomyces ellipsoideus*, *S. chevalieri*, *S. mangini*, *S. carlsbergensis*, *S. oviformis*, *S. cheresiensis*, *S. italicus*, *S. uvarum*, *S. beticus*, etc.

El crecimiento en extracto de malta al 5% después de 3 días de incubación a 25 °C, origina células de forma globosa, ovoidea o elongada. Estas suelen ser observadas bien aisladas, bien en pequeños grupos. Si se realiza el cultivo a 20 °C, después de un mes de incubación se observará sedimento. Por su parte, el cultivo en agar extracto de malta al 5%, después de un mes de incubación a 20 °C, el crecimiento se observa butiroso y ligeramente coloreado en color crema. La superficie será liso, normalmente plano, ocasionalmente elevado o plegado y opaco. En los medios de asimilación esta especie no origina película en superficie. Para la formación de ascosporas, las células vegetativas se transforman directamente en ascas persistentes, que contienen de una a cuatro ascosporas (de forma globosa o algo elipsoidal). La formación de estas ascosporas, casi siempre de forma exclusiva en agar acetato, es normalmente inferior al 10% excepto en las cepas homotáticas altamente fértiles donde el rango de esporulación alcanza el 40-95% en 6-10 días a 20 °C.

Tabla 50: Pruebas de Fermentación en *S. cerevisiae*

| | | | |
|-----------|---|-----------|---|
| Glucosa | + | Lactosa | - |
| Galactosa | v | Rafinosa | + |
| Sacarosa | + | Trealosa | - |
| Maltosa | v | Melobiosa | v |

En las pruebas de asimilación los resultados esperados para la especie *Saccharomyces cerevisiae* son los siguientes:

Tabla 51: Pruebas de asimilación en *Saccharomyces cerevisiae*

| | | | | | |
|-----------|---|------------------------|---|---------------------|---|
| Glucosa | + | D-Xilosa | - | D-Manitol | - |
| Galactosa | v | L-Arabinosa | - | D-Glucitol | - |
| L-Sorbosa | - | D-Arabinosa | - | α-Metil-D-Glucósido | v |
| Sacarosa | + | D-Ribosa | - | Salicilina | - |
| Maltosa | + | L-Ramnosa | - | D-Gluconato | v |
| Celobiosa | - | D-Glucosamina | - | DL-Lactato | v |
| Trealosa | + | N-Acetil-D-Glucosamina | - | Succinato | v |

| | | | | | |
|-----------------|---|------------|---|---------------------------|---|
| Lactosa | - | Metanol | - | Citrato | - |
| Melobiosa | v | Etanol | + | Inositol | - |
| Rafinosa | + | Glicerol | - | Hexadecano | - |
| Melezitosa | v | Eritritol | - | Nitrato | - |
| Inulina | - | Ribitol | - | Crecimiento sin vitaminas | - |
| Almidón soluble | - | Galactitol | - | | |

Tabla 52: Test de asimilación adicionales y otras características de crecimiento

| | | | |
|-------------------------|---|---------------------|-----------|
| Cadaverina-HCl | - | Crecimiento a 37 °C | v |
| L-Lisina | - | Co-Q | 6 |
| Etilamina-HCl | - | Mol% G+C | 38.5-41.1 |
| Cicloheximida (100 ppm) | - | | |

El género *Kloeckera* presenta células apiculadas, de ovoideas a ovoideas-alargadas o elongadas. No forman normalmente pseudohifas y, en caso de hacerlo, estas se presentan raramente bien desarrolladas; Tampoco forman ascosporas. La fermentación de la glucosa es positiva, no asimilan los nitratos y requieren inositol y pantotenato para su desarrollo. La reacción del azul de diazonio B es negativa. El correspondiente género teleomórfico es *Hanseniaspora*.

Dentro de las siete especies reconocidas que presenta este género, *Kloeckera apiculata* es la especie tipo. Para discernir entre estas siete especies se presentan las siguientes claves:

Tabla 53: Claves para la discriminación interespecie en el género *Kloeckera*

| Especie | Fermentación de la sacarosa | Asimilación de 2-ceto-D-gluconato | Crecimiento | | | |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------|-------|-------|-------|
| | | | Cicloheximida 0.01% | 30 °C | 34 °C | 37 °C |
| <i>K. africana</i> | - | - | - | + | + | - |
| <i>K. apiculata</i> | - | + | + | + | n | - |
| <i>K. apis</i> | - | + | + | + | + | + |
| <i>K. corticus</i> | - | - | - | + | - | - |
| <i>K. japonica</i> | - | - | + | - | - | - |
| <i>K. javanica</i> | + | - | - | + | n | - |
| <i>K. lindneri</i> | - | - | + | + | n | - |

Para la determinación de *kloeckera apiculata* (Reess emend. Klöcker) Janke (1928), hemos de ver su forma teleomórfica *Hanseniaspora uvarum* (Niehaus) Sehata, Mrak & Phaff:

Hanseniaspora uvarum (Niehaus) Sehata, Mrak & Phaff. Como comentamos, la forma anamorfica es *Kloeckera apiculata*. Las características de crecimiento se describen a continuación:

El crecimiento en glucosa-extracto de levadura-agua de peptona después de dos días de incubación a 25 °C, origina células apiculadas, ovoideas o elongadas, bien aisladas o en parejas. Originan sedimento. El crecimiento en glucosa-extracto de levadura-peptona-agar después de un mes a 25 °C sembrando en estría es blanco-cremoso, liso, brillante y levemente abombado en el centro. En agar patata puede presentarse o no un pseudomicelio rudimentario ramificado. En la formación de ascosporas, aparecen una o dos ascosporas esféricas por asca con un trazo ecuatorial o subecuatorial. Ambos pueden ser inconspicuos bajo la luz del microscopio. Las ascosporas no son liberadas por el asca. La esporulación sucede tras cuatro o mas días a 25 °C en extracto de malta-agar (Difco).

Las pruebas de fermentación y asimilación se muestran a continuación:

Tabla 54: Pruebas de Fermentación en *Hanseniaspora uvarum*

| | | | |
|-----------|---|----------|---|
| Glucosa | + | Lactosa | - |
| Galactosa | - | Rafinosa | - |
| Sacarosa | - | Trealosa | - |
| Maltosa | - | | |

Tabla 55: Pruebas de Asimilación en *Hanseniaspora uvarum*

| | | | | | |
|-----------------|---|------------------------|---|---------------------------|---|
| Glucosa | + | D-Xilosa | - | D-Manitol | - |
| Galactosa | - | L-Arabinosa | - | D-Glucitol | v |
| L-Sorbosa | - | D-Arabinosa | - | α-Metil-D-Glucosido | - |
| Sacarosa | - | D-Ribosa | - | Salicilina | + |
| Maltosa | - | L-Ramnosa | - | D-Gluconato | v |
| Celobiosa | + | D-Glucosamina | - | DL-Lactato | - |
| Trealosa | - | N-Acetil-D-Glucosamina | n | Succinato | - |
| Lactosa | - | Metanol | - | Citrato | - |
| Melobiosa | - | Etanol | - | Inositol | - |
| Rafinosa | - | Glicerol | - | Hexadecano | n |
| Melezitosa | - | Eritritol | - | Nitrato | - |
| Inulina | - | Ribitol | - | Crecimiento sin vitaminas | - |
| Almidón soluble | - | Galactitol | - | | |

Otros test adicionales así como otras características del crecimiento serían: 2-ceto-D-Gluconato: + y formación de almidón: -; crecimiento a 37 °C: -, crecimiento en presencia de cicloheximida al 0.01%: +.

Candida valida: *Candida valida* (Leberle) van Uden & H.R. Buckley (1970) es la forma anamorfica de *Pichia membranifaciens* (E.C. Hansen) E.C. Hansen (1904).

El crecimiento en agar extracto de malta al 5% tras tres días a 25 °C origina células entre ovoideas y elongadas, que aparecen aisladas, en parejas, en cadena o en grupos. Las colonias aparecen amarillentas-tostadas, lisas o arrugadas. El crecimiento en superficie en los medios de asimilación origina películas de aspecto seco.

Los resultados de las pruebas de fermentación y asimilación se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 56: Pruebas de Fermentación en *Candida valida*:

| | | | |
|-----------|-----|----------|---|
| Glucosa | w/- | Lactosa | - |
| Galactosa | - | Rafinosa | - |
| Sacarosa | - | Trealosa | - |
| Maltosa | - | | |

Tabla 57: Pruebas de Asimilación en *Candida valida*:

| | | | | | |
|-----------------|---|------------------------|---|---------------------------|---|
| Glucosa | + | D-Xilosa | v | D-Manitol | - |
| Galactosa | - | L-Arabinosa | - | D-Glucitol | - |
| L-Sorbosa | v | D-Arabinosa | - | α-Metil-D-Glucosido | - |
| Sacarosa | - | D-Ribosa | - | Salicilina | - |
| Maltosa | - | L-Ramnosa | - | D-Gluconato | - |
| Celobiosa | + | D-Glucosamina | v | DL-Lactato | v |
| Trealosa | - | N-Acetil-D-Glucosamina | + | Succinato | v |
| Lactosa | - | Metanol | - | Citrato | v |
| Melobiosa | - | Etanol | + | Inositol | - |
| Rafinosa | - | Glicerol | v | Hexadecano | - |
| Melezitosa | - | Eritritol | - | Nitrato | - |
| Inulina | - | Ribitol | - | Crecimiento sin vitaminas | v |
| Almidón soluble | - | Galactitol | - | | |

Otros test de asimilación y características de crecimiento son: 2-ceto-D-Gluconato: -; 5-ceto-D-Gluconato: -; crecimiento en 10% NaCl/5% glucosa: +; formación de almidón: -; Crecimiento a 37 °C: v; licuefacción de la gelatina: w/-.

***Trichosporon cutaneum*:** *Trichosporon cutaneum* (de Beurmann, Gougerot & Vaucher) Ota (1926). El crecimiento en agar glucosa de Sabouraud después de 10 días incubando a 22 °C origina colonias color crema, cerebriformes con anchas, húmedas y brillantes zonas marginales de unos 15-17 mm de diámetro, con olor que recuerda al queso. Las colonias están constituidas generalmente por hifas desarticuladas pudiendo transformarse en crecimiento levaduriforme con células que presentan yemas.

No presenta capacidad fermentativa siendo sus características asimilativas las que se muestran a continuación:

Tabla 58: Pruebas de Asimilación en *Trichosporon cutaneum*

| | | | | | |
|-----------------|---|------------------------|---|---------------------------|---|
| Glucosa | + | D-Xilosa | + | D-Manitol | + |
| Galactosa | + | L-Arabinosa | + | D-Glucitol | + |
| L-Sorbosa | v | D-Arabinosa | v | α-Metil-D-Glucosido | + |
| Sacarosa | + | D-Ribosa | + | Salicilina | + |
| Maltosa | + | L-Ramnosa | + | D-Gluconato | + |
| Celobiosa | + | D-Glucosamina | v | DL-Lactato | + |
| Trealosa | + | N-Acetil-D-Glucosamina | + | Succinato | + |
| Lactosa | + | Metanol | - | Citrato | + |
| Melobiosa | + | Etanol | + | Inositol | + |
| Rafinosa | + | Glicerol | + | Hexadecano | n |
| Melezitosa | + | Eritritol | + | Nitrato | - |
| Inulina | - | Ribitol | + | Crecimiento sin vitaminas | - |
| Almidón soluble | + | Galactitol | - | | |

Tabla 59: Otras características de asimilación y crecimiento en *Trichosporon cutaneum*

| | | | |
|--------------------|---|---------------------|---|
| 2-ceto-D-Gluconato | + | Etilamina | + |
| 5-ceto-D-Gluconato | + | 50% glucosa | + |
| Glucuronato | + | 10% NaCl/5% glucosa | + |
| Arbutina | + | Ureasa | + |
| Xylitol | + | Nitrito | - |
| L-Arabinitol | + | 0.01% Cicloheximida | v |
| Glucono-δ-Lactona | - | 0.1% Cicloheximida | - |
| Cadaverina | + | Crecimiento a 30 °C | + |
| Creatinina | - | Crecimiento a 35 °C | - |
| L-Lisina | + | | |

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las Figuras 7 y 8 representan gráficamente, los resultados obtenidos tras la medida de los parámetros físicos más importantes de las uvas: **Peso, Diámetro, Longitud y Rendimiento.**

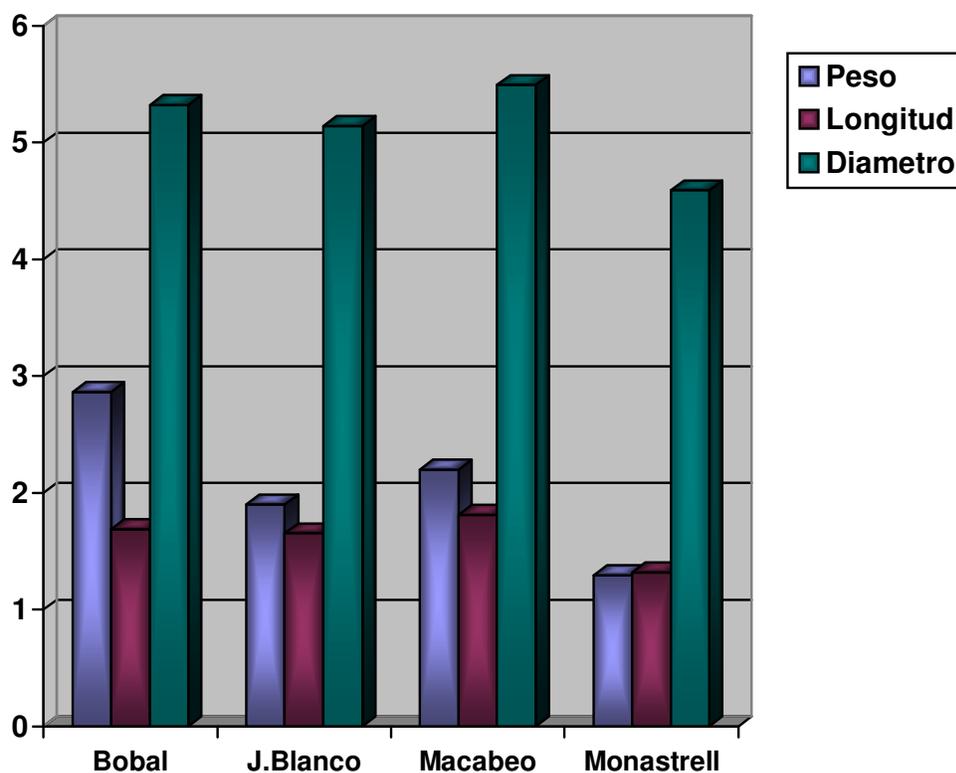
Tras dicho estudio, y como resultado más significativo, se han de destacar los altos rendimientos de las variedades de nueva implantación en la zona como el macabeo o la cavernet frente a las tradicionales como el jaén blanco. Datos que concuerdan con los obtenidos por López, M.I. y col. (1997) en estudios similares de introducción de nuevas variedades en la zona y los de Povedo (1988), Hidalgo y col. (1982), Perez-Juan, P.M. y col. (1997) y los de G^a Escudero y col. (1995).

La **acidez** y el **pH**, van a ser parámetros básicos a controlar dado que intervienen en una serie de procesos fundamentales como el desarrollo y metabolismo de los microorganismos, la actuación del sulfuroso o el sórbico, la actividad de enzimas como la polifenoloxidasas, las pectolasas o las proteasas, los procesos de oxidación y pardeamiento de los vinos blancos, la extracción de las sustancias colorantes de las partes sólidas de la vendimia, la intensidad y tonalidad de los vinos tintos, así como su limpidez brillo y estabilidad.

Influye además en todos los procesos coloidales, como la *quiebra proteica* y la *quiebra férrica*, las precipitaciones de bitartrato potásico o de tartrato neutro de calcio, y por último, va a ser de una gran importancia en las percepciones organolépticas, directa o indirectamente, en el color, olor y sabor.

El pH en nuestras uvas (Tabla 31), varía de los 3.3 de la cavernet sauvignon a los

4.8 de la bobal, siendo la media de 3.8. Valores que podemos considerar normales según la bibliografía general y similares así mismo a los encontrados por Alvarez M^a.L. y col. (1997) en vinos de Badajoz (Tierra de Barros) en variedades similares a las estudiadas por nosotros y a los hallados por De la Presa Owens (1994) en variedades de uvas catalanas.



| | Peso (g) | Longitud (cm) | Diámetro (cm) |
|--------------------|-----------------|----------------------|----------------------|
| Bobal | 2.8644 | 1.690 | 5.32 |
| Jaén Blanco | 1.9001 | 1.655 | 5.14 |
| Macabeo | 2.2011 | 1.810 | 5.49 |
| Monastrell | 1.2955 | 1.320 | 4.59 |

Figura 7: Peso, Diámetro y Longitud de las uvas

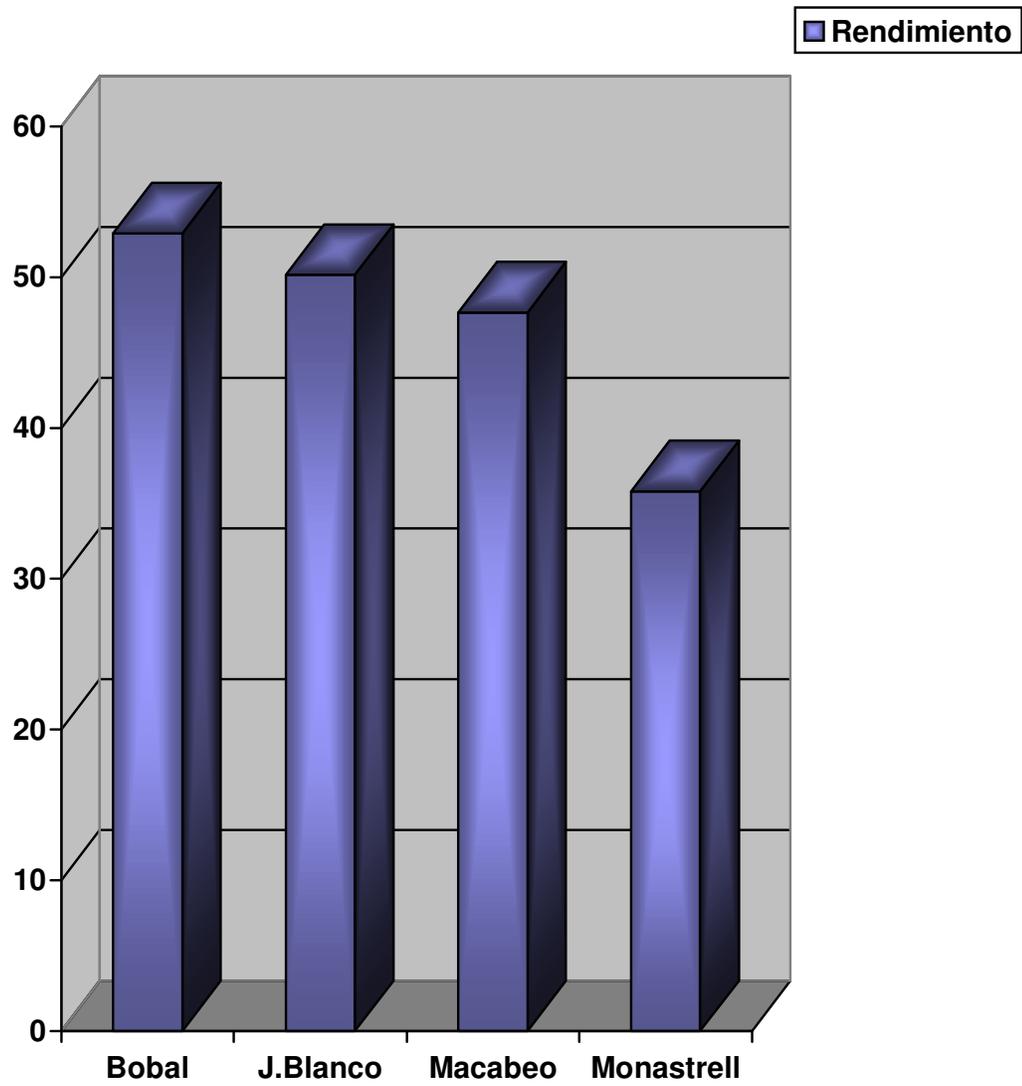


Figura 8: Rendimiento obtenido con las diferentes variedades de uvas.

Para los mostos, este pH, varía de los 3.3 del macabeo a los 4.4 de la monastrell, similares asimismo a los encontrados por los anteriores autores y por G^a Escudero y col. (1995).

Por otra parte, los ácidos contenidos en la uva dependen al igual que el grado alcohólico, de la clase, situación, grado de maduración, cosecha de la misma, etc. Así, entre otros, la realización de operaciones en verde en el viñedo produce grandes variaciones en el microclima luminoso de la zona de los racimos, dando una correlación negativa en la acidez total y positiva en el pH (Martínez De Toda, 1987). Además, dicho contenido, influirá considerablemente en la conservación y sabor del vino.

La **acidez total** de los mostos de uva disminuye durante la fermentación debido a la pérdida de tartrato de potasio y a la descomposición de los ácidos (málico en láctico y CO₂).

Estudiando los valores experimentales de acidez en uvas y mostos (Tabla 31 y 33) de la zona estudiada de Laujar, se observa como es la uva cavernet con 5.90 g/L (en ácido tartárico) la de mayor acidez (recordar que era también la de un pH más ácido), siguiendo la bobal con 4.84 g/L como las de mayor concentración en ácidos, valores algo inferiores en el primer caso e idénticos en el segundo a los estudios de Álvarez M^a.L. y col. (1997) citados anteriormente, estando todas ellas, con valores muy próximos, en torno a los 4 g/L o mayores.

En mostos, se observan considerables aumentos de esta acidez, hasta valores de hasta 7.85 g/L (expresados como ácido tartárico) para la tempranillo, existiendo una gran variabilidad de resultados, debido sobre todo a la técnica normal de la zona de adicionarle ácido tartárico para incrementar la acidez dado la fecha tardía de la vendimia.

El contenido ácido del vino se considera formado por tres fracciones bien definidas y diferenciadas según su origen. Una deriva directamente de la uva, la constituyen los ácidos mayoritarios: tartárico, málico y cítrico y los fenólicos, que se encuentran a un nivel de trazas, además pequeñas cantidades de aminoácidos y circunstancialmente, a bajas concentraciones, acético, fumárico, p-cumárico y shikinico.

Cuando las uvas han sido atacadas por *Botrytis cinerea* están presentes los ácidos glucónico y glucurónico característicos de la infección. Una segunda fracción se origina por el metabolismo microbiano de levaduras y bacterias que intervienen en la fermentación del mosto y en crecimientos posteriores a la fermentación alcohólica durante la maduración o envejecimiento del vino. Esta segunda fracción, está integrada principalmente por los ácidos: cítrico, succínico, láctico, citramálico, fumárico,

dimetilglicérico, pirúvico y ácidos volátiles, especialmente acético. Finalmente una tercera fracción, extractiva, procede de la madera cuando la conservación y crianza se realizan en envases de este tipo; así por ejemplo, productos típicos de vinos madurados en envases de roble son: 4-hidroxibutírico en equilibrio con la γ -butirolactona y el éster etílico correspondiente, la γ -lactona del 4-5 dihidroxicaproico y la γ -lactona del ácido 4-hidroxi-5-ceto-caproico (Iñigo, B., 1974).

Los vinos estudiados en este trabajo, presentan un valor medio de acidez de 6.37 g/L en ácido tartárico con un rango de valores que oscila de los 6.94 g/L del tempranillo como vino monovarietal con más acidez a los 5.87 g/L del vino blanco (mezcla de variedades blancas), estando en la práctica totalidad por encima o muy próximos a los 6 g/L. Estos valores son ligeramente superiores a los encontrados en bibliografía para otros vinos españoles (Tabla 60).

Comparándolos con otros vinos monovariales de la D.O. de la Comunidad Valenciana según estudios similares a los nuestros de García y col. (1997), nuestros vinos siempre presentan unos valores ligeramente más altos de acidez. Así, para la variedad tempranillo, tras analizar 20 muestras de este tipo de vino de distintos orígenes, obtiene un rango de acidez de 3.65 a 6.56 g/L frente a los 6.94 de media de los nuestros. Así mismo, en la variedad bobal, da como acidez media 6.03 g/L frente a los 6.37 de los nuestros y más similares a los obtenidos por vinos del Aljarafe sevillano por Collantes y col. (1995).

Respecto al pH, si comparamos los valores obtenidos en nuestros vinos con los existentes en bibliografía, éstos, con valores de 3.58 para el obtenido a partir de la variedad bobal o inferiores, pero siempre por encima de los 3.19 de la variedad tempranillo, están dentro de los márgenes que Mareca, I. (1983) considera idóneos (valores de 3 a 3.5, siendo mejor cuanto más próximos estén de 3) y de los 2.7-3.7 de Casais, M. y col. (1985) y los de Vogh, E. (1971) y Ribereau, J. y col. (1972) que son de 2.8-3.8 en el caso del primero y 2.7-3.8 para el segundo y de las recomendaciones de Amerine, M.A. y col. (1974) que indica que deben estar por debajo de 3.6 para vinos de mesa y sólo algo más bajos a los 3.5-3.9 considerados por Alais y Linden (1990). Aunque, según Alexandre y Lizama (1998), estos valores serían algo elevados para la vinificación en tinto.

| País | Región | Tipo | Concentración | | Referencia Bibliográfica |
|--------|-----------------------------------|-----------|---------------|-----------|-----------------------------------|
| | | | Media | Rango | |
| España | Montilla Moriles | Vino | 2.79 | - | Ordoñez, R. (1983) |
| “ | La Mancha | Blanco | 4.5 | 3.2-5.2 | Moreno, J. (1974) |
| | | Tinto | 4.6 | 4.2-5.8 | |
| “ | Valdepeñas | Blanco | 5.57 | 4.6-6.6 | Ortíz, J.A. (1983) |
| | | | 4.45 | 3.4-4.9 | |
| | | Tinto | 5.2 | 4.2-6.3 | |
| | | | 4.7 | 4.0-6.0 | |
| “ | Canarias (Lanzarote) | Orotava | 6.03 | 5.2-7.5 | Casais, M. (1985) |
| | | Icoden | 5.3 | 4.0-6.6 | |
| | | Tacoronte | 5.1 | 4.0-6.1 | |
| “ | Galicia | | | 3.75-8.4 | Iñigo, B. (1977) |
| “ | General | Blancos | 5.2 | | Cabezudo, M.D. (1988) |
| | | Tintos | 5.3 | | |
| | | Rosados | 6.0 | | |
| “ | General | Blanco | 5.7 | 4.12-7.31 | Gorostiza, E.F. (1982) |
| | | Tinto | 4.95 | 3.22-6.05 | |
| “ | Tarragona | | 4.79 | 4.43-5.10 | Callao, M ^a .P. (1988) |
| | | | 5.24 | 4.13-6.15 | |
| | | | 5.35 | 4.73-7.05 | |
| “ | La Alpujarra (Granada) | Vigiriega | 5.43 | | López, M.I. y col. (1997) |
| “ | Tierra de Barros (Extremadura) | Blancos | 4.05 | | Álvarez, J.L. y col. (1997) |
| | | Tintos | | 5.0-7.0 | |
| “ | La Axarquía (Málaga) | Secos | | 5.15-5.61 | Gómez, M.A. y col (1997) |
| | | Tintos | | 5.17-6.24 | |
| “ | Cataluña | Blancos | | 3.74-7.03 | De La Presa Owens (1995) |

Tabla 60: Valores de referencia en bibliografía. Acidez Total (Ácido Tartárico g/L)

La **acidez volátil** indica cuál fue el pasado de un vino, la marca que deja una enfermedad, una vinificación fallada o una conservación defectuosa y permite además preveer las dificultades de conservación de ese vino.

Todos los vinos, tienen ácido acético; a este propósito, es interesante considerar que aunque el ácido acético se produce prácticamente en todos los desarrollos bacterianos en vinos y especialmente en los que suponen alteración, siempre es producto secundario de la fermentación alcohólica.

El período más rápido de formación es en los estados iniciales hasta consumirse la mitad del azúcar. La actividad de las levaduras deshidrogenasas en la oxidación de aldehidos, alcoholes y ácido acético está relacionada con cambios en la acidez volátil Amerine, M.A. (1954), pero después disminuye, se reduce a etanal y etanol. También se forma por disminución de etanal especialmente a pH alto, aunque en pequeña proporción en el caso de fermentaciones normales de mosto de uva. Se forma siempre en pequeña proporción junto al ácido láctico en cualquier desarrollo de bacterias lácticas, sea fermentación maloláctica, sean desarrollos de alteración. También se produce pequeña proporción por oxidación directa con aire catalizada por metales plurivalentes (Cu, Fe).

Proceso específico de formación del ácido acético en los vinos, es la oxidación del etanol por bacterias del género *Acetobacter*, es una alteración típica que constituye el llamado *picado acético* o *avinagramiento*.

El zumo de uva fresco, no contiene sino rastros de ácidos volátiles. Durante la fermentación alcohólica, se produce una pequeña cantidad de ácido acético, cantidades que dependen con las condiciones de fermentación, composición del mosto, especie y cepa de las levaduras, pero en la práctica, casi nunca excede de 0.2- 0.3 g/l (expresada en ácido sulfúrico). Normalmente, las bacterias que provocan la fermentación maloláctica forman paralelamente, una pequeña cantidad de ácidos volátiles, fundamentalmente a partir de pentosas. Por encima de estas cifras, se puede sospechar la intervención de bacterias patógenas y el ataque de ciertos elementos del vino: azúcares reductores, glicerina, ácido tartárico o también el desarrollo de bacterias acéticas o acetobacterias capaces de oxidar el alcohol.

Iñigo Leal, B. y col. (1974), tras estudios cinéticos comparativos entre la producción de acidez volátil en el transcurso de la fermentación alcohólica en función de las distintas especies de levaduras, llegaron a la conclusión que las especies de la fase inicial fermentativa son desde el punto de vista enológico indeseables, dado el elevado rendimiento en acidez volátil y la baja concentración en etanol producida, y sobre todo, su

incapacidad para agotar los azúcares del mosto, las especies de fase media presentan un valor aplicativo considerable y las de la fase final producen en las primeras 48 horas una elevada concentración de acidez volátil, pero todas ellas, son capaces de metabolizarlos a medida que disminuye el contenido azucarado de los mostos y se eleva la concentración de etanol.

Nuestros vinos, aunque en su totalidad, están por debajo de los límites máximos marcados por la actual legislación de Vinos de la Tierra que lo regula (Reglamento UE 2676/1990) y de los 0.8 g/L (en ácido acético), que la inmensa mayoría de los autores como Mareca, I. (1983), García, J. (1990), Gómez, M.D. y col. (1997), etc. consideran que nunca debe sobrepasarse. También es cierto, que algunos de ellos (rosado y tinto), con una media de 0.39, en algunos casos, sobrepasan el límite de los 0.5 g/L cifra por encima de la cual, se supone, empieza un desarrollo microbiano que empieza a elevar dichas cifras (Escobar, A. y col., 1995).

