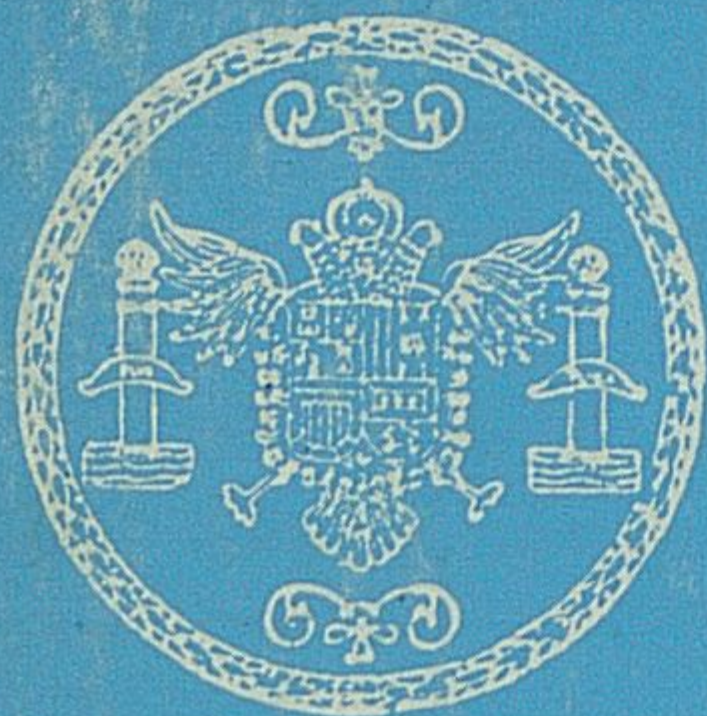


Universidad de Granada

Facultad de Ciencias



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

**ESTUDIOS SOBRE LAS LEVADURAS Y OTROS
MICROORGANISMOS PRESENTES EN
LOS MOSTOS DE JEREZ**

—♦♦♦—
VOLUMEN I

Enrique García Máiquez

Tesis Doctoral

1978

4/64-1

dupl. R. 19734



R. 32.303

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

ESTUDIOS SOBRE LAS LEVADURAS Y OTROS MICRO-
ORGANISMOS PRESENTES EN LOS MOSTOS DE JEREZ

Volúmen I

Enrique Garcia Maiquez

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
GRANADA	
Nº Documento	613501306
Nº Copia	215457059



UNIVERSIDAD DE GRANADA

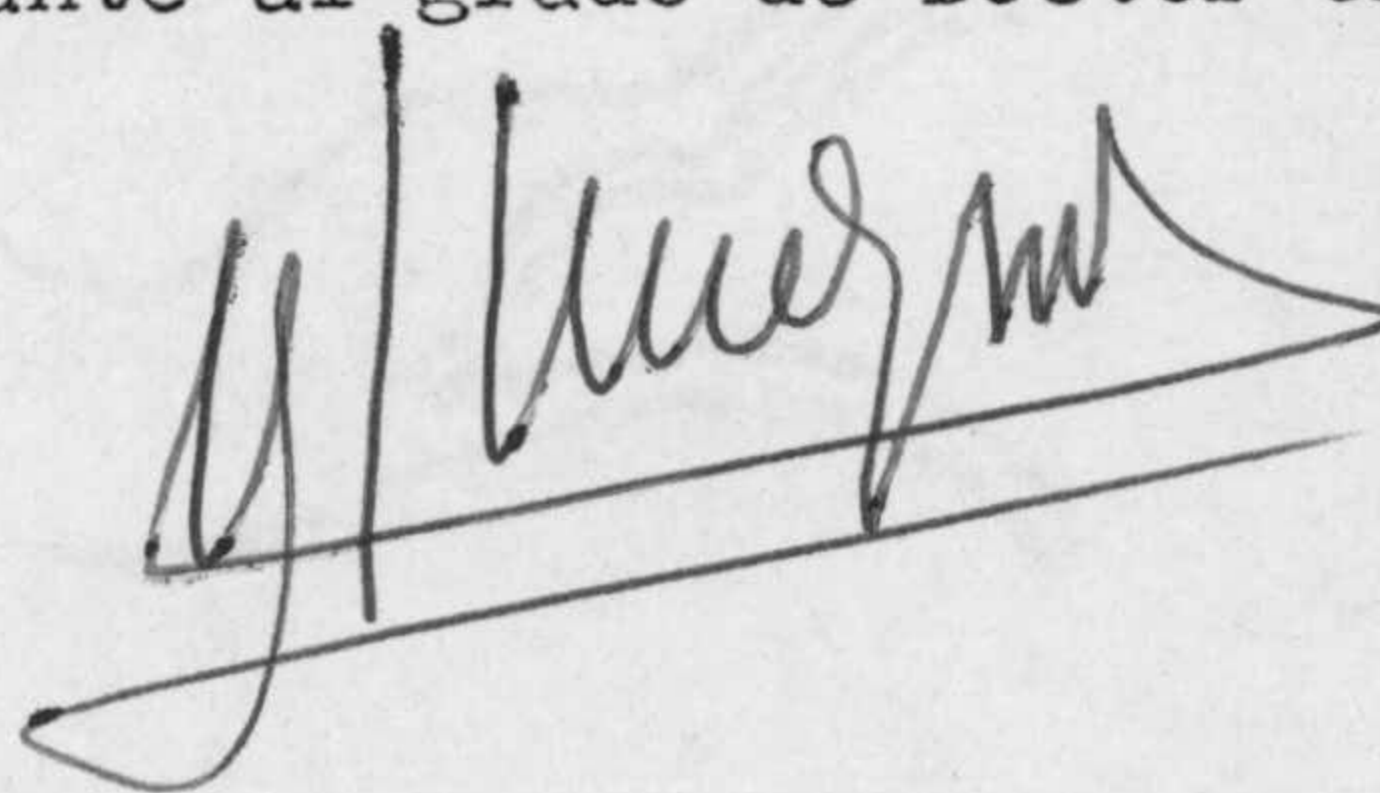
1978

ESTUDIOS SOBRE LAS LEVADURAS Y OTROS MICROORGANISMOS
PRESENTES EN LOS MOSTOS DE JEREZ.

MEMORIA presentada para aspirar al
Grado de Doctor en Ciencias por el
Licenciado D. Enrique Garcia Maiquez.

PROF. DR. D. ENRIQUE MONTOYA GOMEZ
Director de Tesis

Enrique Garcia Maiquez
Aspirante al grado de Doctor en Ciencias

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'E. Garcia Maiquez', is written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.

Granada, Octubre de 1978

a Carmen mi mujer

Faded, illegible handwriting, possibly a signature or address.

Mi agradecimiento:

Al Prof. Dr. D. Enrique Montoya Gómez, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, Director de esta Tesis Doctoral, con el reconocimiento a la gran influencia que siempre tuvo en mi formación investigadora, al ejemplo de su trabajo y amplísima formación científica y humana.

A González Byass, & Co. Ltd., en especial a su consejero Delegado D. Mauricio González Díez, por su cariño a la investigación y a D. Santos Cascallana Canóniga, Director General de la Empresa.

Al Dr. Casas Lucas, Director del Centro de Investigación Enológica, por las facilidades dadas para la realización de este trabajo; a todos los compañeros del Centro y a D. Guillermo Rascón por los datos agrícolas que de él se solicitaron.

Igualmente quiero dar las gracias a D. Juan Escudero Molina; a D. José Chacón Regidor y personal auxiliar del Centro.

Abreviaturas y signos empleados en este trabajo

Géneros de levaduras

- C = Candida
H = Hansenula
K = Kloeckera
P = Pichia
S = Saccharomyces
S'codes Saccharomycodes
T = Torulopsis

Mostos y agentes correctores

- MN = Mosto natural obtenido de las prensas sin ningún tipo de corrección.
- TY = Mosto natural al que se añade ácido tartárico y yeso como agentes correctores.
- A = Mosto natural al que se adiciona alcohol como agente corrector.
- J = Mosto natural al que se añade sulfuroso al estado de metabisulfito, como agente corrector.

Cuando se emplean varias siglas juntas quiere decir que ese mosto ha sido tratado con dichos agentes correctores.

- Bé = Grado Beaumé que expresa la cantidad de azúcar existente en el mosto.

Características morfológicas

Las siglas empleadas en las características morfológicas recogidas en el Adendum nº 1 son:

No = No se ha observado micelio ni pseudomicelio.

CG = No se ha observado micelio ni pseudomicelio pero si células gemantes.

S = Presencia de pseudomicelio.

Sr = Presencia de pseudomicelio rudimentario.

M = Presencia de micelio.

Crecimiento, fermentación de azúcares y pruebas bioquímicas.

Los signos utilizados han sido los siguientes:

— = negativo

± = dudoso o débil

+

++ = positivo fuertemente

A = producción de ácidos a partir de los azúcares de prueba.

AG = producción de ácidos y gases a partir de los azúcares de prueba.

1/3 = fermentación parcial de la Rafinosa.

INDICE

Pág.

I.- INTRODUCCION 8

1.- Microorganismos que intervienen en los procesos de vinificación	9
1.1. Levaduras. Levaduras en mostos y vinos	9
1.2. Otros microorganismos acompañantes	17
2.- Fermentación alcohólica.	18
2.1. Factores que afectan a la fermentación alcohólica de los mostos	23
3.- Vinificación	27
3.1. Obtención de los mostos	27
3.2. Adición de correctores	31
3.3. Elaboración y crianza del vino	33
3.4. Sistema de soleras	36
4.- Factores que afectan a la elaboración del Jerez	37
4.1. Factores que afectan a la calidad de la uva	37
4.1.1. Factores permanentes	38
4.1.2. Factores modificables	44
4.1.3. Factores accidentales	46
4.2. Correcciones de los mostos	47
4.2.1. Adición de yeso	49
4.2.2. Adición de ácido tartárico	50
4.2.3. Adición de sulfuroso	52
4.2.4. Adición de alcohol	53
5.- Objeto del trabajo	54

II.- MATERIAL Y METODO	56
1.- Tipos de mostos	57
2.- Procedencia de los mostos	58
3.- Plano de la zona	63
4.- Toma de muestras	64
5.- Medios de cultivos empleados en el aislamiento y conser- vación de levaduras	66
6.- Técnicas de aislamientos de levaduras	68
7.- Técnicas de recuentos de levaduras	69
8.- Técnicas de recuentos de bacterias	69
9.- Técnicas empleadas en la identificación de levaduras. .	70
9.1. Tinciones	70
9.2. Caracteres morfológicos	70
9.3. Caracteres culturales	71
9.4. Caracteres bioquímicos	71
10.- Factores de corrección utilizados en las vendimias de 1971-72	71
III.- RESULTADOS	
1.- Experiencias previas	74
1.1. Identificación de levaduras a nivel de géneros . .	74
1.2. Estudios realizados en las vendimias de 1969 y 70.	75
1.2.1. Estudios realizados en la vendimia de 1969.	76
1.2.1.1. Estudios realizados en la vendimia de 1969 con mostos naturales. Ta- blas 1 a 4	77

1.2.1.2. Estudios realizados en la vendimia de 1969 con mostos corregidos. Tablas 5 y 6	81
1.2.2. Estudios realizados en la vendimia de 1970.	82
1.2.2.1. Levaduras y bacterias en mostos naturales. Tablas 7 a 9	83
1.2.2.2. Especies de <u>Saccharomyces</u> en mostos naturales. Tablas 10 a 12.	85
2.- Estudios realizados en la vendimia de 1971	88
2.1. Estudio de la flora microbiana- levaduras y bacterias en mostos naturales y corregidos durante la fermentación e inicio de crianza	89
2.1.1. Levaduras y bacterias en mostos naturales. Tablas 13 a 15	89
2.1.2. Levaduras y bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico y yeso. Tablas 16 a 18.	91
2.1.3. Levaduras y bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y sulfuroso. Tablas 19 a 21.	93
2.1.4. Levaduras y bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y alcohol. Tablas 22 a 24.	95
2.1.5. Levaduras y bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso, sulfuroso y alcohol. Tablas 25 a 27	97

2.2. Estudio de la distribución de las distintas especies del género <u>Saccharomyces</u> en mostos naturales y corregidos durante la fermentación e inicio de crianza. .	99
2.2.1. Especies de Saccharomyces en mostos naturales. Tablas 28 a 30	
2.2.2. Especies de Saccharomyces en mostos corregidos con ácido tartárico y yeso. Tablas 31 a 33	101
2.2.3. Especies de Saccharomyces en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y sulfuroso. Ta blas 34 a 36	103
2.2.4. Especies de Saccharomyces en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y alcohol. Ta blas 37 a 39	105
2.2.5. Especies de Saccharomyces en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso, sulfuroso y alcohol. Tablas 40 a 42	107
2.3. Efecto de los factores de corrección empleados sobre el número de levaduras y bacterias en mostos en distintas fases de fermentación. Tablas 43 a 50	109
3.- Estudios realizados en la vendimia de 1972	114
3.1. Estudio de la flora microbiana -levaduras y bacterias- en mostos naturales y corregidos durante la fermentación e inicio de crianza	115
3.1.1. Levaduras y bacterias en mostos naturales. Ta bla 51	115

3.1.2. Levaduras y bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico y yeso. Tabla 52	116
3.1.3. Levaduras y bacterias en mostos corregidos con sulfuroso. Tabla 53	117
3.1.4. Levaduras y bacterias en mostos corregidos con alcohol. Tabla 54	118
3.1.5. Levaduras y bacterias en mostos corregidos con sulfuroso y alcohol. Tabla 55	119
3.1.6. Levaduras y bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y sulfuroso. Tabla 56	120
3.1.7. Levaduras y bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y alcohol. Tabla 57. .	121
3.1.8. Levaduras y bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso, sulfuroso y alcohol. Tabla 58	122
3.2. Estudio de la distribución de las distintas especies del género <u>Saccharomyces</u> en mostos naturales y corregidos durante la fermentación e inicio de crianza .	123
3.2.1. Especies de <u>Saccharomyces</u> en mostos naturales. Tabla 59.	123
3.2.2. Especies de <u>Saccharomyces</u> en mostos corregidos con ácido tartárico y yeso. Tabla 60 . .	124
3.2.3. Especies de <u>Saccharomyces</u> en mostos corregidos con sulfuroso. Tabla 61.	125
3.2.4. Especies de <u>Saccharomyces</u> en mostos corregidos con alcohol. Tabla 62	126

3.2.5. Especies de <u>Saccharomyces</u> en mostos corregidos con sulfuroso y alcohol. Tabla 63	127
3.2.6. Especies de <u>Saccharomyces</u> en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y sulfuroso. Tabla 64	128
3.2.7. Especies de <u>Saccharomyces</u> en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y alcohol. Tabla 65.	129
3.2.8. Especies de <u>Saccharomyces</u> en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso, sulfuroso y alcohol. Tabla 66	130
3.3. Estudios sobre la posible conversión de las especies de <u>Saccharomyces</u> que intervienen en la fermentación en variedades filmógenas. Tablas 67 y 68.	131
IV.- DISCUSION	134
V.- CONCLUSIONES	166
VI.- BIBLIOGRAFIA	171
ADENDUM N° 1.- Características morfológicas, culturales y bioquímicas de las especies de levaduras aisladas en el transcurso de este trabajo	4
ADENDUM N° 2.- Procedencia, caracteres culturales y bioquímicos de todas las levaduras y bacterias aisladas en el transcurso de este trabajo	43
APENDICE	140

INTRODUCCION

INTRODUCCION

El Estatuto del Vino en España define, en su artículo 1º, a esta bebida de la siguiente manera: "Se dará el nombre de vino únicamente al líquido resultante de la fermentación alcohólica, total o parcial, del zumo de las uvas frescas, sin adición de ninguna sustancia ni práctica de otras manipulaciones que las especificadas como permitidas en otros artículos de esta disposición"; de otra parte, en su artículo 2º apartado C se incluye el vino de Jerez entre los vinos generosos como: "aquellos vinos especiales de mayor graduación alcohólica que los corrientes añejados o elaborados con sus normas peculiares".

A la hora, por tanto, de abordar cualquier problema relacionado con la producción de vinos de Jerez, hay que tener en cuenta forzosamente los dos aspectos que influyen en la misma: uno el proceso biológico de fermentación llevado a cabo por microorganismos que acompañan de forma natural y habitual a las uvas y que trae como consecuencia la transformación de los azúcares en alcohol etílico y otros productos secundarios, y otro las manipulaciones o correcciones a que se somete dicho proceso, en la zona de Jerez, para conseguir el tipo de vino de la Denominación de Origen.

Por consiguiente creemos necesario como justificación del objeto de nuestro trabajo efectuar una introducción sobre los microorganismos que llevan a cabo la fermentación, el proceso bioquímico de las mismas y las manipulaciones y correcciones peculiares de este tipo de vino, de acuerdo con el siguiente esquema:

- 1- Microorganismos que intervienen en los procesos de vinificación.
 - 1.1- Levaduras. Levaduras en mostos y vinos de Jerez.
 - 1.2- Otros microorganismos acompañantes.

- 2- Fermentación alcohólica.
- 3- Vinificación.
- 4- Factores que afectan la elaboración del Jerez.
 - 4.1- Factores que afectan la calidad de la uva.
 - 4.2- Correcciones de los mostos.
- 5- Objeto de nuestro trabajo.

1.- Microorganismos que intervienen en los procesos de vinificación

1.1. Levaduras

Las levaduras constituyen un grupo de microorganismos mal definidos, pero si esto es difícil, taxonómicamente han existido problemas para agrupar a todas las especies que constituyen el grupo de las levaduras, que se encuentran ampliamente repartidas y cuya influencia en la industria y en la medicina es conocida desde muy antiguo.

Son numerosos los trabajos para su diferenciación y clasificación, citemos ya en 1905 a Kayser (42) que consideraba para la diferenciación de las levaduras una serie de características de orden morfológico -formas, dimensiones, gemación, aspecto del sedimento, velos, etc.- o de tipo fisiológico: distinta utilización de los azúcares -glucosa, fructosa, lactosa, etc.- pero que admite la clasificación de Hansen, con una gran familia dividida en dos grupos, englobando la primera a seis géneros.

Unos años más tarde Ventre (89) considera que estos microorganismos se pueden clasificar, junto a los caracteres morfológicos por un método botánico y otro fisiológico, basándose el primero en la forma de reproducirse, tiempo que tarda en formarse, etc., y el fisiológico en la utilización de azúcares, junto a la influencia de los ácidos y bases sobre estas levadu-

ras. No es hasta 1928 cuando aparece la "Clave dicotómica para la clasificación de levaduras" de Guilliermond (34), que apoyándose en los métodos de Hansen y Lindner llega a constituir una serie de características a utilizar para su clasificación, entre ellas destacan, los caracteres microscópicos y dimensiones de las células; temperaturas límites y óptimas para la gemación, forma de velo, germinación de ascosporas, etc. que junto con las ya clásicas de fermentación de azúcares, caracteres microscópicos de las células gigantes, etc. le llevan a formar su clave donde se diferencian más de veinte géneros.

Destaquemos entre otros los trabajos de Wickerham (91,92,93) estudiando más de veinte años los caracteres de las levaduras, para facilitar su clasificación, etc.

Para tratar ampliamente sobre sistemática de levaduras y las actuales tendencias que se siguen para la clasificación de estos microorganismos existen numerosos trabajos, con gran cantidad de referencias que pasamos a exponer, deteniéndose a continuación en aquellos que se han realizado con posterioridad a los referidos por los autores citados y entre ellos, la obra de los holandeses Kreger-van-Rij (43,44,45) y J. Lodder (49) manuales imprescindibles para la clasificación de levaduras. Lodder, en su último libro "The yeasts, a taxonomy study" dedica un apartado a recoger las nuevas tendencias utilizadas para la clasificación de levaduras, realizando un estudio crítico sobre el sistema taxométrico propuesto por Kocková-Kratochvilova y col. sobre el género Candida y el realizado por Poncet en el Pichia y describiendo las tentativas llevadas a cabo por diversos autores para emplear como sistema de clasificación el contenido

en moles por ciento de G + C del DNA de los diversos géneros de levaduras. Con posterioridad a las referencias hechas por Lodder (49) de Nakase y Komagata (58) estos autores estudian el contenido en G + C de 84 razas de Saccharomyces y especies afines, encontrando en el contenido de G + C oscila entre 32,2-45,9 moles por ciento, pudiéndose formar tres grupos: - 32,4-33,7; 38,3-40,7 y 43,7-45,9 que pueden ser relacionados con los cuatro grupos de Van der Walt descritos en "The yeasts" (1970).

También se ha intentado una clasificación de levaduras en base de pruebas serológicas, siendo Campbell quien más ha trabajado en este campo, llegando a constituir grupos de Saccharomyces mediante pruebas de aglutinación; Campbell (10) ha sugerido el empleo de antisueros específicos A,B,C,D,E,F, para una mayor rapidez de la identificación de levaduras, reconociendo, no obstante, que estas pruebas serológicas por si sola no son capaces de diferenciar grupos taxonómicos, si bien son útiles para reducir el tiempo - en el trabajo rutinario de identificación y de aplicabilidad para detectar contaminantes en la elaboración de cervezas.

Con posterioridad Campbell (13) ha clasificado a los Saccharomyces en cuatro grupos serológicos A,B,C y D, si bien hay especies como el Sacch. cerevisiae que están incluidos dentro de dos grupos (A y B). Igualmente ha ensayado una taxonomía numérica (11) sin considerar al género Saccharomyces, con 63 pruebas, en donde no solo intervienen las pruebas serológicas -seis en total-, sino doce caracteres morfológicos y cuarenta y dos fisiológicos, cuatro de floculación y uno de "fining"; el resultado obtenido por computadoras presenta apareamientos entre las razas ensayadas que permiten constituir quince grupos o subgrupos; Campbell (15) ha constituido

cuatro grandes subgrupos dentro del género Saccharomyces que fueron los siguientes: grupo Sacch. cerevisiae (12 especies); grupo Sacch. exiguus (7 especies); grupo Sacch. florentinus (3 especies) y el grupo de Sacch. rouxii; aplicando esta misma técnica de análisis numérico al género Kluyveromyces que presenta tres subgrupos, el K. lactis (12 especies); K. veronae y el K. africanus (5 especies).

Todas las especies Kluyveromyces están estrechamente relacionadas a los Saccharomyces y se propone su agrupación a un único género; pasando a continuación a exponer un esquema para la identificación de las levaduras basadas en sus propiedades de aglutinación y morfológicas que compare y discuta con el esquema obtenido, teniendo en cuenta sus propiedades de fermentación y asimilación. Campbell (15) trabajando en la identificación de Saccharomyces con computadoras sigue manteniendo su preferencia por las pruebas serológicas y morfológicas para una rápida identificación.

A lo largo de los trabajos de Campbell (10,11,12,13,14,15) podemos ver que las pruebas inmunológicas no han sido lo suficientemente específicas para darnos una rápida y fácil clasificación de las levaduras, ni siquiera dentro de grupos reducidos, habiendo tenido que recurrir a pruebas morfológicas para completar su clave de identificación. La aplicación de técnicas electroforéticas para la clasificación de levaduras pertenecientes a distintos géneros, propuesta por Campbell, Gilmour y Rous (14), no producen diferencias apreciables entre ellas para considerarla como una prueba de identificación rutinaria, aunque si puede tener valor como carácter adicional para un análisis numérico.

Richards (67) empleando la técnica de inmunofluorescencia, estudia 15 razas de 7 especies de Saccharomyces, comprobando que aquellas fueron antigenéticamente distintas y admitiendo que las pruebas serológicas no son recomendadas como caracteres taxonómicos seguros, si bien pudieran tener aplicación en determinados procesos industriales para una rápida detección de contaminantes.

Estos hechos han sido comprobados por Sandula, J. (71) que ha estudiado los mananos en Saccharomyces, encontrando que las diferentes reacciones inmunológicas dependen de la longitud de la cadena en que se dividen estos mananos de la pared de las levaduras; por tanto no podemos pensar que constituyan un buen método de prueba clasificatoria, unas pruebas que depende, en su especificidad de como se rompen estos mananos en la pared celular.

Por otra parte Tsuchiya y Fukazawa (88) consideran las pruebas serológicas como instrumento adecuado para el estudio filogénico de especies de levaduras relacionadas, más que como caracter utilizable para la clasificación de levaduras, y en todo caso que se empleen como un criterio más, junto con las otras características de las levaduras.

En el tercer Symposium Internacional sobre levaduras celebrado en Delft, 1969, y recogido en la revista *Antonie van Leeuwenhoek*, vol.35 supl. se exponen numerosos trabajos sobre sistemática de levaduras, concretándose en géneros determinados; destaquemos los trabajos de Slooff y col (85) que estudian los polisacaridos de la pared de ascosporas en el género Ly-pomices; a Carmo-Sousa (16) sobre la constitución química de la pared celular de especies del género Candida; Sikl y col. (84) que estudian las estructuras de los polisacáridos en los géneros Candida, Saccharomyces;

Torulopsis y Lypomyces, concluyendo que la composición estructural de estos polisacáridos no demuestran diferencias apreciables entre especies relacionadas. Scheffers y col. (82) utilizan el efecto Custer (efecto Pasteur negativo) donde la inhibición de la fermentación alcohólica, bajo condiciones anaeróbicas sirve para clasificar las especies dentro del género Brettanomyces; Banno y Hasegana (4) consideran la formación de ácidos como criterio de clasificación.

Vemos que ninguna de las nuevas tendencias empleadas para la clasificación de levaduras, pueden resolver a corto plazo, el resto que tienen planteado los taxónomos; Lodder en su último libro (1970) sigue empleando las pruebas clásicas para la clasificación de levaduras, -caracteres morfológicos, culturales y bioquímicos- si bien bastante ampliadas en cuanto al número de pruebas a realizar. En esta misma línea se encuentran los trabajos de Beech y col. (6) y de Barnett (5) que siguen considerando estas pruebas como básicas para la clasificación de las levaduras y por otra parte aplicables a todos los géneros a estudiar.

Nosotros en el presente trabajo hemos considerado las pruebas morfológicas, culturales y bioquímicas ya descritas por Lodder-van-Rij (43) pero empleando el sistema propuesto por Beech y col. (6) para su rápida identificación, en realidad consiste en considerar las pruebas bioquímicas: -fermentación de azúcares; utilización o no de nitrato como fuente de nitrógeno; y asimilación de azúcares- que son los principales factores que condicionan la clave, ocupando el cuarto lugar los caracteres morfológicos y culturales; por su sencillez y rapidez fué la clave seguida por nosotros para llegar a la especie, posteriormente eran comprobadas las de-

más pruebas de acuerdo con "The yeasts" (1952) de Lodder y col. en el aden
dun final se pueden comprobar todas las pruebas realizadas, además del cre
cimiento en caldo-malta y agar-malta observado a los 2 y 30 días que nos -
completaban las características ya recogidas en esas tablas.

Levaduras en mostos y vinos

Uno de nuestros objetivos, como veremos más tarde, al aislar y clasificar las levaduras que se encuentran en los mostos de Jerez, fué el contribuir a la identificación de las distintas especies allí presentes, así como co
nocer su distribución y proporción en la zona del Jerez. El estudio de la flora microbiana acompañante de los mostos, en los principales países pro
ductores de vinos, ha sido ampliamente recogido por Amerine y Kunkee (1) en su revisión "Microbiology of vinemaking" publicado en el Anual rewiev
of microbiology (1968) excelente estudio con más de trescientas referen-
cias sobre trabajos realizados en distintas zonas vinícolas del mundo so-
bre la flora acompañante del vino; creemos, de todas maneras, que es de -
justicia destacar algunos nombres que se han distinguido por la aportación que han realizado en favor de la microbiología enológica, como Castelli, -
Malan y Martini en Italia; Minarick y Ragala en Checoslovaquia; Peynaud, -
Domercq, Lafourcade en Francia; Iñigo Leal, Santa María, Feduchy, etc. en España.

Con posterioridad a esta recopilación de Amerine y Kunkee, Minarick (57) -
ha publicado un interesante trabajo sobre las especies de levaduras encon-
tradas en distintas regiones de Checoslovaquia y República Democrática Ale-
mana, con condiciones climáticas extremas para el cultivo de la vid, pero

donde sigue encontrando las asociaciones de especies características de otras regiones --K. apiculata; C. pulcherrima; S. cerevisiae--; Sapis-Domercq (80-81) ha vuelto a estudiar en Francia las levaduras en vinificación llegando a resultados muy similares a los obtenidos quince años antes.

En España la investigación microbiológica de los vinos se inició en el año 1936 con el trabajo de Marcilla, Alas y Feduchy (51) estudiando las levaduras que constituyen la "flor" de determinados vinos de Moriles-Montilla, con anterioridad los autores rusos Protoserdow y Afrikian habían aislado una especie de Saccharomyces de unas muestras de vino de Jerez; trabajos posteriores de Feduchy y Sandoval (26) sobre levaduras que constituyen la "flor" en vinos de la zona Centro -Rueda, La Seca- continuaron dirigiendo la microbiología enológica española hacia el estudio de las levaduras que forman la "flor" del vino.

Es hacia esta misma fecha cuando comienzan los trabajos de Castelli e Iñigo Leal en el estudio de la flora microbiana acompañante de los mostos que inician en la zona de la Rioja (38) y Rigone de Pritz (68) en la misma región.

Posteriormente Iñigo Leal extiende este estudio a distintas regiones españolas productoras de vino: (36,39,40) Montilla, Jerez, El Aljarafe, Huelva, Galicia, La Mancha, etc. llegando a estudiar estas levaduras en quince zonas vitivinícolas y aislando y clasificando alrededor de 2.400 levaduras en total, realizados en colaboración con Bravo Abad, Arroyo Varela, Vazquez Martinez, etc. Trabajos que consideramos como aportación básica para las levaduras de las distintas zonas estudiadas y que constituirán

el arranque de la microbiología enológica de las mismas.

En el campo de las levaduras de "flor" junto a los trabajos ya citados destacamos el estudio de los velos de vinos en la zona Moriles-Montilla de Iñigo Leal y col (37) y los trabajos de Santa Maria, con descripción de nuevas especies -S. aceti; S. oxidans; S. hispánica, etc- cuyas características bioquímicas exponen en el artículo de Discusión, así como los numerosos trabajos de los citados autores sobre la fisiología de este tipo de levaduras (72,73,74,75,76,77,78,79).

1.2. Otros microorganismos acompañantes

Los microorganismos que acompañan a las levaduras en los mostos, son muy diversos, entre los hongos hemos encontrado especies de los géneros Mucor y Rhizopus y en determinados casos Botrytis, pero su papel en la fermentación de los mostos es considerada nula, ya que su presencia se circunscribe a los aislamientos realizados en la primera fase, es decir acompañantes de la uva, puesto que aún no se ha iniciado la fermentación, por otra parte su porcentaje medio en la vendimia de 1969 fué inferior al 10%.

Caso distinto es el de las bacterias acompañantes, entre las que destacamos las especies pertenecientes a los géneros Acetobacter y Lactobacillus, y si bien su papel dentro de la fermentación no se manifiesta debido a las correcciones a que se someten, de manera habitual, los mostos, tienen gran importancia ya que en determinadas circunstancias pueden proliferar y originar graves defectos de los vinos. Las bacterias acéticas interfieren en los procesos de elaboración de los vinos produciendo ácido acético a partir de etanol en presencia de oxígeno, originando la conocida fermentación

acética; estas bacterias van de manera habitual en los mostos y pueden - aislarse directamente de aquí.

