



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE
INGENIERÍAS AGRARIAS**

Grado en Enología

**Estudio fisicoquímico y microbiológico de la
evolución en botella de vinos sin adición de
anhídrido sulfuroso. Importancia de las
condiciones de conservación y empleo de
nutrientes.**

Alumna:

Labajo Cabornero, Naomy

Tutoras:

Vila Crespo, Josefina

Ruipérez Prádanos, Violeta

Palencia, 2020

RESUMEN

El anhídrido sulfuroso en la elaboración de vinos se aplica como conservante químico, ya que se comporta como un potente antiséptico, además de proteger a los vinos de posibles oxidaciones. En dosis adecuadas, el anhídrido sulfuroso es una sustancia inocua para el hombre, sin embargo, se ha asociado el uso de elevadas dosis de este compuesto a migrañas tras el consumo del vino e incluso a bajas dosis, podría ser un alérgeno. Actualmente existen prácticas en las que se intenta reducir la adición de dicho compuesto, aunque se ha de tener en cuenta sus numerosos beneficios respecto a la conservación del vino, manteniendo la estabilidad microbiana, evitando la proliferación tanto de levaduras como bacterias contaminantes, así como la estabilidad oxidativa, asegurando la calidad final del producto.

Este trabajo propone un estudio sobre la influencia de la ausencia de corrección de la concentración de anhídrido sulfuroso previa al embotellado de vinos blancos elaborados a partir de uva blanca de variedad Verdejo. El estudio se centrará en determinar la influencia de distintos factores en vinos sin adición de anhídrido sulfuroso.

ABSTRACT

Sulfurous anhydride in winemaking is applied as a chemical preservative, due to its behavior as a powerful antiseptic and the fact that it protects the wine from possible oxidations. In adequate doses, sulfur anhydride is a harmless substance for humans, however, the use of high doses of this compound has been associated with migraines after wine consumption and even at low doses it could be an allergen. Currently, the tendency is to reduce the use of this compound in wines although the multiple benefits must be taken into account with respect to the preservation of wine, maintaining microbial stability, avoiding the proliferation of both yeasts and contaminating bacteria, as well as the oxidative stability, ensuring the final quality of the product.

This work proposes a study on the influence of the absence of correction of the sulfurous anhydride made prior to bottling white wines made from Verdejo variety white grapes. This study is focused on the determination of the influence of the different elements on wines with no sulfurous anhydride addition.

ÍNDICE

ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. INFLUENCIA DEL ANHÍDRIDO SULFUROSO.....	4
1.2. INFLUENCIA DE LA NUTRICIÓN NITROGENADA	6
1.3. INFLUENCIA DE LA CONSERVACIÓN	8
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1. UVA Y ELABORACIÓN DE VINOS	9
3.1.1. MICROORGANISMOS.....	9
3.1.2. NUTRICIÓN.....	9
3.2. CONTROL DE LA CINÉTICA FERMENTATIVA	10
3.2.1. CONSERVACIÓN Y TOMA DE MUESTRAS	10
3.3. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	10
3.3.1. MEDIOS DE CULTIVO	10
3.3.2. SIEMBRA.....	11
3.3.3. RECUESTO E IDENTIFICACIÓN	11
3.4. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	12
3.4.1. ACIDEZ VOLÁTIL.....	12
3.4.2. ACIDEZ TOTAL	12
3.4.3. pH	12
3.4.4. ANHÍDRIDO SULFUROSO TOTAL	12
3.4.5. GRADO ALCOHÓLICO	13
3.4.6. NITRÓGENO FÁCILMENTE ASIMILABLE.....	13
3.4.7. AZÚCARES REDUCTORES	13
4. RESULTADOS	14
4.1. CINÉTICA FERMENTATIVA.....	14
4.2. ANÁLISIS MICROBIANO.....	15
4.3. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS.....	17
4.3.1. ANHÍDRIDO SULFUROSO TOTAL	24
5. CONCLUSIONES.....	25
6. BIBLIOGRAFÍA.....	26

1. INTRODUCCIÓN

El vino es un alimento natural obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada no, o de mosto de uva (BOE-A-2003-13864). En la calidad del producto final obtenido intervienen diversos factores que van a afectar a sus características fisicoquímicas y microbiológicas.