Comparándolos con vinos similares de otras regiones españolas (Axarquía de Málaga, Tacoronte de Canarias, etc.), estos valores son ligeramente superiores a los encontrados en bibliografía, salvo respecto a los vinos blancos de Tierra de Barros (Alvarez M^a.L. y col., 1997) y los vinos monovarietales de la D.O. de la Comunidad de Valencia en el estudio citado de García M.J. y col. (1997) donde se alcanzan valores de hasta 0.92 g/L en tempranillo y en bastantes casos superiores a los 0.50 g/L para la variedad bobal o los vinos blancos del Aljarafe sevillano estudiados por Collantes, E. y col. (1995).

Destacar como hecho constatado, que la mejor tecnología utilizada en la zona (control de vendimia, regulación de sulfitación, estabilizaciones, etc.) han hecho descender de forma muy significativa los valores de acidez volátil, sobre todo si lo comparamos con los estudios de vinos tradicionales de la zona realizado por Olalla, M. (1992), donde más del 22% de los vinos analizados presentaban valores de acidez volátil superiores al gramo/litro en ácido acético.

La **acidez fija** es la acidez (valorable) total menos la acidez volátil o, lo que es lo mismo, el conjunto de ácidos no volátiles contenidos en el vino. Tal conjunto incluye los ácidos málico, tartárico, cítrico, succínico y los ácidos inorgánicos y casi siempre se determina a partir de la total y la volátil determinadas por separado aunque no sea totalmente exacto.

Su conocimiento, se requiere para la aplicación de algunas fórmulas enológicas a fin de detectar el aguado. La acidez fija de los vinos normales, se encuentra estrechamente

relacionada con el mosto original pese a las transformaciones sufridas antes y después de la fermentación. Pese a ello, las variaciones de la acidez fija después de la fermentación, son de gran utilidad para distinguir entre la actividad de microorganismos ácido-destructores de la de organismos que generan acidez volátil. (Amerine, M.A. y col., 1974).

Nuestros vinos, presentan un margen en valores medios, que oscilan de los 5.44 g/L en ácido tartárico del vino mezcla de variedades blancas a los 6.60 del macabeo.

En la uva verde apenas hay proteínas. Su síntesis comienza rápidamente después del envero, paralelamente a la acumulación de azúcares. La cantidad de proteínas presente en los mostos depende de factores tales como la variedad, el clima, el grado de madurez, el pH, las características del suelo y las condiciones en que se realiza el prensado.

Una vendimia con deficiente madurez presenta abundancia de amonio y menor contenido de sustancias orgánicas nitrogenadas de elaboración compleja, proteínas y alguna vitamina muy necesaria como la tiamina. La madurez más completa del fruto lleva consigo mayor contenido en proteínas y acidez más baja, simultáneamente; esto va a suponer mayor probabilidad de *quiebra proteica*.

Durante el proceso de elaboración del vino, el contenido en proteínas se ve afectado fundamentalmente por tres factores: la aparición del alcohol y los tratamientos realizados en la bodega. También se ha demostrado la existencia de proteasas exocelulares en las levaduras que pueden degradar las proteínas del mosto.

En los vinos blancos y debido a la utilización de las levaduras, el contenido en Nitrógeno total suele ser la mitad que la del mosto de partida. Sin embargo, los vinos de uvas tintas (rosados y tintos) que se elaboran en contacto con los hollejos, poseen por término medio de un 67 a un 73% de Nitrógeno total de los mostos iniciales de que proceden, debido al aporte de compuestos nitrogenados del hollejo durante la maceración. (Hernandez, P. y col., 1993).

La cantidad total de proteínas no es un índice que permita predecir la estabilidad del vino. Factores como su naturaleza y su grado de asociación o desnaturalización, son importantes a la hora de conseguir una correcta estabilización de los vinos. Los mecanismos que conducen a su coagulación, no están totalmente definidos, por lo que se están llevando a cabo numerosos estudios sobre sus características fisicoquímicas en un intento de comprender mejor los mecanismos que conducen a la formación de turbidez en los vinos embotellados.

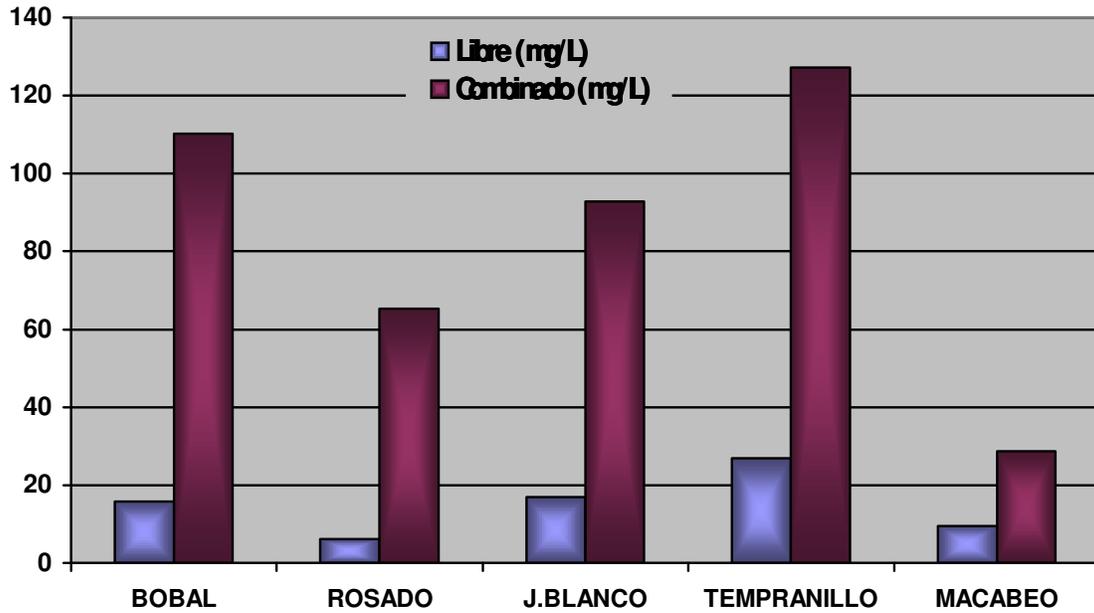


Figura 9: Concentraciones de Anhídrido sulfuroso Libre y Total en vino.

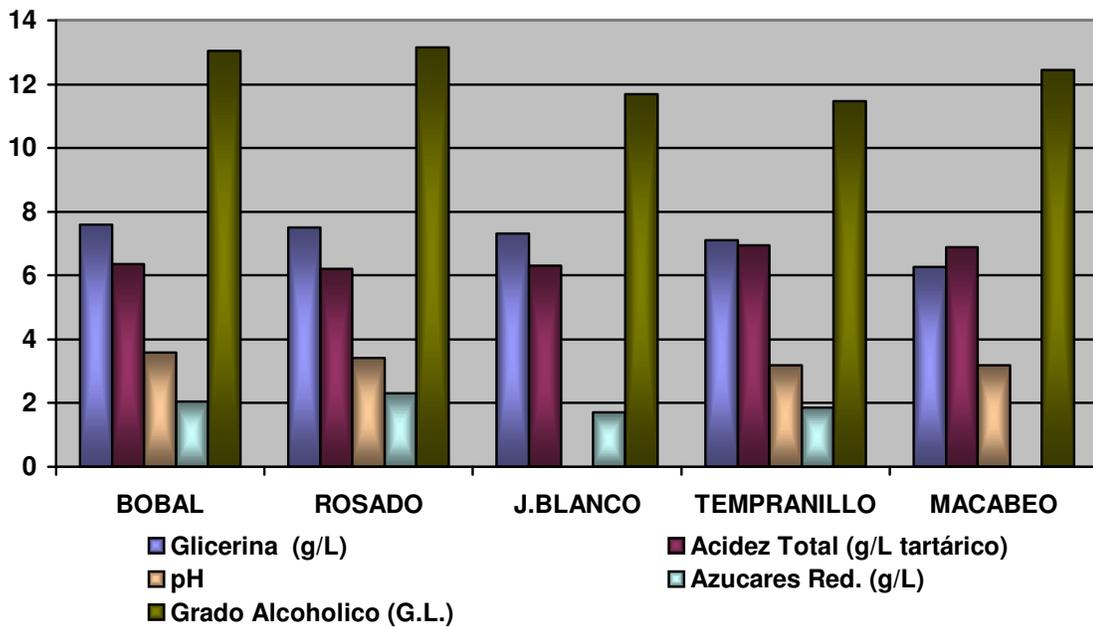


Figura 10: Concentraciones de Glicerina, Azúcares reductores, Acidez Total, Grado alcohólico y pH en vinos.

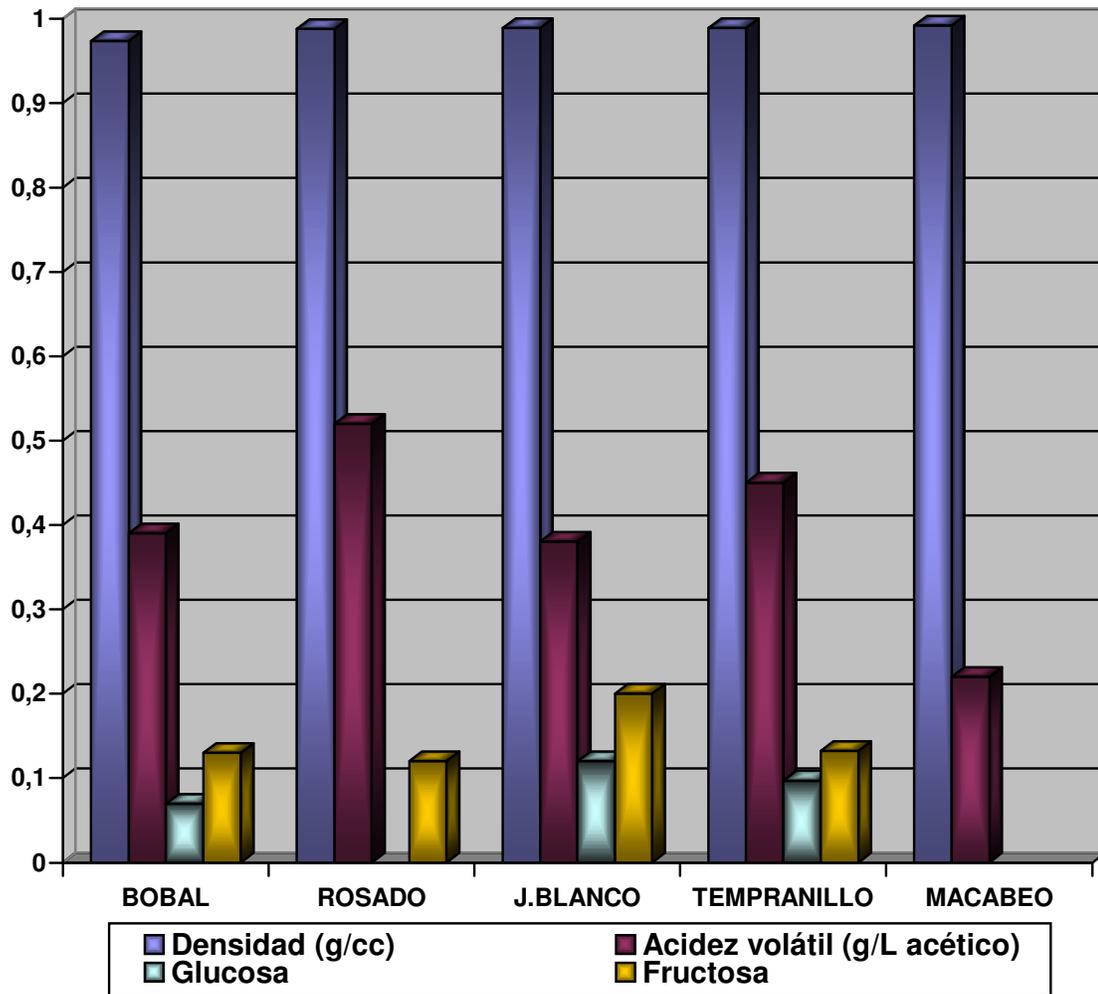


Figura 11: Valores de Densidad, Glucosa, Fructosa y acidez volátil en los vinos.

De los tratamientos realizados en bodega, el que más afecta al contenido de proteínas, es el tratamiento con Bentonita, el cual se utiliza para reducir el contenido en proteínas del vino y para favorecer la eliminación de las lías en la operación de degüello en la elaboración de cavas. Las Bentonitas por su elevada capacidad de intercambio catiónico, eliminan por adsorción las proteínas del vino que están cargadas positivamente. El resto de los clarificantes usados por los elaboradores (gelatina, caseína, caolín, etc.) tienen poca incidencia en el contenido final en proteínas.

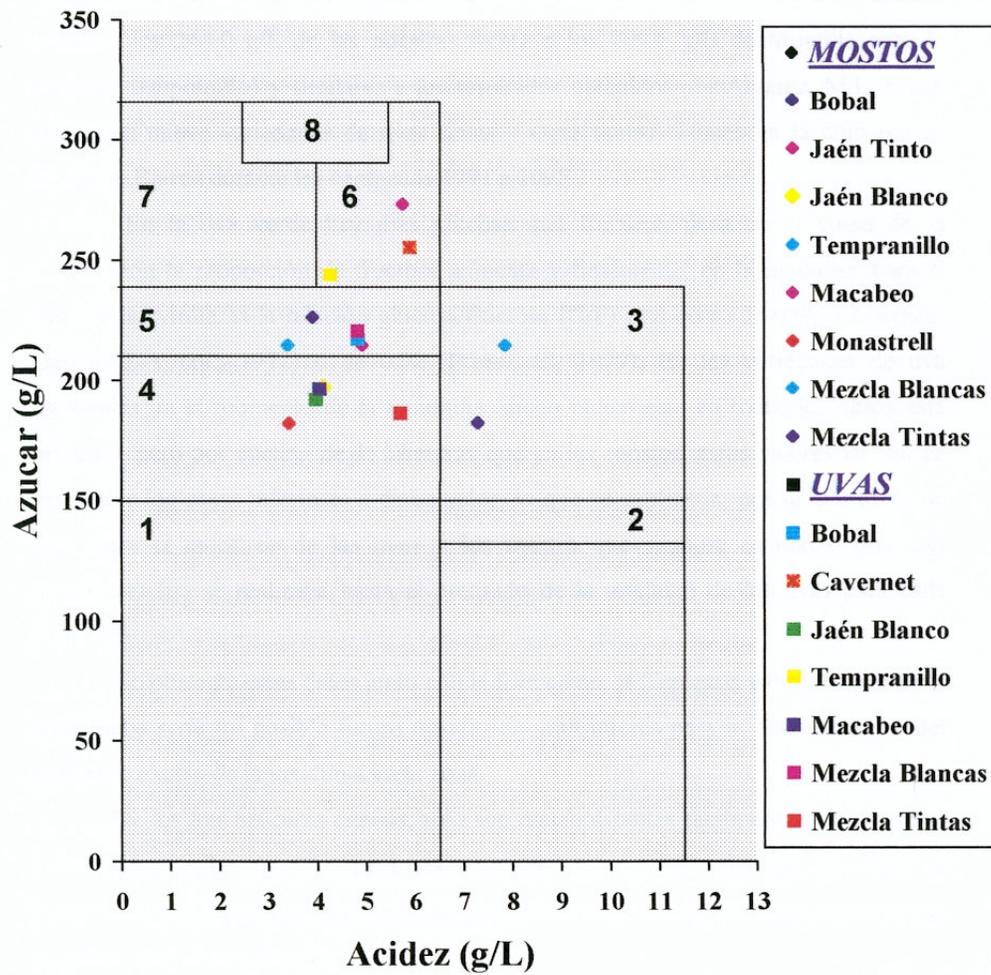
Los valores medios de Nitrógeno (mg/100mL), encontrados en nuestras uvas, oscilan de los 60.37 de la variedad bobal a los 105.64 del jaén blanco, valores dentro del margen (entre 0.2 y 1.4 g/L) que según Vogt, E. (1971) es suficiente para asegurar la capacidad de fermentación de las levaduras o los 200 a 500 mg/L que preconiza Mareca, I. (1983).

Comparando estos valores con otros estudios similares, encontramos que Usseglio-Tomasset, L. (1998), da valores entre un 16% para la caverne sauvignon a los 30% de la sauvignon blanc. De La Presa Owens (1995) en mostos Catalanes da valores medios para el macabeo de 40.83 mg/L y para las otras variedades valores próximos a los 50 mg/L.

En el mosto, se encuentran siempre tres monosacáridos en concentración notable, especialmente dos de ellos: dos hexosas (glucosa y fructosa), aunque se han encontrado también pequeñas cantidades de D-Galactosa y una pentosa que es la arabinosa con alrededor de 1 g/l. Además vestigios de holósidos, ósidos coloidales, resultante de la condensación de moléculas de osas, o de anhídridos de éstas, las osanas, o incluso ácidos urónicos. Son los poliósidos y las pectinas.

En algunas variedades de *Vitis Labrusca* se encuentran pequeñas cantidades de sacarosa y otros azúcares y en sus híbridos la sacarosa puede constituir tanto como el 25% del azúcar total.

Dichos **azúcares** se forman por asimilación del ácido carbónico del aire en las hojas verdes de la vid, bajo el influjo de la luz (fotosíntesis). Desde las hojas verdes pasa a los granos de uva y, durante el periodo de maduración, se acumulan grandes cantidades de azúcar (Vogt, E., 1971). Los productos de fotosíntesis de la hoja y los de reserva, se hidrolizan: la sacarosa en glucosa y fructosa y el almidón en glucosa, y es bajo la forma de azúcares reductores que ocurre la migración hacia el grano.



- 1.- MEZCLA O DESTILADO
- 2.- CACOLI
- 3.- VINOS NOBLES
- 4.- VINOS DE MESA

- 5.- TRANSICIÓN
- 6.- VINOS LICOROSOS
- 7.- VINOS GENEROSOS
- 8.- VINOS DULCES NATURALES

Figura 12: Relación Acidez Total/Azúcares; Aptitud de vinificación

Basándose en los estudios específicos de *madurez* realizados en la Bodega Valle de Laujar en los periodos de vendimia (Tabla 32) y cuya representación gráfica (acidez total/azúcares) siguiendo las indicaciones de Hidalgo aparecen en la Figura 12, nos permiten realizar una clasificación de la utilidad para vinificación de dichas variedades.

Según dicho estudio y como era de esperar la mayor parte de las variedades, presentan una aptitud idónea para la obtención de vinos de mesa (jaén blanco, macabeo, variedades de uvas blancas, de tintas, etc.) con una tendencia a vinos licorosos (jaén tinto, cavernet y bobal), tendencia, justificable, dado la práctica generalizada en la zona de vendimiar en fechas tardías (incluso octubre), y en dos mostos (bobal y tempranillo), aparecen como variedades aptas para la obtención de vinos nobles, si bien, la acidez necesaria para ello casi con total seguridad es debida a la adición artificial de ácido tartárico. Este punto junto con otros, debe ser considerado y evaluado en posteriores estudios de envejecimiento.

Destaca que en los estudios citados de Olalla, M. (1992) en la zona con vinos tradicionales, se observaron en la zona unos valores para las uvas superiores en azúcar y menores de acidez si se comparaban con los estudios de G^a Lujan anteriormente citados, sobre todo en la uva mayoritaria de la zona (jaén blanco). Variaciones, que no aparecen en el presente estudio, lo que hace suponer un mejor control en el proceso de maduración y una mejor fijación del momento óptimo de la vendimia, de hecho, ya se viene haciendo esto en la zona, con una variación de casi un mes.

Si lo comparamos con mostos de otras regiones españolas, observamos que los Gallegos (Iñigo, B. y col., 1977), estarían entre las zonas 1 y 5 cogiendo parte de la 3 y la 2; los de Montilla-Moriles (Ordoñez, R. y col., 1989), en la 7 y los de Málaga (Lasso de la Vega, B., 1989) en la zona 5, 6 y 7. Los de Cataluña (Codony, R. y col., 1985), en la 3,4 y 5, y los mostos de vinos tintos españoles (campana 80-85), según estudio de Cabezudo, M.D. (1988), estarían entre las zonas 5-6 y en la zona 5 de vinos blancos.

Por último y en estudios más recientes en la zona de Montilla-Moriles por Perez-Juan y col. (1996), nuestras uvas, siempre presentan valores más altos de azúcares a igual variedad (217.3 g/L frente a los 209.6 del citado autor para la variedad bobal, o los 244.0 g/L de las nuestras frente a los 209.6 g/L de Montilla para la variedad tempranillo) y similares a los resultados obtenidos por Alvarez, M.L. y col. (1998) en nueve variedades de uvas tintas y otras tantas blancas en la comarca de Tierra de Barros durante las campañas 1991 a 1995.

En la uva verde hay más glucosa que fructosa, pero en el curso de la maduración la proporción de fructosa aumenta y finalmente, en la madurez, para el caso de las

viníferas la relación glucosa/fructosa (G/F) está cerca de 0.95. (Ribereau-Gayon, J. y col., 1972) o de 0.92 (Primo, E., 1979). En las variedades de uva estudiadas en el momento de la vendimia, dicho índice esta en todos los casos está próximo, pero por encima de 1. Mientras que en los mostos, estos valores ya son en casi todos los casos inferiores a dicho valor, lo que se explicaría, por la diferencia de días entre el muestreo de las uvas y los mostos que siempre es uno o dos días posteriores (no se realizaba hasta el prensado de la totalidad de las uvas para cada variedad).

No obstante estos datos junto con la formación de Terpenos y otros precursores aromáticos sería un posible futuro estudio de gran interés para la determinación del momento exacto de la vendimia en la zona.

De los tres azúcares citados, sólo son metabolizables fácilmente por levaduras y bacterias, las hexosas (las pentosas normalmente, no son atacadas). De ellos, se forma el etanol como producto principal junto con otros productos secundarios como ya vimos en la fermentación.

De la importancia de los azucares en los vinos, da idea el que se clasifiquen según el contenido en azúcares reductores en: secos, abocados, semisecos, semidulces y dulces ("Estatuto de la Viña del Vino y de los Alcoholes", 1970).

Los vinos elaborados por la Cooperativa Valle de Laujar y estudiados en esta tesis, son en su totalidad vinos secos, con valores próximos o inferiores a 2 g/L.

La relación G/F baja rápidamente durante la fermentación; la generalidad de las levaduras de los vinos hacen fermentar más activamente la glucosa que la fructosa, lo que se traduce en un contenido residual menor del primero que del segundo y la relación glucosa/fructosa pasa de 0.93 a 0.5 aproximadamente, no obstante, la glucosa, aumenta ligeramente el primer año en el vino por hidrólisis de ciertos heterósidos, sobre todo en el caso de los vinos tintos. Estos datos, han sido comprobados experimentalmente en la presente tesis, como queda reflejado en la Tabla 34.

La **densidad** del vino como tal es un parámetro de muy poca utilidad, es más bien informativo sobre el final de la fermentación o de su posible encabezado. Según Amerine, M.A. y col. (1974), los vinos secos sin encabezar, han de tener un valor de densidad inferior a 1 g/cc, valores que cumplen todos los vinos analizados.

Respecto al **Grado Alcohólico**, la gran mayoría de los vinos estudiados, siguiendo las actuales tendencias del mercado, presentan un grado alcohólico igual o inferior a los 13° G.L. que la Legislación correspondiente a "Vinos de la Tierra" estipulaba para los vinos de esta zona. Dicho grado alcohólico, oscila de los aproximadamente 11.5° G.L. de

la variedad tempranillo y los 11.7 del jaén blanco a los 13.0 y 13.1 de la bobal o el rosado respectivamente.

Comparándolos con otros vinos españoles, encontramos que presentan valores inferiores a la media de vinos españoles según el trabajo realizado por Gorostiza, E.F. y col. (1982), que da un grado alcohólico medio para los vinos tintos de 13.7° G.L., y los de Cabezudo, M.D. (1988) realizado durante las campañas 1980-1983 y que da para los tintos una media de 13.7° G.L. e inferiores a los rosados con una media de 15.2° G.L., dando a su vez, una graduación media de 13.2° a los vinos procedentes de la variedad "jaén blanco", mayoritaria en la zona.

Presentan así mismo valores medios similares a los de la Mancha (Moreno, J. y col., 1974), Valdepeñas (Ortiz, J.A., 1983), Galicia (Iñigo, B. y col., 1977; Lage, M.A. y col., 1989; Garcia-Jares, C.M. y col., 1990), y a los de la Región Central (Hidalgo, L. y col., 1986). Similares a los de Tarragona (Callao, M.P. y col., 1988) y parte de los de Canarias (Casais, M. y col., 1985).

Por último, son inferiores en grado alcohólico a los de la Rioja (Larrea, A., 1974) y a los de Jerez (Bravo, F., 1984), con una producción alcohólica estos últimos de 14.5° G.L. los primeros y entre 14° y 20° G.L. los segundos. Similares a los dados por Lezcurre, O. (1999) para vinos monovarietales de la variedad Vigiriega y obtenidos en la misma zona de la Alpujarra, e inferiores así mismo a los de la Axarquía (Málaga), estudiados por Gómez, M.A. y col. (1997), así como a los de Tierra de Barros (Badajoz)(Alvarez, J.L., 1997) y a los Catalanes analizados por De La Presa Owens (1995).

Entre los factores que definen la calidad de los alimentos, el **color** ocupa un lugar preferente, hasta el punto que el alimento puede ser rechazado por este factor, sin necesidad de tener que valorar otras propiedades, como sabor o textura.

Desde el punto de vista físico, el color resulta de la absorción selectiva de ciertas radiaciones elementales que constituyen el espectro solar.

La mayor dificultad en la medida del color, estriba en determinar aquellos parámetros más significativos, que sean reproducibles al cabo del tiempo. (Amerine, M.A. y col., 1974). En un vino puede haber una serie de pigmentos, pero el observador sólo ve el matiz, el brillo y la saturación resultante.

En definitiva, para obtener la máxima información del espectro de un color necesitamos saber como están reflejados en él los atributos psicológicos tono, pureza y luminosidad. El tono o calidad del color viene determinado por la longitud de onda

predominante, la pureza se relaciona con la mayor o menor altura de la curva en la zona correspondiente al tono, en comparación con la altura de la curva en otras longitudes de onda y la luminosidad, nos la da el área comprendida dentro de la curva, que es una medida relativa de la mayor o menor cantidad de luz que recibe el ojo para un mismo tono de color.

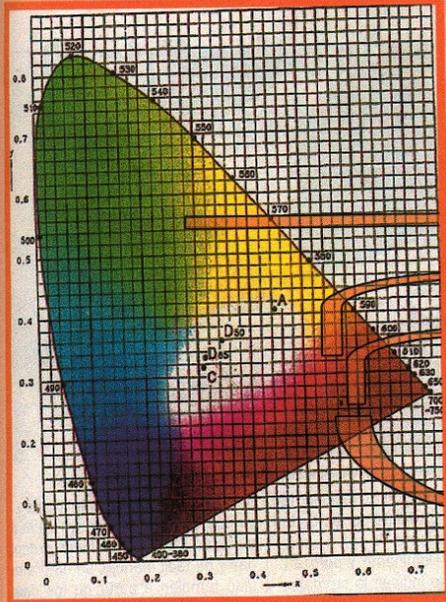
La Longitud de Onda Dominante (valores medios) para los vinos estudiados tal como se representa en la Figura 12 los emplazaría según el diagrama de cromaticidad CIE y las denominaciones zonales de Lozano, R.D. (1978) a los vinos blancos estudiados como verde amarillo ($\lambda < 570$ nm) si bien los vinos elaborados a partir de las variedad macabeo ($\lambda = 569.6$ nm), estarían muy próximos a la zona del amarillo verdoso (570.8 nm). En lo que respecta a los vinos rosados estarían emplazados en la zona de naranja-rojizo (Heredia, F.J. y col., 1986), mientras que los vinos tintos estudiados, con una $\lambda > 640$ nm estarían emplazados en la zona del rojo, si bien los de la variedad bobal con una longitud de onda dominante de 686.4 nm, estarían muy próximos al rojo-púrpura.

Comparando dicha Longitud de Onda con vinos tintos españoles según el trabajo de Heredia, F.J. y col. (1990), se observan que todos (Alicante, Rioja, La Mancha, Navarra, Ribeiro, Valdepeñas), al igual que los nuestros presentan valores todos ellos por encima de los 600 nm.

La Pureza, se relaciona con la mayor o menor altura de la curva en la zona correspondiente a la λ dominante en comparación con la altura de la curva en otras longitudes de onda y la Luminosidad nos da el área comprendida dentro de la curva (medida relativa de la mayor o menor cantidad de luz que recibe el ojo para un mismo tono de color), en nuestros vinos, sus valores medios están muy por debajo del 50%, con un rango que va del 31.4% de los vinos rosados a los 6.7 % de los elaborados con la variedad macabeo. Esto, estaría de acuerdo con Esteve, M.D. y col. (199..) que considera que en los vinos rosados y blancos, la pureza de color aumenta considerablemente con el envejecimiento.

Espacio C I E

Long. Onda Dominantes



J. Blanco 565.6 nm

Macabeo 569.6 nm

Rosado 619.0 nm

Bobal 649.7 nm

Tempranillo 686.4 nm

Espacio CIELAB

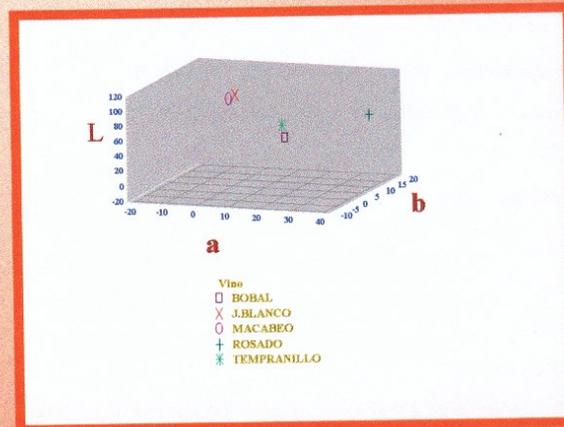
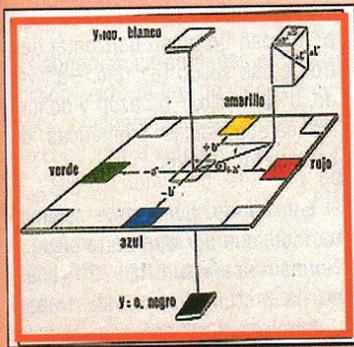


Fig. 13 Distribución de las muestras analizadas en los espacios CIE y CIELAB

Comparándolos con los vinos del mencionado trabajo de Heredia, F.J. y col. (1990), se observa que todos ellos, presentan valores de Pureza por encima del 50% e incluso llegan al 99.6 en el caso del Ribeiro y valores de Luminosidad en % que van desde algo más del 90% para los vinos blancos (92.4 y 95.7 para el jaén blanco y el macabeo respectivamente) a los 33.6 % de los rosados a los valores inferiores al 25% de los tintos (19.8 y 22.0 para el bobal y el tempranillo respectivamente).