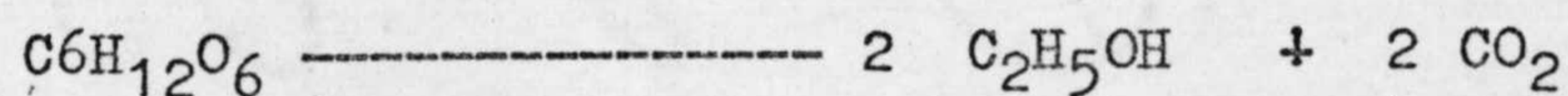
Dentro de los Lactobacillus, existen especies cuya presencia no solo no es perjudicial, sino que diríamos deseable, y existen publicados numerosos trabajos en los que se ha intentado reforzar la fermentación maloláctica mediante siembra con estirpes tapificadas. Sin embargo existen otras especies de Lactobacillus, -L. brevis- que en determinadas circunstancias es capaz de producir butanol-2, compuesto nada deseable en los vinos; así tenemos el "ahilado" producido por especies heterofermentadoras de Lactobacillus; la "vuelta" o "tourné" de los franceses ataque del ácido tartárico por bacterias de este género; picado láctico, fermentación manítica, etc. enfermedades producidas por especies bacterianas que en general, van acompañando a los mostos desde su elaboración en la vendimia.

2.- Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica consiste en la transformación de los azúcares del mosto de uva en etanol y anhídrido carbónico, como componentes fundamentales, a más de glicerol, acetaldehído, butanodiol-2,3; ácido acético, láctico succínico, etc, como productos secundarios, siendo un proceso característico de las levaduras, aunque no exclusivos de ellas.

El mecanismo de transformación de la glucosa en los productos básicos de la fermentación alcohólica se encuentran recogidos en los tratados de bioquímicas, y vamos a resumirlo brevemente siguiendo a Wilkinson y Rose(94).

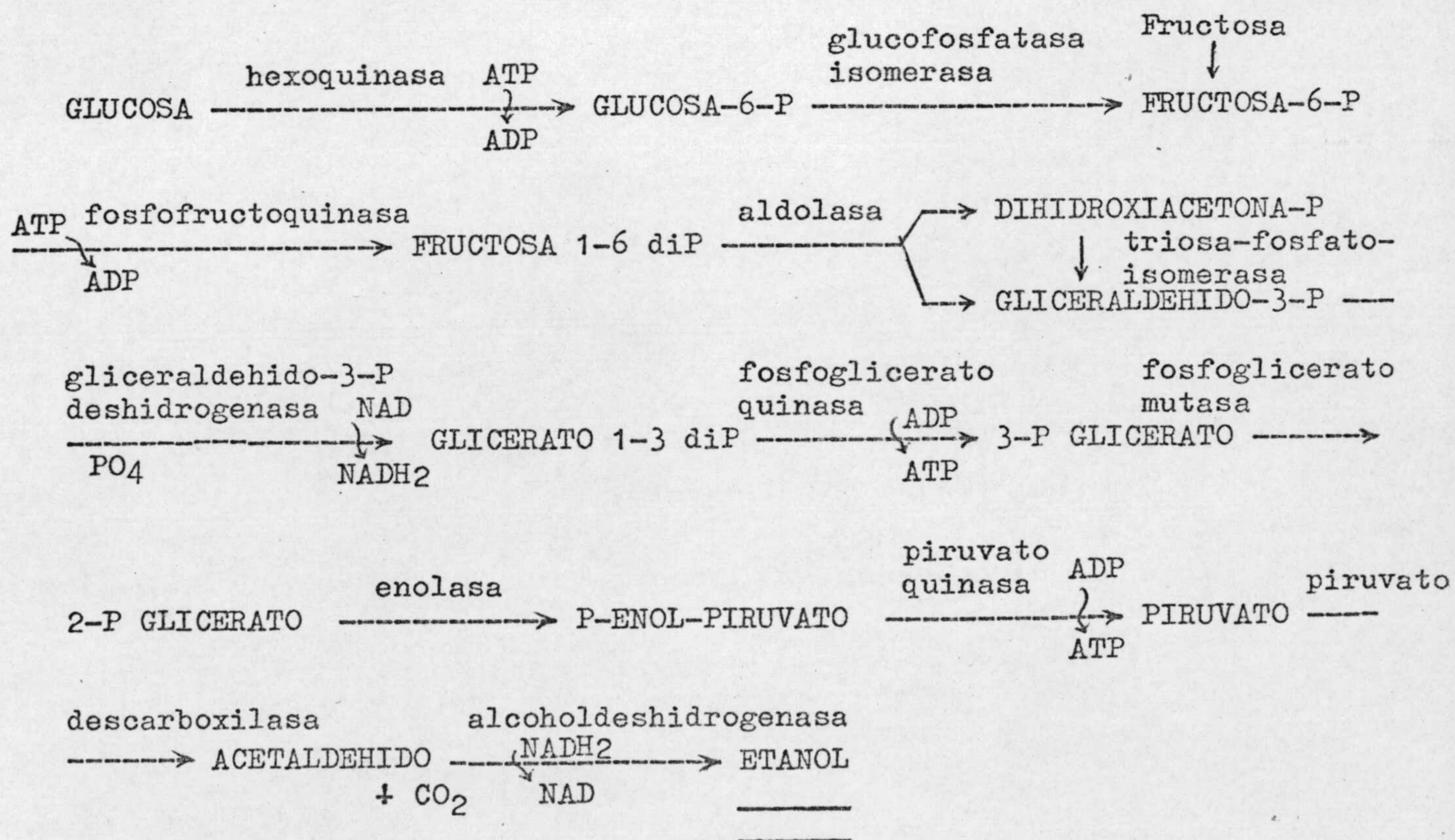
El esquema global del proceso establecido por Gay-Lussac en 1815 con la siguiente ecuación:



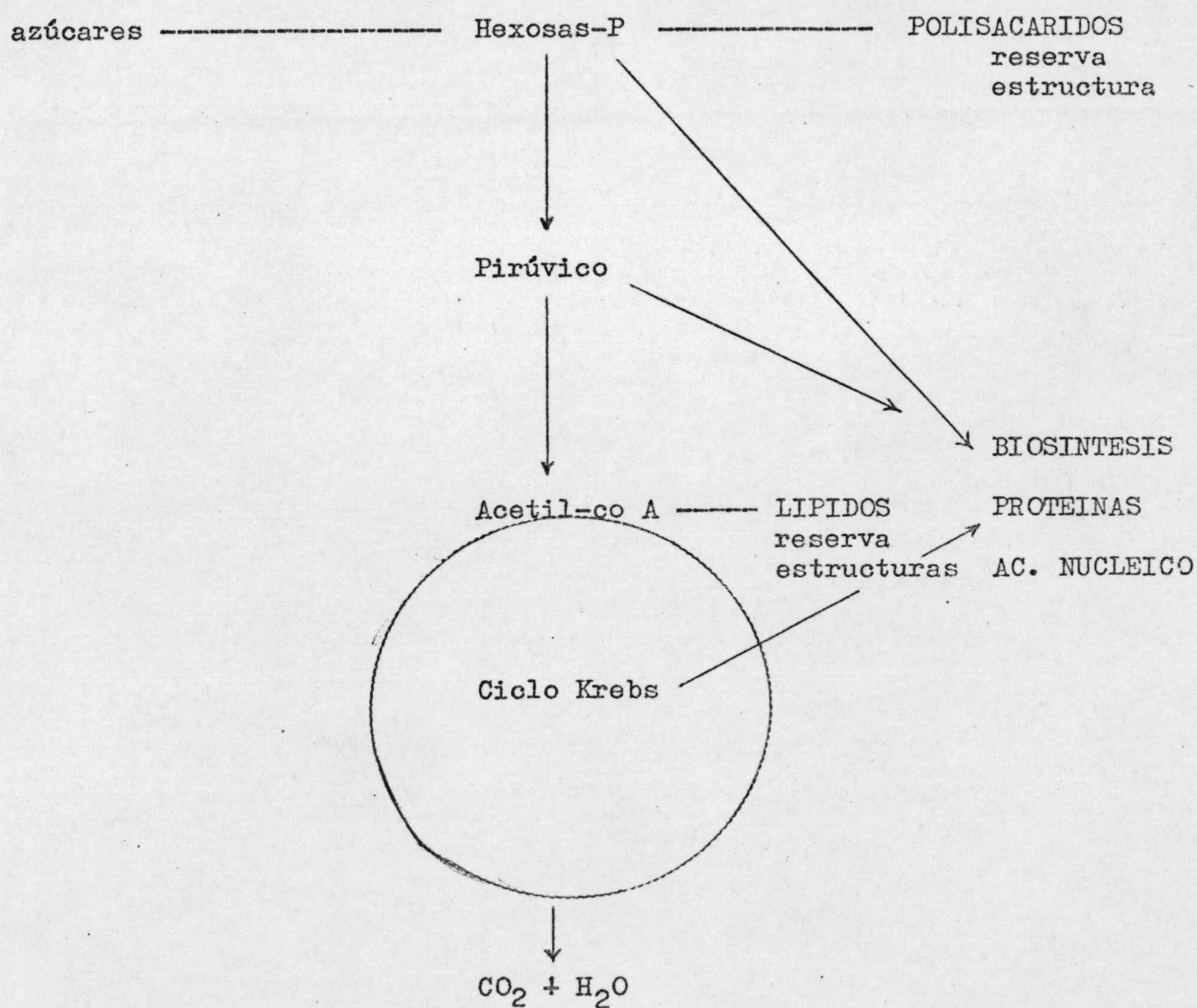
es fundamentalmente correcto, si bien se ha observado la formación de - otros componentes, denominados productos secundarios, encontrados en menor proporción, y estudiados por Lafon (47), Ribereau-Gayon (65), etc. - productos que según viene siendo admitido proceden del etanol y acetaldehído por distintas reacciones de dismutación, reducción, etc.

En forma resumida podemos exponerlo como sigue:

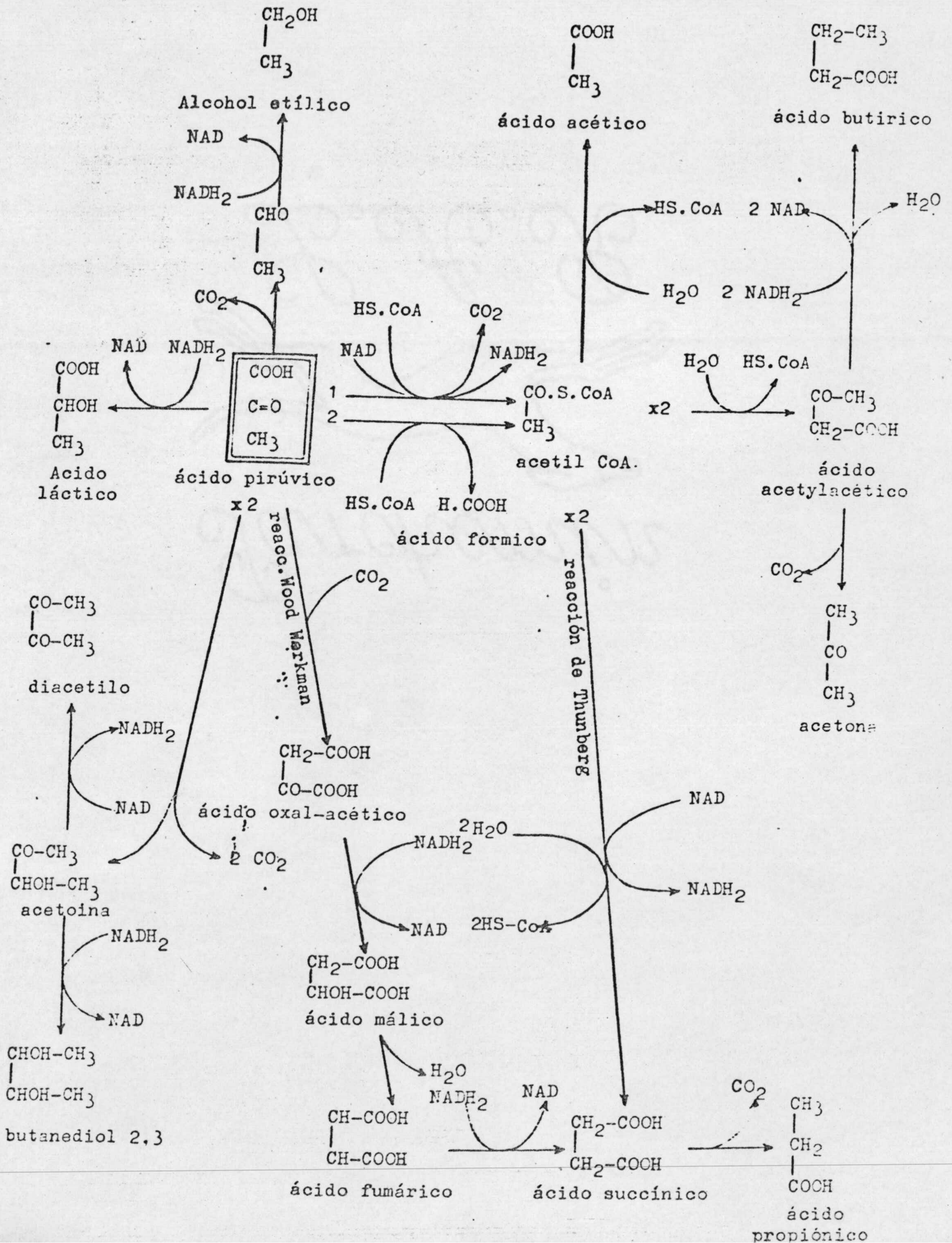
Esquema del metabolismo de azúcares por las levaduras.



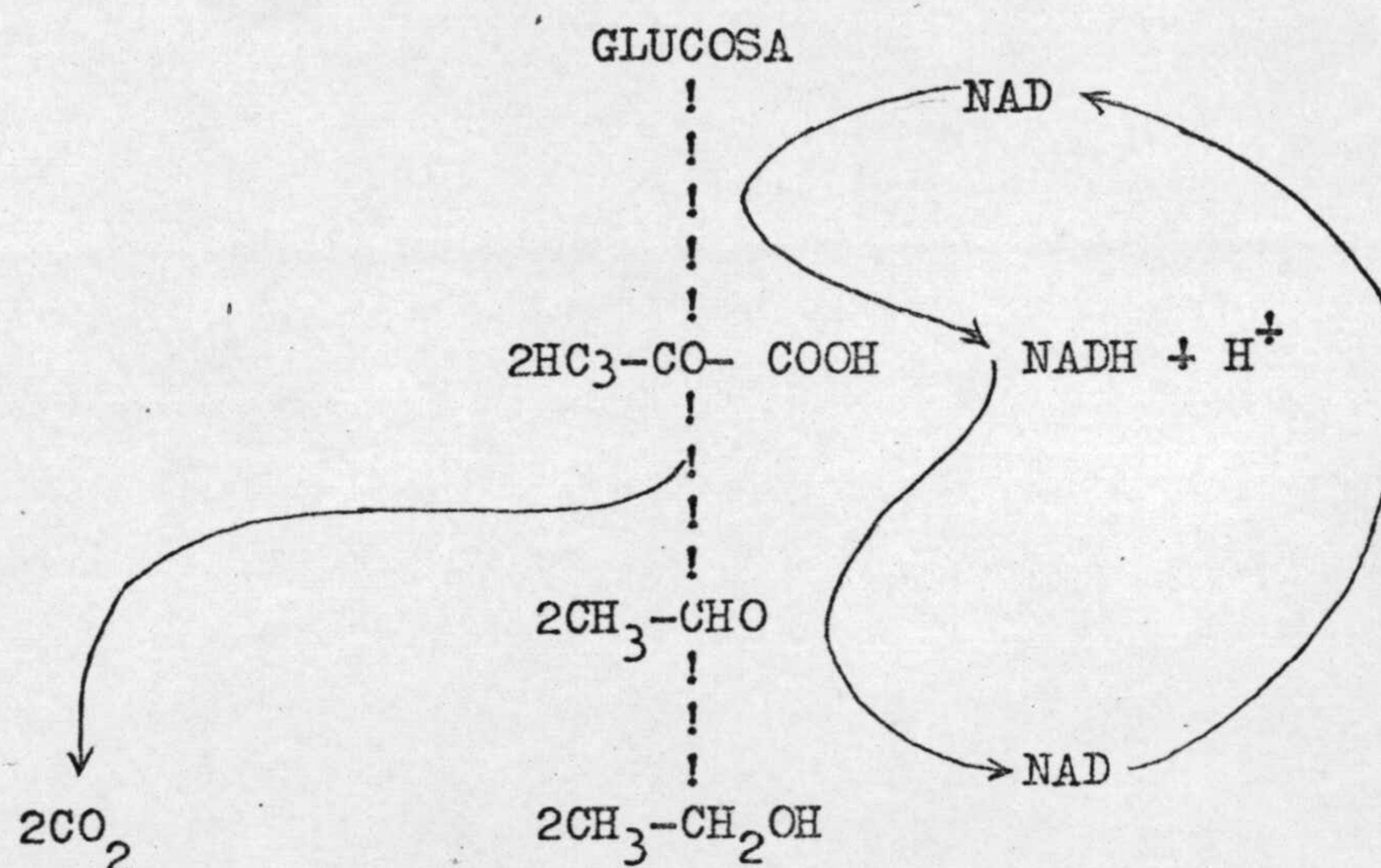
Al mismo tiempo las levaduras utilizan estos componentes para la elaboración de su materia constitutiva, en esquema resumido de Sols, podemos expresarlo como sigue:



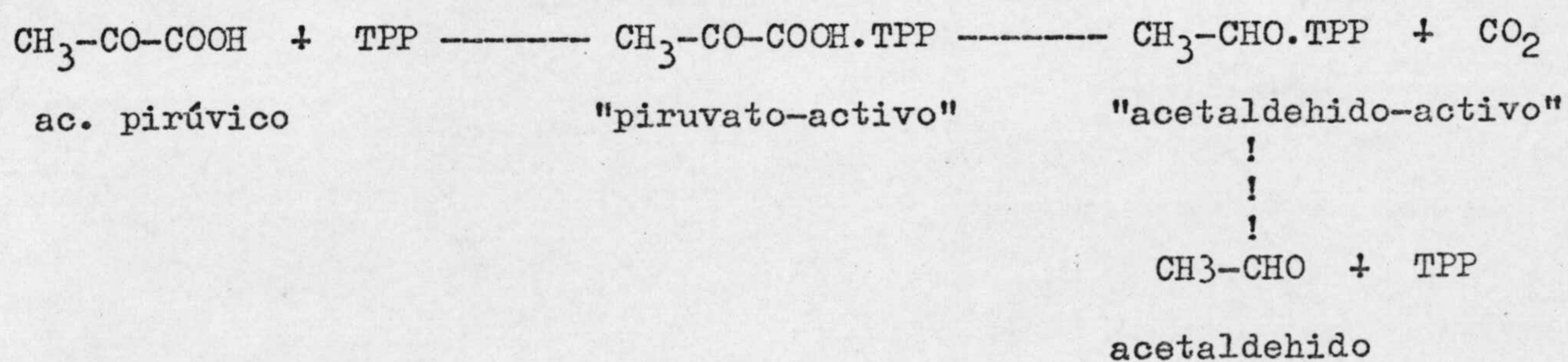
Evolución del ácido pirúvico



Desde el punto de vista de la fermentación alcohólica interesa detenernos a estudiar a partir del piruvato y las posteriores transformaciones a realizar por las levaduras, de manera esquemática podemos resumir la fermentación alcohólica del siguiente modo:



en realidad la piruvato descarboxilasa que cataliza el paso de pirúvico a acetaldehído lo hace a través de pasos intermedios:



El paso de acetaldehído a alcohol etílico, está catalizado por la alcohol-deshidrogenasa, enzima estudiado por Schipfessel (83), que ha demostrado -

en la especie *Sacch. cerevisiae* la presencia de dos isoenzimas, denominados ADH-I y ADH-II; la primera constitutiva de la levadura, y se denomina "fermentativa", es la que teniendo como sustrato el acetaldehído lo transforma en alcohol etílico, y también se conoce que está inducida por la glucosa; por el contrario la ADH-II u oxidativa es inhibida por la glucosa y actúa transformando el etanol, cuando este se encuentra como única fuente de carbono, en acetaldehído, -posteriormente este pasa a acetato-- a acetyl-Co-A y entra en el ciclo tricarboxílico-), este enzima de gran importancia para la posterior transformación de los vinos de Jerez, una vez que se desarrolla la típica "flor" ha sido encontrado en cepas de *S. cheresiensis* por Fernández y col. (27) que también han descrito la presencia de los dos alcoholdehidrogenasas; la aportación de estos autores a las levaduras de flor, ha sido considerar a ambas ADH como inducibles por glucosa y etanol respectivamente y no considerarlas constitutivas y represivas por la glucosa como defiende Schipfessel. Por otra parte Wendy Fowler y col. (90), también han comprobado la presencia de estas dos isoenzimas ADH I y ADH II, en *S. cerevisiae*, si bien han separado por electroforesis una tercera banda de ADH que denominan mito-ADH.

2.1. Factores que afectan a la fermentación alcohólica de los mostos.

Vamos a considerar una serie de factores intrínsecos de la fermentación que pueden afectarle; ya que la influencia de la uva, de la vinificación, etc. se estudiarán en el apartado correspondiente, refiriéndonos aquí solamente a los que de manera directa intervienen en la fermentación alcohólica.

Kunkee y Amerine (46) en vol. 3 de *The Yeasts*, han descrito unos factores

que afectan al proceso y que son aplicables también a Jerez.

1-Etanol. El etanol es el producto final de la fermentación alcohólica, - junto con el anhídrido carbónico, obtenido en mayor proporción, su producción es función del contenido azucarado de las uvas si como de la capacidad de transformación de las levaduras que le acompañan; se suele obtener por cada 17g de azúcar un grado de alcohol, pudiendo conseguirse hasta - 14-15% del alcohol con cepas de levaduras que se consideran buenas fermentadoras; decíamos al principio que esta transformación viene condicionada por las levaduras que intervienen, ya que algunas especies no son capaces de producir grandes cantidades de alcohol, caso de Hansenula, produciendo en su metabolismo sustancias indeseables para la calidad del vino, mientras que otras especies de levaduras, Kloeckera apiculata, Candida pulcherrima, son inhibidas por el propio etanol, efecto inhibitor que incluso - puede afectar a especies propias de Saccharomyces. En la fermentación alcohólica de los mostos el etanol desempeña un importante papel, pues actúa como seleccionador de las propias levaduras que intervienen en la fermentación.

2-Azúcar. La naturaleza y concentración del azúcar de la uva influye grandemente en la fermentación alcohólica, ya que es el sustrato a transformar por las levaduras; de su concentración depende el grado alcohólico a obtener; y de su naturaleza, ya que el azúcar natural de la uva es la sacarosa, formada a partes iguales de glucosa y fructosa, la presencia de levaduras glucofílicas, que fermentan más rápidamente la glucosa que la fructosa; si por el contrario las levaduras son del tipo del Sacch. elegans, -especie fructofílica- utilizarán más rápidamente la fructosa; este hecho

puede tener gran importancia cuando se pretende obtener vinos dulces, a partir de ciertos mostos, siendo aconsejable trabajar con levaduras glucófilas, que utilizarían más rápidamente la glucosa, dejando parte de la fructosa que tiene un sabor más agradable.

3-Anhídrido carbónico. Es el otro producto formado en gran cantidad en la fermentación alcohólica y su efecto sobre el crecimiento de las levaduras es inapreciable a la presión atmosférica normal, las levaduras pueden actuar en aero o anaerobiosis, sin embargo cuando se encuentra este carbónico a grandes presiones realiza un efecto negativo sobre las levaduras. La importancia del carbónico en los mostos estriba fundamentalmente por el nivel de microaerofilia que puede ocasionar, lo que permitiría el desarrollo de bacterias no convenientes para nuestros vinos, caso de Lactobacillus, Pediococcus, etc.

4-Oxígeno. La aireación de los mostos tiene gran importancia en el desarrollo de las levaduras, y ha sido muy estudiado en el último libro de Ribereau-Gayon y col. (66), ya que junto con la influencia que tiene en el incremento del número de células de levaduras, también puede favorecer el desarrollo de bacterias tipo Acetobacter, que actuando sobre el etanol producir ácido acético con el consiguiente perjuicio sobre los vinos. Su control es importante por este doble efecto que puede producir en el desarrollo de la flora microbiana acompañante de los mostos.

5- pH. La alta acidez del mosto es una característica importante puesto que además de inhibir el crecimiento de gran número de microorganismos que acompañan a los mostos favorece el de las levaduras; estos ácidos son componentes importantes del "bouquet" de los vinos, sobre todo los ácidos

málico y tartárico y siendo la presencia de láctico, succínico, acético, etc. productos secundarios de las transformaciones que sufre el mosto. - El valor del pH varía entre 3 a 4, siendo importante este valor no solo para el control de los microorganismos que intervienen en la fermentación sino para el equilibrio de la misma.

6- Temperatura. La influencia de la temperatura en la fermentación alcohólica se centra en el efecto directo que produce sobre el desarrollo de los microorganismos; si el pH era factor controlador de las bacterias la temperatura ejerce fundamentalmente un efecto directo sobre las levaduras, existiendo unos límites dentro de los cuales debe desarrollarse la fermentación. Por otra parte la influencia de la temperatura también se pone de manifiesto sobre los componentes producidos durante la fermentación, etanol, acidez volátil, etc. que nos obliga a controlar estas temperaturas durante el proceso. Los trabajos de Ribereau-Gayon, Domerq, etc. ponen de manifiesto la gran importancia que tiene este factor. Como posteriormente veremos en la industria del vino se procura controlar no solo durante la fermentación sino durante todo el proceso de crianza.

7- Otros factores. Existen otros factores que afectan directamente al desarrollo de las levaduras, y por ende a la fermentación alcohólica, si bien su actuación es concreta en su desarrollo, nos estamos refiriendo a factores de crecimiento, presencia de metales, y componentes nitrogenados fundamentalmente, que se encuentran en los mostos procedentes de las uvas en mayor o menor proporción pero que tienen gran importancia en la fermentación, estos han sido tratados por Kunkee y Amerine (46), Bidan (9), Dupuy (24), Ribereau-Gayon (64), Crowell y col. (20), Ayrapaa (2), Souma-

leinen (87) con una marcada influencia en la producción de componentes secundarios tipo alcohol superiores.

3.- Vinificación

3.1. Obtención de los mostos

Es el conjunto de operaciones -corte de uva, soleo, transporte, prensado, fermentación necesaria, etc. para la obtención del vino a partir de la uva. No vamos a extendernos en estos pasos porque están ampliamente tratados en numerosos libros por diversos autores: Benvegnin y col. (8), Negret y col. (59), Noguera Puyol (60) y en numerosos artículos y revistas; de todas formas vamos a tratar de dar una idea de conjunto de este importante proceso, fundamental para la obtención de un buen vino.

Estas operaciones que vamos a describir varían de unas zonas a otras, y dentro de las mismas por la tecnología propia de cada Empresa, también y es natural, por todos aquellos factores que afectan a la elaboración del Jerez y que se describen en apartado posterior.

La vinificación empieza con la corta de la uva, que no se hace en fecha fija, se comienza cuando su madurez así lo aconseja, procurando no atrasarla demasiado, por los peligros de lluvias y desarrollos de hongos que pudiera haber; en general se realiza en el mes de Septiembre, comenzando en la segunda semana para terminar en los primeros días de Octubre, las uvas cortadas, siempre a mano, (aún en esta zona no han tenido éxito las máquinas sacudidoras de cepas para obtener la uva sin necesidad de mano de obra) se van depositando sobre cajas de plástico de unos 12-14 kilos de capacidad, que una vez llenos son recogidos por los remolques que lo

llevan a la casa central de la viña, estos cajones son superponibles, - con lo que la uva no sufre presiones prematuras, la uva transportada a granel, en camiones, o volquetes suele romperse iniciándose un proceso de estrujado durante el transporte con la consiguiente pérdida de mosto de buena calidad; una vez en la viña se somete al segundo paso que es - el soleo, práctica muy antigua y clásica en toda la zona de Jerez, consiste en someter a la uva, ya cortada, a la exposición del sol, durante 24h. sobre unos rodales de esparto, con capacidad para unos 12 kilos; - esta práctica, que se está perdiendo en los últimos tiempos, tiene según Fdez. de Bobadilla (28) grandes ventajas destacándose un incremento de la concentración de azúcar y del ácido tartárico, así como una disminución del ácido málico, estas tres transformaciones que tienen lugar en tan corto espacio de tiempo son importantes para la calidad de los vinos de Jerez.

Este soleo, requiere mayor mano de obra y pérdida de peso de la uva en detrimento del viticultor, ya que hasta ahora ellos venden cantidad y - no calidad.

El transporte de la uva al lagar se realiza en las mismas cajas de plástico de 12-14 kgrs. superpuestas; una vez recibidas son descargadas sobre cintas sinfin transportadoras que las llevan directamente a las máquinas estrujadoras; a veces este camino se recorre colocando las mismas cajas sobre cintas con un mecanismo adecuado que vuelcan la caja encima de las máquinas estrujadoras siguiendo su recorrido, una vez vaciadas, hasta la zona de lavado y almacenado de cajas.

Todo el proceso que a continuación describimos tiene por objeto obtener

el mosto o zumo de uva en las mejores condiciones para producir un vino de calidad.

Una vez la uva en la estrujadora, se realiza el "despalillado" o "desraspado" de la uva que consiste en quitarle los raspones dejando solo el grano de uva. El sistema más empleado es la utilización de unas estrujadoras centrífugas horizontales o verticales con desraspado a voluntad, ejerciendo su efecto porque aplastan contra las paredes de un cilindro mediante la fuerza de rotación, interponiendo una criba también cilíndrica para impedir el paso de raspones, que son expulsados por otro conducto. La finalidad de esta máquina es que todos los granos queden abiertos, y despojar a las uvas de los raspones que pueden darle sabores ásperos, no deseables en vinos blancos; la pasta, que así se denomina, obtenida en estas máquinas pasa por medio de bombas, junto con el zumo ya extraído directamente a las prensas. En estas máquinas se inicia un proceso largo para la obtención del mosto, los tipos y clases de máquinas son muy numerosos --de presiones continuas, horizontales, verticales, de tornillos, discontinuas, neumáticas, etc.

La experiencia propia ha llevado a elegir las máquinas de tipo horizontal neumáticas, cuyas presiones se ejercen por medio de un pulmón de caucho que recibe aire comprimido en su interior, hinchando el pulmón y comprimiendo la pasta contra la superficie de la máquina, facilitando así la salida del mosto.

No se puede hablar, de los programas que deben llevar estas máquinas, -- en cuanto a carga, tipos de presiones, porque depende de la calidad de la uva y posterior uso del mosto, sin embargo para tener una ligera no-

ción de como funcionan, vamos a describir brevemente un ciclo de trabajo de estas máquinas. Una vez salida de la estrujadora la pasta con el zumo y llevada por las bombas adecuadas a la prensadora, se cargan unos 3.800 kilos, sometiéndola durante unos diez a quince minutos a simple volteo, es decir, hacerla girar sobre si misma, con lo que se consigue un verdadero escurrido, tan importante en la obtención de estos vinos, ya que el mosto, es el de mejor calidad, llamados por algunos autores mosto-flor, a continuación se da un minuto de volteo y presión ascendente que puede ser de 0,4-atm y un minuto de descanso, a continuación se le quita la presión, se voltea un minuto se le vuelve a dar otra presión más alta, así varias veces - presiones de 0,6 y 0,8 atm.--todo lo que hemos obtenido hasta aquí es lo que llamamos mosto de yema, a continuación se dan presiones mayores con lo que se consiguen otros mostos de menor calidad, que no suele emplearse para vinos finos -son empleados en los olorosos- así si el rendimiento de yema fué de un 80-85%, este segundo será de un 5-10%, por último se pueden dar fuertes presiones o pasarlo a otras máquinas de peor rendimiento, donde se presan al máximo obteniéndose unos mostos que se suelen emplear para destilar.

El ciclo completo desde que llega la uva al lagar hasta que estas máquinas prensadoras han producido el mosto suele ser de unas dos horas, a continuación se pasa por unos tamices para evitar las partículas groseras, y de aquí directamente a los depósitos, que sirven para realizar la adición de los correctores de la vendimia, -que variará de un año a otro- en función de la propia vendimia y para su posterior distribución

a botas o a grandes toneles.