1.1. INFLUENCIA DEL ANHÍDRIDO SULFUROSO

El anhídrido sulfuroso es uno de los aditivos más empleados en la industria alimentaria, gracias a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes. El anhídrido sulfuroso puede producirse durante los procesos de fermentación, es decir, de forma endógena. La producción de anhídrido sulfuroso endógeno depende de muchos factores (tipo de microorganismos, composición matricial,...) (Bashan et al., 2016). Por otro lado, su presencia puede deberse a su adición en operaciones tecnológicas individuales durante la elaboración del vino, de forma exógena.

El anhídrido sulfuroso presenta un equilibrio químico complejo con el medio, por lo que se encuentra bajo diferentes formas en el vino. Puede estar presente en el vino bajo dos formas distintas, como son, anhídrido sulfuroso libre, anhídrido sulfuroso combinado, siendo el anhídrido sulfuroso total la suma de los dos anteriores.

En anhídrido sulfuroso libre se encuentra presente primordialmente como ión bisulfito, esta forma suele mostrar una buena actividad contra las desviaciones microbiológicas y las oxidaciones, pero la forma más activa del aditivo corresponde al anhídrido sulfuroso molecular. El porcentaje de anhídrido sulfuroso libre en forma molecular, depende de factores, como el pH, de forma que cuando el pH es más bajo, este aumenta. Otros factores como el grado alcohólico y la temperatura afectan al equilibrio ión bisulfito y anhídrido sulfuroso, debido a que un incremento de la temperatura y la concentración del alcohol, provoca un aumento en la proporción del anhídrido sulfuroso molecular (Zironi et al., 2009).

El anhídrido sulfuroso es el aditivo más utilizado para evitar las oxidaciones en el proceso de vinificación (Ribéreau-Gayon et al., 2006a), ya que es capaz de paliar las oxidaciones tanto enzimáticas como químicas. La primera ocurre en la mayoría de las ocasiones en el mosto de uva, la segunda prevalece en el vino (Li et al., 2008). En el caso de los vinos tintos la oxidación de forma moderada y vigilada, tanto en los procesos de vinificación, como en los de envejecimiento en botella, es favorable, suavizando la aspereza del tanino y el aroma, en cambio para los vinos blancos la exposición al aire generalmente es perjudicial (Gambutì et al., 2017).

En el proceso de vinificación, la adición de anhídrido sulfuroso al mosto, antes de que comience el proceso de fermentación alcohólica, reduce el tiempo de fermentación al reprimir las levaduras que no son *Saccharomyces*, ya que es altamente tóxico para la mayoría de ellas, e incentivar el crecimiento de las levaduras *Saccharomyces* tolerantes al anhídrido sulfuroso (Edinger et al., 1998).

Por ello la estrategia más utilizada, es el empleo de cepas seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae* y la adición de anhídrido sulfuroso, para así tener un control de una posible oxidación y anular el crecimiento de microorganismos no deseables en el vino. Por lo tanto, la prohibición del uso de anhídrido sulfuroso como agente antimicrobiano sin una alternativa, aumentaría el riesgo de que el vino se estropee por levaduras y bacterias contaminantes (Du Toit et al., 2000).

En los últimos años, el empleo de anhídrido sulfuroso en la industria alimentaria ha acarreado ciertas preocupaciones sobre la seguridad de los consumidores (Vally et al., 2009). De hecho se ha demostrado de manera efectiva que el anhídrido sulfuroso desempeña un papel en las reacciones adversas al vino en una población pequeña (alrededor del 1%) de individuos "sensibles al anhídrido sulfuroso" (Vally et al., 2003). Las reacciones observadas incluyen síntomas como broncoespasmo, bradicardia, síntomas gastrointestinales, así como urticaria, angioedema, hipotensión, shock y en casos raros reacciones anafilácticas (EFSA Scientific Opinion, 2014; Vally et al., 2009).