Respecto al estudio de los parámetros del espacio CIELAB, (Figura 13), en los vinos blancos y según indica Ortega, A.P. (1994), resulta bastante complicado la clasificación visual, llegando a la suposición que la escala normalmente empleada esta planteada sobre diferencias de intensidad y no de tonalidad. Así y analizando primero los valores obtenidos experimentalmente, y dado los valores negativos de a (verde) y b positivos (amarillo), englobarían a nuestros vinos, tanto a los macabeo como a los de jaén blanco en la región existente entre los amarillos y los amarillo-verdosos, colores similares a los encontrados por Henao, L. (1986) en vinos blancos monovarietales de uva cayetana, macabeo, parellada y similares así mismo a los encontrados al analizar los valores del espacio CIE.

En cambio, los valores de H (tono), que corresponden al matiz de un determinado color y permite establecer grupos de vinos diferenciados por tonalidades percibidas por el ojo humano (Álvarez Franco, M^a.L., 1998) estos mismos vinos blancos con valores del 84.8 del macabeo y 83.0 del jaén blanco presentarían tonos ámbar, valores que son ligeramente inferiores a los obtenidos para las mismas variedades por el citado autor Álvarez Franco, M^a.L. (1998) y por último según los valores de C (croma), que en esencia, corresponde a pureza o saturación de cada color, y siguiendo las indicaciones de la autora anterior, ambos, tendrían un croma entre amarillo pajizo (macabeo) y amarillo paja (jaén blanco).

En un estudio de color de vinos catalanes (Guardiola, S., 1996), los vinos blancos del Penedés, Conca de Barberá, Alella y Tarragona presentan como tonalidad predominante el amarillo verdoso, sobre todo en las dos primeras, mientras que los de Tierra Alta y Costers del Segre, se desplazarían más hacia los colores oro viejo y paja.

Siguiendo los mismos criterios, y de forma más clara, los vinos tintos de la variedad bobal con valores medios de $a=17.4$, $b= 3.86$ y $H= 15.8$, estarían localizados en la zona del rojo-violáceo, al igual que los de tempranillo con valores de $a=16.1$, $b=4.7$ y $H=16.3$.

En el mismo estudio de vinos catalanes, este mismo color correspondería a casi la totalidad de los vinos tintos de Priorat, Tarragona, Terra Alta, Costers del Segre, Empordá Costa Brava y Alella.

Por último, los rosados, y atendiendo al valor de $H < 26$ (22.7), tendrían un tono rosa-frambuesa, tono en concordancia con los datos de a y b, si bien atendiendo a los de C (que según Ortega, A.P. y col. (1993) no parecen tener influencia en la diferencia de intensidades de color para los vinos rosados, existiendo variaciones importantes dentro de una misma tonalidad), podrían estar en una zona situada entre el rosa-fresa y el rosa frambuesa, tonalidades que según Ortega, A.P. y col. (1994) y tras el estudio de 164 muestras de vino rosado de todas las regiones españolas, presentan el 27 % de ellos en el primer caso y un 6% en el segundo de los casos, siendo así mismo el tono rosa-fresa el mayoritario entre los vinos rosados españoles, tonalidades también mayoritarias en vinos catalanes (Guardiola, S. 1996), rosa fresa en los de Conca de Barbera, Emporda-Costa brava y rosa frambuesa en los de Alella, Pla de Bages, Priorat, Tarragona y Tierra alta.

Las operaciones y procesos van a tener su influencia en el contenido en Polifenoles del vino (el despalillado, el tiempo que transcurre entre el estrujado y la prensada, tipo e intensidad de la prensada, el empleo de SO_2 , la maceración, la fermentación, etc.), el contenido medio total en polifenoles (0.284 g/l de Acido Gálico para los blancos, 1.492 g/l para los tintos y 0.624 g/L para los rosados) de nuestros vinos, están dentro de los contenidos de vinos blancos (0.1 g/l) y de tintos (2-5 g/l) que según Mareca, I. (1983), son considerados como normales.

Superiores son, así mismo, a los vinos blancos obtenidos de las variedades airén (mayoritaria en La Mancha) y la viura (Rioja) con valores medios de 0.197 g/l y 0.159 g/l respectivamente y superiores a los obtenidos de uvas tintas tempranillo (1.18 g/l) y garnacha (0.673 en La Mancha y 0.780 en Rioja), según los trabajos de Gil, C. y col. (1985).

Comparándolos con otros vinos españoles, tenemos que, según el trabajo de Bravo, F. (1973), su concentración es netamente superior a los vinos Finos de Jerez y Moriles y a los blancos de la Rioja, inferiores a los blancos de Valdepeñas (0.5 g/l) y Jerez Semidulce (0.5) y similares a los tintos de Valdepeñas (1.0 y 1.5 g/l), inferiores a los claretes de la Rioja (2.1 y 2.3 g/l) y vinos dulces de Jerez (1.84) y La Mancha (1.7 g/l), similares a los de Málaga (1.32 g/l) y a los vinos tintos de Valdepeñas (1.3 g/l) según estos dos últimos Heredia, F.J. y col. (1989), e inferiores a la gran mayoría de los vinos.

El **Anhídrido Sulfuroso** es un gas insoluble en agua, de gran aplicación y utilidad y del que no se ha encontrado sustituto hasta la actualidad (sólo algunos como el ácido sórbico y los sorbatos, que hacen disminuir su concentración).

Entre sus propiedades, están las antioxidantes (por el sistema sulfuroso-sulfato acaparando el oxígeno e impidiendo el amarillamiento y la maderización), antioxidásicas (bloqueando y destruyendo las oxidasas de las uvas, la tirosinasa y la diastasa, evitando así la quiebra oxidásica), disolventes (especialmente compuestos polifenólicos y de entre ellos, los antocianos), y antisépticas (sobre bacterias acéticas y lácticas, con efecto selectivo de determinados microorganismos, obstaculizando la multiplicación de las levaduras poco alcohólicas y favoreciendo las levaduras elípticas activas, por encima de 1 g/l, impide todo desarrollo microbiano) y mejora gustativa (al bloquear el acetaldehído y conservar la frescura y el aroma) (Mareca, I., 1983; Pynaud, E., 1989).

Para Schopfer, J.F. (1985), en mostos, hoy en día, controlando el estado sanitario de la vendimia y haciendo uso de las nuevas tecnologías, la dosis media de seguridad, la establece entre 75 y 50 mg/l.

En vinos, una vez envasados, para que el sulfuroso ejerza sus funciones antisépticas y antioxidantes, debe encontrarse en unos niveles de 30 mg/l en su forma libre, como aproximadamente, se encuentran unos 30 mg/l de sulfuroso combinado a los ácidos cetónicos y otras sustancias, los niveles de sulfuroso total deben mantenerse en unos 60 mg/l de sulfuroso total, indicando Cabezudo, M.D. (1988), que es preciso limitar la producción de sustancias como el acetaldehído que puedan combinarse con él (enmascara la sensación de sequedad de éste) y además, no deben bajar nunca de 20 mg/l (Laguno, C., 1982), 20 a 30 (Amerine, M.A. y col., 1974), 15 a 20 mg/L (Pynaud, E., 1989), 30 mg/L (Schopfer, J.F., 1985).

Según los trabajos de Herraiz, T. y col. (1988), trabajando con mostos de Verdejo en fermentaciones controladas con cepas puras de levaduras de distintas especies a los que se le adicionaba sulfuroso o no, han llegado a la conclusión que la principal causa de variación entre vinos es la presencia o ausencia de sulfuroso durante la fermentación, produciéndose variaciones significativas en niveles de sustancias tales como el ácido Málico, el 1-Propanol, el Acetato de Etilo, Acetaldehído, y el pH, etc., no produciéndose variaciones significativas en el caso del Metanol, el Etanol, el Glicerol, etc. Bravo, F. y col. (1984), ponen de manifiesto, que la sulfitación ejerce un efecto restrictivo de la multiplicación celular, pero

exalta el poder fermentativo, de forma que si la concentración de sulfuro en el mosto es superior a 200 mg/l, pueden aparecer cepas que producen características organolépticas desagradables. (Valcarcel, M.J. y col., 1990), confirmado por los trabajos de Mateos, P.L. y col. (1985), que considera tras estudios de cepas de levaduras que para los mostos de la zona de Utiel-Requena, no es aconsejable utilizar concentraciones de sulfuroso superiores a 100 mg/l.

Nuestros vinos, en valores medios de Anhídrido Sulfuroso libre de 6.2 mg/L a 26.90 mg/L, estarían ligeramente por debajo de las consideraciones de sulfuroso libre manifestadas anteriormente, y en la mayoría de los casos, por debajo de esos 20-30 mg/L de seguridad. Además, en lo que respecta al combinado con valores de 34.56 a 127.31 mg/L, sobrepasaría en algunos casos (bobal, jaén blanco y tempranillo), la concentración considerada anteriormente por la mayoría de los autores consultados como ideal.

Un aspecto a tener en cuenta, es el cumplimiento de la normativa legal, según ésta, y dependiendo siempre de si son considerados como claretes o rosados, el Estatuto de la Viña del Vino y los Alcoholes (Ley 25/1970. Título II. Capítulo Primero), establece como dosis máxima de 250 a 350 mg/l, la Normativa referente a Calidad, Edad y Crianza de los Vinos (Orden del Ministerio de Agricultura de 1/8/79) de 150 a 250 mg/l, la Normativa de Regulación de Vino de la tierra (Orden 11/ 12/ 86 del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación) a la cual debe ceñirse los actuales vinos, lo establece entre 150 y 250 mg/l, la C.E.E. (Reglamento 1678/77) entre 175 y 225 mg/l.

Nuestros vinos, tendrían límites de Sulfuroso incluidos dentro de las normativas más exigentes.

Comparándolos con otros vinos españoles, los niveles en Anhídrido Sulfuroso libre y según referencias ya citadas: López, M.I. y col. (1997), encuentran un margen de concentración de 2.6 a 5.30 mg/L en la variedad Vigiñega en la misma zona de estudio de la presente tesis, Alvarez, M.L. y col. (1977), en vinos de Extremadura 10 a 20 mg/L, Gómez, M.D. (1997) en vinos de la Axarquía malagueña 1.9 a 3.2, De La Presa Owens (1995) en vinos catalanes de 4 a 20 mg/L. Observándose en líneas generales una sulfitación en nuestros vinos, muy similares a las prácticas generalizadas salvo con los de Tenerife (Casais, M., 1985) o de la Contraviesa (Olalla, M., 1992) pero se trata de vinos artesanales.

Por el contrario, como ya hemos dicho, si se observa unos valores algo más elevados en Sulfuroso Combinado en nuestros vinos, superiores a todos los casos anteriormente

citados salvo los vinos de la Axarquía malagueña o los tradicionales del Aljarafe sevillano estudiados por Collantes, E. y col. (1995).

Todo esto nos hace suponer una oxidación en dichos vinos, por encima de lo que sería conveniente.

De todos estos **ácidos** el ácido tartárico es el más abundante y el menos débil en mosto y vino. Procede de las uvas donde se localiza en todas sus partes, raspón, hollejos y pulpa (Moreno, F. y col., 1983), donde se forma a partir de los azúcares en los órganos jóvenes, o a partir del ácido oxalacético (Villar y col., 1977).

Nuestros vinos, presentan en la mayoría de los casos valores en ácido tartárico próximos a los 4 g/L, valores superiores a los encontrados en bibliografía (Tabla 61), no obstante, es necesario destacar el método de análisis realizado, así nosotros al trabajar a pH=2, la mayor parte de los tartratos están en su forma protónica y por lo tanto cuantificable, cosa que con otros métodos, sobre todo los tradicionales, no ocurre. Actualmente existe en nuestro Departamento una tesina en curso cuyo trabajo de investigación es precisamente la comparación de los principales métodos de determinación de ácidos orgánicos en vinos existentes en la actualidad y su comparación analítica. No obstante, autores como Pérez-Juán, P.M. y col. (1996) en uvas de la zona de Montilla Moriles, da valores para el ácido tartárico de 9.23 g/L para la prieto picuda, 8.66 g/L para la garnacha o 8.18 g/L para la cavernet.

El contenido de ácido málico aumenta en los granos de uva, donde se forma a partir de ácido 3-fosfoglicérico, durante su crecimiento hasta alcanzar de 15-20 g/l, Vogt, E. (1971). Durante el proceso de maduración, sin embargo se reduce considerablemente, debido a dos procesos, por combustión respiratoria y por su transformación en glúcidos que se realiza en el racimo maduro por un mecanismo inverso a la carboxilación del ácido fosfoenol pirúvico. Ribereau, J. y col. (1976), Henao, F. y col. (1986), influyendo sobremanera la temperatura. En el vino y por acción del *Schyzosaccharomyces pombe*, se transforma en etanol, o también en ácido láctico y anhídrido carbónico por acción de las bacterias constituyendo la base de que en los vinos completamente elaborados sólo se encuentre en pequeñas cantidades este ácido, sustituyéndole el ácido láctico de sabor más suave mejorando así las características gustativas del vino (Diez De Betancourt, C.A., 1972), pero aumentando la acidez volátil por descomposición simultánea del ácido cítrico (Larrea, A., 1983), y se eleva el pH, lo cual favorece el desarrollo de agentes microbianos (Santos, M. y col., 1984; Herranz, A. y col., 1982 y Mareca, I., 1982).

En nuestros vinos, las concentraciones en este ácido, oscilan entre los 0.41 g/L de la prieto picuda o los 0.89 g/L del vino macabeo a los 2.15 de la tempranillo. Comparando estos valores con los obtenidos mediante revisión Bibliográfica (Tabla 62), estos se encuentran dentro del rango general de valores, y lo que más importante desde el punto de vista de fermentación maloláctica, incluso por debajo de vinos como los catalanes realizados con variedad macabeo (De La Presa Owens, 1995) con niveles medios de 1.37 g/L lo superan, también son inferiores a los vinos blancos jóvenes de Madrid (Arroyo, T. y col., 1996) elaborados con la variedad airén con niveles próximos a los 2 g/L. Inferiores así mismo a los vinos rosados de la variedad cariñena y garnacha estudiados por Alvaro M.J. y col. (1997) en vinos de Badajoz con valores siempre superiores al gramo por litro. Pérez-Juán, P.M. y col. (1996) por su parte obtiene valores siempre superiores a 1 g/L e incluso llega a los 2.56 g/L en la variedad prieto picuda.

| País | Región | Tipo | Concentración | | Referencia bibliográfica |
|----------|-----------|---------------------------------|---------------|-----------|--------------------------------|
| | | | Media | Rango | |
| España | Galicia | | 2.1 | 1.1-3.6 | García, M.C. (1990) |
| “ | “ | | | 1.5-4.0 | Mareca, J. (1983) |
| “ | “ | | | 2.8-8.0 | Amerine, M.A. (1976) |
| “ | Rioja | Tinto | 2.55 | | Santos, M.C. (1985) |
| | | | 2.03 | | |
| | | | 1.66 | | |
| | | Blanco | 2.57 | | |
| Francia | | | | 1.5-4.0 | Ribereau-Gayon, J. (1976) |
| Alemania | | | | 1.0-3.0 | Rebelein, E. (1971) |
| Italia | | | 1.6 | 0.96-2.61 | Modi y Guerrini, M. (1976) |
| España | | Chacolí | 2.99 | 2.03-4.22 | Campos, G. (1990) |
| “ | General | Blanco | 2.63 | 1.18-4.08 | Gorostiza, E.F. (1982) |
| | | Tinto | 1.65 | 0.82-2.67 | |
| “ | Barcelona | Macabeo | 2.57 | | De la Presa Owens, C. (1995) |
| | | Xarello | 2.92 | | |
| | | Parrellada | 3.15 | | |
| “ | Madrid | Blanco Jóvenes | 3.9 | | Álvarez, M.J. y col. (1997) |
| “ | Madrid | Airén | | 2.51-2.67 | Arroyo, T. y col. (1996) |
| “ | Valencia | Rosado con Ferm. | | 1.66-1.73 | Aleixandre, J.L. y col. (1998) |
| | | Maloláctica | | | |
| | | Rosado sin Ferm. Maloláctica | | 1.85-1.98 | |

Tabla 61: Valores de Referencia en bibliografía de Ácido Tartárico (g/L) en vinos.

| País | Región | Tipo | Concentración | | Referencia bibliográfica |
|---------|-----------|--------------------------------------------------------------------|----------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| | | | Media | Rango | |
| España | Rioja | Tinto Blanco | Trazas 1.93 | | Santos, M.C. (1985) |
| “ | General | | | 0-3 | Mareca, J. (1983) |
| “ | Galicia | | 0.53 | 0.016-1.6 | García-Jares (1990) |
| “ | Chacolí | | 1.9 | 0.2-4.0 | Campos, (1990) |
| Francia | | | | 5-8 | Rebelein, E. (1971) |
| Italia | | | 0.41 | 0.06-0.75 | Modi y Guerrini (1976) |
| España | Navarra | Tinto Blanco Blanco | | 0.1-0.4 0.6-0.8 1.5-1.7 | Diez de Betancourt, C.A. (1972) |
| “ | Levante | Tinto Blanco | | 0.0-2.0 0.2-1.0 | Diez de Betancourt, C.A. (1972) |
| “ | Galicia | Blanco Tinto y Rosado | 0.1 0.8 | 0.1-0.1 0.2-3.5 | Iñigo, B. (1977) |
| “ | Barcelona | Macabeo Xarello Parrellada | 1.37 1.69 1.01 | | De la Presa Owens, C. (1995) |
| “ | Madrid | Blanco Jóvenes | 2.0 | | Álvarez, M.J. y col. (1997) |
| “ | Madrid | Airen | | 2.67-2.80 | Arroyo, T. y col. (1996) |
| “ | Valencia | Rosado con Ferm. Maloláctica Rosado sin Ferm. Maloláctica | | 0.10-0.13 1.84-2.19 | Aleixandre, J.L. y col. (1998) |

Tabla 62: Valores de Referencia en bibliografía de Ácido Málico (g/L) en vinos.

| País | Región | Tipo | Concentración | | Referencia bibliográfica |
|----------|-----------|------------------|----------------------|-----------|---------------------------------|
| | | | Media | Rango | |
| España | Rioja | Tinto | 1.13 | | Santos, M.C. (1985) |
| | | Blanco | 2.06 1.94 0.49 | | |
| “ | Chacolí | | | 0.1-3.4 | Campos, G. (1990) |
| Alemania | | | | 0.5 | Rebelein, E. (1971) |
| Italia | | | 1.16 | 0.48-3.56 | Modi y Guerrini (1976) |
| España | Levante | Tinto | | 0.2-2.5 | Diez de Betancourt, C.A. (1972) |
| | | Blanco | | 0.5-1.5 | |
| “ | Navarra | Maro | | 1.8-3.0 | Diez de Betancourt, C.A. (1972) |
| | | Blanco | | 1.3-2.4 | |
| | | | | 1.4-2.0 | |
| | | | | 1.0-5.3 | |
| “ | Galicia | Blanco | 3.21 | | Iñigo, B. (1977) |
| | | Tinto y Rosado | 2.6 | | |
| “ | Barcelona | Macabeo | 0.92 | | De la Presa Owens, C. (1995) |
| | | Xarello | 0.63 | | |
| | | Parrellada | 0.67 | | |
| “ | Madrid | Blanco Jóvenes | 0.08 | | Álvarez, M.J. y col. (1997) |
| “ | Madrid | Airen | | 12-14mg/L | Arroyo, T. y col. (1996) |
| “ | Valencia | Rosado con Ferm. | | 1.56-2.25 | Aleixandre, J.L. y col. (1998) |
| | | Maloláctica | | 0.03-0.22 | |
| | | Rosado sin Ferm. | | | |
| | | Maloláctica | | | |

Tabla 63: Valores de Referencia en bibliografía de Ácido Láctico (g/L) en vinos.

Muy interesante por su importancia económica, organoléptica y por ser un objetivo de esta Tesis, es la disminución de acidez por fermentación maloláctica, disminución que es grande en los casos de cepas muy ácidas o de años con maduración deficiente, es un fenómeno normal y en la mayoría de los casos saludable.

Esta transformación, es necesaria en los vinos tintos de calidad y cada vez más popular en los vinos blancos en los que se desea mayor complejidad sensorial (Prahl, y col., 1995). Un vino con excesiva acidez resulta áspero y duro al paladar, mientras que un vino excesivamente desgasificado resulta plano, sin carácter (Alexandre, J.L. y col., 1998).

El ácido Málico en el vino y por acción del *Schyzosaccharomyces pombe*, se transforma en etanol, o también en ácido láctico y anhídrido carbónico por acción de las bacterias constituyendo la base de que en los vinos completamente elaborados sólo se encuentre en pequeñas cantidades este ácido, sustituyéndole el ácido láctico de sabor más suave mejorando así las características gustativas del vino, pero aumentando la acidez volátil por descomposición simultánea del ácido cítrico, y se eleva el pH, lo cual favorece el desarrollo de agentes microbianos.

Se trata de un fenómeno bioquímico, bacteriano normal e imprescindible cuando la uva tinta madura se destina a una vinificación en tinto. No es admisible la presencia de ácido málico en un vino tinto de calidad. Por otra parte el ácido málico, el malato, es un nutriente, un metabolito de fácil asimilación por las bacterias lácticas; de esta forma su presencia en un vino es motivo de inestabilidad microbiana, motivo para que el vino pueda enturbiarse por desarrollo microbiano, motivo, además de posible iniciación de deterioro microbiano más amplio y profundo, con alteraciones en la composición. También el ácido cítrico ofrece el mismo motivo de inestabilidad que el málico. Así ningún vino tinto debe contener ácido málico, ni cítrico y debe evitarse la adición de ácido cítrico como "producto enológico".

Hay tres géneros de bacterias con posibilidad de desarrollarse en el mosto-vino o en el vino y de realizar esta transformación: *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactobacillus*. Las que de forma natural y con mayor frecuencia realizan el paso de ácido málico a ácido láctico son el género *Leuconostoc*.

En orden práctico, en la zona vitícola de Montilla-Moriles (Córdoba), bastante próxima a la zona en estudio, la conversión total del ácido L-málico en ácido L-láctico según Calero, F. y col. (1995), tiene lugar tan sólo en el 20% de los vinos producidos anualmente, planteándose

en muchos casos la utilización de inoculos bacterianos, con el peligro sobre todo si no son autóctonas de pérdida de características específicas del vino.

Siguiendo la comparación de estos valores con los obtenidos por Olalla, M. (1992) en vinos de la misma zona pero elaborados de forma tradicional y sin tecnología definida, se observa como los valores medios en este ácido, han bajado de los 1.3 g/L encontrados en aquella ocasión, pero todavía están lejos de los 0.13 a 0.10 g/L que presentan los vinos de Utiel (Valencia) a los que se le han inducido la fermentación maloláctica según estudios controlados de Alexandre, J.L. y col. (1998) con los consiguientes problemas de alteración microbiológica y calidad organoléptica.

Por último, respecto a las concentraciones de ácido láctico, los valores encontrados en este estudio, oscilan de los 0.64 g/L del vino macabeo a los 1.22 g/L de la variedad bobal. Según los estudios citados anteriormente de Alexandre J.L. y col. (1998), en vinos con fermentación maloláctica dirigida presentan valores entre 1.56 y 2.25 g/L para los que la han sufrido y entre 0.03 y 0.22 para los que no lo han sufrido, lo cual parece confirmar, la realización de la fermentación maloláctica al menos parcialmente por nuestros vinos.

Así y comparándolo con otros vinos españoles (tabla 63), estos valores son ligeramente superiores a los vinos catalanes estudiados por De La Presa Owens (1995), así el elaborado con variedad macabeo presenta valores medios en ácido láctico de 0.92 g/L, superiores también a los rosados de Tierra de Barros (Alvarez M.L. y col., 1997), pero inferiores a los vinos blancos de Tierra de Barros (3) con valores medios de 1.4 g/L e inferiores así mismo a los vinos blancos de la variedad airén de la Comunidad de Madrid y estudiados por Arroyo, T. y col. (1996).

Una alta concentración de azúcares reductores en los mostos, inhibe el metabolismo oxidativo de las levaduras de forma que la cinética de formación del etanol, acetaldehído y ácido acético por las levaduras va a ser variable.

Los niveles en **Acetaldehído** de estos vinos, están claramente dentro de la normalidad si los comparamos con los normales que aparecen tras la fermentación o con los valores de otros vinos (Gorostiza, E.F. y col., 1982; Iñigo, B., 1977, etc.). Así, según Ortega, J. (1985), tras la fermentación, los valores en Acetaldehído son de unos 39 mg/l. En nuestros vinos, la concentración media en este aldehído es de 75.4 mg/l. Valores éstos inferiores a los encontrados por Bravo, F. (1984) en vinos de Jerez y a los rosados de Tierra de Barros en

Badajoz con márgenes que van de los 11 a los 253 mg/L en la variedad cariñena y de 27 a 120 mg/L en los de garnacha (Alvarez, M.L. y col., 1997).

Por el contrario estos valores son ligeramente superiores a los encontrados por De La Presa Owens (1995) en vinos catalanes, así esta autora encuentra valores medios en vinos elaborados a partir de la variedad macabeo de 12.9 mg/L, frente a los 47.4 mg/L de nuestros vinos elaborados con la misma variedad de uva, e inferiores a los vinos tintos del Somontano (Planas y Ruiz, 1997).

Lo que si parece confirmarse según estudios previos realizados en la misma comarca (Olalla, M., 1992), en las mismas variedades o similares, es que, la mejora de la tecnología (mejor control del sulfuroso, una mejor conservación, etc.), reduce considerablemente los niveles en este aldehído de valores medios de 160 mg/L encontrados por dicho autor, a los actuales, lo que parece debido más a una conservación particular del vino que a una característica inherente a los mismos. Estos niveles por otra parte, están muy alejados de los umbrales detectables organolépticamente. Shinohara, T. (1984) sitúa el umbral de detección en 100 mg/l y que pueden influir en procesos de condensación fenólica con las consiguientes alteraciones de color.

Las concentraciones en **Esteres Neutros**, por contra van a ser marcadamente inferiores a los valores medios encontrados en la bibliografía. Las concentraciones de Acetato de Metilo, que según Herranz, M.D. (1994), disminuyen en los procesos de clarificación, son nulas en nuestros vinos y en lo referente al Acetato de Etilo. Gorostiza, E.F. y col. (1982) sitúa los valores medios en 117.9 mg/l para blancos y 132.2 mg/l para tintos; Iñigo, B. y col. (1977) da unos valores de 324.1 mg/l en ésteres neutros para vinos gallegos y por supuesto netamente inferiores a los de Jerez en los que según los trabajos de Bravo, F. (1984) tienen unos valores medio en Acetilo de 460 mg/. Estos datos están de acuerdo con los trabajos realizados por Daudt, C. y col. (1973) que consideran que el acetato de etilo se forma durante la fermentación dentro de la célula y no a través de la esterificación en el medio y que cuando cesa la fermentación también cesa prácticamente su formación y que dichos niveles van a depender de la temperatura de fermentación, de las levaduras, la variedad de uva y el SO₂ y que su formación durante el envejecimiento va a ser baja. Sin embargo, López San Miguel, T. y col. (1983), haciendo experiencias con distintas levaduras, llega a la conclusión que la presencia de Acetato de Etilo en los vinos, no depende de las levaduras y que por encima de 50 mg/l, es de suponer sea debida a la acción de bacterias acéticas, además, según Gomez-

Cordobes, M.C. y col. (1975), el almacenamiento prolongado en locales con temperaturas altas, hacen subir los niveles de Acetaldehído y Acetato de Etilo, siendo aun mayor en presencia de luz.

Pero, en definitiva y según el referido Shinohara, T. (1984), nuestros valores con una concentración media de 87.74 mg/L (oscilando entre los 61.4 mg/L del macabeo a los 107.4 mg/L del tempranillo), estarían por debajo del umbral de percepción organoléptica que él lo sitúa en 150 mg/l, lo cual es importante, ya que este éster y no el ácido acético, es al parecer el responsable de la "acescencia" de los vinos alterados (Ribereau, J. y col., 1972).

En cuanto al **Metanol**, se encuentra en concentraciones muy pequeñas en la práctica totalidad de los vinos (ninguno por encima de los márgenes legales de 0.5 g/l). Estos valores están más en concordancia con los encontrados en bibliografía para los vinos blancos, rosados y tintos (Gorostiza, E.F. y col., 1982; Casais, M., 1984).

Respecto a los **Alcoholes Superiores** nos encontramos con pocos datos comparativos en vinos. Los niveles de Propanol, según los autores citados (Gorostiza, E.F. y col., 1982; Iñigo, B., 1971; García Jares, C.M., 1990; Shinohara, T., 1984; Ducruet, V., 1983), están incluidos dentro de los valores normales.

Igual ocurre con los niveles medios de Isobutanol y Butanol, que se encuentran dentro de los niveles normales y muy alejados de sus umbrales de percepción organoléptica. Estos niveles, según los trabajos de Gomez-Cordobes, M.C. y col. (1975) y Cabezudo, M.D. (1988), no se van a ver modificados sensiblemente durante el almacenamiento, aunque según Herranz, M.D. (1994), disminuyen ligeramente tras la estabilización tartárica, dando este autor unos valores entre 2.74 y 3.94 mg/L para sus vinos estudiados.

Los niveles de los Alcoholes Amílicos presentan en nuestros vinos, valores que oscilan desde los 137.9 mg/L de la variedad tempranillo a los 164.3 mg/L del vino rosado, valores considerados normales por la mayoría de los autores consultados en bibliografía (Alvarez, M.L. y col., 1997; Arroyo, T. y col., 1996; Planas y Ruiz, 1997).

Los valores de **Glicerina**, están dentro de los márgenes establecidos por la mayoría de los autores (Ribereau, J. y col., 1972; Casares, R., 1968; Amerine, M.A. y col., 1974), pero con una clara tendencia a la elevación si se le compara con otros vinos (Gorostiza, E.F. y col., (1982) que da unos valores medio de 6.19 (g/l), Iñigo, B. (1977), García Jares, M.C. y col. (1990) y similares a los dados por Lague, M.A. y col. (1989) que dan unos valores medios de 5.86 (g/l) para vinos Gallegos o Gorinstein, Sh. y col. (1989) que para vinos israelíes da unos

márgenes entre 4 y 6 g/l o Shinohara, T. (1984) de 6.2-7.7 g/l para sus vinos, estableciendo el umbral organoléptico en 10 g/l).

Respecto a la composición mineral de los vinos, es preciso destacar la multiplicidad de factores que pueden contribuir a su contenido, incluyendo entre otros, la polución medioambiental, las prácticas agrícolas, los factores agronómicos o los procesos tecnológicos de elaboración a través de prácticamente todas sus fases (fermentación, maceración, envejecimiento, envasado). De todos ellos, el contacto con materiales de distinta naturaleza y la adición de ciertas sustancias, son los puntos más críticos de contaminación. (Usseglio –Tomaset, 1998).

Los elementos minerales que se encuentra en el vino son cualitativamente los mismos que había en el mosto. Sin embargo, en la vinificación el contenido mineral va aumentando en forma continua sobre todo a medida que avanza la maceración. Sin embargo, en el vino la concentración de potasio y calcio está siempre disminuida (Mareca, 1983).