3.2. Adición de correctores

Una vez los mostos recibidos en los depósitos llamados de recepción del mosto, se procede a la adición de correctores, práctica permitida por la legislación y necesaria para los mostos de Jerez; la corrección se realiza, como hemos repetido varias veces, de acuerdo con las características propias de cada mosto, añadiéndole yeso y ácido tartárico en las cantidades adecuadas para cada vendimia, adición que se suele hacer directamente sobre los depósitos --hay bodegueros que prefieren añadir el yeso directamente sobre la uva--

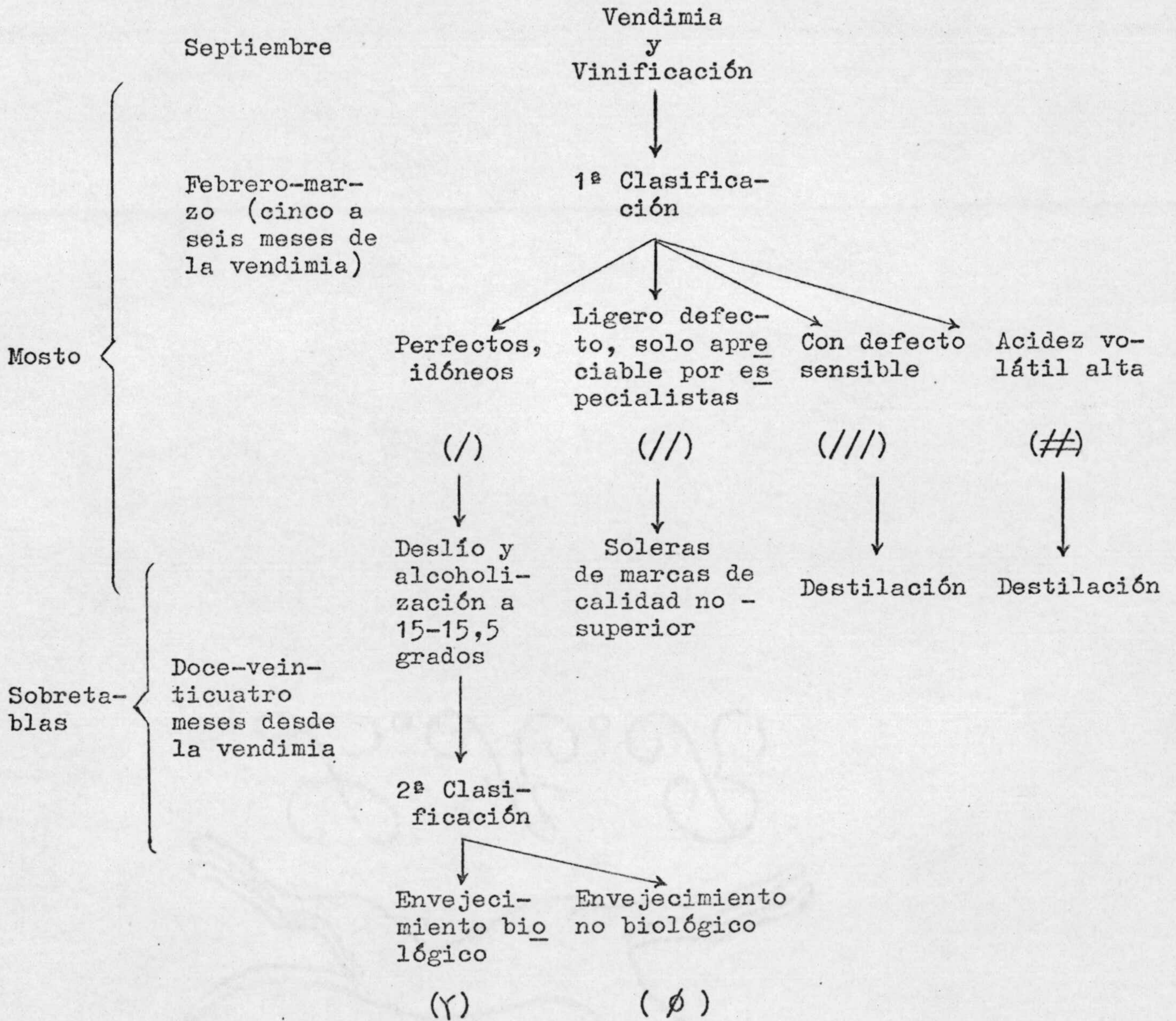
Después de agitar, para favorecer su disolución, se reparte a los depósitos donde van a realizar la fermentación, en este momento y por medio de un dosificador se le inyecta el sulfuroso, al estado de metabisulfito, en la concentración que necesiten esos mostos y teniendo en cuenta el destino que posteriormente llevarán; los mostos en estas condiciones pasarán a "botas" o a grandes depósitos, por último se suele emplear la alcoholización, que consiste en la adición de alcohol, paso que se suele dar una vez terminada la fermentación.

Tradicionalmente la fermentación de los mostos se ha venido realizando en botas de roble americano de unos 500 l. de capacidad, llenados en principio solo a las $2/3$ partes de su volumen y una vez terminada la fermentación se completa a 450 l. aproximadamente, evitándose de esta forma incrementos de temperaturas que afectarían a la fermentación y el que haya "reboces" de las botas; el incremento en la producción del Je-

rez, junto a las subidas del precio de las botas y de la mano de obra, muy grande en estas operaciones, unido a una búsqueda continua hacia técnicas más perfeccionadas, nos ha llevado a la utilización, inicialmente en plan experimental, y posteriormente industrial para realizar estas fermentaciones en grandes toneles de acero inoxidable, de 50.000 l. de capacidad, con circuitos de refrigeración, donde podemos controlar perfectamente la temperatura a que se está desarrollando la fermentación, y consiguiendo que sean más rápidos y mejor controlados que en botas.

3.3. Elaboración y crianza del vino

A continuación exponemos el esquema de elaboración de los vinos de Jerez, del Dr. Casas (17, 18).



Observando el esquema anterior, vemos que una vez realizada la vinificación los mostos fermentados se clasifican hacia Febrero-Marzo por el catador, que observa su color, transparencia y olor, y en ocasiones dudosas se prueba a la boca, esta clasificación se realiza con gran escrupulosidad, y es de gran tradición en las bodegas, de esta primera clasificación se obtienen los vinos perfectos, que se marcan sobre las botas que fermentaron o sobre los toneles de gran capacidad con una raya (/); existen otros vinos que tienen ligeros defectos, solo apreciables por especialistas, que a veces pueden corregirse, se suelen marcar con dos rayas (//), a continuación existen otros vinos con defectos apreciables que van para destilación y posterior obtención de Brandy.- Los clasificados como perfectos -una raya- se utilizarán para la crianza del vino fino, -envejecimiento biológico- para lo cual se hace el deslío y se alcoholizan a 15-15,5º se dejan en botas durante 12-24 meses, a este vino se le denomina "sobretablas" y será el que entra en la solera de crianza del vino. A las botas en sobretablas se les realiza una segunda clasificación dejando aquellos que se consideran perfectos para la crianza biológica (vino fino) y otros con leves defectos para el envejecimiento no biológico, (olorosos, dulces).

En los vinos de Jerez existen dos tipos fundamentales de envejecimiento, los definidos más arriba, que vamos a describirlos brevemente.

La crianza biológica que se inicia después de la fermentación, se continúa en los "sobretablas" y sigue en las criaderas o soleras se debe a las levaduras que se desarrollan en fase aeróbica sobre la superficie del vino en contacto con el aire, utilizando el etanol como fuente de

carbono, y produciendo acetaldehído como componente clave en la vía metabólica de estas levaduras, de aquí se sintetizan los componentes fundamentales de las propias levaduras; la presencia de otros productos clásicos en estos vinos finos y manzanillas hacen pensar en la gran variedad de reacciones de este acetaldehído.

El envejecimiento biológico suele durar unos 4-5 años, en este tiempo hay una importante, si bien lenta, evolución de muchos de sus componentes, desapareciendo algunos, -glicerina, málico, etc. y apareciendo otros nuevos, pero al mismo tiempo que estos, intervienen los factores físico-químicos ya sean directamente sobre el vino como por la influencia que representan sobre las propias levaduras; como se ha venido observando desde tiempo inmemorial la influencia de estos factores de clima, temperatura, clase de madera, etc. sobre los vinos en el caso de la manzanilla de Sanlúcar.

El envejecimiento no biológico, se basa en que a partir de la segunda clasificación, se alcoholiza a 18-19º, con esta graduación no se puede desarrollar el velo, produciéndose por una parte la autólisis de las levaduras que hasta entonces estuvieron en la "flor", y produciéndose una serie de oxidaciones en el vino que le dan un color de oro oscuro, esta mezcla hidroalcohólica realizará una extracción de la madera de la bota; sus características organolépticas son distintas a los finos, no son punzantes y si tiene un carácter vinoso, suele ser seco, intenso y limpio, la vejez media de estos olorosos es de ocho a diez años; y son los que hicieron famosos a Jerez en todo el mundo y todavía hoy constituyen el grueso de la exportación.

3.4. Sistema de soleras

Después de transcurridos unos 12 a 24 meses, es decir, el periodo que comprenden los "sobretablas", se hace una segunda clasificación para pasar los vinos a los distintos tipos de crianzas.

En Jerez se emplea el sistema de soleras para la crianza del vino, - consiste en colocar las botas superpuestas en tres o cuatro filas horizontales, cada fila se denomina escala, y puede tener una longitud variable; los nombres que reciben estas escalas son: solera 1ª que está en el suelo, solera segunda colocada sobre la primera; solera tercera la que se encuentra sobre la segunda, etc.; a veces en algunas bodegas se denomina solera únicamente a la que descansa sobre el suelo, - siendo todas las demás escalas criaderas, primera, segunda, tercera, etc. ya que en realidad aquí están todavía "criando" al vino. Sin embargo - lo importante del sistema de soleras no es su disposición sino su funcionamiento; el vino que se encuentra en la solera está en disposición de sacarse cierta cantidad, nunca debe ser al año, superior, a la mitad de la capacidad de la bota; cuando le corresponde se realiza la saca - de esta solera que se repondrá con vino procedente de las botas que se encuentran sobre ellas, serán solera segunda o criadera primera según la nomenclatura de cada bodega, pero en lugar de añadir directamente - el vino de esta bota sobre su correspondiente de abajo, se hace la "saca", que así se denomina en bodega, se homogenizan el contenido de todas esas botas y se reparte proporcionalmente en las primeras, con lo que se obtiene una igualdad en las características de estos vinos finos, para que su caracter a la hora de salir al mercado sean lo más parecido y den una imagen constante de esa marca. Las segundas se reponen

con las terceras y estas con las cuartas; estas últimas reciben ahora el sobretabla correspondiente que había sido clasificado y considerado idóneo para su envejecimiento biológico.

4.- Factores que afectan a la elaboración del Jerez

La producción del vino es una transformación bioquímica de los mostos por las levaduras, por tanto los factores que influyen en la elaboración de nuestros vinos, serán aquellos que afectan directa o indirectamente a la materia prima, imprescindible para la obtención del vino, así como a las levaduras que realizan este proceso de transformación.

El Jerez, viene condicionado, a grandes rasgos, por tres factores: uva, fermentación y crianza; vamos a describir brevemente los factores que afectan a la uva y que de una u otra manera afectan a la calidad del Jerez, así como aquellas manipulaciones o correcciones a que se someten los mostos procedentes de esta uva. Las condiciones que pueden afectar a la fermentación y crianza ya se han descrito en un apartado anterior.

4.1. Factores que afectan la calidad de la uva

La uva es, por una parte, la materia prima transformable, y por otra el vehículo que transporta a los microorganismos que intervienen o pueden intervenir en la fermentación; nos interesa conocer todos los factores que influyen sobre la uva, tanto como materia transformable en mosto como por su efecto sobre la microflora natural acompañante, y de acuerdo con Tarantola y recogidos por Ribereau-Gayon y col. (66)

los factores que afectan a la uva se pueden clasificar en tres grupos:

4.1.1. Factores Permanentes

- Naturaleza del suelo
- Clima
- Tipos de cepas

4.1.2. Factores Modificables

- Fertilización
- Tratamiento
- Labores
- Poda, etc.

4.1.3. Factores Accidentales

- Enfermedades

4.1.1. Factores Permanentes

-Naturaleza del suelo.- De los diversos factores intrínsecos que consideramos dentro de los permanentes, que contribuyen a la calidad del vino de Jerez, hemos de destacar el tipo de suelo donde se encuentra plantada la viña; Jerez posee un suelo agrícola particularísimo y famoso la "albariza" situada al noroeste de la provincia de Cádiz, y concretamente en los términos municipales de Jerez de la Frontera, El Puerto de Santa María, Sanlúcar de Barrameda, Chipiona, Rota y Trebujena, dedicando unas 15.500 Has. al cultivo de la vid. Garcia del Barrio (31), que ha dedicado su labor investigadora al estudio de la albariza, la define como "marga blanda y orgánica formada por la sedimentación en aguas dulces, profundas y tranquilas y muy cargadas de cal del mar oligocénico, con grandes cantidades de caparazones silíceos de algas diatomeas, espículas de radiolarios y arenas finísimas";

Este suelo no se puede considerar como natural, formado como consecuencia del clima y de los factores naturales, sino que ha sido creado artificialmente por el hombre mediante desfonde, a brazos o a máquinas, hasta una profundidad de unos 80cms., podemos decir que en Jerez el viticultor empieza por fabricarse artificialmente su propio suelo, si bien solo prepara la mitad del que la cepa va a emplear, ya que las raíces en cepas adultas sobrepasan con mucho esa profundidad de 80cms. Seguimos transcribiendo las consideraciones hechas por Garcia del Barrio "la albariza como roca y el suelo sobre ella formado tiene la extraordinaria cualidad de poder suministrar la humedad en forma continua y constante durante todo el año; la viña a pesar de tratarse de un clima cálido y con cuatro meses de estación seca; esta capacidad de suministro de humedad durante todo el ciclo vegetativo de la cepa, es la que explica el alto rendimiento del viñedo de la región, si se le compara con las regiones de clima seco y cálido de la península, a la que casi duplica el rendimiento por cepa. Sin embargo el suelo de la viña de Jerez no tiene nunca exceso de agua debido a las especiales condiciones del mismo y a la roca base que elimina los excesos absorbiéndolos en su gran espesor y, sobre todo, por la topografía típica del terreno; por otra parte los terrenos de albarizas no se agrietan en verano con los fuertes calores y la sequía, o al menos no se agrietan tanto como otros suelos de la región, por lo que no se pierde la humedad del suelo; en cuanto a la constitución de este suelo podemos decir que la albariza tiene un elevado contenido calizo, al que se debe, en buena parte, la calidad de los mostos, pudiendo darse como ci-

fra representativa de carbonato cálcico en superficie la del 30 al 40%, que pasa al 50% a los 70cms. y que puede llegar en esa profundidad - hasta un 60%. Del suelo de albariza se dice tiene muy buenas condiciones físicas pero muy malas condiciones químicas, queriendo decir Garcia del Barrio con esto que lo que tiene muy bueno el viñedo jerezano es el suelo como soporte y habitat de la planta, pero muy malo como fuente de alimento de la cepa. De la simplicidad de su composición se deduce que el contenido en principios fertilizantes del suelo es muy reducido ya que practicamente lo único que el suelo hereda de la roca es cal y silice. El contenido en fosfórico es insignificante y el de potasa ligeramente superior; los oligoelementos tienen aún menos razón geológica de existir. A la vista de un análisis químico no se explica como la vid puede habitar este suelo y dar cosechas que durante cientos de años se basaban única y exclusivamente en el uso del estiércol, puesto que los abonos químicos en el viñedo no se han empezado a usar hasta hace unos diez-doce años; sin embargo en el suelo de albariza, cuando se está labrando con labores superficiales y bien esponjado, hay una intensa nitrificación natural a favor de la temperatura y sobre todo cuando coincide con la humedad ambiental existente, producida como veremos a continuación por el clima marítimo que posee la zona, siendo esta, según Garcia del Barrio, una de las causas de la alta productividad del viñedo, considerando que una labor superficial cuando hay humedad ambiental, equivale a un pase de abono nitrogenado.

CLIMA

La uva es un fruto de la zona templada, situable entre los paralelos 34° de latitud norte y 49 de latitud sur, y aunque se puede cultivar viñas fuera de esta zona, solo ocurre en pequeñas áreas, encontrándose se la uva más septentrional en el valle del Rhin, 50-51° de latitud norte.

El clima junto con el terreno son los factores permanentes más importantes para el cultivo de la vid, ya que condicionan otros factores permanentes y modificables como el tipo de cepa, tratamientos, labores, fertilización, etc.

En general la uva necesita veranos largos y calientes e inviernos frescos, nuestra zona tiene efectivamente unos veranos largos, secos y calurosos, favorecido por el viento de Levante, procedente de Africa; con inviernos no extremadamente frios; podemos considerar un clima de tipo continental, marítimo, con una gran humedad ambiental nocturna, fuertes rociadas en los meses de Agosto y Septiembre, y sobre todo cuando dominan los vientos de Poniente, rocío bastante importante y deseado por los viticultores.

Las lluvias que en general son siempre bien recibidas por los viticultores, se resumen en los cuadros siguientes suministrados por el Departamento de Viñas, de González Byass.

Precipitaciones registradas en los observatorios meteorológicos de las viñas de González Byass en las 12 últimas campañas agrícolas

<u>AÑO AGRICOLA</u>	<u>Octub.</u>	<u>Novbre</u>	<u>Dicbre</u>	<u>Enero</u>	<u>Febrero</u>	<u>Marzo</u>	<u>Abril</u>	<u>Mayo</u>	<u>Junio</u>	<u>Julio</u>	<u>Agosto</u>	<u>Septbre.</u>	<u>TOTAL</u>
61-62	45,5	401,5	137,5	59,5	40,2	152,0	45,8	31,2	20,2	-	-	6,1	939,5
62-63	242,8	107,8	179,9	202,4	129,7	40,3	86,1	40,1	18,1	-	-	13,2	1060,4
63-64	21,3	124,8	414,0	44,9	120,4	50,8	38,1	13,2	39,5	0,4	-	0,7	908,0
64-65	0,3	97,0	107,2	69,3	86,4	90,9	2,7	0,6	20,3	-	-	86,1	560,8
65-66	126,3	92,9	51,6	98,4	105,5	1,8	61,8	2,8	-	-	-	51,1	592,2
66-67	64,4	38,0	14,5	51,9	84,8	19,5	25,9	30,2	13,9	-	-	1,8	344,9
67-68	90,4	125,7	16,8	-	131,3	96,4	42,6	28,1	11,9	-	9,17	-	634,9
68-69	29,9	166,3	77,6	117,9	172,7	143,4	35,6	17,7	20,7	-	-	46,0	767,8
69-70	77,6	162,1	42,5	314,5	10,3	49,0	38,1	40,1	55,1	-	-	-	789,3
70-71	15,8	78,7	101,5	112,8	0,8	44,1	171,5	113,3	24,6	-	28,0	2,0	693,1
71-72	-	34,8	38,2	182,5	78,2	105,0	17,8	3,6	1,2	-	-	22,6	484,8
72-73	182,7	58,0	105,6	64,5	15,0	42,9	5,0	70,0	2,5	-	-	-	546,2
<u>MEDIAS</u>	74,8	124,0	186,5	110,0	81,3	47,6	32,6	32,6	19,0	-	3,1	19,1	693,5

Precipitaciones mensuales medias registradas desde los años

<u>1.901 a 1.960</u>		<u>1.941 a 1.970</u>	
Enero	76,0	Enero	80,8
Febrero	68,5	Febrero	73,8
Marzo	85,9	Marzo	86,0
Abril	54,2	Abril	40,3
Mayo	35,8	Mayo	36,9
Junio	14,6	Junio	9,3
Julio	1,2	Julio	1,3
Agosto	2,9	Agosto	8,3
Septiembre	29,7	Septiembre	28,0
Octubre	79,2	Octubre	63,8
Noviembre	102,0	Noviembre	91,9
Diciembre	85,0	Diciembre	98,0
	<hr/>		<hr/>
T O T A L	635,0	T O T A L	617,4
=====		=====	

TIPOS DE CEPAS

La vid, pertenece al género VITIS dentro de la familia botánica de las Ampelidaceas, que posee doce géneros, dentro de este tenemos cerca de 40 especies, siendo la V. vinifera la base de producción de vinos de calidad, -teniendo en la zona de Jerez un gran número de variedades, que describe ampliamente Fernández de Bobadilla (30) y de las que destacamos las siguientes: Palomino, con Palomino fino, Palomino Jerez, Palomino Peluzón, etc., que suponen alrededor del 90% de las variedades de la zona, el Pedro Ximenez con cerca del 10%, y otras variedades como cañocazo, perruno, albillo, mantuo, etc. etc., todas estas en franca regresión destacando, aunque también en número muy reducido las variedades castellano y barcelonés, en la zona de Trebujena.

La invasión filoxérica que atacó al Vitis vinifera constituyó una verdadera catástrofe para todos los viñedos europeos, por lo que se tuvo que recurrir a la introducción de cepas americanas -V. riparia, V. barlandieri, V. rupestri, etc- cuya capacidad de resistencia al insecto era mucho mayor (tiene una mayor facilidad de cicatrización de las heridas producidas en sus raíces), estas vides se han utilizado como portainjertos (patrones) en toda la zona de Jerez.

Existen preferencias dentro de las variedades de portainjertos a emplear -por zonas, así mientras Jerez utiliza el 41-B, en Sanlúcar encontramos casi exclusivamente el 161-49, y en Trebujena, aparte de ser el "cajón de sastre" de la viticultura jerezana, el predominante es C-333-EM.

4.1.2. Factores modificables

-Fertilización.- Uno de los factores modificables que más influyen



en la producción de la uva, por supuesto en su calidad, es la fertilización o abonado de la viña. Antes de la plantación de una viña ésta suele recibir un fuerte abonado de tipo orgánico, en general de estiercol, aunque modernamente se está empleando Compost, que suele ir acompañado de sales minerales -P y K- la cantidad inicial que reciben las viñas es de 50-60 tnl. por Has. y 1.300 Kg. de superfosfato de cal y 700 kg de cloruro potásico por Has. a veces se suele añadir sulfato de hierro en terrenos muy activos en caliza para evitar la clorosis. A partir del tercer año se suele comenzar un ciclo rotativo de fertilización, agregando unas 30tn/ha. y unos 500 kg. de P y K, haciéndolo para una cuarta parte de la viña. A veces antes de la floración se utilizan abonos nitrogenados. Hay que insistir en que la frecuencia de abonado produce un incremento de la productividad que naturalmente va en detrimento de la calidad.

-Tratamientos.- Los tratamientos, que tienen por finalidad proteger a las viñas de las plagas, se inician en primavera, con la brotación y suelen durar hasta mediados de Julio, a veces antes de vendimia cuando se presentan casos de podredumbre gris (Botrytis cinerea) debido a exceso de humedad del ambiente o a lluvias, se suelen tratar con compuestos orgánicos, de lo contrario las viñas no reciben más tratamiento en todo el verano. Contra el "mildiu" se suelen dar en Jerez hasta 12 tratamientos, y unos tres contra el Oidium; otras plagas tratables son el "mosquito verde" la "mosca de la fruta", algunos casos de "acariosis". En la actualidad se ha puesto de manifiesto unas virosis que afectan a las cepas, disminuyendo sensiblemente su producción, y que son transmitidas por el Xyphinema index; los métodos de lucha y control de estos nemátodos son costosos y difíciles.

-Labores.- Junto a la fertilización, las labores constituyen uno de los factores que más pueden influir sobre la uva considerada como materia prima; podemos resumir estas labores tomadas de López de Carrizosa (50) como: "aserpiado" consiste en la formación de piletas alrededor de las capas con el fin de retener el agua de lluvia; "poda" -Pemán, C. (61) que en Jerez tiene gran importancia, con una poda de formación con la que se pretende formar una cepa adulta con dos brazos, delantero y trasero y una poda de conservación llamada también mixta o de "vara y pulgar" que necesita de gran experiencia para saber elegir la vara de fruto; la "sarmienta" retirada de los sarmientos después de la poda y por último las labores, profundas en invierno, consistente en dar una labor a la tierra en profundidad, unos 25cms, para en verano dar las que podríamos llamar superficiales o someras, que suelen ser más numerosas que las de invierno, -5 ó 6- que se justifican diciendo que tienen por objeto evitar las grietas que se forman en verano en el suelo, con lo que evitaría se perdiera gran cantidad de agua por evaporación, sin embargo y como decía Garcia del Barrio, con esta labor que solo alcanza a unos 10cms de profundidad se realiza una aireación intensa que con las rociadas fuertes de verano producen una importante nitrificación que puede equipararse a un abonado de la viña.

4.1.3. Factores accidentales.- Las enfermedades de la cepa o de la uva, han de considerarse como otro de los factores que pueden influir sobre la calidad y rendimiento de la cosecha; por tanto sobre el mosto y como es lógico en el vino; son numerosas las enfermedades descritas sobre la uva por parásitos, Bacterias y hongos, Lafon, J. y col. (48); sin embargo mencionaremos únicamente la podredumbre gris producida por el Botrytis cinerea, enferme-

dad considerada en Europa como la número uno, propia de climas húmedos y fríos, que raramente se presenta en nuestra zona, si bien a veces hemos observado brotes de la misma; existen numerosos trabajos, Gartel (33), - Beetz (7), Rosa y col. (69), Balloni (3), etc. que estudian la enfermedad, evolución y tratamientos, hoy día bastante controlada por el empleo de botricidas sistémicos del tipo de los Benzimidazoles; su presencia en nuestros viñedos es doblemente perjudicial, ya que puede producir una serie de compuestos nada deseables, -manitol, glicerina, ac. glucónico, etc.- al mismo tiempo que la lacasa segregada por el Botrytis puede favorecer el pardeamiento de los vinos.

El ataque de las raíces de las cepas por el nemátodo Xiphinema index transmisor de un virus productor de la degeneración infecciosa, es uno de los retos que tiene planteada hoy día la viticultura jerezana, que habrá de resolver, en trabajo conjunto con técnicos en la materia y que se ha iniciado con los trabajos de Garcia Gil de Bernabé (32). Las enfermedades son pues otro de los factores que afectan a la elaboración del Jerez, si bien constituyen de por sí un campo propio de estudio e investigación anterior a la llegada del mosto al lagar y por tanto este enfoque no se considera en este trabajo.

4.2. Correcciones de los mostos

Los mostos de Jerez, con una concentración en azúcar próxima al 20%, son un medio de cultivo idóneo para el desarrollo de toda clase de microorganismos, sin embargo, el fin del mosto en su transformación en vino, y en el caso de Jerez de vinos de calidad; como, los principios responsables -

de esta transformación son las levaduras debemos procurar que en dicho zumo solo o preferentemente, actúen estos microorganismos, e impedir la presencia de los indeseables, que no solo serán hongos filamentosos y bacterias acompañantes, sino también diversas especies de levaduras -kloeckera; Candida; Pichia; Hansenula;- entre otras, que producen en su metabolismo productos inadecuados para la obtención de buen vino, -ácido acético, acetato de etilo, etc-.

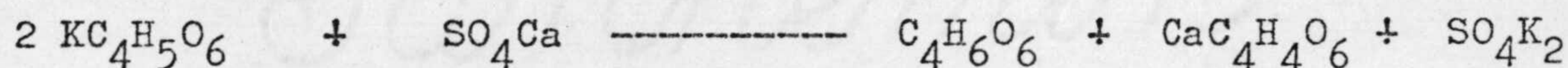
Si consideramos el estudio de la flora microbiana acompañante de los mostos naturales, sin ningún tipo de corrección, estamos investigando la ecología y frecuencia de estos microorganismos, pero si al mismo tiempo estudiamos como influyen estas correcciones, que se realizan en los mostos a lo largo de la vendimia, sobre los distintos tipos de microorganismos, que especies seleccionan, como afectan a unas u otras, etc; estamos realizando un trabajo básico pero al mismo tiempo fundamentalmente práctico, ya que conoceremos como los responsables de la fermentación están condicionados por estos factores y llevaremos a cabo un control microbiológico del proceso, permitiéndonos conocer y perfeccionar las técnicas clásicas de selección de las levaduras, donde las ventajas del sistema, es superior a los inconvenientes del mismo. No podemos olvidar que la mentalidad tradicional de la zona no es partidaria de introducir grandes cambios en la obtención de mostos y que los sistemas aplicables para el posible control de la flora acompañante de la uva es costoso y requiere tiempo para su aplicación, puntos ambos que interfieren su aplicabilidad; si a esto unimos que el sistema tradicional, empleado desde hace muchos años, no es malo aunque por supuesto perfeccionable, debemos trabajar para conseguir un

mejor conocimiento y rendimiento de estos correctores.

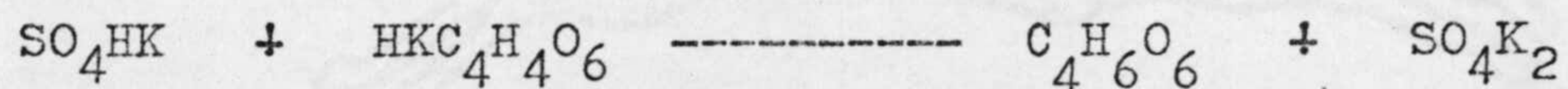
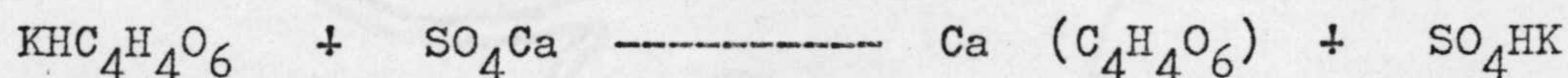
La importancia de estos tratamientos que afectan las características de los mostos y tienen un marcado efecto solo los microorganismos con la casi total eliminación de la flora indeseable de bacterias, que producen productos secundarios en la fermentación, así como la selección, dentro de las levaduras, de las más idóneas para realizar el proceso en la forma adecuada, justifican su empleo. Las correcciones realizadas son las siguientes:

4.2.1. Adición de yeso

La adición de sulfato cálcico a los mostos de Jerez, es una de las prácticas enológicas más antiguas y comunes de esta zona; su finalidad es hacer precipitar el bitartrato potásico que posee de manera natural la uva, en la forma de tartrato cálcico quedando en disolución ácido tartárico y sulfato potásico según la reacción siguiente:



ecuación que transcurre en dos pasos:



Fdez. de Bobadilla (29) en un trabajo clásico sobre el enyesado en Jerez, dice..... "el mosto enyesado presenta depósitos más abundante y compacto, aclarando más rápidamente, al mismo tiempo que dan vinos de mayor "bouquet", su rendimiento en alcohol para la vendimia enyesada es mayor, por

existir una fermentación más completa y más acelerada"; más adelante continúa.... "los mostos enyesados presentan un pH inferior al de los no enyesados, encontrándose por esta razón más protegidos de las levaduras microbianas", y continúa diciendo/ nos queda que mencionar un último aspecto químico-físico de gran interés en el enyesado: el potencial de óxido-reducción. El descenso del pH, que se ha señalado como característica primordial de esta práctica, provoca una disminución en el potencial de oxido-reducción, lo que equivale a lograr un medio más reductor".

De la lectura detenida de este trabajo, podemos concluir que el enyesado solamente produce ventajas, de aquí que se haya venido empleando desde hace muchos siglos y que sea en la única región del mundo donde su práctica está permitida.

Resumiendo podemos decir que el enyesado realiza en los mostos las siguientes funciones: Precipitar el bitartrato potásico de la uva al estado de tartrato cálcico, disminuir el pH del medio, facilitar la floculación y limpieza de estos mostos, produciendo un medio más reductor.

Sobre la cantidad de sulfato cálcico empleado en el enyesado, mucho se ha discutido, y como es natural no podemos dar normas fijas de su utilización, ya que dependerá de circunstancias propias de la uva: edad, calidad, estado de salud de la misma, y del destino que se da a los mostos una vez terminada la fermentación, pero como término medio se suele añadir de 1 a 1,5 kg. de yeso por carretada de uva (690 kg), siendo conveniente no pasar nunca este límite superior.