La disolución de los materiales de construcción de envases, conducciones, máquinas, instalaciones y utensilios en contacto con el mosto o el vino (ambos muy corrosivos debido a su pH aprox. de 3.5 y por su contenido en sulfuroso), produce enriquecimiento en hierro sobre todo y también de calcio y cobre. Otra causa de enriquecimiento mineral, es la adición de los llamados *productos enológicos* de uso legal como sulfuroso, metabisulfito potásico, ferrocianuro potásico, etc. y las impurezas y carga inerte de los mismos, como productos industriales, además de los fungicidas agrícolas, que contienen cobre, zinc, arsénico o plomo.

En el suelo, los aniones y cationes, quedan retenidos en el complejo de intercambio, sólo están disponibles conforme entran en solución por fenómenos de intercambio iónico, esta capacidad de intercambio varía enormemente entre suelos, siendo más alta en los arcillosos y los de alto contenido en materia orgánica (Martínez de Toda, 1991).

Cationes como calcio, potasio y magnesio poseen energías de ligamiento intermedias mientras que el sodio y la mayoría de los aniones, con excepción del fosfato las tienen débiles y consecuentemente, tienden a abundar en la solución del suelo (Vogt, 1986).

Fernández y col. (1987), indican que los elementos metálicos tomados del suelo, se distribuyen en la vid, de forma irregular, existiendo un enriquecimiento especial en las hojas respecto al resto de la planta, existiendo por otra parte, un contenido mayor de Na y K en la pulpa que en los hollejos, semillas o en el raspón, mientras que Mg y Ca parecen estar más concentrados en las semillas. Como consecuencia de esta desigual concentración en el fruto,

el sistema de vinificación empleado influye notablemente sobre el grado de solubilización de los elementos metálicos. En general se admite que existe poca diferencia en el contenido total de cationes entre uvas blancas y tintas, sin embargo, el prensado y la maceración prolongada de las partes sólidas de la vendimia puede extraer en mayor medida, los cationes localizados en hollejos y semillas, y en consecuencia no es de extrañar una mayor presencia de elementos minerales en vinos tintos que blancos.

La operación que va a tener mayor trascendencia en el contenido de elementos minerales, es el prensado, existiendo trabajos que demuestran un aumento general de elementos metálicos en mosto prensa respecto al escurrido libremente, o en mostos procedentes de una destrucción mecánica extensiva de las uvas durante el prensado. Así, Casp y col. (1986), encuentran unos niveles superiores de Fe, Ca, Mg y K, junto con polioles en el mosto prensa, respecto al mosto flor que al contrario, tiene mayor concentración de alcoholes superiores, y si este mosto flor procede de uvas alteradas, se produce un incremento en los niveles de Na y K. Un mayor nivel de sólidos en suspensión en el mosto, da lugar a vinos con un contenido más elevado en cationes, sobre todo Fe y K.

Hay que indicar, además, la importancia de los terrenos de cultivo, pues en mayor o menor medida, acompañan a los racimos y su contribución de una manera global, puede ser incluso superior a la del prensado.

Hoy en día, la determinación de minerales y oligoelementos ha adquirido una importancia considerable puesto que ejercen una notable influencia en los procesos tecnológicos de producción de vinos, con efectos negativos en algunos casos, como reacciones de oxido-reducción y quiebras (Fe y Cu), precipitación de polifenoles (metales divalentes), precipitaciones tartáricas (K y Ca), modificaciones coloidales y formación de geles (metales alcalinoterreos) o alteraciones de las características organolépticas (Vogt, 1986).

Es conocido el hecho de que los metales influyen sobre la estabilidad, color y transparencia de los vinos; elementos como Cu y Fe han sido objeto de estudios enológicos al respecto. El Mg parece desempeñar un papel importante en la separación de sustancias coloidales, mientras que otros elementos como Sn y Al son responsables de problemas de turbidez. Además, se ha puesto de manifiesto la influencia de los elementos traza sobre las características organolépticas, indicando los efectos positivos del Cr y los negativos de

niveles elevados de Al, Ni o Na puesto que comunican sabores desagradables (Almeida y col., 1994).

Las levaduras, como cualquier otro organismo vivo, necesitan elementos inorgánicos para su crecimiento y reproducción; por ello, la limitación de estas sustancias en el mosto reduce la actividad fermentativa (Dombek e Ingram, 1986). Los metales minoritarios forman parte de moléculas biológicas, de sistemas enzimáticos de las levaduras (el zinc es un componente de la alcohol deshidrogenasa), y algunos, como el hierro y el cobre, participan en reacciones redox en dichos microorganismos (Fernandez-Pereira, 1988).

Se han sugerido algunos efectos positivos de la adición de ciertos oligoelementos, (en concentraciones adecuadas) durante el proceso de obtención del vino; algunos estudios han demostrado su influencia sobre el desarrollo de levaduras; así la adición de Mn, Zn y Mo a los mostos puede provocar una aceleración importante en la reproducción de las levaduras, reducción de la acidez total e incremento en el contenido de alcohol y de la biomasa (Fernández, 1988). La presencia de un exceso de hierro (más de 6 mg/l) puede frenar la fermentación, así como el aluminio y el cobre, si rebasan ciertos límites (Primo, 1979).

Normalmente, la concentración total de sales minerales del mosto es la apropiada para el desarrollo de las levaduras. Sin embargo, en el mosto existen compuestos orgánicos que secuestran estos elementos reduciendo su concentración efectiva (Arcos y col., 1993; Jackson, 1994).

Concentraciones de Cu hasta un máximo de 10 mg/Kg producen una pequeña reducción en el porcentaje de alcohol y un incremento en los ácidos volátiles y sulfuro de hidrógeno en el vino. Se ha reseñado la relación directa entre el contenido de Cu en los mostos y la actividad polifenólica durante la fermentación (Sanchez-Pineda y Martín, 1997).

En cambio, otros elementos como Pb, Co o Cu pueden producir una acción negativa por inhibición de los sistemas enzimáticos de las levaduras. Se ha descrito la influencia de la adición de sales de Mn durante la obtención del vino, sobre su contenido en aminoácidos esenciales, así como que Mn y Co estimulan la autooxidación del vino, produciendo aldehidos y diacetilo durante el envejecimiento. Algunos procesos oxidativos producidos por microorganismos han sido relacionados con el contenido de Cu en el vino, (Fernández, 1988).

En otro orden de cosas, es bien conocida la importancia del estudio del contenido de elementos metálicos en vinos desde el punto de vista de su caracterización, objetivo propuesto en esta tesis doctoral.

El contenido de **potasio** en el mosto, es función de la variedad de uvas, las condiciones climatológicas de su desarrollo y del tiempo de recolección; conforme avanza la vinificación, se produce una progresiva disminución debido por una parte al consumo por las levaduras y por otra, a su precipitación como bitartrato potásico. Su contenido, es superior en vinos tintos e inferior en rosados y claretes, mientras que los blancos, presentan valores intermedios.

Es el catión predominante en el vino, así como el catión fundamental en el abonado y nutrición de la viña, si bien Diez, (1986), pone de manifiesto en trabajos de fertilización de viñas con estiércol y potasio, que la climatología, va a tener mayor influencia sobre la producción de uva que ambos factores, además de ser un factor trascendente en la transformación microbiana y bioquímica que conlleva el paso de mosto a vino y de vino joven a viejo. (Jaime, 1974). Su contenido en el mosto, es función de la variedad de uvas, las condiciones climatológicas de su desarrollo y del tiempo de la recolección, junto a otras variables como son la temperatura de fermentación y de almacenamiento, duración del mismo, pH, porcentaje de alcohol, uso de resinas de intercambio iónico, agentes de acabado, auxiliares de filtración entre otros; todos estos factores influyen en el contenido de potasio en el vino terminado. (Amerine y col., 1974).

Los productos enológicos que hoy día se usan son, normalmente sales de potasio, por la buena solubilidad que tienen la mayoría de las sales de metales alcalinos, y la preferencia higiénica del potasio al sodio. Sin embargo debido a la sobresaturación de los vinos en bitartrato potásico es por lo que ha de restringirse todo lo posible el uso de estas sales (metabisulfito potásico, ferrocianuro potásico, etc.) (Mareca, 1983).

El potasio, afecta a la calidad sensorial, disminuyendo la sensación de acidez. Precipita fácilmente en los vinos en forma de bitartrato potásico. Primo (1979) y Jaime (1974) en sus trabajos con vinos de la Rioja, consideran que valores altos en potasio, se identifican en la mayoría de los casos con vinos estimados de gran calidad, reservándose incluso para reserva. Somers (1977), ha realizado un trabajo similar con vinos australianos. Nuestros mostos con valores medios de 663 mg/L y un rango comprendido entre los 347.5 y los 1070 mg/L, presentan valores considerados normales (Vogt, 1986; Mareca, 1983; etc.), pero ligeramente inferiores a los vinos de Badajoz (Fernández, 1987) o a los de Galicia (Iñigo, 1977).

Los vinos con valores comprendidos entre 442.5 y 682.5 mg/L (también expresado como concentración media) son ligeramente inferiores a los dados como referencia por Cabanis (1996), el cual los sitúa entre 0.7 y 1.6 g/L o a los de Mareca (1983). Inferiores así mismo a todos los encontrados en Bibliografía (tabla 63), y por debajo de los vinos de Tenerife (Falcon, 1983), los de Málaga (Ureña, 1988) así como los de Montilla-Moriles según Ordoñez (1983) y los de Valdepeñas (Ortiz, 1983). Observándose al mismo tiempo, una progresiva disminución en su contenido conforme avanza la vinificación: consumo por levaduras y disminución de su solubilidad (Navarro y col., 1988; Jaime, 1974)

Comparándolos así mismo con otros estudios de vinos de la zona (Olalla, 1993), los considerados en este estudio, presentan valores medios inferiores, frente a los 663.2 mg/L como valor medio del estudio anteriormente citado. Diferencias lógicas, si tenemos en cuenta que los estudios anteriores al nuestro, son sobre vinos artesanales no estabilizados por ningún tratamiento con frío.

El contenido en **sodio** oscila entre amplios límites, según la naturaleza de los terrenos de cultivo. Su presencia corresponde normalmente al aporte natural o por adición de NaCl (Cl⁻ y Na⁺ suelen estar en proporción equivalente). Como en el caso de los cloruros, hay más sodio en los vinos procedentes de vides de plantaciones próximas al mar y en las restantes ocasiones en que se añade NaCl.

Su concentración, no queda prácticamente afectada por el proceso de fermentación ni por las operaciones posteriores, pero puede aumentar considerablemente cuando los vinos o mostos se tratan con resinas de intercambio iónico (Primo, 1979). Los valores de los vinos analizados oscilan de los 6.72 mg/L (vino tinto) a los 17.03 mg/L (vino blanco), son inferiores a los valores medios consultados en bibliografía (tabla 64), pero dentro de los márgenes considerados normales.

| País/Región | Tipo | Sodio | | Potasio | | Referencia Bibliográfica |
|------------------|--------------------------------------------|-------|-----------|---------|-----------|---------------------------|
| | | Media | Rango | Media | Rango | |
| Tenerife | | 66.3 | 6.3-17.4 | 809 | 500-1200 | Falcón, J.F. (1983) |
| Galicia | | 22.4 | 2.1-96.6 | 694 | 215-1583 | García Jares, M.C. (1990) |
| Málaga | | 144.3 | 6.3-28.5 | 2006 | 850-3550 | Ureña, M.E. (1988) |
| Tarragona | En rama y embotellado distinta procedencia | 3.0 | 13-54 | 1060 | 859-1360 | Larechis, M.S. (1981) |
| | | 2.4 | 17-37 | 1002 | 809-1351 | |
| | | 11.2 | 27-288 | 1040 | 833-1376 | |
| | | 16.2 | 17-1926 | 877 | 122-1352 | |
| La Mancha | | | 5.6-22.8 | | 656-1680 | García Olmedo, R. (1983) |
| Montilla-Moriles | Mosto | 76.0 | | 1603 | | Ordoñez, R. (1983) |
| | Vino | 36.0 | | 778 | | |
| Cataluña | Vino Blanco | 33.0 | 11-72 | 714 | 558-921 | Muñoz, M. (1987) |
| | | 27.0 | 13-60 | 791 | 482-1137 | |
| Valdepeñas (g/L) | Cosecha 79 | | | | | Ortiz, J.A. (1983) |
| | Blanco | 0.003 | 0.0-0.01 | 1.00 | 0.92-1.21 | |
| | Tinto | 0.017 | 0.0-0.04 | 1.13 | 0.95-1.36 | |
| | Cosecha 80 | | | | | |
| | Blanco | 0.007 | 0.0-0.2 | 0.87 | 0.77-0.95 | |
| | Tinto | 0.023 | 0.01-0.03 | 0.93 | 0.82-1.09 | |
| Tierra de Barros | Mosto | | 2-29 | | 250-2404 | Fernández, C. (1987) |
| | Vino | | 35-38 | | 1733-1750 | |
| Galicia | Mosto | | 24-184 | | 1400-2720 | Iñigo, B. (1977) |
| | Vino Blanco | | 12-124 | | 860-1160 | |
| | Vino Tinto | | 10-360 | | 620-1600 | |
| Grecia | Tinto | 26.0 | 7-150 | 1446 | 961-2089 | Lazos, E.S. (1989) |
| | Rosado | 24.8 | 5.5-92.5 | 1584 | 955-2062 | |
| Galicia | | 43.0 | 28.6-79.4 | | | González, A. (1984) |
| Rioja | Vino Tinto | 11.0 | | 1220 | | González y col. (1987) |

Tabla nº 64: Valores de Referencia encontrados en bibliografía para el sodio y el potasio.

La presencia de **calcio** en mostos y vinos procede del propio fruto, ya que es constituyente de la estructura de la pulpa y de las membranas celulares; interviene en la permeabilidad de las células y es cofactor en las fosfatasas. También procede de la contaminación por contacto con tierra, con los coadyuvantes de filtración que lo contienen y con los depósitos de cemento. Primo, (1979) y Amerine y col. (1974) además, incluyen los tratamientos de los mostos con sulfato o carbonato cálcico, por el uso de agentes como la bentonita sódica, por los tratamientos con intercambiadores iónicos, por las concentraciones en etanol y en los demás constituyentes del vino (sulfatos, tartratos, etc.), por el pH y por el tiempo y temperatura de almacenamiento.

La importancia de su determinación exacta viene dada por el problema de la precipitación como tartrato cálcico, junto con el potasio, pero de forma más enérgica que éste por ser bivalente, asegura la precipitación de los coloides, sobre todo del fosfato férrico en la quiebra férrica y del coloide formado por acción del tanino sobre la gelatina en el colado de los vinos (Ribereau y col., 1972).

Los niveles de calcio, van a estar limitados por el pH, grado alcohólico y el producto de solubilidad del tartrato cálcico, siendo inferior en vinos que en mostos. Según Mareca (1971), cuanto menor sea su concentración, mayor estabilidad frente a insolubilizaciones.

Los vinos estudiados, a diferencia del potasio, presentan valores medios comparables a los revisados en bibliografía (tabla 65), similares a los vinos griegos (Lazos, 1989) y franceses Martín y col. 1994, y ligeramente superiores a los vinos españoles de la Rioja (González y col., 1987), Valdepeñas y algunos gallegos (Iñigo, 1977)

Asimismo, y como ocurría en el caso del potasio, se produce una disminución de la concentración al pasar el mosto (valor medio 168.7mg/L) a vino (valores medios entre los 47.8 mg/L de los vinos rosados y los 82.3 mg/L de los blancos).

El **magnesio** es componente fundamental de la clorofila, y de otras enzimas como las fosforilasas. Participa en el metabolismo de glúcidos y en la respiración celular.

| País/Región | Tipo | Calcio | | Magnesio | | Hierro | | Ref. Biblio. |
|------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------|
| | | Media | Rango | Media | Rango | Media | Rango | |
| Tierra de Barros | Mosto Vinos | | 6-346 54-59 | | 7.5-137 95-100 | | | Fernández, C. (1987) |
| Galicia | Mostos Blanco Tinto | | 36-198 53-98 50-99 | | 10-72 73-115 44-107 | | 5.6-37.0 4.5-10.6 3.2-35.4 | Íñigo, B. (1977) |
| Grecia | Tinto Rosado | 30.7 33.7 | 14-45 23-44 | 103.4 100.4 | 86.5-120.5 90-121 | 3.4 3.7 | 0.75-5.7 1.9-5.6 | Lazos, E.S. (1989) |
| Galicia | | | | 32 | 26.3-49.4 | | | González, A. (1989) |
| Grecia | Blanco Rosado Tinto | | | | | 5.9 3.0 6.1 2.4 7.7 2.4 | 3.8-7.4 1.6-5.7 2.9-9.2 0.9-5.4 4.6-10.3 1.6-4.1 | Soulis, Th. (1989) |
| Mentrida | Cosecha-83 Rosado Tinto Cosecha-84 Rosado Tinto | | | | | | 2.5-6.0 2.0-3.6 2.6-10.6 1.8-9.4 | González, M.J. (1982) |
| Francia | Mosto | 79±30 | | 73±19 | | 0.89±0.6 | | Martin y col., (1994) |
| Rioja | Vino Tinto | 68 | | 85 | | 2.5 | | González y col., (1987) |
| Tenerife | | 60.7 | 32.2-106.4 | 102 | 13-158 | 8.1 | 1.7-14.7 | Falcón, J.F. (1983) |
| Galicia | | 68.2 | 40.2-124.2 | 65.6 | 29.2-113.2 | 4.6 | 0.9-17.5 | García Jares, M.C. (1990) |
| Málaga | | 74.3 | 50-110 | 18.7 | 9.0-33.5 | | | Ureña, M.E. (1988) |
| Tarragona | En rama y embotellado distinta procedencia | 57 74 66 65 | 40-78 21-118 48-100 7-100 | | | 9.9 12.8 7.5 7.6 | 2.3-14 4.8-61 4.1-11.6 1.2-15.2 | Lanechis, M.S. (1981) |
| Montilla-Moriles | Mosto Vino | 501 42.5 | | 68.1 50.1 | | | | Ordoñez, R. (1983) |
| Cataluña | Vino Blanco Dist. proc. | 60 82 | 44-82 54-107 | 124 92 | 87-159 60-139 | 9.1 12.9 | 2.8-15.0 3.5-21.4 | Muñoz, M. (1987) |
| Valdepeñas (g/L) | Cosecha-79 Blanco Tinto Cosecha-80 Blanco Tinto | 0.04 0.046 0.059 0.060 | 0.025-0.050 0.03-0.09 0.05-0.07 0.05-0.07 | 0.089 0.097 0.117 0.124 | 0.062-0.139 0.078-0.127 0.109-0.142 0.109-0.157 | 0.011 0.006 0.01 0.009 | 0.008-0.013 0.00-0.012 0.007-0.013 0.006-0.013 | Ortiz, J.A. (1983) |

Tabla nº 65: Valores de Referencia encontrados en bibliografía para el Calcio, Hierro y Magnesio.

Amerine y col. (1974) indican, que hasta ahora, los enólogos, no se han interesado por las variaciones normales del contenido de magnesio en vinos. Pese a ello, existen indicios de que puede ser de importancia en la estabilidad del tartrato y en el sabor ácido.

En sus niveles, influyen la utilización de agentes filtrantes, el almacenamiento en recipientes de hormigón, los tratamientos de afinado, el uso de resinas de intercambio, la concentración de alcohol y otros constituyentes como son los tartratos y sulfatos, el pH y el tiempo y temperatura de almacenamiento.

Según Cabanis (1996); los valores considerados normales se sitúan entre 0.05 y 0.14 g/L, margen en el que estarían incluidos todos nuestros vinos, valores asimismo, en este caso similar a los encontrados en otros estudios aplicados a vinos de la zona (Olalla y col., 1993; Cabrera y col., 1995).

En vinos conservados al abrigo del aire, como el medio es reductor, el **hierro** está enteramente al estado ferroso o hierro bivalente, forma en la cual es soluble, aún en dosis elevadas. Pero en los vinos con oxígeno disuelto, debido a una aireación, el hierro se oxida, pasa a férrico que puede precipitar la materia colorante o el ácido fosfórico.

La precipitación de fosfato férrico coloidal produce en los vinos blancos un enturbiamiento de aspecto lechoso, conocido como quiebra blanca. El tanato férrico precipita en forma de una película azul negruzca, que se denomina quiebra azul. Estas quiebras pueden aparecer cuando el hierro alcanza 10-20 mg por litro, según Ribereau y col. (1972), o por encima de unos 7 a 10 mg/l según Amerine y col. (1974).

En nuestros mostos, se observan bajos niveles de hierro (del orden de 1 a 3 mg/L) que nos hace suponer que aún en el supuesto que en algunas zonas de la Comarca existan altas concentraciones de Fe en el terreno, éste no pasa por vía biológica a la uva, además, como es bien conocido, al no producirse un alto incremento en el mosto, es de suponer que las prensas utilizadas así como las conducciones, son de la suficiente calidad y que según los autores citados anteriormente como por ejemplo Ribereau y col. (1971), no pueden originar una quiebra.

Además, reseñar que los valores medios de hierro encontrados en vinos, están en los márgenes considerados normales por los citados Cabanis (2 a 10 mg/L) o Vogt (4 a 20 mg/L) y similares a los encontrados en bibliografía (tabla 65) para estos tipos de vinos, elaborados en bodegas con todas las garantías tecnológicas disponibles (inferiores en todos los casos a los 5 mg/L), lo cual queda demostrado por la gran disminución respecto a los valores

obtenidos por Olalla y col. 1993 en vinos de la misma zona pero obtenidos de forma artesanal, con valores medios en este caso, de 66 mg/L; en cambio, resultan similares a los obtenidos más recientemente por Cabrera y col. (1975) con un contenido medio de 1.72 mg/L.

Por último, se ha realizado un estudio de la **evolución** de los distintos minerales a través del proceso de fermentación, y su relación con la actividad de las levaduras, para ello, se analizaron muestras correspondientes a las 5 fases sucesivas del proceso: 1. Mosto. 2. Primera fase de fermentación 3. Fermentación tumultuosa 4. Fase postfermentativa y 5. Vino estabilizado, previamente y previo a su comercialización.

Los datos obtenidos, aparecen en la tabla 66, y representados de forma gráfica en las figuras 14 a 20.

| Concentraciones mg/L | | | | | | |
|-----------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| | Hierro ($\bar{x} \pm \sigma_{n-1}$) | Cobre ($\bar{x} \pm \sigma_{n-1}$) | Magnesio ($\bar{x} \pm \sigma_{n-1}$) | Sodio ($\bar{x} \pm \sigma_{n-1}$) | Potasio ($\bar{x} \pm \sigma_{n-1}$) | Calcio ($\bar{x} \pm \sigma_{n-1}$) |
| | 2.77 | 0.520 | 36.70 | 17.40 | 1318.50 | 112.80 |
| Fase 2 | 2.85 | 0.500 | 36.60 | 17.90 | 893.80 | 97.40 |
| Fase 3 | 2.86 | 0.990 | 38.73 | 19.60 | 673.80 | 86.70 |
| Fase 4 | 2.12 | 0.120 | 36.92 | 13.60 | 660.80 | 87.40 |
| Fase 5 | 2.39 | 0.100 | 36.21 | 15.80 | 549.10 | 56.40 |

Tabla 66: Concentración de metales a lo largo de la fermentación

De acuerdo con estos datos podemos señalar que las concentraciones de potasio y calcio, se redujeron durante la segunda mitad de la fermentación, debido probablemente según Muñoz y col. (1989) a su consumo por las levaduras y a su precipitación como bitartrato potásico y tartrato cálcico, a medida que aumenta el grado alcohólico. Mareca, (1983), Moreno-Clavel y Moreno-Grau (1985) y por supuesto por la técnica de estabilización por frío (-5°C) a la que se sometieron como proceso previo a su comercialización.

Por el contrario, las concentraciones de sodio y magnesio, no experimentaron grandes variaciones en el proceso fermentativo, estando este punto de acuerdo con los trabajos de Zufía y col. (1999).

Al igual que en otros estudios similares (Zufía y col., 1999), los niveles de hierro, aumentan en la primera fase de la fermentación, reduciéndose en la segunda fase de la fermentación, debido según postulan Moreno-Clavel y Moreno-Grau (1985) a que este elemento junto con el cobre y el zinc son necesarios para el desarrollo de las levaduras.

Durante la fermentación, el hierro que estaba parcialmente fijado por las levaduras en el mosto, puede pasar de los sólidos suspendidos al vino (mayor concentración de hierro en el vino que en el mosto), también se ha demostrado una ligera disminución de su concentración al comienzo de la fermentación, probablemente como consecuencia de su incorporación a las células de las levaduras, para posteriormente, recobrar el nivel original durante la fermentación tumultuosa. (Fernández y col., 1987).

Este cobre, y según nuestros estudios, varía poco en la primera fase de la fermentación, pero en la segunda, y probablemente debido a la formación y precipitación de sulfuro de cobre (por reacción extracelular con el H₂S formado por la degradación de las proteínas por las levaduras).y en parte a la absorción de este catión sobre coloides y a su sedimentación posterior (Ribereau-Gayon y col., 1977).

Figura 14

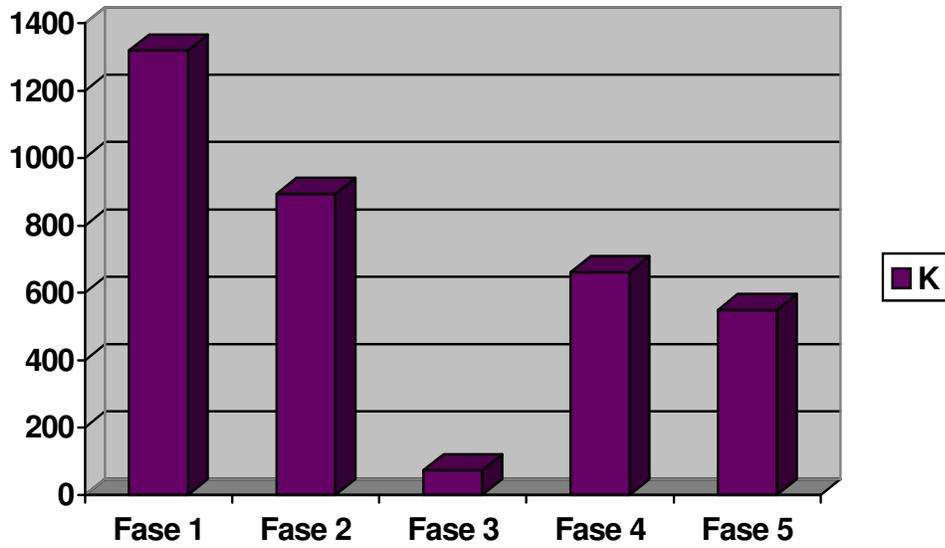
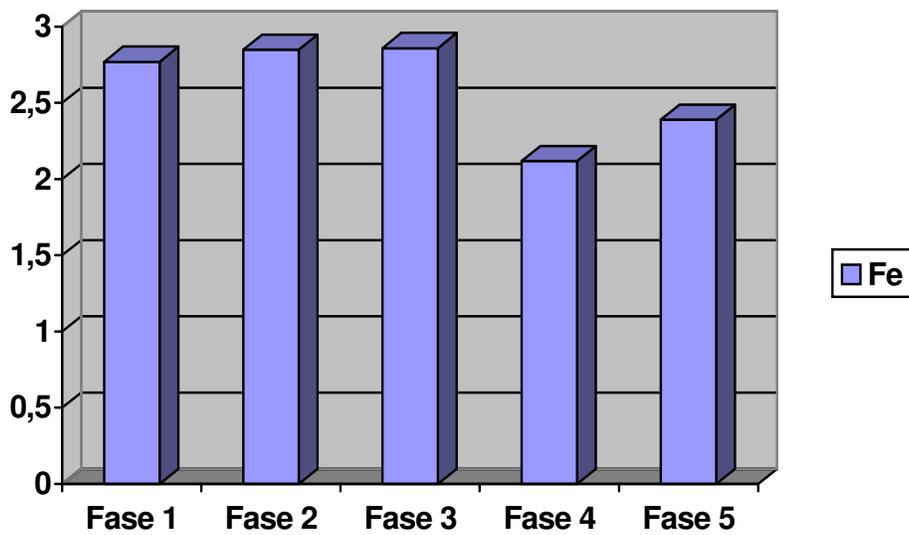


Figura 15



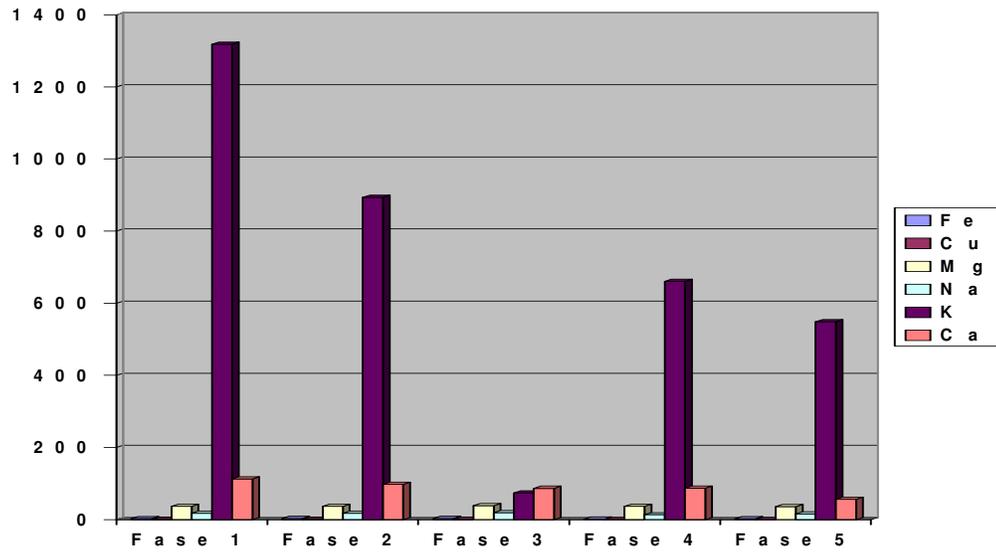


Figura 16

Figura 17

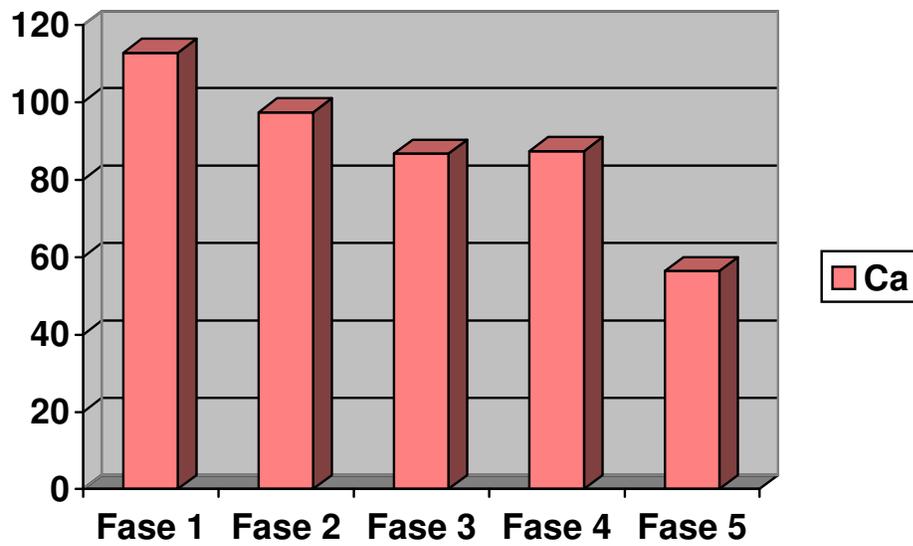


Figura 18

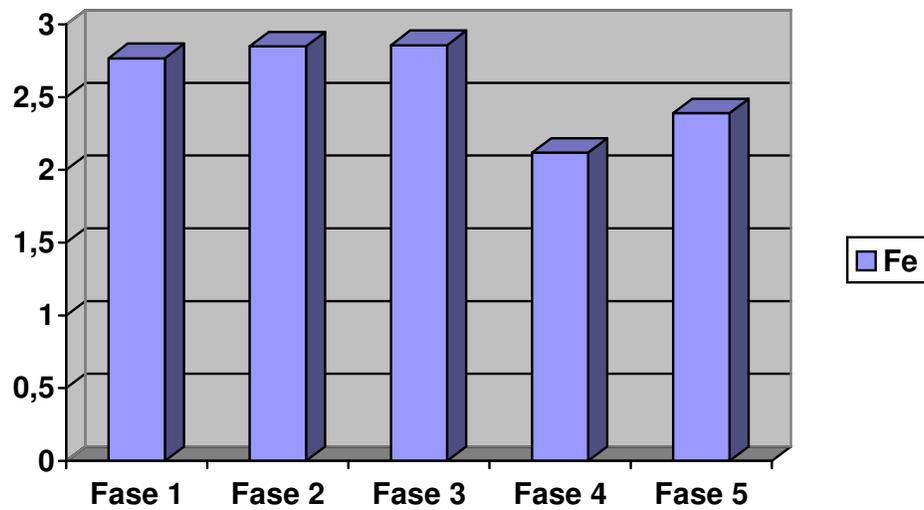


Figura 19

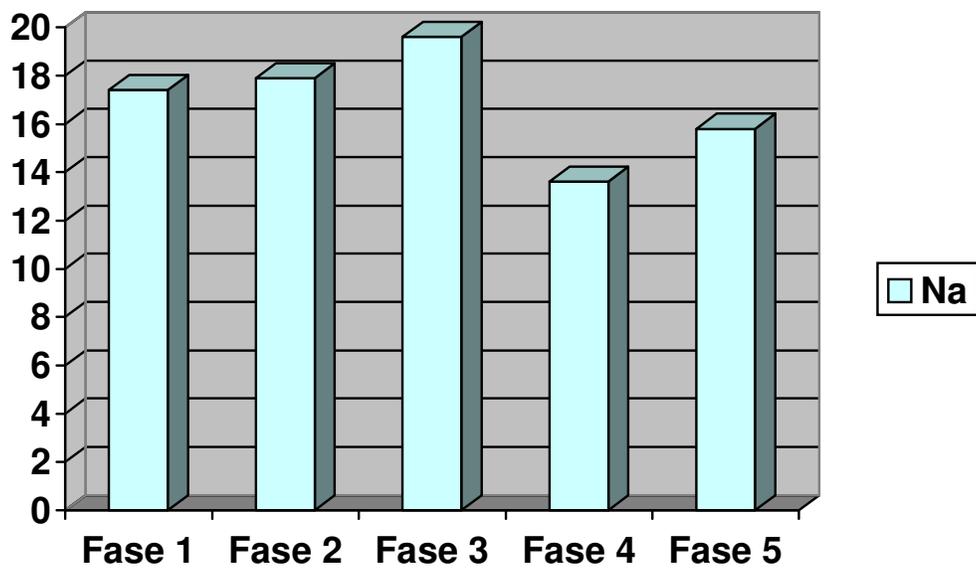
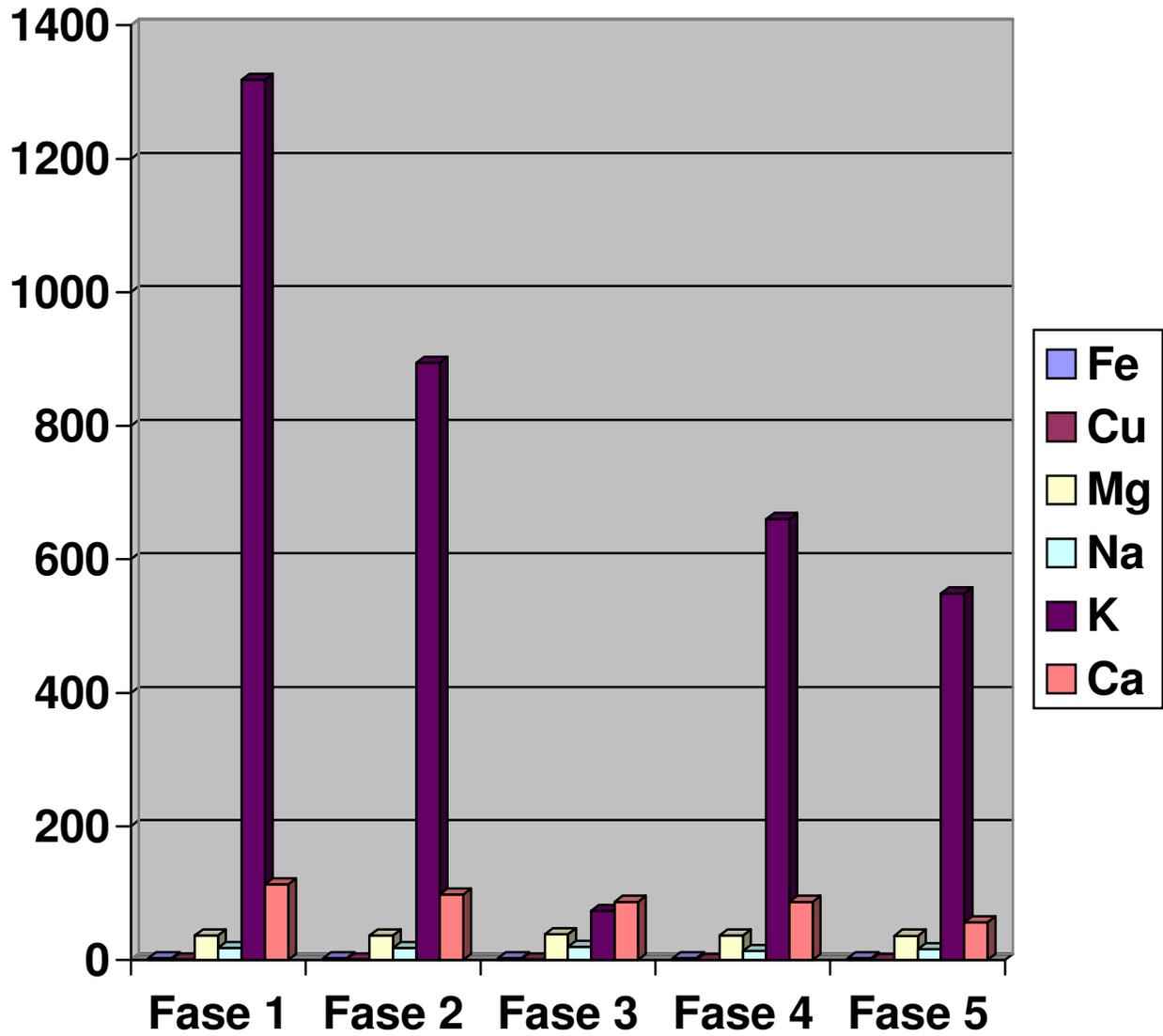


Figura 20



Levaduras en Uvas

En el estudio realizado por Davenport (1972) se puso de manifiesto la presencia sobre hojas, uvas y suelo de levaduras pertenecientes a los géneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Endomycopsis*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Nadsonia*, *Schizosaccharomyces* y *Torulopsis*. Como ya viene siendo habitual, la presencia de *Saccharomyces spp* resultó ser muy escasa, considerando algunos autores que puede ser debido a que la aportación mayor de esta especie provenga de la propia bodega y del material vinario, más que de la superficie de las uvas (Rosini, 1984) .

Por su parte Goto y Oguri en Japón (1983) aislaron *Candida spp.*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia spp.*, *Rhodotorula spp.*, *Saccharomyces spp.* y *Totulopsis spp.* En 1985, Parish y Carrol realizaron un estudio sobre la microflora en uva Muscadina (*Vitis rotundifolia*), encontrando levaduras de *Candida spp.*, *Lodderomyces spp.*, *Pichia spp.*, *Rhodotorula spp.* así como *Hanseniaspora osmophilia*.

Más recientemente, y en nuestro país, Angulo y col. (1993) realizan un estudio sobre la flora levaduriforme asociada a diferentes variedades de *Vitis vinifera* de la zona vitivinícola de “O Rosal” (Suroeste de Galicia). En concreto las cepas que estudian son “Albariño”, “Treixadura”, “Loureiro” y “Mencía”. Las levaduras que aíslan son: *Candida hellenica*, *Candida valida*, *Candida vini*, *Cryptococcus albidus*, *Debaryomices hansenii*, *Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Rhodotorula spp*, *Sporobolomyces roseus*, *Torulaspota delbrueckii*, *Torulaspota globosa* y *Zygosaccharomyces rouxii*. Ningún aislamiento corresponde a *Saccharomyces cerevisiae*.

En 1995, Briones y col. realizan un estudio de las levaduras presentes en uvas de la variedad Airen, aislando finalmente las siguientes especies: *Pichia guillermondii*, *Candida tenuis*, *Cryptococcus laurentii*, *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus albidus*, *Sporobolomyces roseus* y *Debaryomyces hansenii*.

Nosotros, en este trabajo y sobre muestras de uvas pertenecientes a las variedades macabeo, tempranillo, jaén blanco y bobal, hemos podido aislar levaduras que pertenecían a las siguientes especies: *Candida stellata*, *Candida valida*, *Kloeckera apiculata* *Pichia anomala*, *Rhodotorula glutinis* y *Trichosporon cutaneum*.

Hemos de mencionar que, de forma general, la microflora levaduriforme encontrada en este trabajo sobre las uvas coinciden con la encontrada en los estudios de los autores consultados con las lógicas peculiaridades propias de la ecología de la zona objeto de

estudio. Queremos, sin embargo, hacer mención expresa al aislamiento de la especie *Trichosporon cutaneum*, especie poco representativa por su frecuencia (1.82%) y cuya presencia posiblemente se deba a las manipulaciones sufridas por las uvas durante el proceso de recolección y transporte como así lo han puesto de manifiesto entre otros autores Barcenilla y col. en 1990. *Trichosporon* es un género morfológicamente muy variable, con células gemantes, pseudomicelio o micelio verdadero que se fragmenta formando artrosporas. Ciertas especies fermentan los carbohidratos por lo que podrían perjudicar en la fermentación del mosto.

Levaduras en mostos

La composición de la microflora en los mostos es variable cuantitativa y cualitativamente según sea la zona geográfica de donde estos procedan. Esta composición se ve influenciada asimismo por el clima, el año, los tratamientos fitosanitarios y los tratamientos tecnológicos aplicados al mosto (sulfitado...), como así lo han puesto de manifiesto diferentes autores (Castelli y col., 1974; Llaguno y col., 1974; Mateos y col., 1985; Querol y col., 1987; Sanchez-Infante y col., 1986; Minarik, 1971; Lafon-Lafourcade, 1983;.....). Son numerosos los factores que hacen que las comparaciones entre la composición de la flora levaduriforme de unos mostos y otros sean prácticamente vanas puesto que los parámetros que acabamos de mencionar no son controlados, ni siquiera controlables, en su inmensa mayoría.

La distribución de las diferentes especies de levaduras obedece, al parecer, a una ordenación geográfica, como sucede con otros seres vivos. Está ampliamente demostrado que la distribución de la flora epifítica de la uva se adapta en cada región a la influencia del clima y de la técnica vitivinícola, que opera a través del tiempo como un proceso eliminatorio hacia las especies menos adaptadas al medio (Castelli y col., 1974). Las levaduras salvajes de los mostos son capaces de una gran variabilidad y cambian mucho según las regiones, esto determina que dentro de una misma especie se desarrolle una variedad de razas regionales específicas de cada una de ellas (Castelli y col., 1974; Llaguno y col., 1974).

La sucesión de especies de levaduras a lo largo de la fermentación espontánea se repite sistemáticamente en los mostos de cada zona vitivinícola, con las lógicas diferencias ecológicas (Suárez, J.A. y col., 1992).

Por lo que respecta a la identificación de la flora levaduriforme presente en los mostos estudiados destacar que se han identificado seis especies de las cuales, la más abundante a lo largo del proceso fermentativo fue *Saccharomyces cerevisiae*.

En la primera fase de la fermentación espontánea de los mostos estudiados es donde encontramos una mayor diversidad de especies de levaduras. En función de su capacidad para formar esporas, el porcentaje de especies anascoesporógenas es superior en esta fase, con un 80% de los aislamientos, al correspondiente a las especies ascoesporógenas (20% de aislamientos).

En el grupo de las anascoesporógenas, la especie *Kloeckera apiculata* es la que aparece en una mayor proporción con un 52 % de aislamientos en la primera fase de la fermentación. Le siguen en importancia dos especies pertenecientes al género *Candida*, siendo *C. Stellata* la más abundante de ellas con un 20% de aislamientos mientras que *C. Valida* es identificada únicamente en un 2%. Por último destacar en este grupo la especie *Rhodotorula glutinis* que es encontrada en esta fase en un 6% del total de los aislamientos.

Con respecto a las levaduras ascoesporógenas la más abundantemente encontrada es *Saccharomyces cerevisiae* con un 18% del total de aislamientos mientras que la especie *Pichia anomala* presenta un porcentaje del 2%.

El género *Hanseniaspora* presenta células ovoides, elongadas o en forma de limón. Raramente se forma un pseudomicelio. La reproducción vegetativa se realiza por gemación en ambos polos, siendo estas células diploides. Las ascosporas (1–4 por asca) son esféricas, tomando posteriormente forma de sombrero o de Saturno. Fermentan los carbohidratos pero no pueden emplear el etanol como única fuente de carbono. No asimilan los nitratos, requiriendo inositol y pantotenato para el desarrollo. No producen ácido acético y la reacción del azul de Diazonio B es negativa. La especie *Hanseniaspora guillermondii* Pijper cuando es cultivada en mosto de uva presenta unas células típicamente apiculadas con gemación polar. Estas se presentarán bien aisladas, bien en parejas de dos elementos. En agar malta las células que se pueden observar son del mismo tipo, presentando estas una fácil esporificación, con cuatro esporas por asca y otras fuera de estas, que se rompen fácilmente. Al sembrar en mosto de uva, el cultivo se presenta turbio, con un ligero

deposito y trazas de anillo y velo incompleto muy tenue. La estría en agar malta es blanca, con cierta tonalidad marrón, de desarrollo escaso y aspecto húmedo. Esta especie se caracteriza por no asimilar los nitratos, no escindir la arbutina ni desarrollarse en presencia de alcohol etílico. Únicamente fermenta la glucosa y presenta un poder fermentativo en torno al 4%.

Por su parte, en el género *Kloeckera* las células son apiculadas, ovoideas o elongadas. No suelen presentar pseudohifas y, cuando estas están presentes raramente se encuentran bien desarrolladas. Tampoco producen ascosporas. Fermentan la glucosa, no asimilando los nitratos. El género teleomórfico es *Hanseniaspora* por lo que requieren Inositol y pantotenato para el desarrollo, no producen ácido acético y, la reacción del azul de Diazonio B es negativa. Son siete el número de especies que se incluyen en este género. La especie más representativa es *Kloeckera apiculata* (Rees) Janke, siendo su equivalente teleomórfico *Hanseniaspora uvarum* (Niehaus) Shehata, Mrak & Phaff. Se presenta, si se trata de un cultivo en mosto joven, bien aisladas, bien en parejas gemantes de forma apiculada. Las células hijas, muy pequeñas, aparecen aisladas y de forma ovoide. En cultivo agar-malta, las células son de características análogas, pero con tendencia a las formas alargadas y a la gemación polar. No esporula en ninguno de los medios habituales. En algunas células se observa un granulo de grasa apical, muy refringente. El cultivo en mosto de uva se presenta muy turbio, con trazas de anillo y velo superficial muy tenue. Al sembrar en estría sobre agar malta, esta será muy tenue, de color grisáceo y aspecto luciente. Las colonias en gelatina de mosto son redondas, hundidas en el fondo de un embudo originado al hacerse fluida la gelatina. Esta especie no asimila los nitratos ni escinde la arbutina. Tampoco se desarrolla en presencia de alcohol etílico como única fuente de carbono, fermentando únicamente la glucosa. Su poder fermentativo es bajo, en torno al 4%. Fermenta el mosto de uva originando gran cantidad de ácidos volátiles.

Kloeckera apiculata es, junto a su forma perfecta (*Hanseniaspora uvarum*) una de las más frecuentes especies aisladas tanto en España como en el resto de las regiones vitivinícolas del mundo. Así, desde principios de siglo, numerosos investigadores tales como Florenzano (1949), Malan (1954), Peynaud (1984), Loyola (1992), han demostrado la repetición de tales formas de levaduras en la primera fase de la fermentación vínica, al igual que su marcada sensibilidad al SO₂, con la única excepción de mostos azucarados de zonas muy frías Suárez (OIV). La presencia de esta especie en la primera fase de la fermentación

en nuestro país en los últimos años ha sido descrita por Barcenilla (1990) en mostos de la zona de Toro (Zamora), Álvarez Franco (1994) en el Termino Municipal de Almendralejo (Badajoz), en Ziguales (Valladolid) por Barcenilla (1991), Lema y col. (1994) en la comarca Vitivinícola “O Baixo Miño”, Ruiz y col. (1986) en la Comunidad de Madrid, Lorenzo Gómez (1995) en la zona de Bollullos Par del Condado (Huelva)... Estos estudios, coincidentes con el nuestro, vienen a confirmar la ubicuidad de esta especie en los mostos.

El género *Candida* es morfológicamente muy variable, pasando de levaduras gemantes unicelulares a pseudomicelios o, a veces, a un micelio verdadero. Las células son globosas, helipsoidales, cilíndricas o elongadas, ocasionalmente ojivales, triangulares o alunadas. A menudo se forman blastosporas en los micelios. La reproducción puede realizarse por gemación o por escisión. En medios sólidos las colonias son blanquecinas o color crema. La identificación de las especies se lleva a cabo por criterios morfológicos, y en parte en la fermentación de los carbohidratos. La reacción del azul de Diazonio B es negativa. El género posee 163 especies reconocidas. La especie de este género mas ampliamente estudiada es *C. Albicans* por su condición de parásito o patógeno animal y es capsulada. Otras especies pueden ser patógenas para los animales. Un cierto número de especies pueden ser aisladas en alimentos, pudiendo producir alteraciones en bebidas fermentadas y alimentos en salmuera. En el caso de *Candida pulcherrima* (Linder) Windisch (una de las especies de este género más frecuentemente aisladas en mostos), las células que se observan al cultivar en mosto de uva se pueden presentar aisladas o en parejas gemantes. Es la especie anamórfica de *Metschnikowia pulcherrima* Pitt & M.W. Miller. En ocasiones se las encuentra reunidas en grupos de numerosos elementos, cosa que sucede mas frecuentemente en cultivo agar malta. En este último las células son más grandes y, en los cultivos viejos, se presentan con un gran glóbulo de grasa central, muy refringente. Al cultivar en mosto de uva, el medio queda transparente, con abundante depósito y escasa fermentación. La estría en agar malta es muy abundante, con aspecto níveo, lisa y muy lobulada. No esporula en ninguno de los medios habituales. Esta especie, que no asimila los nitratos, se desarrolla muy bien en alcohol etílico. Es capaz de escindir la arbutina, fermenta únicamente la glucosa y su poder fermentativo es muy bajo, en torno al 1%.

Candida stellata, encontrada en este estudio en segundo lugar en porcentaje de aislamientos, presenta también una distribución muy amplia en las diversas zonas

vitivinícolas del mundo. De hecho, se considera una de las especies más frecuentes en los mostos españoles. De forma habitual se encuentra en la superficie de las uvas y también ha sido aislada frecuentemente en mostos de regiones mediterráneas tales como el Penedés (Iñigo y Arroyo, 1969), Rosellón (Sapis Domercq, 1976), Mallorca (Mulet, 1990)... y en menor frecuencia en mostos de Sicilia, Alicante y zonas con clima no totalmente mediterráneo tales como Burdeos (Fleet y col., 1984), Australia (Heard y col., 1986), Pisco chileno (Loyola y col., 1992), Tenerife (Salvadores y col., 1995), Madrid (Ruiz y col., 1986)...

La otra especie del género *Candida* encontrada en nuestros mostos es *C. Valida*, cuya forma perfecta es *Pichia membranaefaciens*. *Candida valida* no es una de las especies que con mayor frecuencia suelen ser aisladas en mostos de uva. Algunos de los autores que destacan su presencia en mostos son Lorenzo, T.M^a y col (1992) que la aíslan en vinos blancos afrutados de Andalucía occidental (D.O. Condado de Huelva, Montilla-Moriles, Jerez-Xérès-Sherry y Manzanilla de San Lucar de Barrameda), así como Querol y Huerta (1997) en la zona de Alicante con un porcentaje de aislamientos del 20%. Sin embargo, su forma perfecta (*P. membranaefaciens*) si que aparece citada en bibliografía de forma frecuente. Así, el mismo Lorenzo y col en 1995 y, en un estudio sobre las vinificaciones en la zona de Bollullos Par del Condado, citan esta especie, Loyola E. y col (1992), en la zona productora del Pisco chileno, Salvadores y col. la aíslan en vinos de Tenerife en 1993 y en mostos de la Denominación específica Abona Sur (Tenerife) en 1995, ...

El género *Rhodotorula* en la actualidad consta de 34 especies. En estas, las células son generalmente gemantes en forma ojival (es decir, esféricas u ovoides, terminando en punta uno de los extremos) o elongadas en otros casos. Puede darse la formación de un pseudomicelio. En medio sólido las colonias son de color blanco a amarillento, y pueden ser brillantes, húmedas y suaves o bien opacas y arrugadas. Algunas especies son capaces de sintetizar pigmentos rojos o amarillos en cultivo sobre agar malta. La mayoría de las especies pueden asimilar el inositol. Si esto sucede, el D-glucuronato no es asimilado. La reacción del azul de Diazonio B y la presencia de ureasa son positivas. Fermentan los carbohidratos y puede formarse ácido acético en condiciones aerobias a partir de la glucosa. La especie más representativa es *R. glutinis* (Fresenius) F.C. Harrison var. *glutinis*. Esta especie presenta una amplia distribución por todo el planeta, habiendo sido aislada en una

gran variedad de substratos. A pesar de que algunas cepas pueden crecer a 37 °C, la especie no es considerada patógeno humano.

La especie *Rhodotorula glutinis* no es infrecuente en los aislamientos realizados en mostos de uva, sin embargo, la frecuencia de aparición de la misma es muy pequeña en todos los casos. Algunos de los autores que mencionan su determinación son, entre otros, Loyola E. y col. (1992) en el Pisco chileno, Park (1974) en la región de Cognac y en la superficie de las uvas, Ruiz A.I. y col. (1986) en los vinos de la Comunidad de Madrid, Lorenzo Gómez, T.M^a. (1992) en vinos blancos afrutados de Andalucía Occidental,...

De las dos especies ascosporógenas que fueron aisladas en el presente trabajo, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia anomala*, es la primera de ellas la que en la primera fase fermentativa se presenta en mayor proporción, con un 18% del total de los aislamientos frente a un 2% de la segunda. Asimismo, *Saccharomyces cerevisiae* ha sido la única especie identificada en todas las fases del muestreo.

Los miembros del género *Saccharomyces* crecen generalmente como células unicelulares de forma esférica, ovoide o alargada con extremos redondeados, pero a veces puede formarse un pseudomicelio. La reproducción vegetativa se realiza por gemación multipolar o mediante la producción de ascosporas, que se pueden formar tras la conjugación de dos células, o pueden derivar de células diploides cuando éstas representan la fase vegetativa. Las ascosporas (1–4 por asca) son generalmente de forma esférica u ovoide. En medios sólidos las colonias son de color blanco o crema, con forma de cúpula, suaves, entre semimates y brillantes, de hasta 5 mm de diámetro y de consistencia mantecosa. En medios líquidos se forma un sedimento, apareciendo el crecimiento en forma de anillo en la zona donde se unen el aire, el líquido y el cristal; no se forma película. Fermenta de forma vigorosa los carbohidratos y no posee capacidad de desarrollo con nitrato como única fuente de nitrógeno. La reacción del azul de Diazonio B es negativa. La definición de las especies se realiza generalmente en base a la fermentación de los hidratos de carbono y a la utilización de los mismos (Lodder, 1970). Si bien existen diferencias morfológicas entre las distintas especies, las variaciones morfológicas dentro de una misma especie en ocasiones son tan grandes que ciertas características, como por ejemplo la forma celular, no ofrecen ninguna fiabilidad. La especie tipo de este género es *S. cerevisiae* Meyen ex Hansen, presentando en la actualidad el género 14 especies reconocidas. Fue a partir de Lodder (1984), cuando algunas especies del género *Saccharomyces* fueron

reclasificadas. Así por ejemplo, *S. uvarum* es considerada actualmente una variedad de *S. cerevisiae*, *S. fragilis* es actualmente *Kluyveromyces marxianus*, y *S. lactis* es en la actualidad *K. marxianus* var. *lactis*. *S. rouxii*, *S. mellis* y *S. nussbaumeri* constituyen hoy día la especie *Zygosaccharomyces rouxii*. *Debaryomyces kloeckeri* es hoy día *D. hansenii*.

Un gran número de investigaciones ecológicas y tecnológicas se han realizado en base a la hipótesis de que *S. cerevisiae* es la especie principalmente responsable de la fermentación alcohólica de los zumos de frutas. *S. cerevisiae* es la levadura “alta“ empleada en la industria cervecera. La variedad *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* produce elevadas concentraciones de alcohol, empleándose en la fabricación industrial de alcohol, en la elaboración de vinos y de licores de destilación. Así mismo, se distingue de *S. cerevisiae* por su forma más elíptica, comparada con la forma esférica u ovoide corta, característica de *S. cerevisiae*, si bien existen pocas diferencias entre ambas. *S. cerevisiae* es también la levadura típica empleada en panadería, y en la producción de alcohol, glicerol e invertasa. Las levaduras de superficie son fermentadoras muy activas y crecen muy rápidamente a 20 °C. La formación de agregados celulares y la rápida formación y desprendimiento de CO₂ ocasionan el desplazamiento de las células de levadura a la superficie de la masa líquida, y de ahí que a las levaduras responsables de la fermentación se les conozca con la denominación de levaduras de superficie. Las levaduras del fondo del tanque de fermentación no forman agregados de células, crecen más lentamente y tienen mayor actividad fermentativa a temperaturas mas bajas (10 a 15 °C). El hecho de que no formen agregados de células y a la mayor lentitud tanto de su crecimiento como de formación de CO₂ permiten a estas levaduras sedimentar en el fondo del tanque conociéndose como levaduras de fondo. Las citadas propiedades de las levaduras corresponden a observaciones que no explican por que algunas forman agregados, mientras que las otras flocculan. Se han descrito también algunas otras especies utilizadas en la producción de bebidas fermentadas. *S. carlsbergensis*, por ejemplo (se incluye actualmente en la especie *S. uvarum*) es la levadura “baja“, de fondo, que se emplea en la fabricación de cerveza tipo “lager“. *S. rouxii* y *S. bisporus* var. *mellis* son osmófilas osmotolerantes y pueden causar alteraciones en productos como la mermelada o la miel.

Las cepas de *Saccharomyces* empleadas en la producción de bebidas alcohólicas presentan las siguientes propiedades importantes: habilidad para una eficaz fermentación alcohólica de azúcares, tolerancia al etanol, producción de compuestos organolépticamente

deseables, estabilidad y viabilidad de las cepas y floculación una vez terminada la fermentación, lo que favorece la separación de la levadura de la bebida.

Sin duda alguna, *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura fermentadora por excelencia, empleándose ampliamente tanto en la industria cervecera como en la vinica. A medida que avanza el proceso fermentativo, los porcentajes de aislamiento de esta especie son crecientes de forma que, en la tercera fase es la única especie que aislamos.

Va a jugar un papel muy importante en el proceso de vinificación puesto que posee una alta actividad fermentativa y un fuerte poder de multiplicación, siendo en nuestro caso la especie que conduce hasta el final el proceso fermentativo. Este hecho se repite en casi la totalidad de la bibliografía consultada. Álvarez Franco, M.L. y col. (1994) en vinos de Almendralejo (Badajoz), encuentra esta levadura en un 50.3% de la totalidad de los aislamientos. Barcenilla, J. y col. (1991) en los mostos de la zona de Zigales (Valladolid) encuentran la especie *Saccharomyces cerevisiae* en todas las muestras analizadas. Asimismo, Salvadores, M^a.P. y col. (1995) obtienen un elevado porcentaje de aislamientos en mostos de Abona-Sur (Tenerife). Estos mismos autores, en 1993 en mostos de Tenerife afirman que *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura fermentadora por excelencia en todas las muestras estudiadas. En este mismo año estos autores, y en mostos de la Denominación específica Icoden-Daute-Isora (Tenerife), encuentran que *Saccharomyces cerevisiae*, por su elevado porcentaje de aislamientos va a jugar un papel muy importante en el proceso de vinificación, dándole al vino resultante su carácter y constitución. En mostos de Andalucía occidental tales como mosto de Jerez (Iñigo Leal B., 1984), la zona de Bollullos Par del Condado (Lorenzo Gómez T.M^a., 1995) y en los vinos blancos afrutados de Andalucía occidental (D.O. Condado de Huelva, Montilla-Moriles, Jerez-Xérès-Sherry y Manzanilla de Sanlúcar de Barrameda) (Lorenzo Gómez T.M^a y col. 1992), los porcentajes de aislamiento de la especie *Saccharomyces cerevisiae* fueron muy elevados.

El género *Pichia* posee en la actualidad 91 especies reconocidas. Entre sus características encontramos que las células son esféricas, ovoides, elípticas o cilíndricas y se reproducen vegetativamente por gemación, pudiendo formarse un pseudomicelio. En medio sólido las colonias son de color blanco o crema, opacas y generalmente de aspecto arrugado. En medio líquido se forma una película arrugada y seca. Las ascosporas (1–4 por asca), pueden tener diferentes formas: esféricas, hemisféricas de sombrero o de Saturno. Las especies pueden ser homotáticas o heterotáticas. Generalmente no fermentan los

carbohidratos o lo hacen muy débilmente. Los nitratos son asimilados por algunas especies y, muchas de estas pueden utilizar el etanol como única fuente de carbono. La reacción del azul de Diazonio B es negativa. Desde que, en 1906, Hansen estableciera el género *Pichia*, la definición de este taxón ha variado considerablemente para adaptarse al siempre creciente número de especies asignado al mismo. Esto ha hecho, que las especies pertenecientes al género *Hansenula*, con ascosporas en forma de sombrero, hayan sido transferidas a *Pichia*, y por lo tanto el género *Hansenula* haya desaparecido como tal. Un hecho destacable del género *Pichia* es que produce alteraciones importantes en la cerveza y en los productos en salmuera. La especie tipo es *P. Membranifaciens* E.C. Hansen.