4.2.2. Adición de ácido tartárico

A veces conviene que los mostos posean una acidez suficiente para que se

realice una perfecta fermentación de los mismos, siendo el método más aconsejable la adición de ácido tartárico o cítrico. Se suele emplear el primero por formar parte de la composición natural de todos los mostos, de aquí que su adición, cuando hace falta, no hace sino equilibrar un desajuste. — En este caso no podemos hablar, como en el enyesado, de reglas generales — para toda la zona vinícola, ni siquiera para una misma viña, pues la falta de acidez depende del grado de maduración de la uva y ya hemos descrito to dos los factores que condicionan esta madurez.

Ribereau-Gayon y Peynaud en su tratado de enología y refiriéndose a E. Bremon, dice "... el empleo racional del ácido tartárico en vinificación es bastante necesario para obtener vinos de calidad, de color vivo, agradable al paladar, y de buena conservación".

La acidez normal del mosto suele ser de 4,5-5g/l expresado en ácido tartárico -60/65 miliequivalente- y el pH óptimo alrededor de 4, pudiéndose recomendar, cuando la acidez del mosto es inferior a 4g/l expresado en tartárico, una ligera acidificación. Marcilla (52) dice "... para orientar a los bodegueros suele decirse que para aumentar 1g/l la acidez tártrica de los vinos es preciso añadir, por litro, de mosto, 1,25g de ácido tártrico, pero esta regla no es cierta, aunque sirve de guía, hasta contar con propia experiencia en los caldos que se elaboran".

Con la adición de ácido tartárico se pretende conseguir una disminución del pH, con la correspondiente subida de la acidez, que tiende a proteger de invasiones microbianas a los mostos, por otra parte veíamos que esta misión — era realizada por el enyesado, quizá el empleo en enología de este producto tenga la finalidad que actúe como coadyuvante con el yeso, evitando tener —

que añadir cantidades excesivas de sulfato de cal, para evitar posibles precipitaciones de sulfato por encima de los valores exigibles en la legislación.

4.2.3. Adición de sulfuroso

Los factores anteriormente estudiados tienen una función química manifiesta sobre los mostos, y que indirectamente, al bajar el pH, afectan sobre la flora microbiana acompañante; por el contrario la acción primordial del sulfuroso es directa sobre estos microorganismos, pudiendo, según las dosis empleadas, retrasar o paralizar la fermentación debido a su efecto microbicida.

La utilización del sulfuroso es práctica muy antigua usada en Enología, y empleado por distintos mecanismos, se usó antiguamente quemando directamente - azufre puro, -pajuelas- sobre todo para azufrar envases en faenas de limpieza, hoy día los métodos usados corrientemente son el empleo de metabisulfito potásico o bien como sulfuroso líquido (anhídrido sulfuroso líquido). El sulfuroso añadido al mosto, se presenta al estado libre y combinado, siendo su efecto exclusivo al estado libre, y nulo el combinado, combinación que puede deberse a la presencia de azúcar o al acetaldehído producido en el metabolismo de los azúcares a su paso a etanol. Por otra parte la fracción del sulfuroso libre varía considerablemente con la acidez del mosto, que viene condicionada por la presencia de los otros factores: enyesado y tartarización-, - variando del 1% a pH 3,8 al 10% a pH 2,8. Por tanto el sulfuroso ejerce un efecto inhibitor sobre los microorganismos acompañantes del mosto, pero este efecto viene, en parte, condicionado por los otros factores de corrección; - sin embargo todavía el sulfuroso se distingue porque su acción inhibitor no es idéntica para todos los microorganismos, su mayor actividad se centra sobre las bacterias, y dentro de las levaduras su efecto es mayor entre espe-

cies apiculadas -Kloeckera- que sobre los Saccharomyces, de aquí que una buena sulfitación, al eliminar o disminuir grandemente el número de bacterias y levaduras indeseables pueda dar origen a vinos de mejor calidad e incluso - con mayor grado alcohólico.

La cantidad de sulfuroso a emplear, como hemos dicho para los anteriores factores de corrección, depende fundamentalmente de la clase de vino a obtener, no es lo mismo el tratamiento para vinos blancos que para tintos e incluso dentro de los blancos según su crianza, de las alteraciones que puede presentar la uva y del grado de contaminación y tipos de levaduras que llevan los mostos; temperatura que alcancen las fermentaciones, tipos de envases empleados, etc. Por todo esto el sulfuroso es necesario, diríamos que imprescindible, en vendimia y bodega por lo que se debe utilizar siempre con un control y criterio verdaderamente técnico, ya que su uso indiscriminado puede dar olor y sabor desagradable y productos de menor calidad; como dice Jaulmes"... debemos usar el sulfuroso en enología solo lo necesario y preciso debido a su olor y sabor desagradable pero sin que sea necesario prohibir su uso". Las dosis usadas de sulfurosos varían según los países y mientras en Suiza y Bélgica las dosis máximas están fijadas en 200mg/l de sulfuroso total; la legislación francesa permite hasta 350mg/l. Mareca (53) aconseja para una fermentación ordinaria dosis de 10g/Hl de sulfuroso o de 20g/Hl de metabisulfito potásico, siendo esta la dosis normal que se viene empleando en Jerez.

4.2.4. Adición de alcohol

La alcoholización de los mostos de Jerez se realiza después de terminada la fermentación, como ya hemos descrito, con el fin de alcanzar una graduación alcohólica entre 15-15,5% de alcohol; la misión de esta adición es doble por

una parte protege a los vinos del desarrollo bacteriano, fundamentalmente de ciertos Acetobacter, que en determinadas condiciones podrían desarrollarse sobre los vinos, alterando totalmente el producto, por otra parte este contenido en alcohol selecciona y permite el crecimiento de las levaduras de "flor" que serán las encargadas de realizar todas las transformaciones en la fase de crianza. La adición del alcohol, que naturalmente será alcohol vínico -procedente de destilados de vinos- es variable de unas vendimias a otras o incluso en el mismo año, y viene condicionado por la calidad de la uva, cepas alcoholigenas empleadas en la fermentación, como ha transcurrido esta, etc. en general se suele añadir la cantidad de alcohol necesario para alcanzar la graduación alcohólica que asegure una buena crianza --alrededor de 15%--.

5.- Objeto del trabajo

Como se desprende a todo lo largo de la introducción, la calidad de un determinado tipo de vino de Jerez es consecuencia, más o menos inmediata, de las levaduras y otros microorganismos que intervienen en su elaboración; y todo el conjunto de manipulaciones y correcciones, etc. que realizamos en la elaboración de estos vinos no tienen, en definitiva, otro objeto que el de seleccionar una flora microbiana adecuada. Por tanto a la hora de emprender un estudio científico sobre la elaboración de vino de Jerez es imprescindible, en primer lugar, un conocimiento adecuado sobre los microorganismos que suelen encontrarse en los mostos de esta procedencia y su evolución a lo largo de todo el proceso de vinificación. De otra parte a la hora de juzgar la bondad, mayor o menor, de los métodos de correcciones empleados es -

igualmente imprescindible el estudio de las modificaciones que dichas correcciones introducen en la flora microbiana de los mostos y su posterior evolución. El estudio a escala de laboratorio de estos dos extremos constituye el objeto de esta Tesis Doctoral.

MATERIAL Y METODOS

1.- Tipos de mostos

El mosto obtenido por presiones suaves y de poca duración en las máquinas prensas, constituyen el llamado "mosto de yema"; es el utilizado en la elaboración de los vinos finos y representa un 75-80% del total. Los mostos obtenidos posteriormente por presiones ligeras o fuertes, con mayor tiempo de prensado, se emplean en otros tipos de vinos de Jerez, olorosos, dulces, etc.- Nosotros siempre hemos trabajado con mostos de yema, y dentro de ellos hemos estudiado dos tipos:

Mostos naturales: es el mosto de yema obtenido de las prensas al que no se adiciona ningún producto; se denomina con las siglas MN, que quiere decir mosto natural; estos mostos no se utilizan como tales en la elaboración del Jerez, es necesario corregirlo, sin embargo, nos permiten realizar estudios básicos desde el punto de vista microbiológico y químico, ya que es donde mejor se puede estudiar la flora microbiana natural que acompañan a los mostos, y nos sirve de base para conocer de manera comparativa la influencia de los factores de corrección sobre los mostos.

Mostos corregidos: el mosto de yema adicionado de unos productos: ácido tartárico, sulfato de cal, sulfuroso, alcohol- que pueden ir solo o mezclados, constituyen el mosto corregido, y se designan con las siglas de los productos añadidos; el objetivo de esta corrección, empleada tradicionalmente desde siglos, es obtener una adecuada fermentación, condicionando unas constantes físico-químicas del mosto al mismo tiempo que actúan de manera positiva, seleccionando la variada y amplia flora microbiana de los mostos.

Si desde un punto de vista ecológico es importante el conocimiento de la

flora natural, desde un plano industrial para obtener un máximo rendimiento y una buena calidad del producto resulta fundamental, estudiar la influencia de estos factores, de manera independiente y asociados para ver como actúan frente a los microorganismos, y deducir desde el punto de vista microbiológico cual sería el tratamiento adecuado para obtener una buena fermentación, si bien habrá que tener en cuenta los factores químicos, que son condicionantes del vino.

2.- Procedencia de los mostos

Todas las muestras estudiadas, a lo largo de las cuatro vendimias -1969, 70, 71 y 72- proceden de mostos obtenidos de los tres "pagos" clásicos de Jerez: Macharnudo, Carrascal y Balbaina.

Las tablas A y B recogen los nombres de procedencia de las viñas estudiadas, número de muestras ensayadas, lugar de recogida, etc. en las vendimias de 1969 y 1970; a partir de 1971 y 72 la mecanización de la vendimia a gran escala, nos colocó en la tesitura de ó bien seguir estudiando muestras de las viñas anteriormente analizadas, independientemente de la vendimia real de la bodega, y por tanto en condiciones que no serían idénticas a la de años anteriores, o por el contrario aislar la flora microbiana de los mostos obtenidos de estas mismas viñas en el lagar, pero donde ya se mezclarían los zumos de distintas procedencias y no se seguirían estos aislamientos conforme a las viñas anteriormente estudiadas, si bien los mostos en su conjunto formarían una base común. Decidimos, que desde el punto de vista industrial, era más lógico estudiar la flora microbiana de estos mostos, tal como se obtienen de las prensas, pero sabiendo que en su conjunto reunían las características de los tres pagos anteriormente

descritos, si desde el punto de vista microbiológico esta circunstancia no era importante, ecológicamente perdíamos un dato que podría tener interés. Por eso la tabla C recoge el número de los depósitos de donde se tomaron - las muestras para posteriormente efectuar los aislamientos. En todos los - casos hemos estudiado los mostos obtenidos por presión suave, que denomina^{mos} el mosto de yema, y tomadas las precauciones descritas posteriormente para evitar toda posible contaminación

3.- Plano de la zona

A continuación de estas tres tablas donde se describe la procedencia - de las muestras, introducimos un plano de la zona de producción de la uva en Jerez, donde se sitúan los tres pagos anteriormente referidos y situación de las viñas que se han estudiado en las vendimias de 1969 y 70, así como aquellas otras que también aportaron muestras en las vendimias de - 1971 y 72.

Todas las características típicas de esta zona, tipo de suelo, clima, etc. ya han sido ampliamente tratadas en la introducción de este trabajo.

A continuación relacionamos todas las tablas descritas.

Procedencia de las muestras estudiadas en la Vendimia 1969

TABLA A. - Origen, número, fecha de recogidas, etc., de las muestras utilizadas en la realización de este trabajo

PAGOS	VIÑAS	NUMERO MUESTRAS	FECHA DE RECOGIDAS	ESTADO DE LA MUESTRA	LUGAR DE RECOGIDAS
MACHARNUDO	Panameña	1	20.9.69	Sin corregir	Viña
	S. Antonio	1	20.9.69	Sin corregir	Viña
	A.B.	3	25.9.69	Sin corregir	Vinificación
			29.9.69	Sin corregir	Vinificación
29.9.69			Corregido	Vinificación	

CARRASCAL	Canariera	3	19.9.69	Sin corregir	Vinificación
			29.9.69	Sin corregir	Vinificación
			29.9.69	Corregido	Vinificación
	Amorosa	2	19.9.69	Sin corregir	Vinificación
			29.9.69	Sin corregir	Vinificación
	Caballero	1	25.9.69	Sin corregir	Vinificación

BALBAINA	De Dios	2	19.9.69	Sin corregir	Vinificación
			29.9.69	Sin corregir	Vinificación
	Las Peonías	3	19.9.69	Sin corregir	Vinificación
			29.9.69	Sin corregir	Vinificación
			29.9.69	Corregido	Vinificación
	El Cuadrado	1	20.9.69	Sin corregir	Viña

TABLA B.--

PROCEDENCIA DE LOS MOSTOS ESTUDIADOS EN LA VENDIMIA 1970

Pagos	Viñas	Muestras	Fecha
Macharnudo	AB	1	23-9-70
	S. Antonio	1	28-9-70
Carrascal	Caballero	1	29-9-70
Balbaina	Peonías II	1	29-9-70

La situación de las viñas, dentro de cada Pago, puede verse en el plano adjunto.

TABLA C.-

Procedencia de las muestras estudiadas en las vendimias 1971-1972

	!	<u>1971</u>				!	<u>1972</u>		!				
Depósitos núms.	!	1	!	2	!	3	!	4	!	1	!	2	!
	!	!		!		!		!		!		!	

Los mostos obtenidos proceden de las viñas de González Byass, pertenecientes a los tres pagos de la zona de Jerez.

4.- Toma de muestras

La toma de muestras se realizó en erlenmeyer estéril de 1.000 ml. de capacidad, a partir de los depósitos que recogen el mosto procedente de las máquinas prensas; las muestras se tomaron inmediatamente de obtenido el mosto y una vez llenado el depósito, previa homogenización con agitador mecánico, para que fueran uniformes.

Durante las vendimias de 1969 y 1970, las uvas procedentes de una misma viña eran prensadas y recogidas en depósitos independientes de 5.000 l. de capacidad, de esta forma podríamos estudiar la flora microbiana en mostos que procedían de una misma viña y conocer si había o no influencia en relación con los distintos pagos de la zona de Jerez.

A partir de 1971 y en la siguiente, las máquinas eran cargadas con uvas procedentes de distintas viñas, -si bien todas fueron del mismo tipo de uva y procedente de los tres pagos clásicos de Jerez- y recogidas en depósitos de 22.000 l.

En todas las vendimias se estudió, como ya se ha dicho anteriormente, mosto de yema procedente de viña adulta, -viña con un mínimo de 7 años de producción, hasta los 7 años se considera "viña joven".

La toma de muestra de mostos naturales -MN- se realizó una vez lleno el depósito y previa homogenización de 10 minutos con agitador y lógicamente antes de iniciar las adiciones clásicas de Jerez. En las vendimias de 1971 y 1972, una vez tomada las muestras de mosto natural, sin adición de "correctores", se calcula la cantidad de ácido tartárico y sulfato de cal que se va a añadir al mosto, para que sus constantes químicas se encuentren dentro de los límites deseados -acidez total, concentración de sulfatos, etc.- a -



continuación se le agregan estos productos y se mantiene durante 20 minutos en agitación para facilitar la disolución de los mismos y conseguir una buena homogenización; esta muestra obtenida después de haber añadido el ácido tartárico y el yeso se denomina TY, y se emplea como base para realizar sobre ella las demás adiciones -sulfuroso y alcohol-.

La adición de alcohol y de sulfuroso, se realizan en el laboratorio, agregando el mosto natural -MN- o al corregido con tartárico y yeso -TY- las cantidades proporcionales de alcohol o sulfuroso, en idéntica proporción que las utilizadas en bodega; el empleo de estos factores en conjunto o de manera independiente tiene por objeto conocer la influencia de ellos de forma separada o en conjunto, y las posibilidades de aplicación a la industria, teniendo en cuenta la selección que realizan y su influencia en el producto terminado.

Las muestras en el laboratorio se repartieron en erlenmeyer de 250 ml. a razón de 200 ml. de mosto, se conservaron en estufa a 28-30°C, de donde se fueron realizando los correspondientes aislamientos; al mismo tiempo se tenían de cada muestra otra idéntica en probetas que nos servían para medir el grado Beaumé, índice empleado por nosotros para realizar los distintos aislamientos, este grado beaumé nos da la concentración de azúcar del mosto que a su vez está en correspondencia con el grado alcohólico que se produce en la fermentación.

Por todo esto, hemos preparado en el laboratorio según las vendimias estudiadas, una escala de correctores que iban desde mostos naturales, MN, a mostos con todas las correcciones, TY, sulfuroso y alcohol, que nos permiten estudiar la influencia de los distintos factores de manera independiente y

en conjunto sobre la flora microbiana y su papel en la selección de determinados microorganismos.

5.- Medios de cultivos empleados en el aislamiento y conservación de levaduras.

Los medios de cultivos empleados en los aislamientos de levaduras agar levadura sal de Davis a pH 3,5 (Davis, (21) cuya composición es la siguiente:

nitrato amónico	0,1%
sulfato amónico	0,1%
fosfato disódico anh....	0,4%
fosfato monopotásico ...	0,2%
cloruro sódico	0,1%
extracto levadura	0,1%
glucosa	1,0%
agar	2 %
agua destilada	100 ml.

Se disuelven todos los ingredientes en el agua, se calienta en corriente de vapor, se comprueba el pH y se ajusta a 6,6 si es necesario; se reparte según convenga y se esteriliza en autoclave a 121°C 20 minutos.

El pH se baja a 3,5 en el momento de tender las placas, añadiendo al medio fundido a unos 40°C, 5,3 c.c. de ácido cítrico estéril al 10%, por cada 100 c.c. de medio.

medio de YMA, (P. Rousseau y H.O. Halvorson, (70)

extr. de levadura	0,3%
extr. de malta	0,3%
peptona	0,5%
glucosa	1,0%
agar	2,0%
agua destilada	100 ml.

El pH a ajustar es de 5,5; también se empleó con pH rebajado a 3,5 por el mismo procedimiento empleado para el medio de Davis.

Medio de conservación:

extr. de levadura	0,3%
peptona	0,5%
glucosa	1,0%
agar	2,0%
agua destilada	100 ml.

La preparación del medio igual a la segunda para el de Davis, ajustando y empleando el pH a 6,5.

En este medio las resiembras de levaduras para su conservación se realizaron cada dos meses.

Medio de Lindegren y al. (1958)

extr. de levadura	2 g.
peptona	2 g.
sulfato amónico	1,5 g.
fosfato monopotásico	1 g.

sulfato magnésico	0,5 g.
glucosa	10 g.
agar	20 g.
agua destilada	1.000 c.c.

Se agregan todos los ingredientes en el agua destilada y se ajusta el pH a 6,5-7, se disuelven en corriente de vapor, se distribuye el medio según convenga esterilizándolo en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

6.- Técnica de aislamiento de levaduras

Los aislamientos de levaduras se realizaron de acuerdo con los principios establecidos por Castelli (19) y seguidos por Iñigo Leal y col. (36); consiste en realizar los aislamientos en tres fases distintas de la fermentación: principio, a mediados y al final del proceso. Nosotros hemos utilizado el grado Bé de los mostos como indicador de estas fases, realizando - el primer aislamiento a las 24h. de la toma de muestra con Bé mayor de 10; el segundo mediada la fermentación con Bé entre 4-6 y el tercero a Bé cero. Estas tres fases de aislamiento se realizaron en las vendimias de 1969 y - 1970; en la siguiente, de 1971, se suprimió los aislamientos de la fase intermedia, -Bé entre 4-6- y se estudió una nueva fase de aislamiento, a los 40 días de la toma de muestra, donde los microorganismos de la fermentación tumultuosa posiblemente habrían disminuido o desaparecido, o por lo menos dejado de intervenir, y pensamos nos podría aportar la flora microbiana de esta fase, inicial para la crianza de los vinos finos.

En la vendimia de 1972 se realizaron los aislamientos en las tres fases establecidas en 1971, si bien la última fase, o fase de crianza, se realizó a los 60 días en lugar de los 40 del año anterior.

Las desiminaciones sobre placas con los medios de aislamientos, se realizaron a partir de suspensiones preparadas en solución salina fisiológica a diluciones de 1/100; 1/1000 y 1/10000 de las muestras en estudios dependiendo del origen de las mismas; si habian sido o no tratadas con factores de corrección y sembradas con asa de Pt. o con espátula de Digrafsky sobre los medios de cultivos empleados en los aislamientos.

7.- Técnicas de recuento de levaduras

El recuento de las levaduras se efectuó sobre los mismos medios empleados para los aislamientos, teniendo en cuenta la cantidad de suspensión inoculada y la dilución utilizada; empleando en algunos casos el hematómetro de Thomas. El número de colonias por placa fueron de unas 100 realizando para cada muestra unas 5 placas.

El medio de agar-levadura sal de Davis a pH 3,5 utilizado en todos los aislamientos nos dan unas características culturales de las colonias, como se describen en los resultados, que son coincidentes con el género a que pertenecen. La proporción de los géneros, en las distintas fases, se calculó teniendo en cuenta estas características culturales de las colonias, realizando un recuento de cada tipo y calculando el porcentaje que representa frente al total.

8.- Técnica de recuento de bacterias

Para el recuento directo de bacterias se empleó la técnica de extensión de Breed, por exámen directo al microscopio, según se describe por Harrigan y McCance (35).

Los mostos se sometieron a un tratamiento previo con objeto de concentrar el número de bacterias, haciendo unas modificaciones a las técnicas propuestas por Peynaud y col. (63); las muestras de mostos -10c.c.- se sometieron a dos centrifugaciones a 3.000 r.p.m. la primera con una duración de 5 minutos, se recoge el sobrenadante y se hace una extensión y recuento según la técnica de Breed, de este mismo sobrenadante se vuelve a realizar la segunda centrifugación a 3.000 r.p.m. y 20 minutos de duración, de aquí se toma el sedimento y se realiza una nueva extensión y posterior recuento, a continuación se sumaban las medias obtenidas en cada caso -5 y 20 minutos- se multiplicaba por el factor del microscopio y se obtenía el número total de microorganismos acompañantes de los 10 c.c. del mosto estudiado.

9.- Técnicas empleadas en la identificación de levaduras

En la identificación de las levaduras aisladas de los mostos se emplearon las técnicas que a continuación se describen:

9.1.- Tinciones:

Tinción sencilla con azul de metileno. Se empleó esta tinción conforme se exponen en "Laboratory Methods in Microbiology" (Harrigan y McCance (35).

Tinción de ascosporas, método de Alessandrini (56).

9.2.- Caracteres morfológicos

Forma y tamaño de las células. Se llevaron a cabo conforme se expone en "The yeasts a taxonomy study".

Reproducción vegetativa. Se examinó sobre agar-patata, como expresa

el libro anteriormente mencionado.

Formación de ascosporas. Dentro de los medios propuestos en la obra de Lodder y Krager-van-Rij se utilizaron el agar-Gorodkova (modificado), agar patata y cultivos viejos en agar malta.

9.3.- Caracteres culturales:

La descripción del crecimiento en agar malta, y en caldo de malta - se realizó de acuerdo con las normas dadas por Lodder y Kreger-van-Rij, en su obra ya citada, y teniendo en consideración las normas - de la Society of American Bacteriologist (86).

9.4.- Caracteres bioquímicos:

Fermentación de azúcares. Se realizó según se indica en Laboratory Methods in Microbiology (35). La investigación de la Rafinosa se realizó conforme lo expone Domerq (23).

Asimilación de azúcares y nitratos. Se llevaron a cabo de acuerdo - con las técnicas descritas en el "Difco Manual" (22).

Etanol como única fuente de carbono. Se ensayó conforme se describe en "Laboratory in Methods in Microbiology" (35).

10.- Factores de corrección utilizados en las vendimias de 1971 y 72.

Los factores de corrección empleados en estas dos vendimias son los clásicos y tradicionalmente utilizados en la zona de Jerez: ácido tartárico, yeso, sulfuroso y alcohol, variando, como hemos repetido, su proporción y el momento de su utilización.

La adición de ácido tartárico fué de alrededor de 1,5g/l, igual a la cantidad de yeso empleado y recomendado por Fdez. de Bobadilla (29), idéntica cantidad en ambas vendimias. El sulfuroso empleado de acuerdo con la -

cantidad preconizada por Mareca estuvo comprendida en ambas campañas, entre 10-20g/Hl.

El alcohol que añadimos en el laboratorio, ya que en bodega no se utiliza hasta después de realizado el "deslío" fué de 2,5c.c. de alcohol por cada 100c.c. de mosto en la vendimia de 1971 y de 2c.c. por cada 100c.c. de mosto en la siguiente.



R E S U L T A D O S
=====

1.- Experiencias previas

1.1.- Identificación de levaduras a nivel de géneros de acuerdo con las características morfológicas de las colonias que se desarrollan en agar levadura sal de Davis a pH 3,5.

En el transcurso de los trabajos previos relacionados con el aislamiento e identificación de levaduras pudo observarse que las características morfológicas de las colonias de levaduras que se desarrollaban sobre el medio empleado en los aislamientos -agar levadura -sal de Davis pH 3,5- presentaba de manera constante, unos caracteres morfológicos específicos, para cada género; dado que las posibilidades de poder identificar, a nivel de género, una levadura mediante una simple siembra en la superficie del medio citado facilitaría grandemente el recuento de los géneros de levaduras presente en los mostos analizados se consideró interesante comprobar exhaustivamente lo expuesto anteriormente, a cuyo fin y de manera sistemática en el transcurso de muy numerosos aislamientos se ha comprobado la correlación existente entre las citadas características morfológicas de las colonias y los géneros a que pertenecen mediante la posterior identificación de las especies formadoras de cada una de los tipos de colonias.

Los estudios realizados han confirmado plenamente lo anteriormente expuesto de manera que se puede identificar el género a que pertenece una determinada estirpe de levadura, y de hecho así se ha hecho en el transcurso de este trabajo; observando las características morfológicas a que da lugar sobre el medio anteriormente citado.

Los criterios de tipo morfológico empleados para la identificación de levaduras a nivel de género han sido los siguientes:

Género Saccharomyces: Colonia circular, grande, crema o blanca, opaca, convexa, o plano-convexa, lisa, entera, mantecosa.

Género Saccharomyces: Colonia circular, mediana, blanca, opaca, elevada, lisa, entera, no mantecosa.

Género Kloeckera: Colonia circular, mediana, traslúcida, plana o ligeramente convexa, lisa, entera, viscosa.

Género Candida pulcherrima: Colonia circular, mediana, blanca con el centro pigmentado en rojo más o menos extendido que se hace difusible en el medio.

Género Pichia/Hansenula: Colonia irregular, grande, beige o blanca, plana, mate, ondulada, rugosa, granugienta.

Género Candida: Colonia circular, mediana, blanca, elevada, mate, rugosa, entera.

Bacterias (suelen ser del género Acetobacter): Colonia circular puntiforme, traslúcida, con irisaciones brillante, entera y ligeramente viscosa.

1.2.- Estudios realizados en las vendimias de 1969 y 1970

Aún cuando estos estudios forman parte del cuerpo de esta Tesis Doctoral, los incluimos dentro del apartado de experiencias previas, ya que, de una parte, al ser los primeros realizados sirvieron como base para planificar los estudios más completos y sistemáticos que se realizaron durante las vendimias de 1971 y 1972; y, de otra, porque en ellos los mostos utilizados, corregidos o no, no fueron homogéneos ya que procedían de viñas distintas y por tanto los resultados obtenidos están sujetos, en cada caso, a las peculiaridades y vicisitudes de las mismas.

1.2.1.- Estudios realizados en la vendimia de 1969

En estos estudios se pretendió exclusivamente obtener una visión de conjunto de los microorganismos -Levaduras, Hongos filamentosos y bacterias aerobias- presentes en los mostos, así como su evolución a lo largo de la fermentación; en relación con las levaduras solamente se estudió la distribución de las especies del género Saccharomyces, en los mostos de las distintas procedencias. Lo anteriormente indicado se llevó a cabo en mostos naturales y mostos corregidos, estos últimos mediante la adición de -ácido tartárico, sulfato de cal, sulfuroso y alcohol.

La técnica empleada fué la propuesta por Castelli y seguido por Iñigo Leal y col. (36) de aislar 15 colonias por mosto -5 en cada fase de fermentación, inicio, media y final del proceso, que desde el primer momento no nos pareció suficiente para sacar conclusiones sobre porcentajes y presencia de unas u otras levaduras, ya que su número era muy reducido.

A continuación exponemos las tablas con los resultados:

1.2.1.1.- Mostos naturalesTABLA 1.-

Porcentaje de levaduras, hongos filamentosos y bacterias en mostos naturales a Bé > 10.*

<u>Procedencia</u>	<u>Levaduras</u>	<u>Hongos f.</u>	<u>Bacterias</u>
CANARIERA I	90,8	9,2	0
" II	88	8	4
AMOROSA I	72	10	18
" II	94,5	5	0,5
DE DIOS I	90	10	0
" II	89	11	1
LAS PEONIAS I	90	10	0
" " II	96	0	4
PANAMEÑA	63	37	0
SAN ANTONIO	90,5	9,5	0
EL CUADRADO	88	4	8
CABALLERO	74	1	25
AB - I	91	4,5	4,5
AB - II	92	3	5
Valor medio	86,5	8,5	5

* Inicio de la fermentación

TABLA 2.-

Porcentaje de levaduras, hongos filamentosos y bacterias en mostos naturales a Bé entre 4 y 6.*

<u>Procedencia</u>	<u>Levaduras</u>	<u>Hongos f.</u>	<u>Bacterias</u>
CANARIERA I	-	-	-
" II	79	-	21
AMOROSA I	-	-	-
" II	100	-	0
DE DIOS I	-	-	-
" II	100	-	0
LAS PEONIAS I	-	-	-
" " II	83	-	17
PANAMEÑA	-	-	-
SAN ANTONIO	-	-	-
EL CUADRADO	-	-	-
CABALLERO	85	-	15
AB - I	100	-	0
AB - II	71	-	29
Valor medio	88,3	-	11,7

* Fase media de la fermentación.

TABLA 3.-

Porcentaje de levaduras, hongos filamentosos y bacterias en mostos naturales a Bé = 0.*

<u>Procedencia</u>	<u>Levaduras</u>	<u>Hongos f.</u>	<u>Bacterias</u>
CANARIERA I	98	-	2
" II	100	-	0
AMOROSA I	96	-	4
" II	100	-	0
DE DIOS I	82	-	18
" II	100	-	0
LAS PEONIAS I	99	-	1
" " II	80	-	20
PANAMEÑA	88	-	12
SAN ANTONIO	69	-	31
EL CUADRADO	56	-	44
CABALLERO	100	-	0
AB - I	100	-	0
AB - II	100	-	0
Valor medio	90,7	-	9,3

* Fermentación finalizada.

TABLA 4.-

Distribución de las estirpes de Saccharomyces aislados en mostos naturales entre las diversas especies que engloba este género.

Procedencia	<u>S. rosei</u>	<u>S. fructuum</u>	<u>S. exiguus</u>	<u>S. chevalieri</u>	<u>S. cerevisiae</u>	<u>S. oviformis</u>	<u>S. delbrueckii</u>	<u>S. sp.</u>
CANARIERA I	1	1						
" II	2		1	1	2			
AMOROSA I		1			1			
" II	1		1		1			1
DE DIOS I		1						
" II		1	1		2			
LAS PEONIAS I		1			2			
" " II	1			1	3			
PANAMEÑA					1			
SAN ANTONIO				1				
EL CUADRADO					1			1
CABALLERO	2		1		1			
AB - I					2		1	
AB - II				2		1		
	7	5	4	5	16	1	1	2

TABLA 5.-

Porcentaje de levaduras, hongos filamentosos y bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso, sulfuroso y alcohol a distintas fases de fermentación.

Procedencia	<u>Bé 10 *</u>			<u>Bé 4-6 **</u>			<u>Bé = 0 ***</u>		
	Levad.	Hongos	f.Bact.	Levad.	Hongos	f.Bact.	Levad.	Hongos	f.Bact.
CANARIERA	95	1	4	100	-	-	100	-	-
LAS PEONIAS	94	-	6	100	-	-	100	-	-
A B	99	0,5	0,5	100	-	-	100	-	-
Valor medio	96	0,5	3,5	100	0	0	100	0	0

* Inicio de la fermentación.

** Fase media de la fermentación.

*** Fermentación finalizada.

TABLA 6.-

Distribución de las estirpes de Saccharomyces aisladas en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso, sulfuroso y alcohol entre las distintas especies que engloban este género.

Procedencia	<u>S. rosei</u>	<u>S. fructuum</u>	<u>S. chevalieri</u>	<u>S. cerevisiae</u>	<u>S. steineri</u>	<u>S. fermentati</u>
A B			2	2	1	1
LAS PEONIAS	2		1	2		
CANARIERA	2	1		3		
	4	1	3	7	1	1

1.2.2.- Estudios realizados en la vendimia de 1970.

Sobre la base de los resultados obtenidos en la vendimia de 1969, en la de 1970, el planteamiento de los estudios sufrió algunas variaciones; en primer lugar y dado que los hongos filamentosos habian demostrado ser el componente minoritario de la flora microbiana presente solo en la fase inicial de la fermentación y sin efecto aparente sobre la misma, se decidió prescindir de su estudio; de otra parte la selección de solamente 5 colonias de levaduras en cada aislamiento realizado, a pesar de ser la técnica usada por otros autores era demasiado reducida y los resultados obtenidos no podian ser considerados de ningún modo representativos de la población de levaduras presentes.

Por esta razón se decidió aumentar el número de colonias estudiadas a 30 en cada aislamiento, lo que supone unas 90 colonias por mosto, cifra que consideramos más correcta a la hora de exponer porcentajes de las levaduras presentes en las muestras. Como contrapartida, dada las limitaciones de nuestro laboratorio, hubo que reducir el número de muestras a las procedentes de cuatro viñas, pertenecientes a los tres pagos clásicos de Jerez.

Finalmente y aunque los resultados obtenidos en la vendimia anterior habian demostrado que la adición de correctores tenían un efecto profundo sobre la flora microbiana presente en los mostos; en esta vendimia se decidió no estudiar la influencia de dichos agentes correctores sino polarizar las experiencias hacia un estudio ecológico de la flora natural presente en los mostos, que sirviera de base para posteriores trabajos.-

A continuación exponemos los resultados obtenidos, resumidos en tablas.

1.2.2.1.- Levaduras y Bacterias en mostos naturales en distintas fases de fermentación.

TABLA 7.-

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros y de bacterias en mostos naturales a Bé > 10.*

Microorganismos	Procedencia			
	Caballero	AB	S. Antonio	Peonias II
<u>Kloeckera</u>	4,4	33,34	10	20
<u>Candida</u>	3,0	-	24,36	-
<u>Saccharomyces</u>	79,8	60	48,3	66
<u>Pichia</u>	-	6,66	17,34	4
<u>Hansenula</u>	6,2	-	-	-
Bacterias	6,6	-	-	10

* Inicio de la fermentación.

TABLA 8.-

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros y de bacterias en mostos naturales a Bé entre 4,5-6. *

Microorganismos	Procedencia			
	Caballero	AB	S. Antonio	Peonias II
<u>Saccharomyces</u>	77,7	87	90	83
<u>Pichia</u>	6,5	-	6,6	-
Bacterias	16,5	13	3,4	17

* Fase media de la fermentación.

TABLA 9.-

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros y de bacterias en mostos naturales a Bé = 0. *

Microorganismos	Procedencia			
	Caballero	AB	S. Antonio	Peonias II
<u>Saccharomyces</u>	93	93	96,6	87
<u>Pichia</u>	-	-	3,4	3
Bacterias	7	7	-	10

* Fermentación finalizada.

1.2.2.2.- Especies de Saccharomyces en mostos naturales en distintas fases de fermentación.

TABLA 10

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos naturales a $Bé > 10$. *

Especie	Procedencia			
	Caballero	AB	S. Antonio	Peonias II
<u>S. cerevisiae</u>	66.0	33,34	8	75
<u>S. fructuum</u>	14,2	33,32	16	5
<u>S. rosei</u>	6,6	27,84	60	15
<u>S. exiguus</u>	13,2	5,50	-	5
<u>S. chevalieri</u>	-	-	16	-

* Inicio de la fermentación.

TABLA 11.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos naturales a Bé entre 4,5-6. *

Especie	Procedencia			
	Caballero	AB	S. Antonio	Peonias II
<u>S. cerevisiae</u>	25	8	12	42
<u>S. rosei</u>	35	25,2	16	13
<u>S. exiguus</u>	15	46,8	12	-
<u>S. chevalieri</u>	20	12	47	33
<u>S. italicus</u>	5	-	-	6
<u>S. fermentati</u>	-	4	-	-
<u>S. marxianus</u>	-	-	5	6
<u>S. oviformis</u>	-	-	4	-
<u>S. steineri</u>	-	4	-	-
<u>S. veronae</u>	-	-	4	-

* Fase media de la fermentación.

TABLA 12.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos naturales a Bé = 0.*

Especie	Procedencia			
	Caballero	AB	S. Antonio	Peonias II
<u>S. cerevisiae</u>	32	48	11	20
<u>S. rosei</u>	21	-	4	-
<u>S. exiguus</u>	8	14	46	8
<u>S. chevalieri</u>	32	28	35	48
<u>S. delbrueckii</u>	-	-	-	4
<u>S. italicus</u>	-	-	-	8
<u>S. fermentati</u>	-	3	-	-
<u>S. marxianus</u>	-	-	4	-
<u>S. feduchyi</u>	7	7	-	12

* Fermentación finalizada.

2.- Estudios realizados en la vendimia de 1971

Como ha quedado expuesto en las vendimias de 1969 y 1970, la vinificación se llevó a cabo independientemente para cada una de las viñas citadas; a partir de 1971, sin embargo, debido al volúmen de producción las uvas procedentes de las distintas viñas se vinificaron conjuntamente de manera que en los depósitos de recepción de mostos se mezclaron los zumos de uvas de todas las viñas citadas por lo que, tanto en esta vendimia como en la de 1972, los estudios se realizaron sobre mostos recogidos sin tener en cuenta las viñas de procedencia.

En esta campaña las experiencias se llevaron a cabo sobre un total de cuatro depósitos, que se numeran del 1 al 4, escogidos al azar entre los cuarenta - que se utilizan para recogida del mosto.

Una variación importante que se introdujo en las experiencias realizadas dicho año para seguir la marcha de la fermentación fué la de tomar tres muestras, al inicio de la fermentación, al final de la misma y una tercera y última a los cuarenta días de finalizada la misma, ya que se consideró que los datos que se podían obtener de esta última toma serían de interés para un mejor conocimiento de la evolución de la flora microbiana de los mostos y su relación con la crianza. De otra parte y tomando como base los resultados obtenidos en la vendimia de 1969 en la que se estudió la influencia conjunta - de todos los factores de corrección empleados usualmente, se consideró interesante estudiar la influencia sobre la flora microbiana del empleo individual o combinado de los mismos; a estos efectos los estudios se extendieron a mostos corregidos con ácido tartárico y yeso; ácido tartárico, yeso y sulfuroso; ácido tartárico, yeso y alcohol, y por último a ácido tartárico, yeso, alcohol y sulfuroso.

Igualmente y al lado de este estudio cualitativo se llevó a cabo otro cuantitativo en el que se estudió el efecto de los correctores antes citados sobre levaduras y bacterias.

2.1.- Estudio de la flora microbiana -levaduras y bacterias- en mostos naturales y corregidos durante la fermentación e inicio de la crianza.

2.1.1.- Levaduras y bacterias en mostos naturales en distintas fases de fermentación e inicio de la crianza.

TABLA 13

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, y bacterias en mostos naturales a $Bé > 10$. *

Microorganismos	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>Kloeckera</u>	69	30	40	38,5
<u>Candida</u>	1	-	-	1
<u>Saccharomyces</u>	29,9	54	60	60
<u>Pichia</u>	0,1	6	-	0,5
<u>Hansenula</u>	-	1	-	-
Bacterias	-	9	-	-

* Inicio de la fermentación.

TABLA 14.

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, en mostos naturales a Bé = 0. *

Microorganismos	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>Saccharomyces</u>	99,8	100	100	100
<u>Pichia</u>	0,2	-	-	-

* Final de la fermentación.

TABLA 15

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, y de bacterias en mostos naturales en fase de crianza. *

Microorganismos	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>Candida</u>	-	10	-	-
<u>Saccharomyces</u>	-	90	-	96
<u>Pichia</u>	-	-	-	4
Bacterias	100	-	100	-

* 40 días después de finalizada la fermentación.

2.1.2.- Levaduras y bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico y yeso en distintas fases de la fermentación e inicio de la crianza.

TABLA 16

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, y de bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico y yeso a Bé > 10.*

Microorganismos	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>Kloeckera</u>	37	25	53,3	38,5
<u>Candida</u>	0,5	0,5	0,5	1
<u>Saccharomyces</u>	62	74,3	46,2	60
<u>Pichia</u>	-	-	-	0,5
<u>Hansenula</u>	0,5	0,2	-	-
Bacterias	-	-	-	-

* Inicio de la fermentación.

TABLA 17

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, y de bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico y yeso a Bé = 0. *

Microorganismos	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>Saccharomyces</u>	100	100	80	95
<u>Saccharomycodes</u>	-	-	5	-
Bacterias	-	-	15	5

* Fermentación finalizada.

TABLA 18

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, y de bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico y yeso en fase de crianza.*

Microorganismos	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>Candida</u>	57	2	-	-
<u>Saccharomyces</u>	-	98	16	100
<u>Pichia</u>	-	-	68	-
Bacterias	43	-	16	-

* 40 días después de finalizada la fermentación.

2.1.3.- Levaduras y bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y sulfuroso en distintas fases de fermentación e inicio de la crianza.

TABLA 19

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, y de bacterias en mostos corregidos con tartárico, yeso y sulfuroso a Bé > 10.*

Microorganismos	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>Saccharomyces</u>	-	84	-	33
<u>Pichia</u>	-	16	-	39
<u>Saccharomycodes</u>	80	-	100	28
Bacterias	20	-	-	-

* Inicio de la fermentación.

TABLA 20

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, y de bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y sulfuroso a Bé = 0.*

Microorganismos	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>Saccharomyces</u>	95	90	80	85
<u>Saccharomycodes</u>	5	10	20	15
Bacterias	-	-	-	-

* Fermentación finalizada

TABLA 21

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, y de bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y sulfuroso en fase de crianza.*

Microorganismos	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>Saccharomyces</u>	50	90	80	85
<u>Saccharomycodes</u>	50	10	20	15
Bacterias	-	-	-	-

* 40 días después de finalizada la fermentación.

2.1.4.- Levaduras y bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 22.-

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, y de bacterias en mostos corregidos con tartárico, yeso y alcohol a $Be > 10$.*

Microorganismos	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>Kloeckera</u>	19	10	10	10
<u>Candida</u>	0,1	0,3	1	0,1
<u>Saccharomyces</u>	80,5	89,6	89	89,9
<u>Hansenula</u>	0,4	0,1	-	-
Bacterias	-	-	-	-

* Inicio de la fermentación.

TABLA 23.-

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, y de bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y alcohol a Bé = 0. *

Microorganismos	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>Kloeckera</u>	-	-	-	-
<u>Candida</u>	-	-	-	-
<u>Saccharomyces</u>	100	100	100	100
<u>Hansenula</u>	-	-	-	-
Bacterias	-	-	-	-

* Fermentación finalizada.

TABLA 24.-

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, y de bacterias en mostos crianza corregidos con ácido tartárico, yeso y alcohol en fase de crianza. *

Microorganismos	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>Kloeckera</u>	-	-	-	-
<u>Candida</u>	-	-	-	-
<u>Saccharomyces</u>	100	100	100	100
<u>Hansenula</u>	-	-	-	-
Bacterias	-	-	-	-

* 40 días después de finalizada la fermentación.

2.1.5.- Levaduras y bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso, sulfuroso y alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 25.-

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, y de bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso, sulfuroso y alcohol a $Bé > 10$. *

Microorganismos	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>Candida</u>	-	-	-	0,2
<u>Saccharomyces</u>	-	40	34	93,9
<u>Pichia</u>	43	20	-	-
<u>Hansenula</u>	14	-	-	-
<u>Saccharomycodes</u>	43	40	66	5,9
Bacterias	-	-	-	-

* Inicio de la fermentación.

TABLA 26.-

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, y de bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso, sulfuroso y alcohol a Bé = 0. *

Microorganismos	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>Saccharomyces</u>	85	80	95	84
<u>Pichia</u>	10	-	-	-
<u>Saccharomycodes</u>	5	20	5	16
Bacterias	-	-	-	-

* Fermentación finalizada.

TABLA 27

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, y de bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso, sulfuroso y alcohol en fase de crianza. *

Microorganismos	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>Saccharomyces</u>	85	95	90	80
<u>Pichia</u>	-	-	-	-
<u>Saccharomycodes</u>	15	5	10	20
Bacterias	-	-	-	-

* 40 días después de finalizada la fermentación.

2.2.- Estudio de la distribución de las distintas especies del género Saccharomyces en mostos naturales y corregidos durante la fermentación e inicio de la crianza.

2.2.1.- Especies de Saccharomyces en mostos naturales en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 28.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos naturales a $Bé > 10$. *

Especie	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>S. cerevisiae</u>	30,5	13,5	60	75
<u>S. rosei</u>	15,5	33,3	20	-
<u>S. exiguus</u>	-	6,2	20	-
<u>S. chevalieri</u>	31	-	-	5
<u>S. marxianus</u>	7,5	-	-	-
<u>S. fermentati</u>	-	13,5	-	20
<u>S. elegans</u>	-	20	-	-
<u>S. veronae</u>	15,5	13,5	-	-

* Inicio de la fermentación.

TABLA 29.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos naturales a Bé = 0.

Especie	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>S. cerevisiae</u>	26,5	24	47	31,5
<u>S. exiguus</u>	15,8	-	-	16
<u>S. chevalieri</u>	21	38	17,5	31,5
<u>S. fermentati</u>	5,3	9	6	10,5
<u>S. elegans</u>	-	9	-	-
<u>S. fructuum</u>	5,2	-	-	-
<u>S. heterogenicus</u>	10,4	5	-	5,2
<u>S. oviformis</u>	-	-	23,5	-
<u>S. steineri</u>	10,5	-	-	-
<u>S. beticus</u>	5,3	-	-	-
<u>S. feduchyi</u>	-	15	6	-
<u>S. sp.</u>	-	-	-	5,3

Fermentación finalizada.

TABLA 30.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos naturales en fase de crianza.

Especie	Depósito			
	1	2	3	4
<u>S. beticus</u>	-	100	-	86
<u>S. feduchyi</u>	-	-	-	14

40 días después de finalizada la fermentación.

2.2.2.- Especies de Saccharomyces en mostos corregidos con ácido tartárico y yeso en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 31.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos corregidos con ácido tartárico y yeso a Bé > 10. *

Especie	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>S. cerevisiae</u>	45,5	15,4	-	35,7
<u>S. rosei</u>	-	23	-	7,15
<u>S. exiguus</u>	27,3	7,7	14,25	7,15
<u>S. chevalieri</u>	18,2	15,4	-	28,5
<u>S. fermentati</u>	-	7,7	-	21,5
<u>S. elegans</u>	-	7,7	14,25	-
<u>S. fructuum</u>	9	-	57,25	-
<u>S. heterogenicus</u>	-	7,7	-	-
<u>S. oviformis</u>	-	-	14,25	-
<u>S. rouxii</u>	-	7,7	-	-
<u>S. sp.</u>	-	7,7	-	-

* Inicio de la fermentación.

TABLA 32.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos corregidos con ácido tartárico y yeso a Bé = 0.*

Especie	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>S. cerevisiae</u>	23,8	36,8	61,5	60
<u>S. exiguus</u>	19	-	7,7	10
<u>S. chevalieri</u>	9,5	42,1	-	15
<u>S. fermentati</u>	4,8	10,5	-	5
<u>S. elegans</u>	-	5,3	-	-
<u>S. fructuum</u>	-	-	-	5
<u>S. heterogenicus</u>	28,6	-	-	5
<u>S. steineri</u>	4,8	-	-	-
<u>S. beticus</u>	9,5	-	30,8	-
<u>S. feduchyi</u>	-	5,3	-	-

* Fermentación finalizada.

TABLA 33.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos corregidos con ácido tartárico y yeso en fase de crianza.*

Especie	Depósitos		
	2	3	4
<u>S. beticus</u>	100	-	85
<u>S. feduchyi</u>	-	100	15

* 40 días después de finalizada la fermentación.

No se considera el depósito 1 por no haberse aislado en él especies de Saccharomyces.

2.2.3.- Especies de Saccharomyces en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y sulfuroso en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 34.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y sulfuroso a $Bé > 10$. *

Especie	Depósitos	
	2	4
<u>S. cerevisiae</u>	20	-
<u>S. rosei</u>	20	-
<u>S. exiguus</u>	-	33,4
<u>S. chevalieri</u>	40	-
<u>S. fructuum</u>	-	33,2
<u>S. heterogenicus</u>	20	-
<u>S. oviformis</u>	-	33,4

* Inicio de la fermentación.

No se consideran los depósitos 1 y 3 por no haberse aislado en ellos especies de Saccharomyces.

TABLA 35.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y sulfuroso a Bé = 0. *

Especie	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>S. cerevisiae</u>	-	41,3	72,7	50
<u>S. exiguus</u>	55	11,7	13,6	-
<u>S. chevalieri</u>	45	11,7	9,2	16,7
<u>S. fermentati</u>	-	35,3	-	33,3
<u>S. oviformis</u>	-	-	4,5	-

* Fermentación finalizada.

TABLA 36.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y sulfuroso en fase de crianza. *

Especie	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>S. cerevisiae</u>	10	6,25	66,8	41,2
<u>S. exiguus</u>	-	-	-	17,6
<u>S. chevalieri</u>	-	12,5	-	41,2
<u>S. fermentati</u>	80	31,25	-	-
<u>S. fructuum</u>	-	18,75	6,7	-
<u>S. heterogenicus</u>	-	18,75	-	-
<u>S. steineri</u>	-	6,25	-	-
<u>S. veronae</u>	10	-	19,8	-
<u>S. beticus</u>	-	6,25	6,7	-

* 40 días después de finalizada la fermentación.

2.2.4.- Especies de Saccharomyces en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 37.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y alcohol a Bé > 10. *

Especie	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>S. cerevisiae</u>	31,25	56,25	31,25	47
<u>S. rosei</u>	18,75	-	-	-
<u>S. exiguus</u>	31,25	-	31,25	11,5
<u>S. chevalieri</u>	6,25	25	-	6
<u>S. fermentati</u>	-	12,50	12,50	23,5
<u>S. fructuum</u>	6,25	-	6,25	-
<u>S. steineri</u>	6,25	-	-	-
<u>S. sp.</u>	-	-	-	6
<u>S. veronae</u>	-	-	-	6
<u>S. feduchyi</u>	-	6,25	18,75	-

* Inicio de la fermentación.

TABLA 38.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y alcohol a Bé = 0. *

Especie	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>S. cerevisiae</u>	30,75	10	55	20
<u>S. exiguus</u>	30,75	5	5	5
<u>S. chevalieri</u>	15,40	50	15	35
<u>S. italicus</u>	-	5	-	-
<u>S. fermentati</u>	7,70	-	10	35
<u>S. fructuum</u>	-	20	5	-
<u>S. heterogenicus</u>	15,40	-	-	-
<u>S. steineri</u>	-	-	-	5
<u>S. feduchyi</u>	-	10	10	-

* Fermentación finalizada.

TABLA 39.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y alcohol en fase de crianza. *

Especie	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>S. exiguus</u>	-	-	15	-
<u>S. fermentati</u>	-	-	-	5
<u>S. sp.</u>	5,9	-	-	-
<u>S. beticus</u>	70,6	80	5	10
<u>S. feduchyi</u>	23,5	20	80	85

* 40 días después de finalizada la fermentación.

2.2.5.- Especies de Saccharomyces en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso, sulfuroso y alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 40.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso, sulfuroso y alcohol a Bé, 10.*

Especie	Depósitos			
	1	3	4	
<u>S. cerevisiae</u>	50	-	38,5	
<u>S. exiguus</u>	-	-	30,7	
<u>S. chevalieri</u>	50	100	15,4	
<u>S. fermentati</u>	-	-	7,7	
<u>S. beticus</u>	-	-	7,7	

* Inicio de la fermentación.

No se considera el depósito 2 por no haberse aislado en él especies de Saccharomyces.

TABLA 41.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso, sulfuroso y alcohol a Bé = 0. *

Especie	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>S. cerevisiae</u>	62,50	26,7	53,9	6,6
<u>S. exiguus</u>	-	13,5	30,7	46,6
<u>S. chevalieri</u>	6,25	6,6	7,7	33,4
<u>S. fermentati</u>	-	-	-	13,4
<u>S. fructuum</u>	-	-	7,7	-
<u>S. heterogenicus</u>	12,50	40	-	-
<u>S. oviformis</u>	6,25	6,6	-	-
<u>S. rouxii</u>	6,25	-	-	-
<u>S. steineri</u>	-	6,6	-	-
<u>S. beticus</u>	6,25	-	-	-

* Fermentación finalizada.

TABLA 42.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso, sulfuroso y alcohol en fase de crianza. *

Especie	Depósitos			
	1	2	3	4
<u>S. cerevisiae</u>	88	79,2	22,5	33,4
<u>S. exiguus</u>	6	5,2	16,5	13,4
<u>S. chevalieri</u>	-	-	55,5	40
<u>S. fermentati</u>	-	-	-	6,6
<u>S. fructuum</u>	-	15,6	5,5	5,6
<u>S. beticus</u>	6	-	-	-

* 40 días después de finalizada la fermentación.

2.3.- Efecto de los factores de corrección empleados, sobre el número total de levaduras y bacterias en mostos en distintas fases de fermentación.

En la experiencia anteriormente descrita se ha estudiado el efecto selectivo ejercido por los factores de corrección empleados sobre los distintos tipos de levaduras y especies de Saccharomyces aisladas, así como la variación relativa de la proporción levaduras-bacterias.

Con esta experiencia se ha querido estudiar, de forma cuantitativa, el efecto ejercido por los citados agentes correctores tanto sobre el conjunto de levaduras como de bacterias.

En el caso de levaduras se determinó el número total de células por c.c. de las mismas a las 0 y 24h. así como al final de la fermentación; mientras que en el caso de las bacterias solamente se determinó su concentración a las 24h. y al final de la fermentación. Las técnicas empleadas en uno y otro caso fueron las descritas en el apartado correspondiente del capítulo anterior, y los resultados son los que se expresan en las tablas siguientes:

TABLA 43.-

Efecto de la adición de los distintos agentes correctores sobre la población de levaduras presentes en el depósito n° 1.

Tratamiento	N° de levaduras (células/ml).		
	0 horas	24 horas *	10 días **
Ninguno	1.800.000	6.560.000	18,7 x 10 ⁶
TY	1.800.000	6.560.000	17 x 10 ⁶
TY + J	1.800.000	13.000	28,3 x 10 ⁶
TY + J + A	1.800.000	10.500	-
TY + A	1.800.000	3.520.000	25,6 x 10 ⁶

* Inicio fermentación; Bé > 10.

** Final fermentación; Bé = 0.

TABLA 44.-

Efecto de la adición de los distintos agentes correctores sobre la población de levaduras presentes en el depósito n° 2

Tratamiento	N° de levaduras (células/ml).		
	0 horas	24 horas *	10 días **
Ninguno	1.000.000	14.720.000	38 x 10 ⁶
TY	1.000.000	17.280.000	132 x 10 ⁶
TY + J	1.000.000	3.000	114 x 10 ⁶
TY + J + A	1.000.000	2.500	66 x 10 ⁶
TY + A	1.000.000	7.360.000	64 x 10 ⁶

* Inicio fermentación; Bé > 10.

** Final fermentación; Bé = 0.

TABLA 45.-

Efecto de la adición de los distintos agentes correctores sobre la población de levaduras presentes en el depósito N° 3.

Tratamiento	N° de levaduras (células/ml).		
	0 horas	24 horas *	10 días **
Ninguno	1.600.000	11.520.000	20 x 10 ⁶
TY	1.600.000	3.720.000	27 x 10 ⁶
TY † J	1.600.000	2.000	19 x 10 ⁶
TY † J † A	1.600.000	4.000	24 x 10 ⁶
TY † A	1.600.000	360.000	21,6 x 10 ⁶

* Inicio fermentación; Bé > 10.

** Final fermentación; Bé = 0.

TABLA 46.-

Efecto de la adición de los distintos agentes correctores sobre la población de levaduras presentes en el depósito n° 4.

Tratamiento	N° de lecaduras (células/ml).		
	0 horas	24 horas *	10 días **
Ninguno	2.000.000	16.000.000	80 x 10 ⁶
TY	2.000.000	18.560.000	78 x 10 ⁶
TY † J	2.000.000	9.000	112 x 10 ⁶
TY † J † A	2.000.000	256.000	94 x 10 ⁶
TY † A	2.000.000	4.700.000	114 x 10 ⁶

* Inicio fermentación; Bé > 10.

** Final fermentación; Be = 0.

TABLA 47.-

Efecto de la adición de los distintos agentes correctores sobre la población de bacterias presentes en el depósito n° 1.

Tratamiento	N° de bacterias (células/ml).		Disminución (%)	
	24 horas *	10 días **	24 horas *	10 días **
Ninguno	11.058.160	10.923.500	-	-
TY	15.293	294.100	99,8	97,1
TY + J	70.584	38.821	99,3	99,6
TY + J + A	41.074	44.703	99,6	99,5
TY + A	52.936	29.410	99,5	99,7

* Inicio fermentación; Bé > 10.
 ** Final fermentación; Bé = 0.

TABLA 48.-

Efecto de la adición de los distintos agentes correctores sobre la población de bacterias presentes en el depósito n° 2

Tratamiento	N° de bacterias (células/ml).		Disminución (%)	
	24 horas *	10 días **	24 horas *	10 días **
Ninguno	882.300	2.441.030	-	-
TY	17.646	53.938	98,1	97,8
TY + J	11.764	17.646	98,8	99,3
TY + J + A	11.764	5.882	98,8	99,8
TY + A	23.500	23.428	97,5	99,2

* Inicio fermentación; Bé > 10.
 ** Final fermentación; Bé = 0.

TABLA 49.-

Efecto de la adición de los distintos agentes correctores sobre la población de bacterias presentes en el depósito n° 3.

Tratamiento	N° de bacterias (células/ml).		Disminución (%)	
	24 horas *	10 días **	24 horas*	10 días**
Ninguno	1.176.420	22.645.000	-	-
TY	99.994	176.460	92,	99,2
TY † J	11.764	23.528	99	99,90
TY † J † A	17.646	17.640	98,5	99,92
TY † A	29.410	29.410	98	99,90

* Inicio fermentación; Bé > 10.

** Final fermentación; Bé = 0.

TABLA 50.-

Efecto de la adición de los distintos agentes correctores sobre la población de bacterias presentes en el depósito n° 4.

Tratamiento	N° de bacterias (células/ml).		Disminución (%)	
	24 horas *	10 días**	24 horas*	10 días**
Ninguno	4.764.420	1.729.308	-	-
TY	11.764	41.174	99,8	97,7
TY † J	23.528	23.528	99,6	98,7
TY † J † A	11.764	17.646	99,8	99
TY † A	29.410	64.702	99,5	97

* Inicio fermentación; Bé > 10.

** Final fermentación; Bé = 0.

3.- Estudios realizados en la vendimia de 1972

En esta vendimia se realizaron las mismas experiencias que en la anterior con excepción de estudio cuantitativo, pero estudiando además el efecto independiente del alcohol y del sulfuroso, así como la mezcla de ambos, -alcohol y sulfuroso-. Dado que al introducir estas nuevas variantes, el número de aislamientos e identificaciones aumentó sensiblemente, hubo que reducir el número de muestras a estudiar, de forma que solamente se estudiaron las correspondientes a dos depósitos, igualmente escogidos al azar y que designamos respectivamente con los números 1 y 2.

De otra parte viendo el efecto selectivo que el proceso de crianza introduce tanto en el tipo de levaduras como en las especies del género Saccharomyces, se consideró oportuno realizar los últimos aislamientos en un periodo más avanzado de la fase de crianza, 60 días, al objeto de confirmar el proceso de selección - antes citado.

3.1.- Estudio de la flora microbiana, levaduras y bacterias, en mostos naturales y corregidos durante la fermentación e inicio de crianza.

3.1.1.- Levaduras y bacterias en mostos naturales en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 51.-

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, y de bacterias en mostos naturales en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

Microorganismos	Depósito	Bé > 10	Bé = 0	Crianza*
<u>Kloeckera</u>	1	53	-	-
	2	33	-	-
<u>Candida</u>	1	0,5	-	-
	2	0,7	-	-
<u>Saccharomyces</u>	1	43,5	100	-
	2	64,9	100	-
<u>Pichia</u>	1	3	-	-
	2	1,4	-	-
Bacterias	1	-	-	100
	2	-	-	100

* 60 días después de finalizada la fermentación.

3.1.2.- Levaduras y bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico y yeso en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 52.-

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, y de bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico y yeso en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

Microorganismos	Depósito	Bé > 10	Bé = 0	Crianza *
<u>Kloeckera</u>	1	18	-	-
	2	32	-	-
<u>Candida</u>	1	2	-	-
	2	1	-	-
<u>Saccharomyces</u>	1	80	100	45
	2	67	100	100
<u>Pichia</u>	1	-	-	55
	2	-	-	-
Bacterias	1	-	-	-
	2	-	-	-

* 60 días después de finalizada la fermentación.

3.1.3.- Levaduras y bacterias en mostos corregidos con sulfuroso en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 53.-

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, y de bacterias en mostos corregidos con sulfuroso en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

Microorganismos	Depósito	Bé > 10	Bé = 0	Crianza*
<u>Kloeckera</u>	1	-	-	-
	2	-	-	-
<u>Torulopsis</u>	1	5	-	-
	2	-	-	-
<u>Saccharomyces</u>	1	34	99,4	33
	2	40	100	-
<u>Pichia</u>	1	-	-	-
	2	-	-	100
<u>Saccharomycodes</u>	1	60,9	0,6	2
	2	59	-	-
Bacterias	1	0,1	-	65
	2	1	-	-

* 60 días después de finalizada la fermentación.

3.1.4.- Levaduras y bacterias en mostos corregidos con alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 54.-

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, y de bacterias en mostos corregidos con alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

Microorganismos	Depósito	Bé > 10	Bé = 0	Crianza*
<u>Kloeckera</u>	1	32	-	-
	2	10,5	-	-
<u>Candida</u>	1	-	-	-
	2	0,5	-	-
<u>Saccharomyces</u>	1	67,5	100	65
	2	87	100	100
<u>Pichia</u>	1	-	-	-
	2	1,5	-	-
Bacterias	1	0,5	-	35
	2	0,5	-	-

* 60 días después de finalizada la fermentación.

3.1.5.- Levaduras y bacterias en mostos corregidos con sulfuroso y alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 55.-

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, y de bacterias en mostos corregidos con sulfuroso y alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

Microorganismos	Depósito	Bé > 10	Bé = 0	Crianza*
<u>Saccharomyces</u>	1	-	95	80
	2	-	84,5	100
<u>Pichia</u>	1	-	-	-
	2	20	-	-
<u>Saccharomycodes</u>	1	-	5	-
	2	80	15,5	-
Bacterias	1	-	-	20
	2	-	-	-

* 60 días después de finalizada la fermentación.

3.1.6.- Levaduras y bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y sulfuroso en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 56.-

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, y de bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y sulfuroso en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

Microorganismos	Depósito	Bé > 10	Bé = 0	Crianza*
<u>Saccharomyces</u>	1	-	63	90
	2	-	70	30
<u>Saccharomycodes</u>	1	80	37	10
	2	100	30	70
Bacterias	1	20	-	-
	2	-	-	-

* 60 días después de finalizada la fermentación.