La segunda especie ascosporógena aislada en el presente trabajo, *Pichia anomala*, se encuentra en muy baja proporción durante la primera fase fermentativa (2%). Esta especie no se encuentra citada muy frecuentemente en la bibliografía consultada. Salvadores, M^a.P. y col., en 1993 la aíslan en vinos de Tenerife en porcentajes que oscilan en torno al 6% afirmando que estos aislamientos en algunas bodegas podrían ser debidos a las malas condiciones higienico-sanitarias de las mismas. Los mismos autores en 1993 vuelven a aislarla en mostos pertenecientes a la Denominación específica Icoden-Daute-Isora de Tenerife. Por su parte, Lema, C. y col. (1994) mencionan su aislamiento en la Comarca Vitivinícola “O Baixo Miño”.

Las levaduras aisladas e identificadas en el presente trabajo podemos dividir las en tres grupos en función del poder fermentativo de las mismas. Estos serían:

- Levaduras de alto poder fermentativo: *Saccharomyces cerevisiae*.
- Levaduras de bajo poder fermentativo (Carácter oxidativo predominante): *Candida stellata*, *Candida valida*, *Kloeckera apiculata* y *Pichia anomala*.
- Levaduras de poder fermentativo nulo: *Rhodotorula glutinis*.

Hemos de destacar que la especie *Kloeckera apiculata* en numerosas ocasiones ha sido señalada como la responsable de los primeros grados de la fermentación alcohólica, llegando a alcanzar de forma habitual los 5-6°.

Por su parte, las especies pertenecientes al género *Pichia* presentan un bajo poder fermentativo que alcanza hasta lo 4-5°. Sin embargo, presentan una alta resistencia al etanol existente en el medio, pudiendo oxidarlo de forma anaerobia con su consiguiente disminución. Además, metabolizan la glicerina y son susceptibles de formar velo por lo que

son consideradas de forma general como especies dañinas para la enología. En nuestro caso, sin embargo, solamente fueron aisladas en la primera fase de fermentación.

En el género *Candida* existen especies de poder fermentativo débil como *Candida stellata* (Glucosa y Sacarosa), encontrada en este trabajo en un 20% en la primera fase fermentativa y que sin embargo no asimilan el etanol, pudiendo contribuir en los primeros grados alcohólicos del vino. Por otro lado, existen otras especies del género que presentan carácter oxidativo-filmogeno (como *Candida valida*), que no solo no poseen capacidad fermentativa sino que son capaces de asimilar el etanol del medio, reduciendo así la graduación alcohólica, y producir alteraciones en el vino. Posee gran importancia este efecto pernicioso derivado de su acción oxidativa sobre el etanol y los ácidos orgánicos fijos, dando lugar a una alteración conocida como flores del vino. Es por esto que se les considera especies perjudiciales para el mismo.

Las especies del género *Rhodotorula*, al igual que algunas pertenecientes al género *Candida*, no poseen capacidad fermentativa, pudiendo sin embargo resistir una graduación alcohólica en torno a los 15°. Su presencia se considera de forma general negativa para el vino debido a la capacidad de estas de asimilar el etanol de forma variable.

Para finalizar queremos destacar que la especie *Saccharomyces cerevisiae* ha sido la dominante a lo largo de la fermentación espontánea de los mostos estudiados, presentando un crecimiento que ha ido en aumento a lo largo de la misma, en detrimento del resto de especies. La graduación alcohólica alcanzada en estas fermentaciones (11.47-13.04) se debe a su alto poder fermentativo, si bien en este trabajo no se ha llegado a distinguir entre las diferentes razas fisiológicas de *Saccharomyces cerevisiae* por no haberse considerado en un principio objetivo prioritario del mismo. No obstante creemos muy interesante continuar en esta línea, investigando las diferentes razas fisiológicas así como su poder fermentativo, resistencia al anhídrido sulfuroso, contribución a la formación de compuestos volátiles del vino, etc. a fin de poder seleccionar aquellas que mejores características organolépticas produzcan en los vinos y aplicarlas en el proceso fermentativo.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Se han analizado y caracterizado un total de 12 variedades de uva de vinificación mediante la determinación de 15 parámetros fisicoquímicos. Se observan como características más destacadas: los altos rendimientos de obtención de mosto de las variedades de nueva implantación en la zona como la macabeo o la caveret, frente a las tradicionales como el jaén blanco, o los altos valores medios de acidez y bajos ph de la variedad caveret-sauvignon.
2. La inmensa mayoría de los mostos obtenidos a partir de dichas variedades de uvas que tienen valores de azúcares en general mayores a los obtenidos para las mismas variedades en otras zonas vinícolas, son aptos para la elaboración de vinos de mesa, con una ligera tendencia a la elaboración de vinos licorosos, e incluso, algunos como los obtenidos a partir de tempranillo y bobal, serían aptos para un posterior envejecimiento.
3. En los vinos analizados se han obtenido unos valores medios de acidez total de 6.37 g/l en tartárico ligeramente más altos que la media de los vinos españoles, valores de ph comprendidos entre 3.12 del macabeo y el tempranillo a los 3.58 g/l de la bobal, todos secos con concentraciones inferiores a los 2 g/l y un grado alcohólico de 13° o inferiores siguiendo las nuevas tendencias del mercado y una longitud de onda dominante que emplazaría a los blancos entre el verde amarillento ($\lambda < 570$ nm) y próximos al amarillo verdoso ($\lambda = 695$ nm) para el macabeo. Naranja rojizo para los rosados y en la zona del rojo los tintos, si bien la bobal con una longitud de onda dominante de 686.4 nm estarían muy próximos al rojo púrpura, por último con valores medios en glicerina próximos a los 7 g/l y valores en polifenoles totales que oscilan de los 279.7 g/l en ácido gálico y los 1725.6 g/l del bobal.
4. Se confirman como idóneas, las técnicas de cromatografía líquida utilizando como eluyente una disolución de ácido sulfúrico a $\text{ph} = 2.2$ y purificación previa de la muestra con cartucho sep-pack de Waters® para la cuantificación de los principales ácidos orgánicos en mostos y vinos y en control de la fermentación maloláctica, así

como la cromatografía de gases con ionización de llama e inyección de la muestra previa destilación para la cuantificación de los principales alcoholes, aldehídos y ésteres y por último, la espectroscopia atómica previa digestión ácida de la muestra para la determinación de los principales iones metálicos en uvas, mostos y vinos.

5. Los caldos analizados presentan un perfil aromático adecuado y unos niveles medios de metanol (inferiores todos a los 75 mg/l) y acetato de etilo y metilo muy alejados de malas o incorrectas técnicas de elaboración o alteración posterior. Pero que los hace al mismo tiempo, ser vinos con un aroma no excesivamente desarrollado salvo excepciones. Punto este, que debe ser mejorado mediante control de la fermentación y la aplicación de levaduras seleccionadas que mejoren este punto.
6. Según los datos obtenidos en la cuantificación de los principales ácidos orgánicos por HPLC y las determinaciones enzimáticas así como los controles de bacterias totales y acidófilas, se deduce una cierta dificultad y por tanto un retraso en la realización de la fermentación maloláctica. Punto este que ha de considerarse prioritario para establecer los criterios de selección de cepas de levaduras a utilizar en posteriores trabajos o estudios.
7. Los valores de (Na, K, Ca, Mg, Cu y Fe) , están dentro de las concentraciones normales, pero ligeramente inferiores en la mayoría a los encontrados en bibliografía. Confirmándose así mismo, tras un estudio específico, la tendencia a disminuir del potasio y el calcio durante la fermentación, la variación no significativa en los niveles de sodio y magnesio, así como en el caso del hierro y el cobre, una ligera disminución en la segunda fase de la fermentación tras un ligero aumento en la primera
8. La mejor tecnología junto con una más correcta dosificación del anhídrido sulfuroso (aun cuando con una concentración media en el sulfuroso libre de 6.2 mg/l estarían algo alejados de los 20 mg/l considerada idónea por la mayoría de los autores consultados en bibliografía) han conseguido la desaparición de problemas tradicionales en la zona como era la quiebra férrica (hoy con valores inferiores a los 5mg/l en hierro), la precipitación de materia colorante o tartratos o el aumento de los niveles de acetaldehído (muy alejados de los 100 mg/l considerados como peligrosos) o de la

acidez volátil, si bien en este último parámetro, aunque todos los vinos analizados están muy alejados del margen legal máximo estipulado, algunos con valores ligeramente superiores a los 0.5 g/l estarían por encima de los deseados.

9. Se ha confirmado la utilidad del Sistema API como técnica complementaria en la identificación de levaduras con aplicación enológica.
10. Tras la aplicación de la metodología descrita, se han aislado en uvas pertenecientes a las variedades macabeo, tempranillo, jaén blanco y bobal, levaduras de las especies: *Candida stellata*, *Candida valida*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia anomala*, *Rhodotorula glutinis* y *Trichosporon cutaneum*. Todas ellas similares a las encontradas en zonas de peculiaridad afín a la ecología de la zona objeto de estudio.
11. En los mostos, de las especies ascosporógenas aisladas es la *Saccharomyces cerevisiae* la que se encuentra en mayor proporción en la primera fase fermentativa (18%), frente al 2% de la *Pichia anomala*. La primera es la única especie identificada en todas las fases del muestreo.
12. Se han aislado especies pertenecientes a los géneros *Candida* y *Trichosporon* consideradas perjudiciales para la calidad de los vinos. El *Trichosporon* debido a problemas de manipulación por lo que se han tomado las medidas oportunas con el fin de mejorar la calidad de los caldos.
13. La toma de muestras de uvas y de mostos en las tres fases de fermentación, la utilización de los medios YPD y MYPD, así como la realización de pruebas morfológicas, bioquímicas, etc., junto a la utilización de los Sistemas API y en algunos casos con la confirmación mediante el análisis de los patrones de restricción de cepas conocidas, ponen de manifiesto que el método seguido ha resultado idóneo para el aislamiento e identificación de la flora levaduriforme autóctona.

BIBLIOGRAFÍA

- AGUILAR RUÍZ, J.; FERNANDEZ, J.; SIMON, M.; GIL, C.; MARAÑES, A. 1989. Clasificación de las condiciones de fertilidad en los suelos. Aplicación a la cuenca del río Adra. C.S.I.C
- AGUILAR RUÍZ, J.; SIMON, M. 1984. Los suelos de Sierra Nevada y la Alpujarra. Sierra Nevada y la Alpujarra. Ferrer M.; Ed. Regional del Sur. Granada
- ALAI, C.; LINDEN, G. 1990. Bioquímica de los alimentos. Masson S.A. París
- ALEIXANDRE, J.L.; GARCÍA, M^a.J.; LIZAMA, V.; AZNAR, A. 1998. Estudio de vinos rosados elaborados en ausencia y con pequeñas dosis de sulfuroso. Efecto de la fermentación maloláctica. XXIII Congreso O.I.V. Lisboa.
- ALEIXANDRE, J.L.; LIZAMA, V. 1998. Factores que intervienen en la composición de un vino. Alimentaria. 297:141-146
- ALMEIDA, A.; CARDOSO, M.A.; LIMA, J.L. 1984. Determination of copper in Port wine and Madeira wine by electrothermal atomization. Aas. Atom. Spectrosc. 3:73-77.
- ALONSO HERNÁNDEZ, J.E.; CARDELL CRISTELLYS, E.; SALVADORES SÁNCHEZ, C. 1994. Investigación de levaduras vínicas en la D.O. Ycoden-Daute-Isora. Caracterización de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* mediante el análisis de restricción del DNA mitocondrial. XVI Jornadas de viticultura y enología Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 321-328
- ÁLVAREZ FRANCO, M.L.; COTILLA DEL HOYO, P.A.; NIETO-SANDOVAL VERDÚ, R.; ZAMORA DE ALBA, E. 1994. Aislamiento e identificación de la flora levaduriforme autóctona en el término de Almendralejo. XVI Jornadas de Enología y Viticultura Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 251-264
- ÁLVAREZ FRANCO, M^a.L.; COTILLA DEL HOYO, P.A.; MARÍN EXPÓSITO, M^a.J.; MATEOS DE PORRA, J.M.; ZAMORA DE ALBA, E. 1998. Experiencia de acidificación con ácido láctico de mostos y vinos blancos de Extremadura. XX Jornadas de Viticultura y Enología Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz)
- ÁLVAREZ FRANCO, M^a.L.; COTILLA DEL HOYO, P.A.; MARÍN EXPÓSITO, M^a.J.; ZAMORA DE ALBA, E. 1997. Vinificación en Rosado. Primeros resultados. XIX Jornadas de Viticultura y Enología Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 181-188
- ÁLVAREZ FRANCO, M^a.L.; COTILLA DEL HOYO, P.A.; NIETO-SANDOVAL VERDÚ, R.M.; ZAMORA DE ALBA, E. 1998. Contribución al estudio de nueve variedades de uvas tintas *Vitis Vinífera* en la Comarca de Tierra de Barros: Vinificaciones monovarietales. Campañas 1991-1995. XX Jornadas de Viticultura y Enología Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz)
- ÁLVAREZ FRANCO, M^a.L.; GONZÁLEZ CORTÉS, A.M.; MARÍN EXPÓSITO, M^a.J.; NIETO-SANDOVAL VERDÚ, R.M.; ZAMORA DE ALBA, E. 1998. Contribución al estudio de quince variedades

- de uvas blancas *Vitis Vinífera* en la Comarca de Tierra de Barros: Vinificaciones monovarietales, Campañas 1991-1995. XX Jornadas de Viticultura y Enología Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz)
- AMERICAN CHEMICAL SOCIETYS. Committee on Environmental Improvement. Subcommittee on environmental Chemistry. 1980. Guide for data acquisition and data quality evaluation in environmental Chemistry. *Ana. Che.* 52:2242-2249.
- AMERINE, M.A. 1954. *Advances in food Research*. Academic Press INC. Publishers. New York.
- AMERINE, M.A.; OUGH, C.S. 1976. *Análisis de vinos y mostos*. Ed. Acribia. Zaragoza.
- ANGULO, L.; FREIRE, M.L.; LEMA, C.; VICENTE, A.; LÓPEZ, E. 1993. Presencia de levaduras Killer durante la fermentación de mostos de "O Baixo Miño". XV Jornadas de Enología y Viticultura Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 215-233.
- ANGULO, L.; VICENTE, J.; LEMA, C.; LÓPEZ, J.E. 1993. Flora levaduriforme asociada a diferentes variedades de *Vitis vinífera*. XV Jornadas de Enología y Viticultura Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 205-213
- ANTEQUERA LUENGO, F. 1997. La producción agrícola y ganadera de la Alpujarra granadina: Alternativas de futuro. 1ª Conferencia sobre la Alpujarra. Cátedra UNESCO. Universidad de Granada.
- ANTEQUERA LUENGO, F. 1997. La vid en la Contraviesa-Alpujarra. Pasado y presente. II Conferencia de La Alpujarra. Agricultura y Medio Ambiente. Ed. Rosua Campos, J.L. Cátedra UNESCO de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente. Universidad de Granada.
- ANUARIO DE ESTADÍSTICA AGRARIA 1997. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaría General Técnica. Madrid
- ANUARIO ESTADÍSTICO DE ANDALUCÍA 1987 y 1989. Junta de Andalucía. Consejería de la Presidencia y de Economía y Hacienda.
- AOAC. OFFICIAL METHOD OF ANALISYS OF THE ASSOCIATION OF THE ANALYTICAL CHEMIST. 13th ed. 1990. Helrich L EDS. Association of Official Analytical Chemists. Arlintong.
- AOAC. OFFICIAL METHOD OF ANALISYS OF THE ASSOCIATION OF THE ANALYTICAL CHEMIST. 15th ed. 1998. Helrich L EDS. Association of Official Analytical Chemists. Arlintong.
- ARROYO, T.; CABELLOS, J.M.; PEDREGOSA, A.; MÍNGUEZ, J.M.; LAHIGUERA, A.M. 1996. Tratamientos fermentativos y su influencia en la calidad Airén en la D.O. Vinos de Madrid. Seguimiento mediante electroforesis en campo pulsante de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* inoculada. XVIII Jornadas de Viticultura y Enología Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 475-490.
- ASOCIACIÓN COMARCAL DE COSECHEROS-PRODUCTORES DE VINO DE LA TIERRA DE LA COMARCA CONTRAVIESA-ALPUJARRA. 1987. Reestructuración del viñedo en el marco de

operaciones colectivas.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. USA. 1990. Official methods of analysis. 15 ed. William Horwite Ed. A.O.A.C. Washington. USA.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS: Official Methods of Analysis. Virginia, USA, 1970, 1980, 1990.

AVILA CANO, J.C. 1997. Revalorización de cultivos en la Alpujarra. II Conferencia de La Alpujarra. Agricultura y Medio Ambiente. Ed. Rosua Campos, J.L. Cátedra UNESCO de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente. Universidad de Granada.

BARCENILLA MORALEDA, J.M. 1989. Aspectos básicos de la microbiología del vino. Alimentación, Equipos y Tecnología. Año VIII. 6:95-100.

BARCENILLA, J. Y ARROYO, V. 1989. Dinámica fermentativa de los mostos de uva por levaduras en la Comunidad de Madrid. Alimentaria 203:57-66.

BARCENILLA, J.; ARROYO, V. 1991. Agentes de fermentación de mostos de uva de la zona de Zigales (Valladolid). Aliment. Equipos y Tecnología 1º (2):89-92

BARNET, J.A.; Paine, R.W.; Yarrow, D. 1979. A guide to identifying and classifying yeast. Cambridge University Press. Cambridge
BARNET, J.A.; Paine, R.W.; Yarrow, D. 1990. Yeast: characteristics and identification. Cambridge University Press. Cambridge

BARROS, G. 1986. Calidad y certificación. Denominaciones de origen, denominaciones genéricas y específicas de calidad. Estudio crítico. Su valor. Alimentaria 170:11-32. BELING, J.M. 1972. A study of the budding of *Saccharomyces uvarum* Beijerinck with the scanning electron microscope. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.*, 38:341-349

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. 1985. Química de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza. BENEDICTO, J.L. 1992. Relación de la Normativa de mayor interés en el sector vitivinícola. Servicio de Estudios de la Conselleria de Agricultura y Pesca de Valencia

BERENGER SOLER, J. 1992. "Hongos" en Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. Mª del Rosario Pascual Anderson (ed). Díaz de Santos S.A., Madrid.

BIDAN, P.; FEUILLAT, M.; MOULIN, J.P. 1986. Les vins mousseux, section II, Techniques d'élaboration et d'appréciation de la qualité, rapport national de la France. 65^e Asssemblée Générale de l'OIV, Paris. Bull. OIV 59:562-569.

BLOUIN, J. 1966. Contribution a l'étude des combinaisons de l'anhydride sulfureux dans les mouts et les vins. *Ann. Technol. Agric.* 15 (3):223-287.

BONED, F., COLOMO, B., SUÁREZ, J.A. 1992. Selección de levaduras vínicas de la D.O. Bierzo I.-

- Caracterización de cepas autóctonas. *Vitivinicultura* 3:37-38.
- BOSQUE MAUREL, J. 1984. Análisis geográfico de una Comarca Andaluza. Sierra Nevada y la Alpujarra. Editorial Regional del Sur. Granada. España.
- BOURGEOIS, C.M.; LARPENT, J.P. 1995. Microbiología alimentaria. 2. Fermentaciones alimentarias. Ed. Acribia. Zaragoza. España.
- BRAVO ABAD, F. 1984. Consumo de glicerina por levaduras de flor en vinos finos. *Alimentaria* 156:19-24.
- BRAVO ABAD, F. 1993. Vinificación ecológica del mosto de uva. *Alimentaria* Octubre 59-65.
- BRAVO ABAD, F.; BELLANATO, J. 1973. Estudio de vinos por espectroscopia infrarroja. II. Estudio comparado de vinos secos de Jerez, Moriles, Valdepeñas y Rioja y de vinos dulces de la región andaluza. *A.T.A.* 13 N° 1:143-157
- BRAVO ABAD, F.; IÑIGO LEAL, B. 1978. Estudio de vinos quinados. *Anal. Bromatol.* XXX(3-4):247-252.
- BRAVO ABAD, F.; PÉREZ ZÚÑIGA, F.J. 1995. Perfil enzimático de cultivos puros de levaduras vínicas. *Alimentaria* 41:41-44.
- BRAVO ABAD, F.; REDONDO CUENCA, A. 1984. Producción y consumo de ácido málico por levaduras en la fermentación del mosto de uva. *Anal. Bromatol.* XXXVI(1):127-132.
- BRAVO ABAD, F. 1984. Estudio de vinos base de Jerez. *Alimentaria* 150:19-29
- BRIONES, A.I.; IZQUIERDO, P.M.; PALOP, M. LL.; UBEDA, J. 1995. Aspectos de la influencia del suelo en la flora levaduriforme espontánea en las uvas de la variedad Airén. *Alimentaria* Julio-Agosto 95/29.
- CABANIS, J. 1986. Vin: santé et sécurité alimentaire. *Ars Pharmaceutica* 37 (2):197-220.
- CABEZUDO IBAÑEZ, M.D. 1982. *El análisis sensorial de los vinos*. Capítulo IV: Enología. Temas actuales. Asociación Nacional de Químicos de España. Madrid.
- CABEZUDO IBAÑEZ, M.D. 1984. Bebidas alcohólicas. Tema 23: Los alimentos, inspección y control. Colección Fomento de la calidad. Primeras Jornadas sobre Inspección en materia alimentaria. Ministerio de Sanidad y Consumo. Dirección General de Control y Análisis de la Calidad. Madrid
- CABEZUDO, M.D. 1988. El análisis íntegro de los vinos VIb. determinaciones tradicionales para indagar el aguado. *Alimentación, Equipos y Tecnología* VII(3):175-183.
- CABEZUDO, M.D. 1988. El análisis íntegro de los vinos. VI. Determinaciones más antiguas. *Alimentación, Equipos y Tecnología*. VII(2):105-112.
- CABEZUDO, M.D. 1988. La investigación enológica en estos cien años, desde la invasión de la filoxera. *Alimentación, Equipos y Tecnología*. VII:67-74.
- CABEZUDO, M.D.; SALVADOR, M. D.; BRIONES A.I. 1992. Técnicas modernas para establecer la

identidad y el origen geográfico de los vinos. Ponencia de España, XX Congreso Mundial de la Vid y el Vino. Madrid, Mayo 18-26.

CABRERA, C.; De MENA, C.; LORENZO, M.L.; LOPEZ, M.C. 1995. Determinación de hierro, cobre, zinc y manganeso en bebidas alcohólicas por espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica. *Ars Pharmaceutica* 36(1): 81-91.

CABRERA, C.; TEISSEDE, P.L.; CABANIS, M.T.; CABANIS, J.C. 1987. Determination of platinum in wine by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *J. AOAC Int.* 80:57-61.

CALDENTEY ALBERT, P.; GÓMEZ MUÑOZ, C. 1988. Estudio sobre implantación de signos de calidad para productos agroalimentarios de la Sierra Norte de Sevilla. Universidad de Córdoba. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes. Departamento de Economía, Sociología y Política Agrarias. No publicado. 196 pp

CALDERÓN, F.; NAVASCUÉS, E.; VARELA, F.; COLOMO, B.; SUÁREZ, J.A. 1998. Influencia de la temperatura y del pH en la biosíntesis de ácido málico por *Saccharomyces cerevisiae* seleccionadas. XX Jornadas de Viticultura y Enología Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 237-243.

CALERO DUEÑAS, F.; PÉREZ LORENTE, R.; SANCHO PUEBLA, E.D. 1995. Preparación de inoculos bacterianos utilizados en la inducción de la fermentación maloláctica de los vinos. XVI Jornadas de Viticultura y Enología Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 265-272.

CALLAO, M.P.; GUASCH, J.; RIUS, F.X. 1988. Perfil aromático de vinos de la zona de Tarragona. *Anal. Bromatol.* XL(2):229-235.

CAMACHO, M.T. 1995. Cartografía de los paisajes erosivos de la Sierra de la Contraviesa. Ed. Servicio de publicaciones de la Universidad de Granada. Granada. CAÑETE, M.L.; LEZCURRE, O.; MOYANO, L.; CORTÉS, M.B. 1998. Seguimiento de la maduración de la uva de la variedad Vigiriega cultivada en la Comarca Vitícola <<Contraviesa-Alpujarra>> (Granada). XX Jornadas de Viticultura y Enología Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 113-120

CARBÓ, R.; ALONSO, M.J.; DE CASTRO, J.J.; SANCHO, J. 1998. Influencia del anhídrido sulfuroso total en la fermentación maloláctica. *Alimentaria* 292:89-94

CARPENT, J.P. 1990. *Biotechnologie des levures*. Ed. Masson. Paris

CARRASCOSA SALAS, M.J. 1992. *La Alpujarra*. Universidad de Granada.

CASAS MARTINEZ, M.; FALCON FLORIDO, J.T.; HARDISSON DE LA TORRE, A.; SIERRA LOPEZ, A.; WILDPRET DIXKES, L.M. 1984. Determinación de alcohol metílico en vinos, bebidas destiladas y alcoholes de consumo ordinario en las Islas Canarias. *Alimentaria* 153:53-56.

CASAS MARTINEZ, M.; HARDISSON DE LA TORRE, A.; SIERRA LOPEZ, A.; WILDPREST DIXKES,

- L.M. 1985. Vinos de la isla de Tenerife. *Alimentaria* 164:37-48
- CASARES, R. 1968. *Anales de Bromatología*. 4ª ed. Ed. Casares. Madrid.
- CASTELLI, T.; IÑIGO, B. 1957. Los agentes de fermentación vínica en la región Manchega y zonas limítrofes. *Ann. Fac. Agr U. Perugia* Vol. 3.
- CASTELLI, T.; IÑIGO, B. 1958. Los agentes de fermentación vínica de La Rioja. *An. Fac. Agraria U. Perugia* XII (1), 4.
- CASTELLI, T.; ROSI, J. 1974. L'ecologie del levures. *Vignes et vins. Marze* (Nº especial), 19-25.
- CAVAZZANI, N. 1989. *Fabricación de vinos espumosos*. Ed. Acribia. Zaragoza
- CENSO AGRARIO DE ESPAÑA (1982 y 1989). *IV*. Granada. Instituto Nacional de Estadística. Madrid.
- CODONY SALCEDO, R.; GOMEZ PIÑOL, J.M.; MARTI PALLARES, M. 1985. Métodos analíticos para la determinación de azúcares: Su aplicación en mostos. *Alimentaria* 161:83-88.
- COLLANTES VÉLEZ, E.; MATO IGLESIAS, Mª.L.; PANEQUE GUERRERO, G. 1995. Caracterización fisicoquímica de algunos mostos fermentados genuinos de Andalucía Occidental, Zona Aljarafe sevillano. XVII Jornadas de Viticultura y Enología Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 321-340
- COSTABEBER, I.; IBÁÑEZ, P.J.; GALLEGU, M.C.; SERRANO, S.; ANGÚLO, R.; JODRAL, M. 1998. Métodos de identificación de levaduras en alimentos. *Alimentaria* 289:89-98
- COULTATE, T.P. 1998. *Manual de química y bioquímica de los alimentos*. 2ª ed. Ed. Acribia. Zaragoza.
- COUTO, M.B.; HARTOG, B.J.; HOFSTRA, H.; VAN DER VOSSSEN, J.M. 1996. Identification of spoilage yeast in a food-production chain by microsatellite polymerase chain reaction fingerprinting. *Food Microbiology*, 13:59-67.
- CUADROS, L.; GARCIA, A.M.; ALAE F.; JIMENEZ, C.; ROMAN, M. 1995. Validation of an analytical anstrumental method by standard addition methodology. *J. AOAC Int.* 78(2): 471-476
- CUINIER, C. 1980. Origine des levures assurant l'élaboration d'un vin de Touraine. *Identification des espèces. Connaissance Vigne et vin* 14(2):111-126.
- CUINIER, C. 1991. Les levures selectionnees: interet et utilisation. *Vignes et Vins* 7:53-57
- CUINIER, C.; LEVEAU, J. 1979. L'identification des vignobles et des vins: methode rapide a l'aide de la galerie API 20 C. *Vignes et vins* 283:44-49.
- DAUDT, C.E.; OUGH, C.S. 1973. Variations in some volatile acetate esters formed during grape juice fermentation. Effects of fermentation temperatura, SO₂. Yeast strain, and grape variety. *Amer. J. Enol. Viticult.* 24(3):130-135.
- DAVENPORT, R.R. 1974. Microecology of yeast and yeast-like organisms associated with an English vineyard. *Vitis* 13:123-130

- DAVIS, C.R.; WIBOWO, D.; ESCHENBRUCH, R.; LEE, T.H. 1985. Practical implications of malolactic fermentation: a review. *Am. J. Enol. Vitic.* 36(4):290-301.
- DE LA PRESA OWENS, C. 1994. Caracterización química y sensorial de mostos y vinos del Penedés. Tesis Doctoral. Departamento de Ciencias Fisiológicas Humanas y de la Nutrición. Area de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. Barcelona, Noviembre 1994
- DE LA PRESA OWENS, C.; LAMUELA RAVENTÓS, R.M^a.; BUXADERAS, S.; DE LA TORRE BORONAT, M^a.C. 1995. Study of Characterization of Macabeo, Xarel.lo and Parellada wines from the Penedés region (II). *Am. J. Enol. Vitic.* 46(4):529-541
- DE LA PRESA OWENS, C.; LAMUELA RAVENTÓS, R.M^a.; BUXADERAS, S.; DE LA TORRE BORONAT, M^a.C. 1995. Differentiation and grouping characteristics of varietal grape must from Penedés region (I). *Am. J. Enol. Vitic.* Vol. 46(3):283-291
- DE LA PRESA OWENS, C.; NOBLE, A.C. 1995. Descriptive analysis of three white varieties from Penedés. *Am. J. Enol. Vitic.* Vol. 46(1):5-9.
- DEAK, T.; BEUCHAT, L.R. 1998. Evaluation of simplified and commercial systems for identification of foodborne yeast. *Int.J.Food.Microbiol.* 7(2):135-45.
- DECRETO 835/1972 de 23 de marzo, por el que se aprueba el Reglamento de la Ley 25/1970 "Estatuto de la Viña, del Vino y de los Alcoholes". (BOE 11-abril-1972).
- DELFINI, C.; BARDI, L. 1990. La biotecnología aplicada a la enología y a los microorganismos del vino. *Vitivinicultura* 9:32-38.
- DELIA-DUPUY, M.L.; STREHAIANO, P. 1996. La fermentation alcoolique en vinification: observations cinétiques et physiologie. *Rev. Franç. D'Oenologie* 159:19-23
- DELTEIL, D. 1992. Gestione della fermentazione con i lieviti enologici selezionati. *Vigne Vini*, 9:35-38.
- DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS (D.O.C.E.), de 3/10/90. 1990
- DIEZ DE BETHENCOURT, C.A. 1972. Los ácidos málico y láctico y los vinos españoles. *Ann. Technol. Agric.* 1(12):62-70
- DIEZ, J.A. 1986. Efecto de la fertilización de la viña con estiércol y K en la zona de Mentrída. *An. Edafol. Agrobiol.* 1579-1590.
- DUCRUET, V.; FLANZY, C.; BOURZEIX, M.; CHAMBROY, J. 1983. Les constituants volatils des vins jeunes. Carbonic maceration. *Sciences des Aliments*, 3:413-426.
- DUQUE MARTÍNEZ, M^a.C.; SANCHEZ MUÑOZ, P.J. 1992. Modificación del método de Kliewer para determinaciones del color en variedades tintas de *Vitis vinifera*, L. *Alimentación, Equipos y Tecnología.* Año XI. 2:93-98.

- DUTEURTRE, B. 1995. "El vino" en Microbiología alimentaria 2. BOURGEOIS, C.M.; LARPENT. J.P. Ed. Acribia. Zaragoza. España.
- DZIEZAK, J.D. 1987. Yeast and yeast derivatives: definitions, characteristics and processing. Food Technol. 41(2):104-121
- EPIFANIO, S.I.; GUTIERREZ, A.R.; SANTAMARÍA, M^a.P.; LÓPEZ, R. 1999. The influence of enological practices on the selection of wild yeast strains in spontaneous fermentation. Am. J. Enol. Vitic. 50(2):219-224.
- ESCOLAR, D.; HARO, M.R.; SALCEDO, A.; GOMEZ, J.; ALVAREZ, J.A. 1992. La determinación del color de vinos y brandys mediante el cálculo de coordenadas triestimulares. XX Congreso Mundial de la Viña y el Vino. Madrid-La Rioja
- FALCON FLORIDO, J.T.; FERNANDEZ, M.C.; GALAN GONZALEZ, J.M.; HARDISSON DE LA TORRE, A.; WILDPRET DIXKES, L.M. 1983. Determinación de iones metálicos (sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro y zinc) en los vinos de la isla de Tenerife por fotometría de llama y espectrofotometría de absorción atómica. Anal. Bromatol. 1983. XXXV. 1:31-40.
- FAO: ALIMENTACION Y NUTRICION. 1989. Manuales para el control de calidad de los alimentos. 9. Introducción a la toma de muestras de alimentos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. 14/9
- FERNANDEZ-PEREIRA, C. 1988. The importance of metallic elements in wine. A literature survey. Z.Lebensman Unters Forsch, 186:295-300.
- FERNANDEZ-PEREIRA, C.; ORTEGA TORRES, J. 1987. Elementos metálicos traza durante la fermentación y envejecimiento del vino. Alimentación, Equipos y Tecnología 57-63.
- FIGUERUELO OJEDA, M^a E.; GUTIERREZ JEREZ, F.; TRUJILLO JACINTO DEL CASTILLO; M^a I. 1987. Viñedos canarios. Zona de Acentejo. I. Climatología. An. Edaf. Agrobiol. 977-988
- FLANZY, C.; FLANZY, M.; BENARD, P. 1990. La vinificación por maceración carbónica. Ed. A. Madrid Vicente, Ediciones. Madrid.
- FLEET Y HEART. 1993. Wine microbiology and biotechnology. Ed. Graham H. Fleet. Harword Academic Publishers, pp. 27-54
- FLORENZANO, G. 1949. La flora blastomicetica dei mosti ei dei vini alcune zone Toscane. Ann. Sper. Agrar. Torino, 3:887-893.
- FRATIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. 1993. Microbiología de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza.
- GALLEGO ROCA, F.J. 1987. Morfología urbana de las poblaciones del reino de Granada a través del Catastro del Marqués de la Ensenada. Diputación Provincial de Granada.

- GARCÍA DE LA PEÑA, M^a.E.; ORTEGA HERNÁNDEZ-AGERO, A.P.; HIDALGO TOGORES, J.; TIENDA PRIEGO, P.; NAVARRO ROZALÉN, P.; SERRANO CUADRILLO, J. 1994. Contribución al estudio del color de los vinos españoles. III. Vinos tintos. *Vitivinicultura* 5-6:58-62.
- GARCÍA LUJÁN, A.; PUERTAS GARCÍA, B.; LARA BENÍTEZ, M. 1990. Variedades de Vid en Andalucía. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y pesca. Dirección General de Investigación y Extensión Agraria. Sevilla
- GARCIA OLMEDO, R.; GARCIA PUERTAS, R.; MASOUD, T.A.; DIEZ MARQUES, C. 1977. Determinación de sodio y potasio por espectrofotometría de absorción atómica en vinos de la región manchega. *Anal. Bromatol.* XXIX. 3:281-304.
- García Valderrama, F. 1997. Las tareas del campo y el pastoreo. II Conferencia de La Alpujarra. Agricultura y Medio Ambiente. Ed. Rosua Campos, J.L. Cátedra UNESCO de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente. Universidad de Granada.
- GARCÍA, M.J.; ALEIXANDRE, J.L.; LIZAMA, V.; ÁLVAREZ, I. 1997. Influencia de la zona geográfica sobre los parámetros comunes en vinos de Cavernet, Sauvignon, Tempranillo, Monastrell y Bobal. XIX Jornadas de Viticultura y Enología Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 401-409.
- GARCIA-JARES, C.M.; LAGE-YUSTY, M.A.; SIMAL LOZANO, J. 1990. Estudio de la composición mineral de los vinos de las denominaciones de origen gallegas. *Anal. Bromatol.* XLII. 2:325-336.
- GARCIA-JARES, C.M.; LAGE-YUSTY, M.A.; SIMAL-LOZANO, J. 1990. Estudio de componentes volátiles en vinos gallegos con denominación de origen. *Anal. Bromatol.* XLII(2):307-313
- GARCIA-JARES, C.M.; LAGE-YUSTY, M.A.; SIMAL-LOZANO, J.; LOPEZ-HERNANDEZ, J.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, M.V. 1990. Aplicación de la cromatografía de alta eficacia al estudio de los ácidos orgánicos en vinos gallegos con denominación de origen. *Anal. Bromatol.* XLII. 2:315-313
- GIL, C.; GOMEZ-CORDOVES, C. 1985. El contenido en polifenoles totales, catequinas, o-difenoles y el color, de vinos como característica varietal. *Anal. Bromatol.* XXXVII:153-159
- GIUDICI, P.; ZAMBONELLI, C. 1992. Criteri di selezione dei lieviti per enologia. *Vignevini* 9:29-34
- GOMEZ SANCHEZ, R. 1997. Agricultura y medio ambiente: Los programas de forestación de tierras agrarias y agroambientales. II Conferencia de La Alpujarra. Agricultura y Medio Ambiente. Ed. Rosua Campos, J.L. Cátedra UNESCO de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente. Universidad de Granada.
- GÓMEZ, M.D.; LÓPEZ, M.I.; LÓPEZ, M.J.; SÁNCHEZ, M.T. 1997. Caracterización de los vinos elaborados en la Comarca de <<La Axarquía>> (Málaga). *Alimentaria*, Noviembre 97/77.
- GOMEZ-CORDOBES, M.C.; CABEZUDO, M.D. 1975. Evolución de los vinos de consumo corriente

- envasados en botellas de vidrio. Anal. Bromatol. XXVII. 2:135-148.
- GONZÁLES-LARRAINA, M.; GONZÁLEZ, A.; MEDINA, B. 1987. Les ions métalliques dans le différenciation des vins rouges des trois régions d'Appellation d'Origine Rioja. *Connaissance Vigne Vin* 2(2):127-140.
- GONZÁLEZ HERNÁNDEZ, G.; HARDISSON DE LA TORRE, A.; ARIAS LEÓN, J.J. 1997. Densidad, grado alcohólico y azúcares reductores del mosto y vino tinto tradicional de la Comarca de Denominación de Origen Tacoronte-Acentejo (Islas Canarias). *Alimentaria* 284:97-106.
- GONZALEZ OROSTICA, C.A. 1973. Determinación analítica de nutrientes en viña. Su relación. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- GONZALEZ SALGUEIRO. A. 1989. Los depósitos de encubado en la vinificación en tinto. *Alimentación, Equipos y Tecnología*. VIII. 2:85-93
- GONZALEZ, A.; BERMEJO, F.; BALUJA, C. 1984. Contenidos de calcio y magnesio en los vinos de Galicia. *Rev., Agroquim. Technol. Aliment.* 24(2):233-238
- GONZALEZ, M.J.; MARTINEZ-PARA, M.C. AGUILAR, M.V. 1988. Determination of Fe, Cu, Zn, Mn, and Pb in DOC wines. *Z. Lebensm Unters Forsch.* 187:325-9.
- GONZÁLEZ-NEVES, G.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARREIRO, L.; BOCHICCHIO, R.; GATTO, G.; GIL, G.; TESSORE, A.; BALADO, J. 1998. Composición de vinos tintos Merlot, Cavernet Sauvignon y Tannat de Uruguay. XXIII Congreso O.I.V. Lisboa.
- GOROSTIZA, E.F.; CABEZUDO, M.D.; MARTIN ALVAREZ, P.; SUÁREZ, M.A. 1982. Modelos lineales para caracterizar los vinos blancos y los tintos. Detección de las adiciones de enocianina a los vinos blancos. *Rev. Agroquim. Technol. Aliment.* 22(2):229-244.
- GUARDIOLA, S.; MASQUE, M.C.; IÑIGUEZ, M. 1996. Estudio del color de los vinos de las distintas denominaciones de origen de Cataluña. XVIII Jornadas de viticultura y enología Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 365-378
- GUILLEM RUÍZ, J.V. 1992. La viña en el sistema agroalimentario. *Alimentación, Equipos y Tecnología*. n°?? pag 83-??.
- GUTIERREZ JEREZ, F.; TRUJILLO JACINTO DEL CASTILLO, I.; FIGUERUELO OJEDA, E.; CURBELO MUJICA, C. 1987. Viñedos canarios, zona de Acentejo. II, Características físicas del suelo. *An. Edaf. Agrobiol.* 989-1004.
- GUTIERREZ, M.A. 1997. Forestación de tierras agrarias en la Alpujarra. II Conferencia de La Alpujarra. *Agricultura y Medio Ambiente*. Ed. Rosua Campos, J.L. Cátedra UNESCO de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente. Universidad de Granada.

- HARRIGAN, W.F.; Mc CANCE, E.M. 1979. Métodos de laboratorio de microbiología de alimentos y productos lácteos. Ed. Academia. Madrid
- HAYES, P.R. 1993. Microbiología e higiene de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza.
- HENAO, L.; MESIAS, J.L.; MAYNAR, J.J.; MIGUEL, C. 1986. Evolución de los ácidos tartárico y málico durante la maduración de uvas cayetana y pardina (variedades *Vitis vinífera*). An. Edafol. Agrobiol. 505-516
- HEREDIA MIRA, F.J.; GUZMAN CHOZAS, M. 1990. Parámetros cromáticos en vinos tintos españoles. Anales de Bromatología. XLII. 2:279-286
- HEREDIA, F.J.; CAMEAN, M.; GUZMAN, M. 1986. Utilidad de los parámetros cromáticos en la evaluación de la calidad de los vinos tintos. A.T.A. 26(4):477-481
- HEREDIA, F.J.; GUZMAN, M. 1989. Contribución a la caracterización cromática de vinos de variedad Cencibel de la zona Castellano-manchega. Anal. Bromatol. XLI:383-391.
- HERNÁNDEZ ORTE, P.; CACHO, J.; GUITART, A. 1993. Evolución del contenido en Nitrógeno total en la uva durante la maduración de la variedad Garnacha en Aragón. Vitivinicultura. Año IV. 11-12:40-46.
- HERNANZ, M^a.D.; ALEIXANDRE, J.L.; GARCÍA, M^a.J. 1994. Proceso de estabilización de vinos blancos. Comportamiento de algunos polialcoholes y compuestos volátiles. Vitivinicultura Año V. 3-4:63-71
- HERRANZ, A.; MARECA, I. 1982. Contenido de los ácidos L(+) y D(-) láctico en vinos. Anal. Bromatol. XXXIV. 2:219-229
- HERRERA PUGA, P. 1984. Historia de las Alpujarras. Sierra Nevada y la Alpujarra. Ferrer, M.. Ed. Regional del Sur. S.A.
- HIDALGO, P. 1996. Flora levaduriforme de las fases postfermentativas en vinos de la Denominación de Origen <Vinos de Madrid>. Alimentaria 277:101-109
- HIDALGO, L. 1979. Caracterización macrofísica del ecosistema medio-planta en los viñedos españoles. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Madrid
- HIDALGO, L.; CARCELA, J.A. 1986. Crianza de vinos en la región central. Caracterización y origen de los vinos "Encinero". Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Madrid.
- HIDALGO, P. 1992. Caracterización de levaduras de la D.O. "Vinos de Madrid", respecto a la presencia del Factor Killer. Influencia de parámetros enológicos. XX Congreso Mundial de la viña y el vino. O.I.V. 72^a Asamblea General. Madrid y la Rioja (España) Tomo III, Sección 2^a.
- HIDALGO, P., DIZY, M., POLO, M.C. 1992. Criterios utilizados en la actualidad para la clasificación de las levaduras vínicas. Rev. Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos 32 (2)

- HIDALGO, P.; FLORES, M. 1991. Estudio taxonómico de las levaduras de la D.O. "Vinos de Madrid" aisladas en el transcurso de la fermentación espontánea de mostos y vinos. *Microbiología SEM* 7:120-125.
- HIDALGO, P.; Flora levaduriforme de las fases postfermentativas en vinos de la Denominación de Origen <Vinos de Madrid>. *Alimentaria* 1996 101-109
- HIDALGO, P.; GALLEGO, F.J.; PÉREZ, M.A.; FERNÁNDEZ, K.; MARTÍNEZ, I.; CARCELA, J.A. AÑO. Caracterización taxonómica, genética (RAPDs, SSRs y AFLPs) y enológica de razas fisiológicas de *Saccharomyces cerevisiae*. Discrepancia de *S. Cerevisiae r.f. uvarum*. II, 251-256
- HOLLOWAY, P.; SUBDEN, R.E. 1990. The yeast in Riesling must from the Niagara grape growing region of Ontario. *Canadian Inst. Food Sci. And Technol. J.* 23:212-216.
- HORWITZ W. 1990. Repport of the Committee interlaboratory studies. *J.AOAC Int.* 73: 661-680.
- HORWITZ W.; KAMPS L.R.; BOYER, F.W. 1980. Quality assurance in the analysis of foods and trace constituents. *J. Assoc. off Anal. Chem.* 63:1344-1354.
- HOUG, J.S. 1990. *Bioteconología de la cerveza y de la malta*. Ed. Acribia. Zaragoza
- HUGH, J. 1987. *El vino. Atlas mundial de vinos y licores*. Ed. Blume. Barcelona.
- ICMSF. 1983. *Microorganismos de los alimentos 1. Técnicas de análisis microbiológico*. Ed. Acribia. Zaragoza
- ICMSF. 1983. *Microorganismos de los alimentos 2. Ecología microbiana de los alimentos. Productos alimenticios*. Ed. Acribia. Zaragoza.
- ID 32 C. 1990. *Catálogo analítico*. Bio Merieux. S.A
- IÑIGO LEAL, B. 1980. La crianza ecológica del vino. II Semana Internacional del Vino de Jerez. Jerez de la Frontera.
- IÑIGO LEAL, B. 1984. Aspectos generales de la microbiología en el vino de Jerez. *Alimentaria* 156:11-17.
- IÑIGO LEAL, B.; BRAVO ABAD, F. 1974. Evolución biológica de los ácidos del vino. *Anales de Química.* 70(12):1168-1171
- IÑIGO LEAL, B.; BRAVO ABAD, F. 1977. Estudio de mostos y vinos de Galicia. *A.T.A.* 17(2):268-276
- JAIME Y BARO, A.L. 1974. Estudio del contenido de potasio en los vinos de la Rioja en relación con su calidad. *An. INIA/Serv. Tecnol. Agr.* 1:225-239
- JOBE, J. 1987. *El nuevo gran libro del vino*. Ed. Blume. Barcelona.
- KARADIMTCHEVA, B. 1977. Etude de l'influence de quelques fongicides sur la microflore du raisin. *Connaissance Vigne et vin*, 11(4):313-323.

- KRAUS, J. K.; REED, G.; VILLETAZ, J. C. 1984. Levures sèches actives de vinification, 1ère partie. Fabrication et caractéristiques. *Connaissance vigne et vin* 17(2):93-103.
- KRAUS, J. K.; REED, G.; VILLETAZ, J. C. 1984. Levures sèches actives de vinification, 2ème partie. Utilisation et évaluation. *Connaissance vigne et vin* 18(1):1-26.
- KREGER-VAN RIJ, N.J.W. 1984. *The yeast, a taxonomic study*. Elsevier Science B.V. Amsterdam.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. 1998. *The Yeast. A Taxonomic Study*. 4ª Edición. Elsevier Science B.V. Amsterdam.
- LAFON-LA FOURCADE y PEYNAUD, E. 1974. Sur l'action antibacterienne de l'anhydride sulfureux sous forme libre et sous forme combinée. *Conn. Vigne Vin*. 8(2):187-203.
- LAFON-LA FOURCADE, S. 1984. Souche de levure. *Bull. OIV* 637:185-204.
- LAFON-LA FOURCADE, S.; JEYEU, A. 1979. Techniques simplifiées pour le dénombrement et l'identification des microorganismes vivants dans le mout et les vins. *Conn. Vigne Vin* (4):295-309.
- LAGE YUSTY, M.A.; GARCIA JARES, C.M.; SIMAL LOZANO, J.; ALVAREZ PIÑEIRO, M.E. 1989. Método gas-cromatográfico rápido para la evaluación directa de etanol y glicerina en vinos. *Anal. Bromatol.* XLI(2):375-381.
- LAGE-YUSTY, A.; SIMAL LOZANO, J.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, M.V.; GARCIA-JARES, C. 1989. Determinación de ésteres en el aguardiente de orujo. *Anal. Bromatol.* XLI(1):141-148.
- LARA BENÍTEZ, M. 1993. Aspectos agroeconómicos y ampelográficos de las variedades recomendadas en la Comarca Contraviesa-Alpujarra. Estación Experimental "Rancho de la Merced". Jerez de la Frontera. No publicado. 124pp
- LARREA REDONDO, A. 1983. *Enología básica*. Ed. Aedos. Barcelona
- LARREA, A. 1974. Un estudio sobre vinos de la cosecha 1970 en Rioja. *An. Inia/Ser. Tecnol. Agr.* 1:219-225.
- LARREA, A. 1978. *Vides americanas. Portainjertos*. Ministerio de Agricultura. Publicaciones de Extensión Agraria. 4ª ed. Madrid
- LARRECHI, M.S.; CALLAO, M.P.; RIUS, F.X.; GUASCH, J. 1987. *Contenido de sodio, potasio, calcio, hierro y cobre en los vinos tintos de Tarragona*. *Agroquímica y Tecnología de Alimentos*. 27(1):53-59.
- LARUE, F.; GENEIX, C.; LAFON-LA FOURCADE, S.; BERTRAND, A.; RIBEREAU - GAYON, P. 1984. Première observation sur le mode d'action des écorces de levure. *Connaissance Vigne et Vin*, 18:155-161
- LASSO DE LA VEGA, B. 1989. Influencia edáfica en vinos con Denominación de Origen "Málaga". Tesis de Licenciatura. Universidad de Málaga.

- LAZOS, E.S.; ALEXAKIS, A. 1989. Metal ion content of some Greek wines. *Int. J. Food Science Technol.* 24:39-46
- LEMA, C.; LÓPEZ, J.E.; VICENTE, J.A.; ANGULO, L. 1994. Influencia de la maceración prefermentativa del mosto Albariño en las poblaciones levaduriformes. XVI Jornadas de viticultura y enología Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 289-297
- LEMA, C.; LÓPEZ, J.E.; VICENTE, J.A.; ANGULO, L. 1995. Efecto del proceso de desfangado en la población de levaduras. XVII Jornadas de viticultura y enología Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 277-286.
- LEMARESQUIER, H.; GAINVORS, A.; LEQUART, C.; CHARLEMAGNE, B.; FRÉZIER, V.; BELARBI, A. 1995. Sélection de levures oenologiques à activité clarifiante. *Revue Française d'Oenologie* 154: 23-29.
- LESCURE EZCURRA, O. 1999. Vitivinicultura de la Alpujarra. Hacia la reestructuración del sector. Cátedra Unesco de Desarrollo sostenible y Medio Ambiente. Universidad de granada. Granada
- LEY 25/1970, de 2 de diciembre del Estatuto de la Viña, del Vino y de los Alcoholes (BOE de 5-XII-70).
- LODDER, J. 1970. *The Yeast, a taxonomic study.* Amsterdam. North Holland Publishing. 1385 p.
- LONG, G.L.; WINEFORDNER, J.D. 1983. Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.* 55:713-720.
- LÓPEZ ALEJANDRE, M.M. 1995. *Los vinos del Sur.* Cajasur. Córdoba.
- LOPEZ SAN MIGUEL, T. 1983. Formación de compuestos volátiles durante la fermentación de los mostos con diferentes cepas de levaduras de Rioja. 1ª parte. *An. INIA/SER. Agric.* 22:139-144.
- LOPEZ, M.I.; LÓPEZ, M.J.; LEZCURRE, O.; GÓMEZ, M.D.; SÁNCHEZ, M.T. 1997. La variedad "Vigiriega" y su adaptación a la elaboración de vinos jóvenes de calidad en la comarca "Contraviesa-Alpujarra" (Granada). *Alimentaria*, Julio-Agosto, 97/107
- LÓPEZ, M.I.; LÓPEZ, M.J.; TORRALBO, F.; SÁNCHEZ, M.T. 1995. Efecto del anhídrido sulfuroso sobre la fermentación y conservación de los vinos blancos jóvenes de calidad. (Estudio de la variedad <<Pedro Ximénez>>). *Alimentaria*, Enero-Febrero 95/75
- LORENZO GÓMEZ, T. M^a.; ARROYO LÓPEZ, J. 1994. Estabilidad biológica de los vinos jóvenes afrutados de Andalucía Occidental. XVI Jornadas de viticultura y enología Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 235-241
- LORENZO GÓMEZ, T. M^a.; ARROYO LÓPEZ, J. 1995. Aislamiento e identificación de las levaduras presentes en los procesos de vinificación de la zona de Bollulos Par de Condado. XVII Jornadas de viticultura y enología Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 219-234

- LORENZO GÓMEZ, T. M^a.; ARROYO LÓPEZ, J.; PANEQUE GUERRERO, G. 1992. Notas sobre levaduras presentes en vinos blancos afrutados de Andalucía Occidental: Metodología, criterios de identificación y ecología microbiana. XIV Jornadas de Viticultura y Enología de Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 215-224
- LOUREIRO, V.; MALFEITO-FERREIRA, M.; "Zymological indicators": a new approach to assess microbiological quality of wines. II,146-152.
- LOYOLA, E.; BUSTOS, O. 1992. Identificación de levaduras de la zona productora del pisco chileno. XX Congreso Mundial de la viña y el vino. O.I.V. 72^a Asamblea General. Madrid y la Rioja (España) Tomo III, Sección 1^a.
- LOZANO, R.D. 1978. El color y su medida. Ed. Americalee. Buenos Aires.
- LUCDEME. ICONA. 1986. Mapa de suelos. Berja 1043. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaría Técnica. Madrid
- LUCDEME. ICONA. 1987. Mapa de suelos. Gergal 1029. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaría Técnica. Madrid.
- LLAGUNO, C. 1974. Les levures a voile. Vignes et vins. Marze (Nº especial), 37-45
- LLAGUNO, C. 1982. Enología: temas actuales. Fondo Editorial Anque. Asoc. Nac. de Químicos de España. Madrid.
- LLAGUNO, C. 1982. Estabilización de vinos. Capítulo VI. "Enología temas actuales". Asociación Nacional de Químicos de España. Madrid.
- M.A.P.A. 1989. Caracterización agroclimática de la provincia de Almería. Ed. Dirección General de Producción Agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- M.A.P.A. 1989. Caracterización agroclimática de la provincia de Granada. Ed. Dirección General de Producción Agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- MALAN, C.E. 1954. I lieviti della fermentazione vinaria in Piemonte. Atti Acad. Ital. Vite e Vino 5:477-485
- MALPICA CUELLO, A. 1988. Un modelo de ocupación humana del territorio de la Alpujarra. Sierra Nevada y su entorno. Universidad de Granada
- MANZANO, P.; VARGAS, P. 1986. La ciudad de Albuñol. Ayuntamiento de Albuñol.
- MAPA DE CULTIVOS Y APROVECHAMIENTOS DE ANDALUCÍA. 1998. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Dirección General de Agricultura, ganadería y Montes
- MARECA CORTES, I. 1983. Origen, composición y evolución del vino. Ed. Alhambra. S.A.
- MARECA, I. 1980. Enología. Ed. Acribia. Zaragoza.
- MARTIN ANDRES, A.; LUNA DEL CASTILLO, M. 1989. Bioestadística para Ciencias de la Salud.

Editorial Norma, S.A.

MARTIN, P.; ZHANG, B.; MARTIN, G. 1994. The use of trace element data to complement stable isotope methods in the characterization of grape must. *Am. J. Enol. Vitic.* 45(1):79-85.

MARTINEZ DE TODA, F. 1987. Relación entre la intensidad luminosa recibida por los racimos y la acidez total y el pH del mosto de la variedad "garnacha" en Rioja alta. *Inv. Agrar. Prod. Prot. Veg.* 2(1):45-51.

MARTÍNEZ de TODA, F. 1991. *Biotechnology de la vid. Fundamentos biológicos de la viticultura.* Ed. Mundi-Prensa. Madrid.

MARTINS, G.; MONTROCHER, R.; PONCET, S. 1990. Differentiation rapide de souches de leveures de vinification par un étude de caracteres morphologiques et bioquimiques. *Rev. Française d'Oenologie*, 126:35-43

MARTOS MARTÍNEZ, V. 1997. Capacitación de recursos humanos y agricultura. II Conferencia de La Alpujarra. Agricultura y Medio Ambiente. Ed. Rosua Campos, J.L. Cátedra UNESCO de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente. Universidad de Granada.

MASQUÉ, M.C., GUARDIOLA, S., BORDONS, A. 1991. Control de la fermentación maloláctica mediante cepas de bacterias aisladas del vino. *Vitivinicultura*, Nov-Dic. 64-68

MATEOS, P.; KHAYYAT, N.; ARROYO, V. E IÑIGO B. 1986. *Alimentaria* Nº 162, 63-67.

MATEOS, P.L.; ARROYO, V.; KHAYYAT, N. E IÑIGO B. 1985. Los agentes de fermentación de la zona de Utiel Requena. *Alimentaria* 162:63-69.

MELERO, R. 1992. Fermentación controlada y selección de levaduras vínicas. *Rev. Esp. Cienc. y Technol. Aliment.* 32(4):371-379

MIJARES y GARCÍA PELAYO, M.I.; SÁEZ ILLOBRE, J.A. 1995. *El vino: de la cepa a la copa.* Ed. CDN, Ciencias de la Dirección. Madrid

MILLER, J.C.; MILLER, J.N. 1988. *Statistics for analytical chemistry.* Londres: Ellis Horwood.

MODI, G.; GUERINI, M. 1976. Assesment of the gemineness of wines. Study N-compounds cations organic-acid. *Bolletino dei laboratori Chimichi Porvinciali.* 27(11):318-325.

MONTES VALVERDE, J. 1997. La restauración del paisaje vegetal en la Alpujarra. II Conferencia de La Alpujarra. Agricultura y Medio Ambiente. Ed. Rosua Campos, J.L. Cátedra UNESCO de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente. Universidad de Granada.

MORA, J., BARBAS, J.I., RAMIS, B., MULET, A. 1988. Yeast microflora associated with some Majorcan must and wines. *AM. J. Enol. Vitic.* 39:344-346

- MORA, J.; MULET, A. 1991. Effects of some treatments of grape juice on the population and growth of yeast species during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 42(2):133-136
- MORENO GARCIA, J.; QUIRALTE CRESPO, J. 1974. Contribución al estudio de características de los vinos de la Mancha. *Anal. INIA/Ser. Tecnol. Agr.* 1:251-267
- MORENO MARTÍN, F.; DE LA TORRE BORONAT, M.C. 1979. Lecciones de Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona
- MOSSEL, D.A.A.; MORENO GARCÍA, B. 1985. Microbiología de los alimentos; Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza
- MULET, A. 1990. Estudio de la ecología de las levaduras en la fermentación de los mostos y vinos mallorquines Serie Projectes 2. Palma de Mallorca: Universidad de las Islas Baleares; Conselleria d'Agricultura i Pesca.
- MÜLLER, G. 1981. Microbiología de los alimentos vegetales. Ed. Acribia. Zaragoza
- MUÑOZ, M.; JUNCA, A.; GUASCH, J.; LARRECHI, M.S.; RIUS, F.X. 1987. Determinazione di ioni metallici in vini bianchi catalani mediante spettrometria atomica. *Riv. Vitic. Enol. Conegliano.* 5:208-218
- NAVARRO, G.; ZUÑEL, C.; MENDEZ, C.; NAVARRO, S. 1988. Vinificaciones comparadas, en tinto tradicional y por maceración carbónica, de *Vitis vinifera* variedad Monastrell. II. Evolución del color. *Anal. Bromatol.* XL:175-180
- NAVARRO, G.; MENDEZ, C.; ZUÑEL, C.; NAVARRO, S. 1987. *Vitis vinifera* en el campo de Cartagena. I. Aspectos edafoclimáticos y del desarrollo del fruto. *An. Edagol. Agrobiol.* 201-209
- NAVARRO, G.; ZUÑEL, C.; MENDEZ, C.; NAVARRO, S. 1988. Vinificaciones comparadas, en tinto tradicional y por maceración carbónica, de *Vitis vinifera* variedad Monastrell. I. aspectos generales y evolución de los parámetros de control de la fermentación. *Anal. Bromatol.* XL(1):164-174
- NAVARRO, G.; ZUÑEL, C.; MENDEZ, C.; NAVARRO, S. 1988. Vinificaciones comparadas en tinto tradicional y por maceración carbónica, de *Vitis vinifera*, variedad monastrell. III. Evolución del nitrógeno total y del contenido catiónico. *Anal. Bromatol.* XL(2):361-367.
- NYKÄNEN, L.; SUOMALAINEN, H. 1983. *Aroma of Beer, Wine and Distilled Alcoholic Beverages.* D. Reidel Publishing Company.
- OIV (1990). *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins caracteristiques chromatiques.* OIV.
- OLALLA, M.; LÓPEZ, M.C.; LÓPEZ, H.; VILLALÓN, M. 1993. Parámetros enológicos que caracterizan y determinan la calidad de los vinos elaborados en la comarca granadina de la "Alpujarra-Contraviesa". *Alimentaria* Nº:109-115, Septiembre.