3.1.7.- Levaduras y bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 57.-

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, y de bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

Microorganismos	Depósito	Bé > 10	Bé = 0	Crianza*
<u>Kloeckera</u>	1	9	-	-
	2	12	-	-
<u>Candida</u>	1	-	-	-
	2	1	-	-
<u>Saccharomyces</u>	1	76	100	100
	2	86	100	100
<u>Pichia</u>	1	-	-	-
	2	1	-	-
Bacterias	1	15	-	-
	2	-	-	-

* 60 días después de finalizada la fermentación.

3.1.8.- Levaduras y bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso, sulfuroso y alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 58.-

Porcentaje de levaduras, distribuidas por géneros, y de bacterias en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso, sulfuroso y alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

Microorganismos	Depósito	Bé > 10	Bé = 0	Crianza*
<u>Saccharomyces</u>	1	-	70	100
	2	-	20	-
<u>Pichia</u>	1	-	-	-
	2	-	-	-
<u>Saccharomycodes</u>	1	50	30	-
	2	100	80	100
Bacterias	1	50	-	-
	2	-	-	-

* 60 días después de finalizada la fermentación.

3.2.- Estudio de la distribución de las distintas especies del género Saccharomyces en mostos naturales y corregidos durante la fermentación e inicio de crianza.

3.2.1.- Especies de Saccharomyces en mostos naturales en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 59.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos naturales en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

Espece	Depósito	Bé > 10	Bé = 0	Crianza*
<u>S. cerevisiae</u>	1	40	50	-
	2	16,6	11,2	-
<u>S. rosei</u>	1	20	-	-
	2	16,6	-	-
<u>S. exiguus</u>	1	10	5	-
	2	25	5,5	-
<u>S. chevalieri</u>	1	-	10	-
	2	16,6	55,5	-
<u>S. delbrueckii</u>	1	-	5	-
	2	-	-	-
<u>S. fermentati</u>	1	10	30	-
	2	16,6	11,2	-
<u>S. veronae</u>	1	20	-	-
	2	8,6	-	-
<u>S. feduchyi</u>	1	-	-	-
	2	-	16,6	-

* 60 días después de finalizada la fermentación y no se considera esta fase por no haberse aislado en él especies de Saccharomyces.

3.2.2.- Especies de Saccharomyces en mostos corregidos con ácido tartárico y yeso en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 60.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos corregidos con ácido tartárico y yeso en distintas fases de la fermentación e inicio de crianza.

Espece	Depósito	Bé > 10	Bé = 0	Crianza*!
<u>S. cerevisiae</u>	1	69,2	57,9	-
	2	27,3	25	-
<u>S. rosei</u>	1	7,7	-	-
	2	9,1	-	-
<u>S. exiguus</u>	1	-	-	-
	2	18,1	-	-
<u>S. chevalieri</u>	1	-	21	-
	2	9,1	65	-
<u>S. italicus</u>	1	-	5,3	-
	2	-	-	-
<u>S. fermentati</u>	1	7,7	15,8	-
	2	27,3	5	-
<u>S. veronae</u>	1	7,7	-	-
	2	-	-	-
<u>S. marxianus</u>	1	-	-	-
	2	9,1	-	-
<u>S. oviformis</u>	1	7,7	-	-
	2	-	-	-
<u>S. feduchyi</u>	1	-	-	100
	2	-	5	100

* 60 días después de finalizada la fermentación.

3.2.3.- Especies de Saccharomyces en mostos corregidos con sulfuroso en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 61.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos corregidos con sulfuroso en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

Especie	Depósito	Bé > 10	Bé = 0	Crianza*
<u>S. cerevisiae</u>	1	-	38,8	70
	2	37,5	61,9	-
<u>S. rosei</u>	1	-	-	-
	2	12,5	-	-
<u>S. exiguus</u>	1	66,6	33,3	10
	2	12,5	14,3	-
<u>S. chevalieri</u>	1	-	11,2	10
	2	25	9,5	-
<u>S. fermentati</u>	1	16,7	11,2	10
	2	12,5	14,3	-
<u>S. acidifaciens</u>	1	16,7	-	-
	2	-	-	-
<u>S. elegans</u>	1	-	5,5	-
	2	-	-	-

* 60 días después de finalizada la fermentación.

3.2.4.- Especies de Saccharomyces en mostos corregidos con alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 62.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos corregidos con alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

Espece	Depósito	Bé > 10	Bé = 0	Crianza*
<u>S. cerevisiae</u>	1	31,25	35	-
	2	25	35	-
<u>S. rosei</u>	1	25	-	-
	2	8,3	-	-
<u>S. exiguus</u>	1	-	30	-
	2	-	5	-
<u>S. chevalieri</u>	1	6,25	15	-
	2	25	35	-
<u>S. fermentati</u>	1	6,25	20	-
	2	8,3	-	100
<u>S. veronae</u>	1	12,5	-	-
	2	16,8	-	-
<u>S. carlbergensis</u>	1	6,25	-	-
	2	-	-	-
<u>S. fructuum</u>	1	-	-	-
	2	8,3	-	-
<u>S. oviformis</u>	1	12,5	-	-
	2	-	-	-
<u>S. steineri</u>	1	-	-	-
	2	8,3	5	-
<u>S. feduchyi</u>	1	-	-	-
	2	-	20	100

* 60 días después de finalizada la fermentación.

3.2.5.- Especies de Saccharomyces en mostos corregidos con sulfuroso y alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 63.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos corregidos con sulfuroso y alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

Espece	! Depósito !	! Bé > 10 !	! Bé = 0 !	! Crianza* !
<u>S. cerevisiae</u>	! 1 !	! - !	! 10,5 !	! 68,5 !
	! 2 !	! - !	! 60 !	! 95 !
<u>S. exiguus</u>	! 1 !	! - !	! 10,5 !	! - !
	! 2 !	! - !	! 13,3 !	! - !
<u>S. chevalieri</u>	! 1 !	! - !	! 26,5 !	! 25,2 !
	! 2 !	! - !	! 20 !	! - !
<u>S. delbrueckii</u>	! 1 !	! - !	! - !	! 6,3 !
	! 2 !	! - !	! - !	! - !
<u>S. italicus</u>	! 1 !	! - !	! 10,5 !	! - !
	! 2 !	! - !	! - !	! - !
<u>S. fermentati</u>	! 1 !	! - !	! - !	! - !
	! 2 !	! - !	! - !	! 5 !
<u>S. fructuum</u>	! 1 !	! - !	! - !	! - !
	! 2 !	! - !	! 6,7 !	! - !
<u>S. feduchyi</u>	! 1 !	! - !	! 42 !	! - !
	! 2 !	! - !	! - !	! - !
=====	! ===== !	! ===== !	! ===== !	! ===== !

* 60 días después de la fermentación, no considerándose la fase B>10 por no haberse aislado en el especies de Saccharomyces.

3.2.6.- Especies de Saccharomyces en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y sulfuroso en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 64.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y sulfuroso en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

Espece	! Depósito !	! Bé > 10 !	! Bé = 0 !	! Crianza [†] !
<u>S. cerevisiae</u>	! 1 !	! - !	! 7,1 !	! 87,5 !
	! 2 !	! - !	! 38,4 !	! - !
<u>S. exiguus</u>	! 1 !	! - !	! 28,5 !	! - !
	! 2 !	! - !	! - !	! 12,5 !
<u>S. chevalieri</u>	! 1 !	! - !	! 43 !	! - !
	! 2 !	! - !	! 7,7 !	! - !
<u>S. fermentati</u>	! 1 !	! - !	! 7,1 !	! - !
	! 2 !	! - !	! 46,2 !	! 83 !
<u>S. oviformis</u>	! 1 !	! - !	! - !	! - !
	! 2 !	! - !	! - !	! 17 !
<u>S. steineri</u>	! 1 !	! - !	! - !	! - !
	! 2 !	! - !	! 7,7 !	! - !
<u>S. feduchyi</u>	! 1 !	! - !	! 14,3 !	! - !
	! 2 !	! - !	! - !	! - !

* 60 días después de la fermentación, no considerándose la fase B > 10 por no haberse aislado en él especies de - Saccharomyces.

3.2.7.- Especies de Saccharomyces en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 65.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

Especie	Depósito	Bé > 10	Bé = 0	Crianza*
<u>S. cerevisiae</u>	1	33,2	52,6	-
	2	31,25	26,3	-
<u>S. rosei</u>	1	6,7	-	-
	2	6,25	-	-
<u>S. exiguus</u>	1	20	-	-
	2	18,75	26,3	-
<u>S. chevalieri</u>	1	6,7	15,8	-
	2	12,5	31,6	-
<u>S. fermentati</u>	1	20	15,8	22
	2	12,5	5,3	-
<u>S. fructuum</u>	1	-	-	-
	2	6,25	-	-
<u>S. oviformis</u>	1	6,7	-	-
	2	6,25	-	-
<u>S. steineri</u>	1	-	5,3	-
	2	-	-	-
<u>S. veronae</u>	1	6,7	-	-
	2	6,25	-	-
<u>S. beticus</u>	1	-	-	16
	2	-	-	-
<u>S. feduchyi</u>	1	-	10,5	62
	2	-	10,5	100

* 60 días después de finalizada la fermentación.

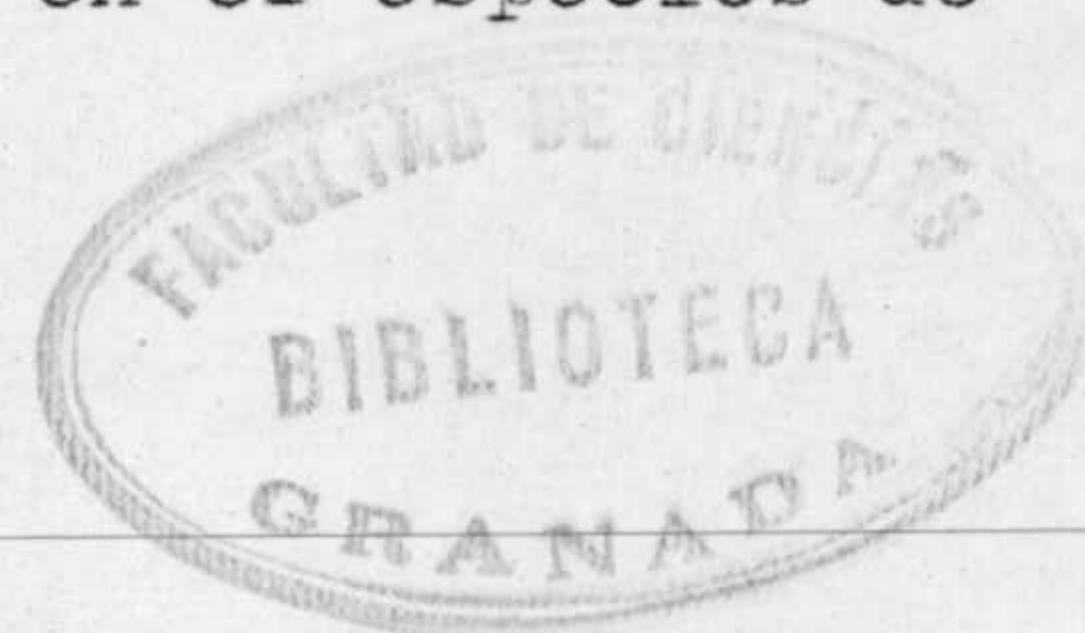
3.2.8.- Especies de Saccharomyces en mostos corregidos con ácido - tartárico, yeso, sulfuroso y alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

TABLA 66.-

Porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso, sulfuroso y alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza.

Espece	Depósito	Bé > 10	Bé = 0	Crianza*
<u>S. cerevisiae</u>	1	-	13,6	-
	2	-	-	-
<u>S. exiguus</u>	1	-	40	-
	2	-	-	-
<u>S. chevalieri</u>	1	-	-	-
	2	-	75	-
<u>S. fermentati</u>	1	-	6,6	84,3
	2	-	-	-
<u>S. fructuum</u>	1	-	6,6	-
	2	-	-	-
<u>S. heterogenicus</u>	1	-	6,6	-
	2	-	25	-
<u>S. rouxii</u>	1	-	-	5,2
	2	-	-	-
<u>S. feduchyi</u>	1	-	26,6	10,5
	2	-	-	-

* 60 días después de la fermentación, no considerándose la fase B > 10 por no haberse aislado en él especies de - Saccharomyces.



3.3.- Estudios sobre la posible conversión de las especies de Saccharomyces que intervienen en la fermentación en variedades filmógenas.

En los estudios realizados por Iñigo Leal (39) sobre la flora de levaduras presentes en distintas fases de fermentación de mostos de Jerez, no fueron nunca detectadas la presencia de especies de Saccharomyces que se encuentran posteriormente en velos o "flor" durante la fase de crianza - de estos vinos; por lo que este autor había propuesto la hipótesis de que posiblemente especies fermentativas típicas, tales como S. chevalieri, S. exiguus y otras, fueron las mismas que posteriormente constituyen los velos durante el proceso de crianza, como consecuencia de una variación genética que le confiriese dicha capacidad. Habida cuenta que a más de la citada capacidad de formación de velo, la única diferencia bioquímica - existente entre los Saccharomyces filmógenas y los Saccharomyces fermentativos, citados anteriormente, es su incapacidad para utilizar la galactosa.

En nuestro trabajo y como ha sido expuesto, se ha podido comprobar la presencia de especies filmógenas en las fases de fermentación, por lo que no es necesario acudir a la citada hipótesis para explicar su posterior aparición y predominio de la etapa de crianza; no obstante al objeto de descartar totalmente la posibilidad citada de conversión de especies fermentativas en filmógenas, se realizaron una serie de experiencias en las que se comprobó si las especies fermentativas cultivadas en condiciones similares a las existentes en el periodo de crianza, adquiriría la capacidad de formar velo; las especies empleadas así como su comportamiento en relación con la utilización de distintos azúcares se expone en la tabla siguiente:

TABLA 67.-

Comportamiento de las levaduras ensayadas frente a los azúcares de prueba.

Espece	!	G	Ga	S	M	L	R	!
<u>S. cerevisiae</u>	!	A/G	A/G	A/G	A/G	-	1/3	!
<u>S. exiguus</u>	!	A/G	A/G	A/G	-	-	1/3	!
<u>S. chevalieri</u>	!	A/G	A/G	A/G	-	-	1/3	!
<u>S. oviformis</u>	!	A/G	-	A/G	A/G	-	-	!
<u>S. feduchyi</u>	!	A/G	-	A/G	-	-	1/3	!
=====	!	=====	=====	=====	=====	=====	=====	!

Para la realización de las experiencias, todas las especies se cultivaron en medio de Lindegren y al. (1958) medio líquido 24h. en agitación recogidos por centrifugación y resuspendido en solución salina; este inóculo se sembró sobre 300 c.c. de mostos estériles mantenido 48h. a 30°C. y posteriormente conservado a 20°C de temperatura.

A los tres días de la siembra se observa el inicio de la fermentación en todos los erlenmeyer, a continuación se le añaden 3 c.c. de alcohol estéril a las muestras y se sigue observando periódicamente la aparición o no de velo o "flor", resultados que se recogen en la siguiente tabla:

TABLA 68.-

Formación de velo sobre mostos por distintas especies de Saccharomyces.

Especie	! 11 dias !	! 14 dias !	! 30 dias !	! 65 dias !
<u>S. cerevisiae</u>	!	!	!	!
<u>S. exiguus</u>	!	!	!	!
<u>S. chevalieri</u>	!	!	!	!
<u>S. oviformis</u>	!	!	!	!
<u>S. feduchyi</u>	!	!	!	!
<u>S. exiguus</u> + <u>S. cerevisiae</u>	!	!	!	!
<u>S. oviformis</u> + <u>S. cerevisiae</u>	!	!	!	!
<u>S. chevalieri</u> + <u>S. cerevisiae</u>	!	!	!	!
<u>S. feduchyi</u> + <u>S. cerevisiae</u>	!	!	!	!
=====	=====	=====	=====	=====

"Islotes": Trozos de velo que van apareciendo en la superficie del mosto y que es el inicio del auténtico velo o "flor".

(-) : No se aprecia ningún desarrollo en superficie, ni velo ni islotes.

Después de esta experiencia podemos considerar las especies filmógenas S. feduchyi, como la única de las ensayadas que es capaz de producir velo y en ningún caso, ni consideradas aisladamente o en mezclas con S. cerevisiae, aparece la formación de "flor", por las especies fermentativas.

Como puede observarse en ningún caso pese a la cantidad masiva de levaduras empleadas como inóculo y el periodo de fermentación que tiene lugar antes de la adición de alcohol, ninguna de las células de tipo fermentativo dieron lugar a la producción de velo, por lo que hay que concluir - que las levaduras filmógenas están ya presentes durante el periodo de fermentación como especies distintas y que si no se detecta es debido a su escasa proporción.

DISCUSSION



DISCUSION

Al iniciar la discusión de los Resultados, expuestos en el capítulo anterior, debe hacerse incapie en las experiencias previas relacionadas con el empleo del agar levaduras sal de Davis a pH 3,5 para recuento de los distintos tipos de levaduras y bacterias del género Acetobacter en los mostos a analizar, ya que consideramos que la utilización, para este fin, del citado medio constituye una aportación original al estudio de la flora microbiana del mosto de Jerez y que, por tanto, su utilización con éxito como medio de identificación, a nivel de género, de las levaduras consideramos es una de las conclusiones válidas de este trabajo.

Por lo demás, se ha considerado conveniente efectuar la discusión de los datos obtenidos agrupándolos por vendimias, dado que tal como se expone en el capítulo de Resultados, los estudios realizados en las de 1969 y 70 sirvieron de base para planificar los más completos y sistemáticos realizados posteriormente, a más de que en las citadas vendimias los mostos utilizados, corregidos o no, no fueron homogéneos.

VENDIMIA 1969

Los resultados de la vendimia de 1969 lo hemos esquematizados en las tablas 1 a 6. En la primera podemos ver que a Bé mayor de 10, es decir, una vez terminada la "pisa" y antes de que se inicie la fermentación, los resultados descritos dan un valor medio para las levaduras del 86,5% con un máximo de presencia de estos microorganismos del 94,5% en la viña Amorosa II y un mínimo del 63% en Panameña, siendo las cifras más dominantes por encima del 90%. Los hongos en este primer aislamiento tuvieron una media del 8,5%, con un máximo del 37% en Panameña, valor demasiado grande y que debe considerarse como excepcional, y con un mínimo del 0% en Peonías II; las bacterias tipo Acetobacter, que aislamos con facilidad en el medio utilizado, tuvieron un valor medio del 5%, no habiéndose aislado en cinco muestras, lo que no quiere decir que no las hubiera, únicamente que no se aislaron.

En la tabla 2, hay algunas muestras que aparecen como no estudiadas: en realidad lo que ocurrió es que cuando calculamos la graduación de los mostos o todavía no habían llegado al límite impuesto por nosotros de 4-6 Bé o ya se habían pasado, y únicamente realizamos los aislamientos en las muestras comprendidas entre los límites ya establecidos. Por esta razón solo pudimos estudiar siete muestras, encontrando en estas un porcentaje superior al 88% de levaduras y solo un 11,7% de bacterias. Con relación a los datos obtenidos en la tabla 1ª, encontramos, pues, un ligero aumento del número de levaduras y de bacterias, y una ausencia total de colonias de hongos. En estos aislamientos a media fermentación, tres de las siete muestras han presentado un 100% de levaduras, siendo de destacar la presencia de bacterias en Canariera II y AB-II en cantidades importantes, 21 y 29% respectivamente.

La tabla 3, que representa los porcentajes a $Bé = 0$, vienen a coincidir en líneas generales con los encontrados en los anteriores aislamientos, y así tenemos para levaduras un valor medio del 90,7% y del 9,3% para bacterias, aunque si descartamos los resultados anómalos de las muestras procedentes de S. Antonio y El Cuadrado, con 69 y 56% de levaduras, entonces el porcentaje medio de levaduras representaría un 95%, quedando reducidas las bacterias al 5%. En este tercer aislamiento tampoco aislamos ningún tipo de hongos filamentosos, o sea que estos microorganismos no lo volvimos a encontrar pasada la primera fase de la fermentación.

Las bacterias que al principio se encuentran en escasa proporción, -5%- , a medida que transcurre el proceso fermentativo, presentan un ligero incremento, -11,7% y 9,3%-. En realidad estos microorganismos no son meros acompañantes de la uva, como le ocurre a los hongos, sino que se incorporan, -por decirlo de alguna manera, al proceso fermentativo, y debemos pensar que si no fuera por ciertos factores correctores, podrían constituir los microorganismos dominantes de los mostos. Su papel es muy importante ya que influyen con su metabolismo, fuertemente oxidativo, incrementando la acidez volátil.

En este primer año de trabajo, creimos interesante el condiderar, aunque -fuese a grandes rasgos, y sin diferenciar el efecto de cada uno de los factores de corrección, que estos ejercen sobre los microorganismos acompañantes del mosto. Comparando los resultados expresados en la tabla nº 5 -Porcentajes de microorganismos en mostos corregidos,- con los correspondientes mostos no corregidos, podemos observar, en todas las fases, diferencias -apreciables. Al inicio de la fermentación, -Bé mayor de 10- las levaduras

representan un 96%, frente al 90,6% en los mostos no tratados; los porcentajes de hongos filamentosos y bacterias son muy inferiores en los mostos corregidos comparándolo con los no corregidos. Pero si estos resultados - obtenidos al inicio de la fermentación son lo suficientemente claros y - demostrativos del efecto conjunto de estos factores de corrección, es a mediada la fermentación y al final de la misma, donde mejor se aprecia - este efecto, pues el 100% pertenecen a especies de levaduras. No obstante, como veremos en los resultados obtenidos en vendimias sucesivas esta acción de los correctores no es tan clara para el control y eliminación de las bacterias ya que de hecho siguen existiendo en el mosto, si bien en menor proporción lo que hace más difícil su aislamiento; por otra parte su presencia viene condicionada por el tipo de tratamiento dado al mosto.

La ausencia sistemática de hongos filamentosos, no solo en mostos corregidos sino en los no tratados mediada la fermentación y lógicamente al final de la misma, nos hacen considerarlos como meros microorganismos - acompañantes propios de la flora natural del mosto de Jerez, sin ningún papel demostrable en el proceso y que se eliminan de manera normal a medida que se pone en marcha el mecanismo fermentativo por las levaduras; sin embargo, las bacterias no sufren esta acción inhibidora del etanol, pues este incluso a determinada concentración podría favorecer el desarrollo de ellas por lo que su eliminación y control exige el empleo de correctores que reduzcan su número y por tanto su actividad.

En relación con las especies de levaduras encontradas, pensamos que no tenemos en esta primera vendimia resultados suficientes para sacar con-

clusiones; en primer lugar porque en este ensayo, al igual que en los realizados por Castelli, Iñigo Leal, etc. solamente hemos aislado cinco colonias por fase de aislamiento, número muy reducido que puede dar lugar a que cada una de las cinco colonias aisladas de una placa pertenezcan a géneros distintos, lo que hace imposible investigar las distintas especies de un mismo género presentes en las muestras. Igualmente el aislamiento de quince colonias en toda una fase fermentativa es insignificante e inadecuada para sacar conclusiones o porcentajes de las especies que han llevado a cabo el proceso, y creemos que no sirven ni siquiera para darnos una visión de conjunto de las especies que han intervenido. De todas formas estas 100 levaduras clasificadas en la vendimia de 1969 nos permitió confirmar que en los mostos de Jerez existen las especies típicas encontradas en mostos de diversas regiones españolas -Montilla, Rioja, Huelva, etc.- y europeas -Italia, Francia, Alemania, etc.- destacando la presencia de especies de Kloeckera, Candida, Pichia, Hansenula, etc.

Los Saccharomyces encontrados, principales responsables del proceso de fermentación, se indican en la tabla 4 donde se describen las especies encontradas en las catorce muestras estudiadas no corregidas. Podemos ver como el S. cerevisiae se encuentra en trece de las catorce viñas, excepto en Canaria I, sin embargo, el no haber encontrado S. cerevisiae en estas muestras no excluye su presencia por los motivos antes indicados en relación con el reducido número de colonias manejadas; en total se han clasificado 16 colonias como pertenecientes a este Saccharomyces. Le siguen en orden de frecuencia el S. rosei con 7 colonias repartidas en cinco de las catorce estudiadas; el S. fructuum y S. chevalieri con cinco, el S. exiguus con cuatro,

S. sp. con dos y por último, con una sola colonia S. delbrueckii y S. oviformis.

A pesar de la escasez de datos, los resultados obtenidos en vendimias posteriores coinciden en general con los encontrados durante esta primera vendimia. En la tabla 6, que recoge la distribución de levaduras en mostos corregidos, puede observarse el predominio de S. cerevisiae se acentúa, ya que se aísla de todas las muestras, siguiéndole el S. rosei y S. chevalieri, que se encuentran en dos muestras, y por último con una sola colonia tenemos S. fructuum; S. steineri; y S. fermentati.

Otro hecho que debiéramos considerar, pero que se tratará más amplamente al comentar los resultados obtenidos en otras vendimias, es que dentro de las especies clasificadas como Saccharomyces, no todas se encuentran en las tres fases estudiadas, por ejemplo el S. rosei, no se aísla en última fase de fermentación; este hecho se va a repetir con algunas otras especies de este género.

En este primer año se han clasificado pues un total de 105 colonias de levaduras procedentes de 17 muestras de mostos, de ellas 14 no tuvieron ningún tipo de corrección y 3 con todos los factores de corrección usados en el tratamiento de los mostos, las muestras procedían de viñas enclavadas en los tres pagos característicos de la zona del Jerez: Carrascal, Machar nudo y Balbaina. Dentro de las levaduras hay especies cuya presencia es importante al inicio de la fermentación, pero que no se encuentran en tercera fase, sin embargo su papel puede considerarse como importante, enológica mente hablando, pues los productos metabólicos que pueden producirse son indeseables para el producto final; nos referimos a las especies pertene-

tes a los géneros Kloeckera, Candida y Hansenula, que en general, desaparecen una vez iniciada la fermentación y otras, como les ocurren a las del género Pichia, que hemos aislado en los mostos incluso después de terminada la fermentación.

A la vista de estos resultados se podrían sacar ya algunas conclusiones sobre el tipo y evolución de la flora presente en los mostos de Jerez; no obstante dado el carácter preliminar de la experiencia realizada en esta vendimia y el escaso número de datos sobre los que se puede operar, la única conclusión clara que se puede deducir es que los hongos filamentosos ejercen un papel nulo en el proceso de fermentación y que por tanto su detección y recuento pueden ser excluidas en los estudios posteriores.

VENDIMIA 1970

En este segundo año de trabajo sobre las levaduras del Jerez, y tenidos en cuenta los datos obtenidos en la campaña anterior, introdujimos unas modificaciones en el plan de trabajo, tales como la ampliación del número de colonias de levaduras a estudiar en cada fase de fermentación a 30, lo que supone unas 90 levaduras por muestra de mosto, y la no investigación de los hongos en estos aislamientos. Se volvieron a estudiar las viñas de los tres pagos clásicos de Jerez: Carrascal, Macharnudo y Balbaina, con un total de cuatro muestras de las procedencias indicadas, en las que se realizaron los aislamientos en las tres fases fermentativas, -inicial, media y final- clasificándose un total de 324 colonias.

Los resultados obtenidos en esta vendimia se resumen en las tablas 7 al 12, donde recogemos los porcentajes de géneros y especies de las levaduras encontradas.

En las tablas 7, 8 y 9 se puede observar la evolución de la flora en mostos naturales durante las tres fases estudiadas; en la primera fase las levaduras no ascosporógenas del género Kloeckera se encuentran en todas las muestras en proporciones variables y las especies de Candida solamente en dos de las cuatro muestras estudiadas. Las levaduras ascosporógenas Saccharomyces; Pichia y Hansenula están en elevado porcentaje, fundamentalmente la primera de ellas oscilando desde un 79,8% en la muestra de la viña Caballero al 46,8% de Canariera.

En la fase media de la fermentación observamos especies pertenecientes a los géneros Saccharomyces, Pichia y bacterias tipo Acetobacter, con importante incremento de estas últimas en relación al porcentaje obtenido al

inicio y final de la fermentación; sin embargo sigue siendo la presencia de Saccharomyces lo más destacado de esta fase.

La fase final es muy similar a la anterior en cuanto a la presencia de las levaduras encontradas -Saccharomyces; Pichia y Acetobacter si bien el porcentaje de Saccharomyces es aún mayor que en la fase anterior, lo que confirma, en líneas generales, los resultados obtenidos en segunda fase, aunque las diferencias encontradas entre géneros se hace más patente, con una mayor reducción en los porcentajes de Pichia y Acetobacter en beneficio de los Saccharomyces.

Al aumentar durante esta vendimia de 1970 el número de colonias a clasificar aproximadamente a unas 30 por fase fermentativa, nos ha sido posible calcular el porcentaje de las especies de Saccharomyces en las distintas fases tal como se expresa en las tablas 10, 11 y 12 cuyos datos corresponden, respectivamente, al inicio, mitad y fin de la fermentación. En la fase inicial clasificamos cinco especies de Saccharomyces, estando presente en todas las muestras el S. cerevisiae; S. rosei y S. fructuum en proporciones variables; el S. exiguus y S. chevalieri se aislaron en tres y una muestra, respectivamente.

En la fase media de la fermentación, el número de especies de Saccharomyces aislados fué mayor, con un total de diez, sin embargo solo tres se encuentran en todos los mostos -S. cerevisiae; S. rosei; S. chevalieri; y el S. exiguus en tres de las cuatro muestras, estas cuatro especies constituyen más del 88% de los Saccharomyces aislados en esta fase; el resto de las especies la encontramos en proporciones escasas y solamente en una o dos muestras a lo sumo.

En la fase final, fermentación finalizada, a la que corresponde la tabla - 12, las especies S. cerevisiae; S. exiguus y S. chevalieri se encuentran en todas las muestras y en conjunto representan el 72, 90, 92 y 76 por ciento respectivamente, de los Saccharomyces aislados en las cuatro muestras, si - bien en relación a la fase anterior hay que destacar una mayor presencia de S. exiguus y S. chevalieri y una disminución del S. rosei. La presencia del S. feduchyi en esta última fase en tres de las cuatro muestras es un dato a tener en cuenta y que discutiremos al hablar de las levaduras de "flor" en apartados posteriores.

VENDIMIA 1971

Como ya expusimos en los resultados, los estudios de la vendimia de 1971 se realizaron sobre depósitos, sin tener en cuenta las viñas de procedencia, si bien todos los mostos proceden de los tres pagos en que se inició este trabajo en 1969. El número de depósitos analizados también fué de cuatro, sin embargo, el número de colonias estudiadas se aumentó a 1.022. Finalmente los mostos se investigaron al inicio y final de la fermentación y en fase de crianza, -cuarenta días después de finalizada la fermentación-. Los resultados obtenidos en esta vendimia se resúmen en las tablas 13 a 42 y recogen no solo los porcentajes de géneros y especies de levaduras encontradas, sino la influencia que sobre los mismos ejercen los distintos factores de corrección empleados.

En las tablas 13, 14 y 15 podemos observar la evolución de la flora en mostos naturales durante las tres fases estudiadas. En la primera fase las levaduras no ascospógenas -Kloeckera y Candida- están prácticamente en equilibrio con las ascospógenas de los géneros Saccharomyces, Pichia y Hansenula.

En la fase final de la fermentación, tabla 14, prácticamente solo encontramos levaduras del género Saccharomyces, no detectándose bacterias, lo que no quiere decir, como ya hemos repetido en numerosas ocasiones, que no estuvieran presentes, ya que como puede verse en la tabla 15, correspondiente a la fase de crianza, en dos de los cuatro depósitos, 1 y 3, solo se encontraron bacterias, lo que demuestran que forzosamente debían existir en la fase que discutimos. En las otras dos muestras los Saccharomyces continuaron siendo las levaduras predominantes junto a una pequeña propor

ción de Candida y Pichia.