- OLALLA, M.; LÓPEZ, M.C.; VILLALON, M. 1993. Determinación de iones metálicos en vinos de la comarca granadina de la Alpujarra-Contraviesa por espectroscopia de absorción atómica. *Alimentaria* Junio 93. 79-84
- ORDEN de 11-12-86 del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, sobre utilización de nombres geográficos y de la mención de "vino de la tierra" en la designación de los vinos de mesa (BOE nº 306, de 23-12-86).
- ORDEN de 11-12-86 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, por la que se actualizan los anexos de la orden de 11-12-86 (BOE nº 95 de 20-abril-88).
- ORDEN de 15-julio-87 de la Consellería de Agricultura de la Xunta de Galicia, sobre las condiciones a cumplir para acogerse a la denominación "Vino de la tierra, Valle del Miño-Ourense", por los caldos elaborados en esta comarca (BOE nº 160 de 21-agosto-87).
- ORDEN de 17-septiembre-81, de la Presidencia del Gobierno, por la que se establecen métodos oficiales de análisis de... plantas, suelos, productos derivados de la uva y similares y toma de muestras. (BOE Nº 246 de 14-octubre-81),
- ORDEN de 30-3-87, de la Junta de Extremadura, por la que se establecen las comarcas vitícolas y municipios extremeños acogidos a la calificación de "vinos de la tierra" y a la utilización de "indicación geográfica" para designación de los vinos de mesa (BOE nº 28 de 8-abril-8).
- ORDEN de 4-abril-1988 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, por la que se actualizan los Anexos de la de 11 de diciembre de 1986 (BOE de 20-4-1988).
- ORDEN de la Presidencia del Gobierno, de 31 de julio de 1979, por la que se establecen métodos oficiales de análisis de aguas y productos derivados de la uva. (BOE Nº 208, de 30-agosto-79).
- ORDEN de la Presidencia del Gobierno, por la que se establecen los Métodos Oficiales de Análisis de y productos derivados de la uva, establecidos por Orden de 31 de enero de 1977. (BOE nº 175, de 23-julio-1977).
- ORDEN de la Presidencia del Gobierno, por la que se establecen los Métodos Oficiales de Análisis de... y productos derivados de la uva, establecidos por Orden de 31 de enero de 1977. (BOE nº 174, de 22-julio-1977).
- ORDEN del Ministerio de Agricultura de 1-agosto-79, por la que se reglamenta el uso de las indicaciones relativas a la calidad, edad y crianza de los vinos (BOE, nº 209, 31-8-79).
- ORDOÑEZ, R.; PANEQUE, G.; MEDINA, M.; CORRAL, L. 1983. Estudio de mostos de vendimia y fermentados de la zona Montilla-Moriles: II. K, Ca, Na, Mg, Fe, Cu, Zn y Mn. *Anal. Edafol. Agrobiol.* XLII:1133-1144.

- ORDOÑEZ, R.; PANEQUE, G.; MEDINA, M.; CORRAL, L. 1983. Estudio de mostos de vendimia y fermentados de la zona Montilla-Moriles: I. Azúcares reductores acidez total, acidez volátil, cenizas y grado alcohólico. *Anal. de Edafol. y Agrobiología*. XLII(7-8):1121-1131.
- ORRIOLS, I.; MORENO, F.M. 1991. Influencia de las levaduras en la formación de sustancias volátiles en la vinificación de la variedad Albariño. *Viticultura* 2(6):21-26
- ORTEGA HERNÁNDEZ-AGERO, A.P.; GARCÍA DE LA PEÑA, M^a.E.; HIDALGO TOGORES, J.; TIENDA PRIEGO, P.; NAVARRO ROZALÉN, P.; SERRANO CUADRILLO, J.; 1993. Contribución al estudio del color de los vinos españoles. I. Vinos rosados. *Viticultura* 11-12:52-58.
- ORTEGA HERNÁNDEZ-AGERO, A.P.; GARCÍA DE LA PEÑA, M^a.E.; HIDALGO TOGORES, J.; TIENDA PRIEGO, P.; NAVARRO ROZALÉN, P.; SERRANO CUADRILLO, J. 1994. Contribución al estudio del color de los vinos españoles. II. Vinos blancos. *Viticultura* 13-4:55-62
- ORTEGA TORRES, J. 1985. El aroma de los finos de Jerez. II. Evolución de la fracción aromática de los vinos de Jerez durante el envejecimiento. *Alimentaria* 168:21-24
- ORTEGA TORRES, J. 1985. El aroma de los vinos de Jerez. I. Composición del aroma. *Alimentaria* 167:35-42.
- PARDO, I.; GARCÍA, M.J.; ZÚÑIGA, M.; URUBURU, F. 1988. Evaluation of the API 50 CHL System for identification of *Leuconostoc oenos*. *Am. J. Enol. Vitic.* 39 (4): 347-350.
- PARISH, M.E.; CARROLL, D.E. 1986. Indigenous yeast associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and must. *Am. J. Enol. Vitic.* 36:165-169.
- PAZO, M.; TRAVESO, C.; CISNEROS, M^a.C.; MONTERO, E. 1999. *Determinación de ácidos orgánicos en vinos por C.L.A.R.* *Alimentaria*, Mayo 99/139
- PÉREZ GARCÍA, J. 1990. La transformación del paisaje. Ayuntamiento de Motril. Granada.
- PÉREZ PUJALTE, A. 1979. Mapa de suelos de la provincia de granada. Escala 1:200.000. C.S.I.C. Granada.
- PÉREZ ZUÑIGA, F.J.; GÓMEZ MORENO, M.S.; BRAVO ABAD, F. 1994. Vinificación de mosto de uva cv. Malvar: Contenidos en ácidos málico y láctico durante los procesos fermentativo y postfermentativo. *Alimentaria*, septiembre 94/59
- PEREZ-JUAN, P.M.; MORALES, J.; DE LA TORRE, M^a.J.; JIMENEZ, F.J. 1996. Estudio de diferentes cultivares tintos en Montilla-Moriles. XVIII Jornadas de Viticultura y Enología Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 1-18
- PEYNAUD, E. 1989. *Enología Práctica, conocimiento y elaboración del vino*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid
- POMERANZ, Y.; MELOAN C.E. 1994. *Food analysis: theory and practice*. Chapman and Hall. New

York..

POULARD, A.; REBERTEAU, R.; ROUSSET, Y. 1985. La microflore des phases préfermentaires. *Revue Française d'Oenologie* 99:14-19.

POVEDO, J.; 1988. Comportamiento agronómico de viníferas de la D.O. Rioja y francesas en Rioja Baja. Período 1983-1987. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias.

Primo Simposio Internazionale LE SOSTANZE AROMATICHE DELL'UVA E DEL VINO. 1987. Instituto Agrario Provinciale. Trento (Italia).

PRIMO YUFERA, E. 1979. Química Agrícola. Tomo III: Alimentos. Ed. Alhambra. Madrid.

QUEROL, A.; BARRIO, E.; HUERTA, T.; RAMÓN, D. 1992. Dry yeast strain for use in fermentation of Alicante wine: selection and DNA patterns. *J. Food Sci.* 57:183-185

QUESADA GIL, M.P.; MARTÍNEZ CUTILLAS, A.; PARDO MINGUEZ, F.; FERNANDEZ FERNANDEZ J.I. 1992. La microflora levaduriforme presente en las vinificaciones tradicionales de la región de Murcia. XX Congreso Mundial de la viña y el vino. O.I.V. 72ª Asamblea General. Madrid y la Rioja (España) Tomo III, Sección 2

RANKEN, M.D. 1993. Manual de industrias de los alimentos. 2ªed. Ed Acribia. Zaragoza.

RANKINE, B.C.; PILONE, D.A. 1973. *Saccharomyces bailii* a resistant yeast causing serious spoilage of bottled table wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 24(2):55-58
RANKINE, B.C.; POCKOCK, K.F. 1969. Influence of yeast strain on binding of SO₂ in wines, and on its formation during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 20:104-109.

REBELEIN, E. 1971. Correction de l'acidité des moûts et des vins. *Bull. O.I.V.* 480(44):136-141

REED, G. 1981. Use of microbial cultures: yeast products. *Food Technol.* 35:89-94.

REGLERO, G. 1987. *Nuevas técnicas en la elaboración del vino*. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.* 27:463-470

REGODÓN MATEOS, J.A.; PÉREZ NEVADO, F.; CUENDA MÉNDEZ, M.; VALDÉS SÁNCHEZ, M.E.; DE MIGUEL GORDILLO, C. 1996. Levaduras autóctonas extremeñas para vinificación. *Alimentaria*, Enero-Febrero 96 / 73-77. ¿Nº?

REGODÓN MATEOS, J.A.; PÉREZ NEVADO, F.; VALDÉS SÁNCHEZ, M.E.; DE MIGUEL GORDILLO, C.; RAMÍREZ FERNÁNDEZ, M. 1996. Levaduras autóctonas extremeñas para vinificaciones industriales. XVIII Jornadas de viticultura y enología Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 463-473.

REGODÓN MATEOS, J.A.; PÉREZ NEVADO, F.; VALDÉS SÁNCHEZ, M.E.; DE MIGUEL GORDILLO, C.; RAMÍREZ FERNÁNDEZ, M. 1995. Utilización de levaduras autóctonas extremeñas en la elaboración de vinos típicos de calidad. XVII Jornadas de viticultura y enología Tierra de Barros.

- Almendralejo (Badajoz). 287-300.
- RIBEREAU-GAYON, J. 1976. *Traité d'enologie: sciences et techniques du vin*. Ed. Dunod. Paris
- RIBEREAU-GAYON, J. 1980. *Ciencias y Técnicas del vino. Tomo I. Análisis y control de los vinos*. Ed. Hemisferio Sur
- RIBEREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E.; SUDRAUD, P.; RIBEREAU-GAYON, P. 1980. *Tratado de Enología. Ciencias y Técnicas del vino. Tomo I: Análisis y control de vinos*. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- RIBEREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E.; SUDRAUD, P.; RIBEREAU-GAYON, P. 1982. *Science et Technique du vin*. Bordas, Paris.
- ROCA, A.: "Estudio integral de la cuenca del río Gualchos. Degradación y uso del suelo". Tesis Doctoral. Univ. de Granada. Facultad de Ciencias. Sección de Geológicas.
- ROHM, H.; LECHNER, L.; LECHNER, M. 1990. Evaluation of the API ATB 32C system for the rapid identification of foodborne of foodborne yeast. *Int. J. of Food Microbiology* 11:215-224.
- ROSINI, G. 1984. Assessment of dominance of added yeast in wine fermentation and origin of *Saccharomyces cerevisiae* in wine-making. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 30:249-256
- ROSUA CAMPOS, J.L.; MARTÍN MOLERO, J.C. 1997. La creación del Parque Nacional de Sierra Nevada: algunas implicaciones para la Alpujarra. II Conferencia de La Alpujarra. Agricultura y Medio Ambiente. Ed. Rosua Campos, J.L. Cátedra UNESCO de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente. Universidad de Granada.
- RUÍZ HERNÁNDEZ, M. 1994. *Crianza y envejecimiento del vino tinto*. Ed. A. Madrid Vicente, Ediciones. Madrid
- RUIZ, A.I.; PELAYO, R.; ARROYO, V. E IÑIGO, B. 1986. Agentes de fermentación de los mostos de uva de la Comunidad Autónoma de Madrid. *Alimentaria* 173:53-56.
- SALVADORES, M^a DEL PINO; CARDELL, E. 1992. Estudio experimental de los fenómenos de competencia entre levaduras autóctonas y comerciales en los vinos de Tenerife. XIV Jornadas de Viticultura y Enología de Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 225-230.
- SALVADORES, M^a DEL PINO; CARDELL, E. 1995. Identificación de la flora levaduriforme asociada a vinificaciones en la Denominación Especifica Abona-Sur de Tenerife. *Alimentaria* 264:37-39
- SALVADORES, M^a DEL PINO; CARDELL, E.; ALONSO, J.E. 1994. Aislamiento e identificación de levaduras autóctonas en la Denominación Especifica Abona-Sur de Tenerife. XVI Jornadas de viticultura y enología Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 313-320.
- SALVADORES, M^a DEL PINO; CARDELL, E.; DARIAS, J.; DÍAZ, M.E. 1995. Influencia de la adición de

- levaduras autóctonas en un mosto y su incidencia en el vino resultante durante la vendimia de 1994. XVII Jornadas de enología y viticultura Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 243-251
- SALVADORES, M^a DEL PINO; DÍAZ, M.E.; CARDELL, E. 1993. Levaduras autóctonas aisladas en vinos de Tenerife y su influencia en las concentraciones de acetato de etilo y alcoholes superiores analizados por cromatografía de gases. *Microbiología SEM* 9:107-112.
- SANCHEZ INFANTE, P.; KHAYYAT, N.; ARROYO, V.; IÑIGO B. 1985. Mostos de uva de la Denominación de Origen Alicante. *Alimentaria* 164:25-28.
- SANCHEZ INFANTE, P.; MATEOS, P.; RUÍZ, A.I.; Y ARROYO, V. 1986. *Alimentaria* 174:49-55
- SANCHEZ PINEDA, M.T.; MARTIN LOPEZ, E.. 1997. Metales pesados en el vino. *Alimentación, Equipos y Tecnología*. Marzo 43-47.
- SANTAMARÍA, M.T.; VIDAL, M.C.; MARINÉ, A.; CODONY, R. 1989. Aspectos analíticos relacionados con la D.O. Ampurdán, Costa brava. *Alimentaria* 203:71-75
- SANTOS MARRODAN, M.; LOPEZ SAN MIGUEL, T.; MARINE FONT, A. 1984. Estudio comparativo de métodos de análisis de ácidos orgánicos en vinos. *Alimentaria* 157:17-26.
- SANTOS MARRODAN, M.; LOPEZ SAN MIGUEL, T.; MARINE FONT, A. 1984. Los ácidos orgánicos de los vinos. *Alimentaria* 153:45-52
- SANTOS, M.C.; LOPEZ SAN MIGUEL, T. 1985. Contenido de ácidos orgánicos en vinos de Rioja. *An.Iria/Ser. Agric.* 28(1):45-51
- SAPIS DOMERCQ, S. 1980. Etude de l'influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore des raisins et des vins. *Connaissance Vigne et vin* 14(3):155-181.
- SCHOPFER, J.F.; AERNY, J. 1985. Le rôle de l'anhydride sulfureux en vinification. *Bulletin l'O.I.V.* 652-653.
- SHINOHARA, T. 1984. L'importance des substances volatiles du vin. Formation et effects sur la qualité. *Bulletin de l'O.I.V.* 641-642.
- SILVA, M^a.L.; MALCATA, F.X.; DE REVEL, G. 1996. Volatile contents of grape marcs in Portugal. *Journal of Food Composition and Analysis* 9:72-80
- SOULIS, TH.; ARVANITTOYANNIS, I.; KAVLENTIS, E. 1990. Iron, copper, manganese and zinc contents of some bottled and non-bottled greei wines. *Sciences des Aliments.* 9:799-803.
- SPAJNI, J.CH. 1959. La Alpujarra, la Andalucía secreta. Exma. Diputación Provincial de Granada. Instituto Provincial de Estudios y Promoción Cultural.
- STANIER, R.Y.; INGRAHAM, J.L.; WHEELIS, M.L.; PAINTER, P.R. 1991. *Microbiología*. 2^a Edición. Editorial Reverté, S.A.;

- STIEL, R.G. 1982. Principles and Procedures of Statistics. McGraw-Hill. London.
- STREHAIANO, P.; URIBELARREA, J.L.; MOTA, M.; GOMA, G. 1985. Observation sur les mécanismes d'inhibition en fermentation alcoolique. *Revue Française d'Oenologie* 97:55-60.
- SUÁREZ LEPE, J.A.; IÑIGO LEAL, B. 1990. *Microbiología Enológica*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid
- SUÁREZ, J.A. 1990. Selección de levaduras vínicas: criterios, conservación y biotecnología. *Vitivinicultura* 9:23-30
- SUÁREZ, J.A.; COLOMO, B.; ARROYO, V.; IÑIGO, B. 1992. Levaduras vínicas de 1ª fase en mostos españoles. Distribución porcentual, histogramas de frecuencia y estimación de la misma por intervalos de confianza. Comunicación al XX Congreso Mundial de la viña y el vino. O.I.V. 72ª Asamblea General. Madrid y la Rioja (España). Tomo III.
- TIMBERLAKE, C.F. 1981. Parameters of red wine quality. *Food Technology in Australia* 33(3):139-146.
- TOROK, T.; KING, A. 1991. Comparative study on the identification of food-borne yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(4):1207-12
- TRILLO SAN JOSÉ, C. 1992. *La Alpujarra. Historia, Arqueología y Paisaje*. Diputación Provincial de Granada
- UNIÓN EUROPEA (UE). 1990. Reglamento nº 2676/90 de la Comisión de 17/9/90 (DOCE nº 272 de 3 de Octubre 1990).
- UNIÓN EUROPEA (UE). 1997. Reglamento nº 536/97 del Consejo de 17/3/97 (DOCE nº 283 de 25 de Marzo 1997).
- UREÑA POZO, M.E.; GIMENEZ PLAZA, J.; CANO PAVON, J.M. 1988. Determinación de diversos elementos alcalinos y alcalino-térreos en vinos de Málaga. *Anal. Bromatol.* XL(1):89-96.
- USSEGLIO-TOMASSET, L. 1998. *Química enológica*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid
- VALCARCEL, M.J., PÉREZ, L., GONZÁLEZ, P., DOMEQ, B. 1989. Efecto de las prácticas enológicas en vendimia sobre las levaduras responsables de la fermentación de mostos de Jerez I.- Fermentación dirigida mediante la adición de un pie de cuba. *Alim. Equip. Tecno.* 8(6):89-95
- VALCARCEL, M.J., PÉREZ, L., GONZÁLEZ, P., DOMEQ, B. 1990. Efecto de las prácticas enológicas en vendimia sobre las levaduras responsables de la fermentación de mostos de Jerez III- Modificación del pH por corrección de la acidez. *Alim. Equip. Tecno.* 9(2):169-172.
- VAN DER KUHLE, A.; JESPERSEN, L. 1998. Detection and identification of wild yeast in lager breweries. *Int. J. Food. Microbiol.* 43(3): 205-13
- VAN DER WALT, J.P.; YARROW, D. 1984. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeast. En N.J.W. Kreger-van Rij (ed). *The yeast, a taxonomic study*. Elsevier,

Amsterdam, 45-104

- VARGAS MUÑOZ, A. 1991. Albondón. El Señorío de Çéhel (Sejel) en la Alpujarra granadina. Granada
- VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. 1997. Bebidas. Tecnología, química y microbiología. Ed. Acribia. Zaragoza.
- VERSAVAUD, A.; DULAU, L.; HALLET, J.N. 1993. Etude écologique de la microflore levurienne spontanée du vignoble charentes et approche moléculaire de la diversité infraspécifique chez *Saccharomyces cerevisiae*. Rev. Franç. Oenologie 142:20-28
- VEZINHET, F.; LACROIX, S. 1984. Marquage génétique des levures: outil de controle des fermentations en souches pures. Bull. OIV. 57:643-644;759-773.
- VIADER, R. 1989. Manual de control de calidad. I. Métodos de muestreo e inspección para embotellado de vinos tranquilos y espumosos. Ed. Línea de Proyectos Editoriales, S.A. Barcelona.
- VICENTE, J.A.; LEMA, C.; LÓPEZ, J.E.; FONTAO, R.; ANGULO, L.; LONGO, E. 1995. Actividad xilanasa y relaciones antagónicas entre levaduras como posibles factores de colonización en uvas. XVII Jornadas de Viticultura y Enología Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 265-273
- VOGT, E. 1971. Fabricación de vinos. Acribia, Zaragoza.
- VOGT, E.; JAKOB, L.; LEMPERLE, E.; WEISS, E. 1984. El vino: Obtención, elaboración y análisis. 9ª ed. Ed. Acribia. Zaragoza.
- WATSON, D.(Año) Revisiones sobre Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Volumen 1. Higiene y Seguridad Alimentaria. Ed . Acribia, S.A.
- WINKLER, A.J.; COOK, J.A.; KLIEWER, W.M.; LIDER, L.A. 1974. General Viticulture. University of California Press, Berkeley, Los Angeles. EEUU
- YARROW, D. 1984. *Genus Saccharomyces* Meyer ex Reess. En *The Yeast, a taxonomic study*. (Editado por N.J.W. Kreger van Rij). Elsevier, Amsterdam. 379-395.
- ZEA CALERO, L.; MORENO VIGARA, J.J.; MEDINA CARNICER, M. 1992. Comportamiento de tres razas de *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación alcohólica y desarrollo de velo en mostos esterilizados de *Vitis vinifera* "Pedro Ximenez". XIV Jornadas de Viticultura y Enología Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 215-224
- ZUFIA LOPEZ, L.; GARCIA SOTO, A.; AZPILICUETA, C.1999. Influencia de la filtración a vacío en el contenido de cationes de un mosto de la variedad viura y en su evolución durante la fermentación y conservación del vino. Food Sci. Tech. Int. (4) 311-317

ANEXOS

ANEXO I: Clasificación de los ASCOMICETOS

| |
|---------|
| Clase |
| Orden |
| Familia |
| Género |

Phylum: Ascomycota

“Archiascomycetes”

Schizasaccharomycetales Prillinger, Dörfler, Laaser, Eckerlein & Lehle ex Kurtzman

Schizasaccharomycetaceae Beijerinck ex Klöcker

Schizasaccharomyces

Taphrinales Gäumann & C.W. Dodge Taphrinaceae Gäumann

Taphrina

Lalaria (Anamorph of *Taphrina*)

Protomycetales Luttrell ex D. Hawksworth & O.E. Eriksson

Protomycetaceae Gray

Protomyces

? *Saitoella* (Anamorphic genus)

Pneumocystidales O.E. Eriksson

Pneumocystidaceae O.E. Eriksson

Pneumocystis

Euascomycets

? *Endomyces* (*E.scopularum*)^{a b}

Oosporidium

Hemiascomycetes

Saccharomycetales Kudryavtsev (syn. Endomycetales Gäumann)

Ascoideaceae J. Schröter

Ascoidea

Cephaloascaceae L.R. Batra

Cephaloascus

Dipodascaceae Engler & E. Gilg

Dipodascus

Galactomyces

? *Sporopachydermia*

? *Stephanoascus*

? *Wickerhamiella*

? *Yarrowia*

? *Zygoascus*

Endomycetaceae J. Schröter

? *Endomyces* (*E. Decipiens*)^{a b}

? *Helicogonium*^a

? *Myriogonium*^a

? *Phialoascus*^a

? *Trichomonascus*^a

Eremotheciaceae Kurtzman

Eremothecium

? *Coccidiascus*

Lipomycetaceae E.K. Novák & Zsolt

Babjevia

Dipodascopsis

Lipomyces

Zygozoma

Metschnikowiaceae T. Kamienski

Clavispora

Metschikowia

Saccharomycetaceae G. Winter

Arxiozoma

? *Citeromyces*

? *Cyniclomyces*

? *Debaryomyces*

? *Dekkera*

? *Issatchenkia*

Kluyveromyces

? *Lodderomyces*

? *Pachysolen*

? *Pichia*

Saccharomyces

? *Saturnispora*

? *Torulaspota*

? *Williopsis*

Zygosaccharomyces

Saccharomycodaceae Kudryavtsev

? *Hanseniaspora*

? *Nadsonia*

Saccharomycodes

? *Wickerhamia*

Saccharomycopsidaceae von Arx & van der Walt

? *Ambrosiozoma*

Saccharomycopsis

Candidaceae Windisch ex van der Walt (Anamorphic)

Aciculoconidium

Arxula

Blastobotrys

Botryozyma

Brettanomyces

Candida

Geotrychum

Kloeckera

Myxozyma

Schizoblastosporion

Sympodiomyces

Trigonopsis

ANEXO II: Clasificación de los BASIDIOMICETOS

| |
|-----------------|
| Características |
| Orden |
| Familia |
| Género |

Teleomorphic taxa

1.- Poros septales "simples"

A.- Basidios cilíndricos, septos transversales

Ustilaginales

Ustilaginaceae

Microbotryum

Schizonella

Sorosporium

Sphacelotheca

Sporisorium

Ustilago

Ustilentyloma y probablemente con *Ustilago* tipo basidio^a

Sporidiales

Sporidiobolaceae

Leucosporidium

Rhodosporidium

Sporidiobolus

? *Erythrobasidium*

? *Kondoa*

? *Sakaguchia*

Platyglloeales

Cystobasidiaceae

Colacogloea

Cystobasidium

Kriegeria^b

Mycogloea

Occultifer

Tijbodasia

Septobasidiales

Septobasidiaceae

Auriculoscypha

Coccidiodictyon^c

Ordonia^c

Septobasidium

Atractiellales^d

Chionosphaeraceae

Chionosphaera

Stilbum

Atractogloeaceae

Atractogloea

Agaricostilbales

Agaricostilbaceae

Agaricostilbum

B.- Basidios globosos, no septados.

Graphiolales

Graphiolaceae

Graphiola

C.- Basidios cilíndricos, no septados.

Cryptobasidiales

Cryptobasidiaceae

Conyodyctum

Cryptobasidium

- Microstromaceae
Microstoma
- Exobasidiales
 Exobasidiaceae
Brachybasidium
Dicellomyces
Exobasidiellum
Exobasidium
Laurobasidium
- II.- Dolipore septa, parentheses cupulate
 A.- Basidios “cruciate-septate”
 Tremellales
 Sirobasidiaceae
Fibulobasidium
Sirobasidium
- Tremellaceae
Bulleromyces
Itersonia^e
Holtermannia
Phyllogloea
Sirotrema
Tremella
Trimorphomyces
- B.- Basidios aseptados
 Filobasidiales
 Filobasidiaceae
Cystofilobasidium^f
Filobasidiella
Filobasidium
Mrakia
Xanthophyllomyces
- Syzygospora
Chistiansenia
Syzygospora
- Anamorphic taxa
 Sporobolomycetaceae
Bensingtonia pro parte
Kurtzmanomyces
Rhodotorula pro parte
Sporobolomyces pro parte
Sterigmatomyces
- Cryptococcaceae
Bullera
Cryptococcus
Fellomyces
Kockovaella
Phaffia
Trichosporom
Tsuchiyaea
Udeniomyces
 ? *Hyalodendron*
 ? *Moniliellas*

ANEXO III: Actividad enzimática de diferentes tipos de levaduras (API ZYM)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 |
|-----------------------------|---|---|----|---|----|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Fosfatasa ácida | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 2 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Fosfatasa alcalina | 3 | 4 | 5 | 2 | 5 | 2 | + | 5 | 1 | 2 | 4 | 2 | 1 | 5 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| α glucosidasa | - | 3 | 5 | - | - | 5 | + | 3 | - | + | - | - | 5 | 5 | - | 3 | + | - | + | 1 | 1 | 2 |
| β glucosidasa | - | 2 | 1 | - | +- | 1 | - | 3 | 1 | 3 | + | + | - | 5 | + | + | + | - | - | - | - | - |
| α galactosidasa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| β galactosidasa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| β glucuronidasa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α manosidasa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α fucosidasa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Naftol-AS-BI-Fosfohidrolasa | - | - | - | - | 3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Esterasa (C 4) | 3 | + | 1 | 2 | + | 3 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 | 1 | 2 | 2 | 3 | 3 | 4 | 4 | 3 | 3 |
| Esterasa lipasa (C 8) | 2 | 3 | 2 | 2 | + | 4 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 4 | 3 | 3 | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 |
| Lipasa (C 14) | - | - | +- | - | - | + | + | - | - | + | - | - | - | +- | - | - | - | - | - | - | +- | + |
| Tripsina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | - | - |
| α qimotripsina | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| Leucina arilamilasa | 5 | 3 | 5 | 5 | 1 | 5 | 5 | 4 | 4 | 5 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 5 | 4 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Valina arilamilasa | 1 | 1 | + | 4 | + | 3 | 3 | 2 | 5 | 5 | 4 | 4 | 5 | 1 | 4 | 3 | 5 | + | 3 | 1 | 1 | 2 |
| Cistina arilamilasa | 1 | 2 | 2 | 2 | + | 1 | + | 1 | - | - | + | 1 | 3 | 3 | + | 2 | 2 | - | 3 | 3 | 2 | 2 |

API ID32 A

| REACCIÓN | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 |
|--------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Fosfatasa alcalina | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| α Glucosidasa | - | + | + | - | - | + | + | + | - | + | - | - | + | + | - | + | + | - | + | + | + | + |
| β Glucosidasa | - | + | + | - | + | - | - | + | + | + | + | + | - | + | + | | + | + | - | - | - | - |
| α Galactosidasa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| β Galactosidasa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| β Galactosidasa 6 fosfato | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| β Glucuronidasa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α Arabinosidasa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α Fucosidasa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| β N - Acetil - Glucosaminidasa | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ac. Glutámico Descarboxilasa | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Leucina arilamidasa | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Serina arilamidasa | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | |
| Alanina arilamidasa | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | |
| Fenilalanina arilamidasa | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | |
| Tirosina arilamidasa | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | |
| Arginina arilamidasa | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | | |
| Histidina arilamidasa arilamidasa | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | | |
| Prolina arilamidasa | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | - | + | - | + | - | + | | | |
| Leucil glicina arilamidasa | + | - | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | | |
| Glicina arilamidasa | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | | |
| Ácido Prioglutámico arilamidasa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| Glutamil Ac. Glutámico arilamidasa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| Ureasa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| Arginina dihidrolasa | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Producción de Indol | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | - | + | + | + | | |

CORRESPONDENCIAS

| Nº | Especie de Levadura |
|----|---------------------------------------|
| 1 | <i>Candida mycoderma</i> |
| 2 | <i>Cryptococcus laurentii</i> |
| 3 | <i>Debaryomyces hansenii</i> |
| 4 | <i>Pichia membranaefaciens</i> |
| 5 | <i>Rhodotorula glutinis</i> |
| 6 | <i>Candida pulcherrima</i> |
| 7 | <i>Candida guilliermondii</i> |
| 8 | <i>Hansenula subpelliculosa</i> |
| 9 | <i>Kloeckera apiculata</i> |
| 10 | <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> |
| 11 | <i>Torulopsis bacillaris</i> |
| 12 | <i>Torulaspora rosei</i> |
| 13 | <i>Zygosaccharomyce veronae</i> |
| 14 | <i>Hansenula anomala</i> |
| 15 | <i>Zygosaccharomyces acidifaciens</i> |
| 16 | <i>Saccharomyces ellipsoideus</i> |
| 17 | <i>Saccharomyces ludwigii</i> |
| 18 | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> |
| 19 | <i>Saccharomyces rouxii</i> |
| 20 | <i>Saccharomyces beticus</i> |
| 21 | <i>Saccharomyces cheresiensis</i> |
| 22 | <i>Saccharomyces montuliensis</i> |