En las tablas 16, 17 y 18 podemos observar la evolución de la flora en mostos corregidos con ácido tartárico y yeso durante las tres fases estudiadas. A primera vista observamos que al inicio de la fermentación se encuentran los mismos géneros de levaduras que en mostos naturales, si bien en proporciones ligeramente distintas, y que no se detectan bacterias; así pues, si bien la adición de ácido tartárico y yeso no influye marcadamente sobre los distintos géneros de levaduras si lo hace sobre las bacterias; esto, por si solo, justifica su empleo.

En la fase final de la fermentación vuelve a predominar notablemente los Saccharomyces aunque se detecta la presencia, en una muestra, de S'codes ludwigii, resultado sorprendente y sin explicación lógica, ya que como se verá más adelante, el aislamiento de esta especie viene condicionado fundamentalmente y diríamos que casi en exclusividad, por la presencia del sulfuroso en las muestras. En esta fase aparecieron bacterias en dos de las muestras.

Finalmente en la fase de crianza, si bien dos de las muestras evolucionaron favorablemente, con un claro predominio de Saccharomyces, en las otras dos predominaron otros tipos de levaduras y bacterias, si bien estas últimas no llegaron a constituir la totalidad de la flora como ocurre en mostos naturales. Esto nos lleva a considerar que la corrección con ácido tartárico y yeso como se ha dicho anteriormente debe mantenerse, si bien los resultados de la misma no son totalmente satisfactorios.

En las tablas 19, 20 y 21 se puede observar la evolución de la flora en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y sulfuroso durante las tres

fases estudiadas. En la primera, al inicio de la fermentación, aparecen por primera vez el S'codes ludwigii en tres de las cuatro muestras y en dos de ellas representa el 80% y 100% del total de la flora; las especies de Saccharomyces sufren una reducción importante, ya que no se detectaron en las muestras 1 y 3. Los otros microorganismos acompañantes fueron Pichia en dos muestras y Acetobacterias en tan solo una de ellas.

En la fase final de la fermentación, tabla 20, siguen apareciendo S'codes ludwigii en todas las muestras, si bien en proporción mucho menor, y constituyendo las especies de Saccharomyces el resto de la flora presente.

La tabla 21, después de 40 días de finalizada la fermentación, confirma la presencia de S'codes ludwigii en todas las muestras. La adición del sulfuroso en los mostos actúa pues, sobre la flora microbiana acompañante, seleccionando al S'codes ludwigii, que salvo en un caso no se había aislado hasta el momento, y reduciendo el número de microorganismos presentes en las muestras.

En las tablas 22, 23 y 24 observamos la evolución de la flora en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y alcohol en las tres fases estudiadas. En la primera fase, tabla 22, la adición de alcohol junto al ácido tartárico y yeso produce una reducción en cuanto al porcentaje de las especies de Kloeckera y Candida, favorece la presencia de Saccharomyces que llegan a constituir del 80,5% al 89,9% de la flora total y elimina las bacterias.

El empleo, pues, del alcohol como factor corrector es muy interesante dado que afecta tanto a las especies no ascospóroenas, reduciendo de manera importante su número, como a los Acetobacter que no aparecen en ninguna de

de las muestras de las tres fases estudiadas.

En las tablas 25, 26 y 27, podemos observar la evolución de la flora en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso, sulfuroso y alcohol en las tres fases estudiadas. En la tabla 25, que recoge la flora microbiana al inicio de la fermentación, destaca la presencia del S'codes ludwigii en todas las muestras y en proporciones que varían del 5,9 en el depósito nº 4 al 66% - en el nº 3; los Saccharomyces se encuentran disminuidos en dos de las muestras, números 2 y 3, no aislándose en la primera. Los Acetobacter no se aislaron en esta fase, aunque si especies de Pichia, Hansenula y Candida, si bien esta última en una sola muestra y con un 0,2% sobre el total de la flora.

La tabla 26, que recoge los datos obtenidos al final de la fermentación, nos sigue mostrando la presencia del S'codes ludwigii en todas las muestras pero representando los Saccharomyces un gran porcentaje que varían del 80 al 95%; proporciones que prácticamente se mantienen en la última fase estudiada, recogida en la tabla 27.

En las tablas 28, 29 y 30 se puede observar la distribución de las distintas especies de Saccharomyces en mostos naturales durante las tres fases estudiadas; en la tabla 28 se recoge el porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos naturales al inicio de la fermentación, destacando el S. cerevisiae presente en todas las muestras y en proporción variable de un 13,5% a un 75%. Le sigue el S. rosei presente en tres de las cuatro muestras con un máximo del 33,3%; S. exiguus, S. fermentati, S. chevalieri y S. veronae en dos de las cuatro muestras y S. marxianus y S. elegans en un solo depósito. En la tabla 29 describimos 12 espe-

cies de Saccharomyces aislados al final de la fermentación, destacando la presencia, en las cuatro muestras, del S. cerevisiae, S. chevalieri y S. fermentati que representa de un 63,3% a un 79,5% de todos los Saccharomyces presentes en esta fase; a continuación les siguen S. exiguus y S. heterogenicus aislados en dos y tres muestras respectivamente y la presencia del S. beticus y S. feduchyi.

La tabla 30, recoge los Saccharomyces en los depósitos 2 y 4 en fase de crianza encontrando al S. beticus y S. feduchyi que son levaduras típicas de "flor".

En las tablas 31, 32 y 33 podemos observar la distribución de las distintas especies de Saccharomyces en mostos corregidos con ácido tartárico y yeso en las distintas fases estudiadas. La primera de estas tablas recoge el porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces, describiendo once especies en total, si bien la proporción de las mismas es distinta, destacando S. cerevisiae, S. exiguus y S. chevalieri, en orden descendente.

En la tabla 32, que muestra el efecto del ácido tartárico y yeso al final de la fermentación, siguen destacando las especies descritas en el párrafo anterior, y se registra la presencia del S. beticus y S. feduchyi que constituirán en la fase de crianza -tabla 33- los únicos Saccharomyces aislados en los depósitos 2, 3 y 4.

En las tablas 34, 35 y 36 podemos observar la distribución de las especies de Saccharomyces en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y sulfuroso presentes en las tres fases; la tabla 34 que solo recoge los datos correspondientes a los depósitos 2 y 4, ya que no se aislaron Saccharomyces en los 1 y 3 en esta fase, muestran la presencia de los S. cerevisiae, S.

rosei, S. exiguus, S. chevalieri, etc.

Al final de la fermentación -tabla 35- el grueso de los Saccharomyces aislados lo constituyen los S. cerevisiae, S. exiguus y S. chevalieri. que - pueden llegar a representar en algunos depósitos el 100% de los Saccharomyces aislados, acompañándolos en menor proporción los S. fermentati y S. oviformis.

La tabla 36, recoge las especies presentes en fase de crianza, encontrándose se nueve especies de Saccharomyces de las que solo una, S. beticus corresponde a levaduras filmógenas, encontrándose solo en los depósitos 2 y 3 y con un porcentaje inferior al 7%. Esto viene a confirmar el efecto negativo que desarrolla sobre las levaduras de flor en fase de crianza La corrección con sulfuroso, al igual que lo hace sobre los Saccharomyces en general al comienzo de la fermentación, y que como es lógico se traduce en un retraso en el inicio de uno y otro proceso.

En las tablas 37, 38 y 39 podemos observar la distribución de la especie - de Saccharomyces en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y alcohol en las tres fases estudiadas. La tabla 37 recoge dicha distribución al inicio del proceso presenta las especies ya clásicas hasta ahora aisladas en esta fase ocupando el S. cerevisiae, S. exiguus, S. chevalieri y S. fermentati unos porcentajes globales que oscilan entre el 75 y 94% del total, - distribuyéndose el resto entre S. rosei, S. fructuum, S. veronae, etc.

Es de destacar el haber aislado en esta primera fase el S. feduchyi en dos muestras -depósitos 2 y 3- y en proporción del 6,25 y 18,75% respectivamente, hecho que no se había producido hasta el momento.

Al final de la fermentación -tabla 38- los S. cerevisiae, S. exiguus, S. -

chevalieri y S. fermentati siguen constituyendo las especies más frecuentes; también se encuentran en los depósitos el S. fructuum y el S. feduchyi -depósitos 2 y 3- y en una única muestra el S. italicus, S. heterogenicus y S. steineri.

La tabla 39 que recoge las especies de Saccharomyces encontrados en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y alcohol en fase de crianza muestra que los Saccharomyces de "flor" -S. beticus y S. feduchyi- representan del 85 al 100% de los Saccharomyces totales.

En las tablas 40, 41 y 42 podemos observar la distribución de las especies de Saccharomyces en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso, alcohol y sulfuroso en las tres fases estudiadas.

La tabla 40, que recoge dicha distribución al inicio de la fermentación, muestra la presencia de cinco especies de Saccharomyces, en los depósitos 1, 3 y 4, ya que el número 2 no se incluye por no haberse aislado en él especies de Saccharomyces. Se destaca el S. chevalieri presente en los tres depósitos y el S. cerevisiae en dos de ellos.

Al final de la fermentación -tabla 41- el número de especies de Saccharomyces aumenta hasta diez, destacando sobre las restantes S. cerevisiae, S. exiguus y S. chevalieri.

En suma, tres efectos de esta corrección son muy similares a los obtenidos cuando empleamos sulfuroso junto con tartárico y yeso.

Finalmente, en fase de crianza, resultados que recoge la tabla nº 42, no se aislaron los clásicos Saccharomyces de "flor" representados únicamente por el S. beticus con un 6% en el depósito 1, sino que predominan los S. cerevisiae, S. exiguus y S. chevalieri.

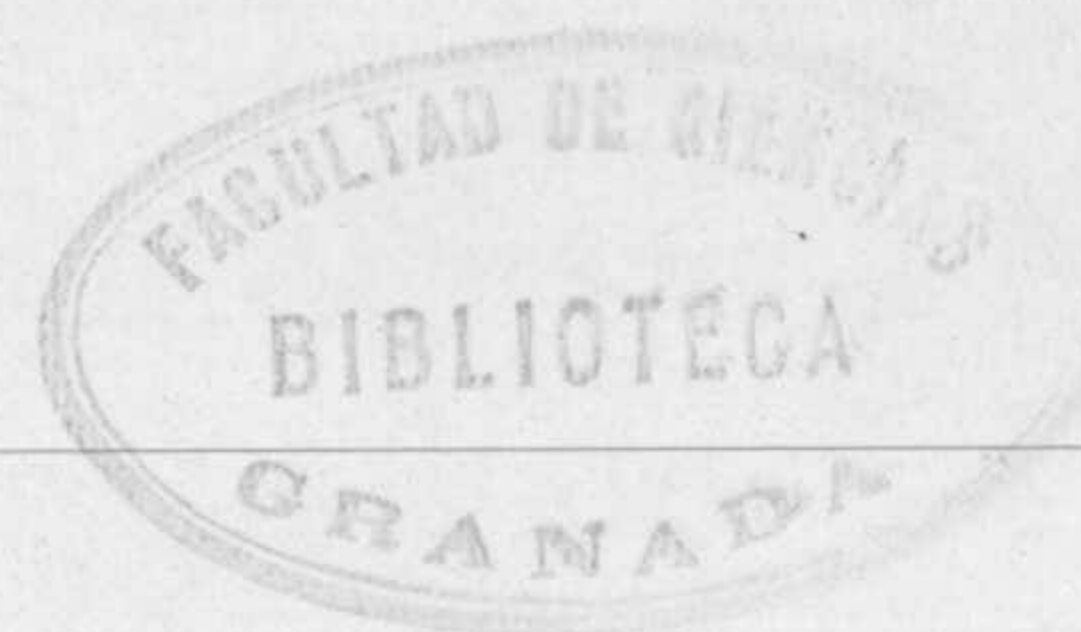
VENDIMIA 1972

Como ya decíamos en el capítulo de Resultados, durante esta vendimia introdujimos algunas variaciones en el empleo de los correctores, al objeto de comprobar el efecto de algunos de ellos cuando se emplean aisladamente sobre la flora microbiana. Dado el incremento en el número de pruebas a realizar hubo que reducir a dos los depósitos estudiados con un total de 832 colonias.

Al igual que en la vendimia anterior los estudios se realizaron al inicio, final de la fermentación y en fase de crianza, 60 días después de finalizada la fermentación; los resultados obtenidos en esta campaña se resumen en las tablas 51 a 66 que recogen no solo los porcentajes de géneros y especies de levaduras encontradas, sino la influencia que sobre las mismas ejercen los distintos factores de corrección empleados.

En la tabla 51 recogemos el porcentaje de levaduras distribuidas por géneros y de Acetobacter en mostos naturales en las tres fases estudiadas. En la primera fase, inicio de la fermentación, existe al igual que en la vendimia de 1971 un equilibrio entre especies no ascospórogenas Kloeckera, Candida y las ascospórogenas Saccharomyces y Pichia, no aislándose bacterias; al final del proceso el 100% de las levaduras encontradas pertenecen al género Saccharomyces. En el tercer aislamiento, las bacterias han reemplazado a los Saccharomyces constituyendo la flora predominante.

En la tabla 52 podemos observar la distribución por géneros de levaduras en mostos corregidos con ácido tartárico y yeso en distintas fases de la fermentación e inicio de crianza. En la primera fase se aíslan las levaduras ya clásicas, y al igual que en la vendimia anterior podemos decir que estos



correctores aunque no parecen afectar grandemente a estas especies, si influyen notablemente sobre las bacterias presentes al final de la fermentación.

Son las especies de Saccharomyces las que ocupan en los dos depósitos el 100% de las levaduras para aparecer, en fase de crianza, especies de Pichia. En la tabla 53 podemos observar la distribución de levaduras por géneros y de bacterias en mostos corregidos con sulfuroso en las distintas fases estudiadas; en primera fase -inicio de la fermentación- como ya venía siendo clásico al emplear este corrector, hay una selección de especies de Saccharomyces que llegan a alcanzar el 60,9% y 59% de la flora total en los depósitos 1 y 2, con la consiguiente reducción en el porcentaje de Saccharomyces, no aislándose especies de Kloeckera ni Candida y encontrándose bacterias en ambos depósitos aunque en escasa proporción 0,1% y 1%, respectivamente.

Al final del proceso hay una "recuperación" de los Saccharomyces como viene siendo característico en todos los casos estudiados, reduciéndose grandemente el porcentaje de Saccharomyces.

En fase de crianza aparecen una diversidad de microorganismos, ya que mientras en el depósito nº 2 el 100% de la flora total está constituido por especies de Pichia, en el nº 1 se lo reparten entre Saccharomyces, Saccharomyces y bacterias.

En la tabla 54 se puede observar el porcentaje de levaduras distribuidas por géneros y de bacterias en mostos corregidos con alcohol en las distintas fases estudiadas. En primera fase se puede apreciar un importante incremento de los Saccharomyces que ocupan el 67,5% y 87% del total, detectándose especies de Kloeckera y Candida, así como Pichia y bacterias. Es de des-

tacar el alto porcentaje de Kloeckera con un 32 y 10,5% respectivamente, en los depósitos 1 y 2. En fase final el 100% lo representan especies de Saccharomyces y en fase de crianza, aunque en el depósito 2 se mantiene esta situación, en el 1 se detecta una importante contaminación por Acetobacter. En la tabla 55 podemos observar los porcentajes de levaduras y bacterias en mostos corregidos con sulfuroso y alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza; en primera fase en el depósito nº 1 no se aislaron microorganismos, en el nº 2 se representan con el 20% de Pichia y 80% de Saccharomyces; al final del proceso se sigue aislando S'codes ludwigii en porcentajes del 5 y 15,5%, ocupando los Saccharomyces el 95 y 84,5%. En fase de crianza en el depósito nº 2 el 100% pertenece a especies de Saccharomyces; en el nº 1 tenemos 80% del mismo y un 20% de bacterias. Vemos que el fuerte efecto de ambos factores se contrarrestan y predominan cada uno en una fase, siendo típico el efecto del sulfuroso al inicio, quedando mucho más atenuado en la fase final; en la crianza es el alcohol quien impone su poder de selección.

En la tabla 56 podemos observar el efecto conjunto de ácido tartárico, yeso y sulfuroso sobre mostos en las distintas fases estudiadas; en el inicio de la fermentación debido a la presencia del sulfuroso, hay una selección de la especie S'codes ludwigii que representa el 80% y 100% de los depósitos 1 y 2 respectivamente. Al final de la fermentación aparecen los Saccharomyces, si bien se siguen manteniendo la especie resistente al sulfuroso que se continúa aislando en fase de crianza; constituyendo en el depósito nº 2 el 70%. En la tabla 57 podemos observar el efecto conjunto de ácido tartárico, yeso y alcohol en las distintas fases estudiadas, al igual que ocurría en la ven

dimia anterior. En esta se puede ver que el efecto sobre la flora microbiana acompañante es, fundamentalmente, el realizado por el alcohol, en primera fase aparecen las especies clásicas no ascospórogenas que acompañan al mosto -Kloeckera, Candida junto a los Saccharomyces que si en esta fase representan el 76% y 86%, en los depósitos 1 y 2; en las otras dos fases estudiadas constituyen el 100% de la flora, tal como ocurre en las tablas 23 y 24 de la vendimia 1971.

En la tabla 58 podemos observar el efecto conjunto sobre mostos que se han corregido con ácido tartárico, yeso, sulfuroso y alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza; como hemos observado predomina la selección del corrector con efectos más potentes, en primera fase destacamos la presencia de Saccharomyces seleccionado por el sulfuroso; al final de la fermentación, aparecen los Saccharomyces en proporciones del 70 y 20%, para en fase de crianza constituir este género el 100% en el depósito nº 1 y los Saccharomyces el mismo porcentaje en el depósito nº 2.

En la tabla 59 podemos observar las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos naturales en distintas fases de fermentación e inicio de crianza. Hay especies que se encuentran en ambos depósitos y fases de fermentación, tales son S.cerevisiae, S.exiguus, S.fermentati, S.chevalieri y otras que solo se encuentran en una u otra fase tal como ocurre con el S.rosei y S.veronae ambos a $Bé > 10$ o el S.feduchyi que solo se encontró a $Bé$ cero en el depósito nº 2.

En la tabla 60 recogemos el porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces en las fases estudiadas en mostos corregidos con ácido tartárico y yeso, y ocurre algo similar a lo descrito en la tabla anterior, presencia

de algunas especies en ambas fases fermentativas y en los dos depósitos - como S.cerevisiae, S.chevalieri, S.fermentati; presencia de otras especies únicamente en primera fase = S.rosei, S.veronae; y por último en fase de crianza presenta al 100%, en ambas muestras, del S.feduchyi, especie típica de "flor".

En la tabla 61 podemos observar el porcentaje de las distintas especies de Saccharomyces en mostos corregidos con sulfuroso en las distintas fases de fermentación e inicio de crianza. S.cerevisiae, S.exiguus, S.chevalieri y S.fermentati constituyen más del 80% de los Saccharomyces en las fases fermentativas; en fase de crianza no se encontraron, como sospechábamos, las especies típicas de "flor"; pues el sulfuroso les afecta de manera muy importante.

La corrección con alcohol sobre muestras en distintas fases la recogemos - en la tabla nº 62, aislándose once especies de Saccharomyces y destacando por su presencia los siguientes: S.cerevisiae, S.exiguus, S.Chevalieri y S.fermentati en fases fermentativas y siendo en la de crianza el 100% S.fermentati y S.feduchyi.

En la tabla 63 se puede observar los porcentajes de las distintas especies de Saccharomyces encontrados en mostos corregidos con sulfuroso y alcohol en distintas fases de fermentación e inicio de crianza; en la primera fase no se aislaron especies de Saccharomyces; a Bé cero destacan las especies clásicas de esta fase, es decir, S.cerevisiae, S.exiguus, S.chevalieri y ocupando el S.feduchyi un 42% porcentaje sorprendente si tenemos en cuenta la corrección con sulfuroso; sin embargo, en fase de crianza que debería haberse mantenido o incluso aumentado no se aisló, destacando el S.cerevi-

siae con un 68,5 y 95% respectivamente en los depósitos números 1 y 2.

En la tabla 64 podemos observar los porcentajes de los distintos Saccharomyces en mostos corregidos con ácido tartárico, yeso y sulfuroso en las correspondientes fases. Al igual que en la tabla anterior el sulfuroso no ha permitido aislar en primera fase ninguna especie de Saccharomyces apareciendo al final de la fermentación, S.cerevisiae, S.exiguus, S.chevalieri y S.fermentati, especies que se repiten en fase de crianza.

En la tabla 65 se puede observar la influencia del ácido tartárico, yeso y alcohol sobre las distintas especies de Saccharomyces destacando que entre las tres fases se encuentra un total de once especies, que algunas solo aparecen en primera fase = S.veronae y S.rosei, y sin embargo otras solo a Bé cero y fase de crianza S.beticus y S.feduchyi, este último constituye el 62 y 100% en el velo de los depósitos 1 y 2; en las fases fermentativas se encuentran los ya clásicos S.cerevisiae, S.chevalieri, S.fermentati, etc.

Por último, en la tabla 66 recogemos la influencia de todos los factores -ácido tartárico, yeso, alcohol y sulfuroso- sobre las especies de Saccharomyces en las distintas fases; en la primera de ellas no se aisló Saccharomyces por el efecto selectivo tan importante del sulfuroso, que selecciona fundamentalmente S'codes ludwigii; a Bé cero hay presencia de varias especies y en crianza se encuentran especies de S.fermentati, S.rouxii y S.feduchyi.

Los resultados de la vendimia de 1972, que acabamos de comentar, no hacen sino confirmar de forma definitiva, lo ya observado en años anteriores, - por lo que prácticamente no merece la pena insistir en la discusión de los

mismos. A título de resúmen podríamos destacar que el resultado de aplicación independiente del sulfuroso y del alcohol es prácticamente el mismo que el obtenido en la vendimia anterior cuando se aplicó conjuntamente con ácido tartárico y yeso. Se confirma el efecto negativo del sulfuroso, destacando en las primeras fases de la fermentación sobre bacterias y levaduras no ascospóroenas con excepción del S'codes ludwigii que es seleccionado. En este sentido hay que destacar el gran efecto negativo que el sulfuroso ejerce sobre las levaduras filmógenas lo que inevitablemente repercute en el inicio de la fase de crianza. Finalmente, se ha confirmado igualmente que la adición de alcohol, como agente corrector, ejerce una evidente acción beneficiosa ya que de una parte elimina, si no totalmente, gran parte de las bacterias y, de otra, selecciona las especies de Saccharomyces que llevan a cabo la fermentación y sobre todo a las especies filmógenas, con lo que se favorece la formación de velo en la fase de crianza. En los casos que se ha añadido simultáneamente alcohol y sulfuroso se ha podido comprobar que predomina el efecto de este último.

Estudio cuantitativo del efecto de los correctores sobre levaduras y bacterias.

La reducción cuantitativa sobre levaduras y bacterias producidas por los agentes correctores fué estudiada únicamente en la vendimia de 1971 y los datos obtenidos están resumidos en las tablas núms. 43 a 50 del capítulo anterior. En las tablas 43 a 46 recogemos los recuentos de levaduras realizados sobre distintas muestras de mostos que sometimos a los correspondientes tratamientos con correctores, para conocer su efecto de forma cuan

titativa sobre los microorganismos responsables de la fermentación. Los recuantos realizados al inicio de la fermentación -24h. de la toma de muestra- confirman el nulo efecto que presenta la adición de ácido tartárico y yeso sobre las levaduras ya que si exceptuamos el resultado obtenido en el depósito nº 3, en todas las demás el número de células de levaduras por c. c. es igual o superior a los recuentos obtenidos en las muestras sin ningún tipo de tratamiento. Teniendo en cuenta que el ácido tartárico y el yeso no ejercen ningún efecto negativo sobre esta flora es lógico que al estudiar conjuntamente, en las demás pruebas el ácido tartárico y yeso con los otros correctores, sulfuroso y alcohol, el efecto resultante sea el de estos correctores y efectivamente así es; el empleo de alcohol presenta una reducción importante del número total de levaduras, que podríamos cifrar casi en el 50% de esta flora acompañante del mosto, y que será función del tipo de levaduras que constituyen esta flora ya que si el predominio inicial es de especies no ascospóroenas la reducción será mayor porque el alcohol les afecta de manera apreciable.

El efecto drástico observado en los mostos tratados con ácido tartárico, yeso y sulfuroso, o con ácido tartárico, yeso, sulfuroso y alcohol, se debe fundamentalmente, al empleo del sulfuroso, con reducciones en el número de levaduras al 99%, por lo que su utilización deberá ser escrupulosamente estudiada; si estos son los resultados que obtenemos a las 24h. de su empleo sobre los mostos al final de la fermentación, hay una recuperación en todas las muestras independientemente del tipo de tratamiento recibido por el mosto y con resultados similares a los que no recibieron tratamiento alguno; presentando una recuperación total que asegura una completa fermenta-

ción en un tiempo adecuado.

En las tablas 47 a 50 recogemos los recuentos de bacterias realizados sobre mostos al inicio de la fermentación -24h. después de adicionado el tratamiento- y al final de la misma -10 días-.

La adición de ácido tartárico y yeso sobre los mostos presenta un marcado efecto sobre las bacterias acompañantes, reduciendo su número como se recoge en las tablas en más del 99%; el efecto del sulfuroso y del alcohol, al haber realizado su adición conjuntamente con el ácido tartárico y yeso, no nos permite distinguir si ese mantenido efecto negativo es debido al nuevo agente empleado o por el contrario se debía fundamentalmente al ácido tartárico y yeso ya experimentado; no obstante en todos los casos que empleamos sulfuroso esta reducción es aún mayor por lo que admitimos que el sulfuroso refuerza aún más este efecto negativo sobre las bacterias acompañantes.

Similares resultados obtenemos en los recuentos realizados a los diez días quizá reforzados, al final de la fermentación, por la presencia de una cierta concentración de etanol propia del proceso y el elevado número de levaduras que se encuentran presentes junto a las que seguirán actuando en la fase siguiente de crianza.

Descripción y propuesta de una nueva especie de Saccharomyces de tipo filmógeno.

A lo largo de este trabajo se ha descrito en múltiples ocasiones el aislamiento, fundamentalmente a la etapa de crianza, de una especie de Saccharomyces que se designa con el nombre de S. feduchyi; realmente la citada levadura no ha sido descrita hasta el momento y mucho menos considerada como -

especie, por lo que al emplear la terminología citada nos hemos adelantado a una de las conclusiones de este trabajo, consistente en la descripción de un tipo de Saccharomyces de la variedad filmógena, existente en los mostos de Jerez, cuyas características y comportamiento hacen, que en nuestra opinión, pueda ser considerada como una especie independiente de las ya descritas y para la que, por las razones que más adelante se expondrán, proponemos el epíteto antes citado.

Las levaduras filmógenas se aislaron en velos de vinos típicos de la zona andaluza de Moriles-Montilla, por Marcilla, Alas y Feduchy en 1936, encontrando una especie de Saccharomyces que designaron con el nombre de S.beticus, del que describieron tres razas: alfa, beta y gamma, diferenciables entre sí por su distinto comportamiento bioquímico, así como de las especies descritas en vinos por Guilliermond y Osterwalder, recogidas por Marcilla y col. (51).

Con anterioridad (1933) los rusos Prostosserdov y Afrikian habían clasificado una especie de Saccharomyces en vinos de Jerez al que denominaron S. cheriensis.

Los trabajos citados y otros posteriores realizados sobre velo de vinos en distintas regiones españolas por numerosos autores -Iñigo Leal y col. (37), Santa Maria (77), Feduchy y col. (26) y propios nos han permitido confeccionar una tabla en la que se incluyen todas las levaduras filmógenas descritas y su comportamiento fermentativo.

Tabla nº 69

Comportamiento fermentativo de los distintos Saccharomyces filmógenos frente a los azúcares de prueba.

<u>Especie</u>	<u>Aislado por</u>	<u>G</u>	<u>Ga</u>	<u>S</u>	<u>M</u>	<u>L</u>	<u>R</u>
S. beticus raza α	Marcilla y col.	+	-	+	-	-	-
S. beticus raza β	"	+	-	+	+	-	- ó 1/3
S. beticus raza γ	"	+	-	+	+	-	+
S. cheresiensis	Prostosserdow	+	-	+	+	-	1/3
S. rouxii	Iñigo Leal	+	-	-	+	-	-
S. montuliensis	"	+	-	-	-	-	-
S. acetii	Santa Maria	+	-	-	-	-	-
S. oxidans	"	+	-	+	-	-	-
S. hispánica	"	+	-	-	+	-	-
S. cordubensis	"	+	+	+	-	-	-
S. gaditensis	"	+	+	+	+	-	-
S. feduchyi	Gia-Maiquez	+	-	+	-	-	1/3

El similar comportamiento que presentan algunos de estos Saccharomyces filmógenos frente a los azúcares de prueba, podría llevarnos a agrupar algunas de estas especies puesto que podemos, en nuestra opinión, considerar las idénticas y así tenemos que el S.cheresiensis se comporta como la raza beta del S.beticus; que la raza gamma de esta misma especie se debería incluir dentro del S.fermentati, pero únicamente esta raza y no como han hecho Lodder y Kreger-van-Rij de incluir las tres razas, pues para el propio Marcilla esta raza gamma era incapaz de desarrollarse en etanol como única fuente de carbono. El S.rouxii aislado por Iñigo Leal en velos de vino de

Andalucía Occidental; las características bioquímicas de este S.rouxii según Lodder y Kreger-van-Rij (43) presenta fermentación de glucosa y maltosa y asimilación de glucosa, galactosa y maltosa; sin embargo, la descripción que hace Iñigo Leal del Saccharomyces filmógeno aislado del vino no tiene la capacidad de asimilación de la galactosa, lo que hace no debemos considerar esta especie como tal S.rouxii; si tenemos en cuenta que el trabajo de Santa Maria (79) sobre Saccharomyces aislados en vinos de Jerez encuentra una especie con las mismas características bioquímicas a las descritas por Iñigo Leal, que designa como S.hispánica y que es perfectamente diferenciable del S.rouxii de Lodder y Kreger-van-Rij (43) no solo en la asimilación de la galactosa, sino en la capacidad para formar velo, en la utilización del etanol, asimilación de la L-lisina, creemos deben considerarse como especies distintas y englobar el S.rouxii de Iñigo Leal aislado en vinos en este S.hispánica de Santa Maria.

Las otras especies de Saccharomyces aislados en vinos -S.aceti y S.oxidans- presentadas por Santa Maria (74) al tercer Symposium internacional de levaduras celebrados en Delft, también presentan características bioquímicas similares al S.montuliensis y S.feduchyi respectivamente, no obstante las especies descritas por Santa Maria presentan un metabolismo frente al etanol totalmente diferente. Pues mientras el S.aceti produce en vinos una acidez de hasta 5g/l, el S.montuliensis, es de alrededor de 1g/l. Las diferencias en este comportamiento son aún mayores entre el S.oxidans y el S.feduchyi, ya que el primero sigue presentando un elevado contenido de ácido acético a partir del etanol que, como en el caso del S.aceti, pueden efectuar negativamente a la calidad de los vinos produciendo un impor

tante incremento de la acidez volátil, sin embargo el S. feduchyi, nunca -
llega a producir esos altos niveles de acidez, ejerciendo un efecto benefi-
cioso sobre los vinos en que se desarrolla controlando y reduciendo esa -
acidez.

Como es lógico pensar, no solamente existe una diferencia apreciable en el
comportamiento frente al etanol, sino que desde un punto de vista indus-
trial también existe una marcada diferencia.

Por otra parte, las características fermentativas y asimilativas del S.fe-
duchyi frente a las especies fermentativas aisladas en los mostos -S.rosei,
y S.elegans- son bastante similares como puede verse en la tabla siguiente:

	Fermentación										
	G	Ga	S	M	L	R	G	Ga	S	M	L
<u>S. rosei</u>	+	-	+	-	-	1/3	+	-	+	-	-
<u>S. elegans</u>	+	-	+	-	-	+ d.	+	+d.	+	-	-
<u>S. feduchyi</u>	+	-	+	-	-	1/3	+	-	+	-	-

El S. elegans, se puede diferenciar por su actuación frente a la Rafinosa
y la asimilación débil de la galactosa, pero el S. rosei, tiene las mismas
características, sin embargo en la prueba de crecimiento sobre etanol como
única fuente de carbono, existe una clara diferencia: el S. feduchyi pre-
senta un abundante crecimiento con formación rápida de velo, y el S.rosei,
no lo hace, o débil y ocasionalmente. Pero si a estas diferencias de carac-
ter fisiológico unimos las morfológicas- forma, tamaño, protuberancias en
la conjugación- propias del S. rosei, y las culturales, con incapacidad de
producir velo en vinos, ir desapareciendo del mosto a medida que transcurre
la fermentación debido a la presencia de etanol, que es todo lo contrario

de lo que le ocurre al S. feduchyi, hacen de esta una especie distinta, tanto desde el punto de vista fermentativa como filmógena, con las especies comparadas.

El S. feduchyi, no coincide pues con ninguna de las especies descritas en la tabla que recoge las especies filmógenas en vinos de España. No obstante, Feduchyi y Sandoval (26) describieron un grupo de levaduras aisladas de velos de vinos de Valladolid -Rueda, La Seca, etc- que ellos clasifican como "un tercer grupo de levaduras" cuyas características son iguales a las especies descritas por nosotros en velos de Jerez, y aunque los autores consideran que podría tratarse de una nueva especie, dejaron su estudio para un posterior trabajo. Consideramos que habiendo sido aislada y estudiada, aunque no propuesta, por Feduchy, esta nueva especie sea designada, y así lo hemos recogido en este estudio, como S. feduchyi.

CONCLUSIONES
=====

Bartholomäus

Bartholomäus

CONCLUSIONES

- 1.- El medio de cultivo, agar levadura-sal de Davis a pH 3.5, es adecuado no solo para el aislamiento de levaduras, hongos y ciertas bacterias, sino que se ha utilizado como medio de diferenciación, a nivel de género, - de las levaduras aisladas en las distintas fases de fermentación, lo que ha permitido un cálculo de la frecuencia de estas levaduras.
- 2.- Los hongos filamentosos tipo Mucor, Rhizopus y Aspergillus solamente se encuentran, y en muy escasa proporción, en la primera fase de la fermentación por lo que se considera que no desempeñan ningún papel específico en la misma, aunque formen parte de la flora microbiana de la uva.
- 3.- Igualmente, las levaduras no ascospórogenas Kloeckera apiculata y Candida pulcherrima, solamente se detectan en la primera fase de la fermentación por lo que, como en el caso anterior, se considera que no tienen ningún papel activo en la misma.
- 4.- Las especies ascospógenas de los géneros Pichia y Hansenula se encuentran normalmente en aislamientos realizados en la primera fase de fermentación, pero así como las especies de Hansenula no se vuelven a detectar normalmente en otras fases, las de Pichia, por el contrario, se detectan al final del proceso fermentativo y en algunos casos en fase de crianza, llegando a constituir en ocasiones, aún en mostos corregidos, la flora predominante con el consiguiente efecto negativo sobre los vinos. Por el momento no se ha conseguido ningún método de corrección que asegure la eliminación de estas levaduras.

5.- Las especies del género Saccharomyces, principales responsables de la fermentación, constituyen, como es lógico la flora dominante, habiéndose detectado un conjunto de especies cuyo número y proporción varían considerablemente a lo largo del proceso, y entre las que cabe destacar junto al S. cerevisiae las especies S. rosei, S. fermentati, S. exiguus, S. chevalieri, S. beticus, entre las ya descritas por otros autores.

6.- De manera casi constante se han podido aislar, principalmente en fase de crianza, un tipo de Saccharomyces cuyas características bioquímicas y culturales nos llevan a considerarlo como una especie distinta de las descritas hasta el momento y para la que se propone el nombre de S. feduchyi.

7.- La fermentación y crianza del vino de Jerez es el resultado de la acción conjunta y escalonada de estas especies que, según la fase del proceso van siendo seleccionadas, y por tanto predominan o desaparecen en función principalmente de la concentración de etanol producidas por ellas.

8.- En relación con esta sucesión escalonada de especies predominantes, los resultados obtenidos llevan a rechazar la hipótesis de que las encontradas en la fase de crianza -levaduras filmógenas- puedan proceder de las fermentativas en virtud de un proceso de adaptación de éstas; considerándose, por tanto, como especies distintas, presentes en los mostos desde los primeros momentos pero que solo son seleccionadas y predominan cuando la concentración de etanol es elevada.

9.- En la mayoría de los casos solamente se detectaron bacterias -Aceto-

bacter- en la primera fase del proceso, salvo en algunos casos en que llegan a constituir la flora microbiana predominante, con la consiguiente alteración del proceso. Esta circunstancia se da principalmente en mostos no corregidos.

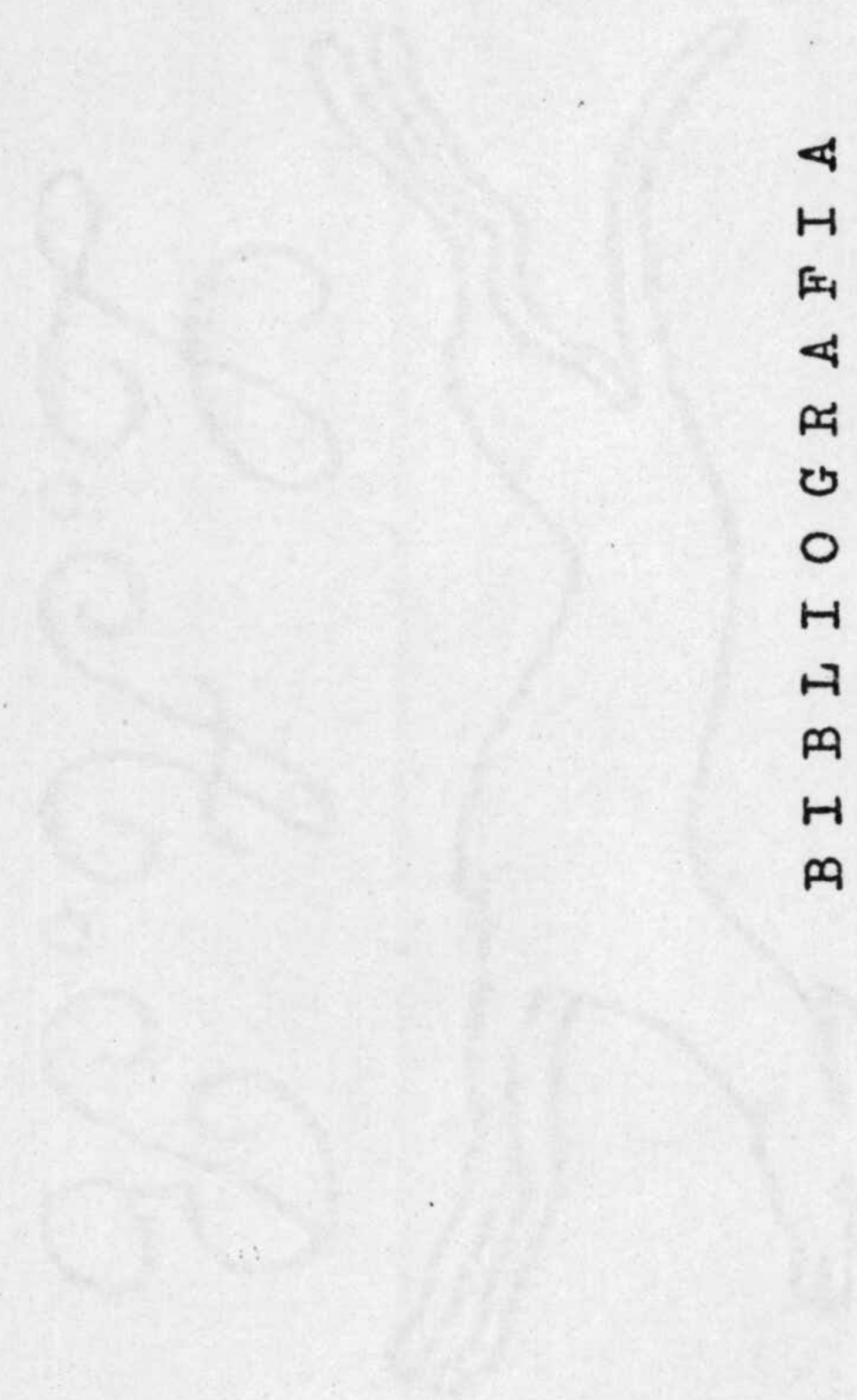
10.- La corrección con ácido tartárico y yeso no tiene ningún efecto apreciable, sobre las levaduras presentes en el mosto, ni siquiera sobre las especies no ascospógenas; sin embargo su influencia sobre las bacterias acompañantes es importante, reduciendo su número de manera patente, lo que justifica sobradamente el mantenimiento de esta corrección.

11.- La corrección con sulfuroso, por el contrario, a más de eliminar las bacterias perjudiciales para el proceso, afecta drásticamente a las levaduras presentes en los mostos, ya que con excepción del Saccharomyces ludwigii que es seleccionado, elimina las especies no ascospógenas y afecta negativamente a las ascospógenas y en especial a las especies filmógenas.

Todo ello hace que el empleo de sulfuroso, si bien asegura un correcto desarrollo del proceso, retrase el inicio de la fermentación y sobre todo el de la crianza.

12.- El empleo del alcohol como agente corrector en vinificación juega un papel importante y beneficioso sobre el proceso ya que, de una parte, reduce apreciablemente la proporción de algunas especies no ascospógenas perjudiciales, no afecta sensiblemente a los Saccharomyces que realizan la fermentación y ejercen una verdadera selección positiva sobre las levaduras filmógenas que aparecen en la fase de crianza; por todo ello se considera que esta corrección debería utilizarse de manera habitual.

13.- El empleo conjunto de los correctores citados anteriormente, ha demostrado que en todos los casos predomina la acción correspondiente al más enérgico, sulfuroso cuando es usado o alcohol en ausencia de éste.



BIBLIOGRAFIA

=====

Bibliothèque

- 1 - AMERINE, M.A. and KUNKEE, R.E. 1968.- "Microbiology of Winemaking" Ann. Rev. Microbiol. 1968, pp. 323-58
- 2 - AYRAPAA, T. 1968.- Formation of higher alcohols by various yeasts. J. Inst. Brew. 1968, 74, 2, pag. 169-78
- 3 - BALLONI, N.; y MATERASSI, R.; SILI, C.V. 1976.- Indagini preliminari sugli effetti degli antibiotritici sui lieviti della fermentazione vinaria. Vini d'Italia, 1976, 100, pag. 49-52
- 4 - BANNO, I. and HASEGANA, T. 1972.- Acid formation as a criterion for the classification of yeasts. Proceeding of the IVth International Fermentation Symposium, 1972, 775-80.
- 5 - BARNETT, J.A.- 1971.- Selection of test for identifying yeasts. Nature New Biology, 1971, 232, 221-3.
- 6 - BEECH, F.W.; DAVENPORT, R.R.; GOSWELL, R.N.; BURNET, J.K. 1968.- Two simplified schemes for identifying yeast cultures. pag. 151-75 del libro Identification methods for microbiologist part. B Academic Press.
- 7 - BEETZ, K.J.- 1976.- Ronilan, ein neues Kontaktfungizid zur Botrytis-Bekämpfung im Weinbau Des Deutsche Weinbau, R.F.A. 1976, 10, 344-6.
- 8 - BENVEGNIN, L.; CAPT, E.; FIGUET, G. 1951.- Traité de Vinification. Libraire Payot. Lausanne.
- 9 - BIDAN, P.- 1975.- Relation entre la teneur des vins en alcools supérieurs et la teneur des moûts en substances azotées en particulier en acides aminés. Bulletin de L'O.I.V. 536, pag. 842-65
- 10 - CAMPBELL, I. 1971.- Antigenic properties of yeasts of various genera. Journal of applied Bacteriology, 1971, 34, 327-42.

- 11 - CAMPBELL, I. 1971.- Numerical taxonomy of various genera of yeasts.-
Journal of General Microbiology, 1972, 67, 223-31.
- 12 - " 1972.- Simplified identification of yeasts by a serological technique. vol. 78, pag. 225-29, Journal of
Inst. Brew.
- 13 - " 1972.- Numerical analysis of the genera Saccharomyces and
Kluyveromyces. Journal of General Microb. 1972, 73,
279-301.
- 14 - CAMPBELL, I.; GILMOUR, R.H. and ROUS, P.R.- 1972.- Differentiation of
Yeasts by electroforetic methods. Journal of the
Inst. of Brewing. 1972, 78, 491-496.
- 15 - CAMPBELL, I.- 1973.- Computer identification of yeasts of the genus
Saccharomyces. Journal of General Microbiology 1973,
77, 127-35.
- 16 - CARMO-SOUSA, LIDIA and BARROSO LOPES, CANDIDA.- 1969.- A comparative study
of the extracelular and cell wall polisaccharides
of some Candida sp. Ant. van Leeuw. vol. 35 sup.A-7.
- 17 - CASAS LUCAS, J.F.- 1969.- Enología de I. Mareca, pág. 160-75.
- 18 - " " " 1972.- La crianza de los vinos de Jerez. Bol.Asoc.
Nac.Ing.Agron. (ANIA), nº 227, pág. 407-416.
- 19 - CASTELLI, T.- 1953.- Atti. VI Cong. Int. de Microbiología. Roma. 1953.
- 20 - CROWELL, E.A. y GUYMON, J.F. and INGRAHAM, J.L.- Techniques for studying
the mecanism of higher alcohol formation by yeasts.
Amer.Journ. of Enol.Vitic. 1961, 12, 3, 111-6.
- 21 - DAVIS, J.G.- 1958.- A convenient semi-sinthetic medium yeast and mould
counts. Lab. Pract. 7, pág. 30.

- 22 - DIFCO MANUAL.- 1953.- Niwth Edition, Detroit 1, Michigan.
- 23 - DOMERCQ, S.- 1956.- "Etude et classification des levures de vin de la Gironde". 2^e Thesix presentées a La Faculté des - Sciences de L'Université de Bordeaux. n^o d'ordre 20, I.N.R.A. 7, rue Keppler. París.
- 24 - DUPUY, P. et FLANZY, M.- 1954.- Influence de la thiamine sur la fermentation des jus de raisin. C.R. Acad. Agric. Fr. 40, 273-77.
- 25 - FEDUCHY MARIÑO, E.- 1956.- Contribución al estudio y relación de la "flora" española de levadura perteneciente a las principales regiones vinícolas. Bol. Inst. Nac. Inv. Agron. 15, (35), 211-37.
- 26 - FEDUCHY MARIÑO, E. y SANDOVAL, J.A.- 1960.- Contribución al estudio de los vinos típicos españoles y de la "flora" de levadura con ellos relacionados.- Bol. Inst. Nac. Inv. Agron. 20, (42), 1-55.
- 27 - FERNANDEZ, M^e J.; GOMEZ MORENO, C.; RUIZ AMIL, M.- 1972.- Indution of - isoenzymes of alcohol deshidrogenase in "flor" yeast. Arch. Microbi. 84, 153-60.
- 28 - FERNANDEZ DE BOBADILLA, G.; NAVARRO, E.- 1949.- Bol. Inst. Nac. Inv. Agr. 21, 473.
- 29 - FDEZ. DE BOBADILLA, G.; QUIROS, J.M.; SERRANO, J.J.- 1954.- Vinos de Jerez. El enyesado de los mostos.- Bol. Inst. Nac. Inv. Agr. vol. XIV, 31, pág. 411-46.
- 30 - FDEZ. DE BOBADILLA, G.- 1956.- Viníferas Jerezanas y de Andalucía Occidental.- Inst. Nac. Inv. Agr.- Ministerio Agricult. Madrid.

- 31 - GARCIA DEL BARRIO.- 1972.- El tema del vino de Jerez. Bol. Asoc. Nac. Ing. Agr. nº 227, 367-84
- 32 - GARCIA GIL DE BERNABE, A.- 197 .- Problemas de la replantación de viñedos en la zona del Jerez causados por la degeneración infecciosa de la vid. Aportación al caso de las cepas Carrasqueñas y Canarias.- Tesis Doctoral. Univ. Polit. de Madrid.
- 33 - GARTEL, N.- 1975.- Lutte contre la pourriture grise (*Botrytis cinerea*). Effects des nouveaux fongicides (efficacité, rémanence, accumulation dans le sol, dans la plante et dans les produits viticoles, toxicité, etc.) Bol. de L'O.I.V., 48, 1025-1041.
- 34 - GUILLEIRMOND, A.- 1972.- Les levures, ed. "Otave Doin et fils". Paris.
- 35 - HARRIGAN, W.F. and McCANCE, M.E.- 1966.- Laboratory Methods in Microbiology. Academic. Press.
- 36 - IÑIGO LEAL, B.; ARROYO VARELA, V.- 1960.- Los agentes de la fermentación vínica en la zona Moriles-Montilla". Rev. Cienc. - Aplic. 72, 18-29.
- 37 - IÑIGO LEAL, B.; ARROYO VARELA, V.- 1964.- Microbiología de los velos desarrollados sobre vinos de la zona de Montilla-Moriles.- Rev. Cienc. Aplic. 96, 1964, 23-29.
- 38 - IÑIGO LEAL, B.; TOMELO LACRUE, M.; HEGARDT, F.G.- 1969.- Los agentes de la fermentación vínica en la zona de Aragón. Agroq. Tec. Alim. 2, (3), 437-49.
- 39 - IÑIGO LEAL, B.; VAZQUEZ MARTINEZ, D.; ARROYO VARELA, V.- 1963.- Los agentes de la fermentación vínica en la zona de Jerez. Rev. Cienc. Aplic. 93, 296-305.

- 40 - IÑIGO LEAL, B.; VAZQUEZ MARTINEZ, D.- 1964.- Los agentes de la fermentación vínica en la zona de El Condado y El Aljarafe.-
Agroq. Tec. Alim. 4, (2), 246-54.
- 41 - IÑIGO LEAL, B.- 1971.- Comunicación personal.
- 42 - KAYSER, J.- 1911.- Les levures. Masson y Cia. Paris.
- 43 - KREGER-VAN-RIJ and LODDER, J.- 1952.- The yeasts; a taxonomy study. ed.
Nort- Holland.
- 44 - KREGER-VAN-RIJ.- 1966.- Taxonomy of the genera Pichia. II Symposium on yeasts held Bratislava. pag. 51-8. Edt. Slovak Academic of Sciences.
- 45 - KREGER-VAN-RIJ.- 1969.- The yeasts vol. 1, pag. 5-73. Edt. A.H. Rose and J.S. Harrison. Academic Press.
- 46 - KUNKEE, R.E. and AMERINE, M.A.- 1970.- The yeast. vol. 3 pp 5-71 ed. A.H. Rose and J.S. Harrison. Academic Press.
- 47 - LAFON, MADELEINE.- 1955.- Contribution a l'étude de la formation des - produits secondaires de la fermentation alcoolique. Thes. Doct. n° ord. 69, Inst. Nat. Recher. Agron. 7, rue Keppler. Paris, 16.
- 48 - LAFON, J.; ROVILLAUD, P.; HUDE, R.- 1955.- Maladies et parasites de la vigne. vol. I y II. Librair. J.B. Bailliere et fils 19, Rue Hautefuille. Paris (VI).
- 49 - LODDER, J.- 1970.- The yeasts, a taxonomy study. ed. North-Holland.
- 50 - LOPEZ DE CARRIZOSA, 1972.- Prácticas culturales del viñedo. Bol. de la Asoc. Nac. Ing. Agron. n° 227, 359-65.
- 51 - MARCILLA; ALAS y FEDUCHY, E.- 1939.- Contribución al estudio de las levaduras que forman velo sobre ciertos vinos de ele-

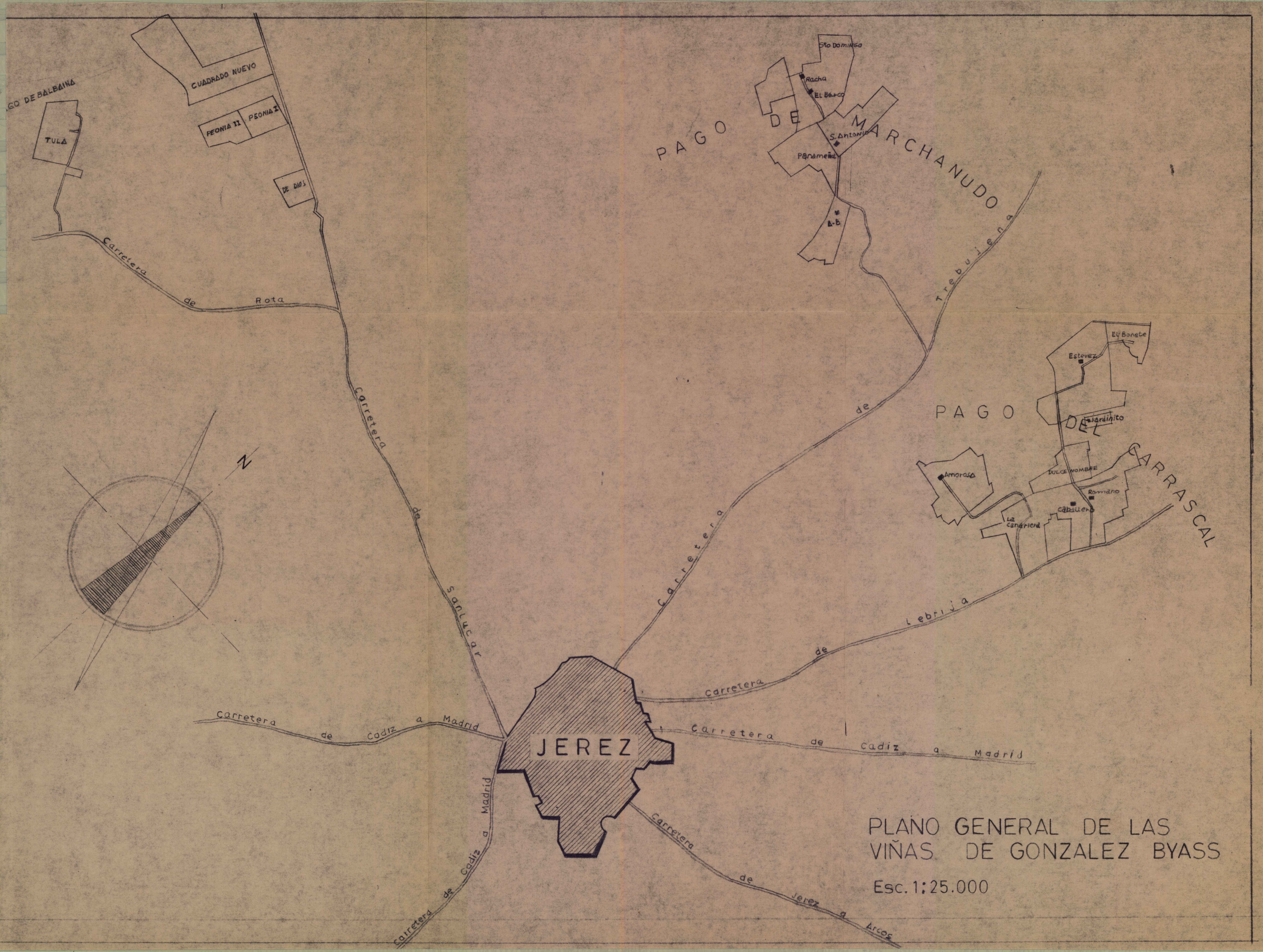
- vado grado alcohólico. Anales del Centro de Invest. Agron. vol. I, nº 1, 1-230.
- 52 - MARCILLA, J.- 1967.- Tratado práctico de viticultura y enología española. Sexta edición 1967. edt. Saeta, S.A. Madrid.
- 53 - MARECA, I.- 1969.- Enología. Edt. Alhambra, S.A.
- 54 - MARTINI, A.- 1960.-Studio sulla microflora blastomicética dei vini della provincia de Perugia. Rev.Vit. e di Enol. 13, - 117-27.
- 55 - MARTINI, A.- 1962.-La microflora blastomicética del vino Moscato di Pantelleria. Rev. Vitiv. enol. 15, (2), 57-60.
- 56 - MEDICAMENTA.- 1962.- Tomo 2 (Técnica de Alessandrini) pp. 1958.- Edit. Labor, S.A. Barcelona.
- 57 - MINARIK, E.- 1971.- Etude de la flore levurienne des regions viticoles peripheriques en Tchecoslovaquie. Connaiss. Vig. et Vin. 5 (2), 185-97.
- 58 - NAKASE, T.; KOMAGATA, K.- 1971.- Significance of DNA base composition in the clasification of yeast genus Saccharomyces. Jour.of Gen. and appl. Microb. Tokio 1971, 17, 227-38.
- 59 - NEGRET, E. et FRANCO, P.- 1971.- Manuel Practique de Vinification et de conservation des vins. Flammarion edt. 26, Rue Racine. Paris.
- 60 - NOGUERA PUJOL, J.- 1973.- Enotecnia Industrial, Dilagro Ediciones.- General Brito, 1 - Lérida.
- 61 - PAMAN MEDINA, C.- 1972.- La poda de la vid en Jerez. Bol. Asoc. Nac. Ing. Agron. nº 227, 367-84

- 62 - PEYNAUD, E.- 1956.- Sur la formation d'acetate d'éthyle par les levures de vin. Ind. Agric. et Alim. 73, 4, 253-7.
- 63 - PEYNAUD et DOMERCQ, S.- 1961.- Etudes sur les bacteries lactiques des vins. Ann. Technol. Agric. 1961, 10, (1), 43-60.
- 64 - RIBEREAU-GAYON, J. et PEYNAUD, E.- 1952.- Sur l'emploi en vinification de quelques activateurs vitaminiques de la fermentation.- Acad. d'Agricult. de France, seance 25-Junie-1952, pp. 1-4.
- 65 - RIBEREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E. et LAFON, MADELEINE.- 1954.- Facteurs de croissance et produits secondaires de la fermentation alcoolique. seance 22-Novem.1954 Acad. Sciences t. 239, 1549-1550.
- 66 - RIBEREAU-GAYON, J.; PEYNAUD, E.; RIBEREAU-GAYON, P.; SUDRAUD, P.-1975.- Traité d'oenologie "Sciences et techniques du vin" tomo 2,3. Edit. Dunod, Paris. 1975 y 76.
- 67 - RICHARDS, M.- 1972.- Serology and yeast classification. Ant. van Leeuwenh. 1972, 38, 177-92.
- 68 - RIGONE DE PRITZ, J.A.- 1958.- Contribution a l'étude des levures viniques de la province de la Rioja. Bull. L'O.I.V. 1959, 35, 343, p. 99.
- 69 - ROSA, G.; DOLCINI, E.; NERETTIV.- Esperienze di lotta contro la Botrytis cinerea. Vigne Vini, 1925, 4, 35-42.
- 70 - ROUSSEAU, D. and HALVORSON, H.O.- Preparation and storage of single spores of Sacch. cerevisiae. Journ. of Bacteriol. 1969, vol. 100, n° 3, 1426-7.

- 71 - SANDULA, J. and A. VOJTKOVA LEPSIKOVA.- 1972.- Immunochemical studies on mannans of the genus *Saccharomyces*.- *Folia Microbiologica*. 1974, 19, 94-101.
- 72 - SANTA MARIA, J.- 1957.- Sobre especies pluri esporuladas del género - *Saccharomyces*. *Bol. Ind. Nac. Inv. Agron.* vol. XVII, nº 37, 231-8.
- 73 - SANTA MARIA, J.- 1957.- Un nuevo género de levaduras: *Citeromyces*. *Bol. Inst. Nac. Inv. Agron.* vol. XVII, nº 37, 269-76.
- 74 - SANTA MARIA, J.- 1959.- Oxidación del alcohol etílico a ácido acético por levaduras vivas. I. *Sacch. aceti* nov. sp. y *Sacch. oxidans* nov. sp. nuevas especies aisladas de vino.- *Anales Inst. Nac. Inv. Agron.* 1959, VIII, 3, 713-36.
- 75 - SANTA MARIA, J.- 1964.- *Sacch. onubensis*, nov. spec. aislada de mosto de uva y su relación con *Sacch. capensis* (syn. *Sacch. oviformis*). *Bol. Inst. Nac. Inv. Agron.* 51, 527-38.
- 76 - SANTA MARIA, J.- 1968.- *Sacch. hispánica* nov. sp. Nueva especie de levadura de "flor". *Bol. Inst. Nac. Inv. Agron.* 58, 21-32.
- 77 - SANTA MARIA, J.- 1969.- Spanish "flor" Yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*. vol. 35, supplement. *Yeast Symposium 1969*. D. 13-14.
- 78 - SANTA MARIA, J.- 1970.- Spanish "Flor" Yeasts.- *Bol. Inst. Nac. Inv. Agron.* 63, 151-156.
- 79 - SANTA MARIA, J.- 1970.- *Sacch. gaditensis* y *Sacch. cordubensis*, dos nuevas especies de levaduras de flor.- *Bol. Inst. Nac. Inv. Agron.* 62, 57-66.
- 80 - SAPIIS-DOMERCQ, S.- 1969.- Comportement des levures apiculées au cours de la vinification. *Connais.Vigne Vin.* 1969, 3, (4), 379-92.

- 81 - SAPIIS-DOMERCQ, S.- 1970.- Nouvelles etudes de la microflore en vinification. Connais. Vig. et Vin. 1970, 4, (1), 45-61.
- 82 - SCHEFFERS, W.A. and WIKEN, T.O.- 1969.- The custers effect (negative Pasteur effect) as a diagnostic criterium for the - genus Brettanomyces Ant. van Leeuwenh. vol. 35, A-31.
- 83 - SCHIMPFESSEL, L.- 1966-7.- Aspects de la regulation des alcools deshydrogenases chez les levures. Rev. Fermt. et des Indust. Alimen. tome 21, 4 pp 117-29; 5 pp 161-75; 6 pp 201-17.- tome 22, 1 pp 31-43; 2 pp 67-83; 3 pp 99-114; 4 145-48 (1967).
- 84 - SIKL, D.; MASLER, L. and BAUER, S.- Relation-ship between extracelular and cell wall polisaccharides of selected yeasts and yeasts-like microorganism. Ant. van Leeuw. vol. 35, supl. A-9.
- 85 - SLOOFF, W. CH.; NIEUNDORP, P.J. and P. BOS.- 1969.- Polisaccharides as cosporas walls and clasification of Lipomices. Ant. van Leeuw. vol. 35, supl. A-23.
- 86 - SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGYST.- 1957.- Manual of Microbiological methods etd. Mcgran-whill Book Company.
- 87 - SUOMALEINE, H. and NYKANEN, L.- 1973.- Formation of aroma compounds in alcoholic beverages. Wallert. Laborat. Communications vol XXV n° 118.
- 88 - TSUCHIYA, T. and FUKAZAWA, Y.- 1969.- Serological relation ship amont various yeasts. Ant. van Leeuwen. vol. 35, A-17.
- 89 - VENTRE, J.- 1911.- Les levures dans le vinification. Masson y Cia. - Paris.

- 90 - WENDY FOWLER, P.; ALAN, J.S.;-BALL and DAVID E. GRIFFITHS.- 1971.- The control of alcohol deshidrogenase isozyme synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. Journ. of Biochem.* vol. 50, 35-43.
- 91 - WICKERHAM, L.J.- 1946.- A critical evaluaci3n of the nitrogen assimilation tests commonly used in the clasificaci3n of yeasts. *Journ. Bacter.* 52, (3), 293-301.
- 92 - WICKERHAM, L.J.- 1952.- Recent advances in the taxonomy yeasts. *Ann. Rev. Microbiol.* 6, 317-32.
- 93 - WICKERHAM, L.J.- 1966.- Hibridization as a basic for specification in - the genus *hansenula* the proceeding of the IInd Symposium in yeasts held in Bratislava, 7, 41-4.
- 94 - WILKINSON, J.F. and ROSE, A.H.- 1963.- *Biochemistry of Industrial micro-organism.* edt. AH. Rose and C. Raimbow, pp. 379-414. Academic Press.



PLANO GENERAL DE LAS
 VIÑAS DE GONZALEZ BYASS
 Esc. 1:25.000