La comunidad investigadora nacional e internacional, entre ellas el IFAPA (Investigación y Formación Agraria y Pesquera) situada en Rancho de la Merced (Jerez de la Frontera), se puso como meta la búsqueda de diferentes alternativas al uso del anhídrido sulfuroso en la elaboración de vinos, con el fin de obtener un producto final que asegure que las alternativas a este conservante no sean ofensivas para la salud del consumidor, que se mantenga la estabilidad microbiológica, evitar oxidaciones y mantener las características que definen al producto, destacando entre ellas, el color, el tanino, la acidez y el alcohol (Guerrero et al., 2015). Los estudios realizados sugieren que la reducción ligera del contenido en anhídrido sulfuroso en vino blanco es más aconsejable que la eliminación completa del mismo. Los vinos obtenidos con la aplicación de las alternativas al anhídrido sulfuroso, entre ellas la adición de compuestos tales como dicarbonato de dimetilo, bacteriocinas, compuestos fenólicos, complejo de plata o lisozima, según el IFAPA, son considerados por el consumidor más naturales, inofensivos hacia la salud y más sostenibles. No obstante, las alternativas sustitutas al anhídrido sulfuroso en muchas ocasiones no ofrecen la capacidad protectora que ofrece el anhídrido sulfuroso.

Se debe evitar el uso de dosis excesivas de anhídrido sulfuroso, no solo por razones de salud, sino también porque, desde un punto de vista enológico, puede causar alteraciones organolépticas en el producto final, neutralizar el aroma e incluso producir defectos de aroma característicos (Ribereau-Gayon et al., 2006). Por el contrario, una concentración insuficiente no garantiza la estabilidad adecuada del vino frente a una oxidación excesiva o desarrollo microbiano, lo que puede comprometer su calidad final (Blouin et al., 2004).

En la siguiente tabla se han recopilado las diferentes ventajas y desventajas del anhídrido sulfuroso empleado en el proceso de vinificación.

Tabla 1. Ventajas y desventajas del anhídrido sulfuroso. Adaptada de Guerrero, (2005).

VENTAJAS	DESVENTAJAS
<p>PROPIEDAD ANTIOXIDANTE</p> <ul style="list-style-type: none"> - Supresión de oxígeno. - Reduce la concentración de quinonas. - Inhabilita las reacciones de Maillard. - Inactiva las enzimas. - Reacciona con peróxido de hidrógeno. 	<p>PROPIEDAD ANTIOXIDANTE</p> <ul style="list-style-type: none"> - Destruye la Tiamina o vitamina D. - La efectividad depende del pH
<p>PROPIEDAD ANTIMICROBIANA</p> <ul style="list-style-type: none"> - Previene la formación de aminos biógenas. - Previene formación de etilfenoles. - Evita sabores desagradables. 	<p>PROPIEDAD ANTIMICROBIANA</p> <ul style="list-style-type: none"> - Concentraciones de 30-50 mg/l de SO₂ libre. - Dosis ineficaces contra algunos microorganismos indeseables.
<p>PROPIEDAD DISOLVENTE</p> <ul style="list-style-type: none"> - Extracción de minerales. - Extracción de ácidos orgánicos. - Extracción de compuestos fenólicos. 	<p>PROPIEDAD DISOLVENTE</p> <ul style="list-style-type: none"> - No mejora la coloración del vino.
<p>PROPIEDAD SENSORIAL</p> <ul style="list-style-type: none"> - Da sabor más complejo - Sabor más complejo en uvas podridas. 	<p>PROPIEDAD SENSORIAL</p> <ul style="list-style-type: none"> - Uso excesivo da lugar a sabores amargos. - Forma compuestos como mercaptanos y sulfuro de hidrógeno.

1.2. INFLUENCIA DE LA NUTRICIÓN NITROGENADA

La transformación del mosto de uva en vino es un proceso biotecnológico, en el que los microorganismos que están presentes, requieren una serie de nutrientes. Los nutrientes son necesarios para que las levaduras consigan un correcto desarrollo de la fermentación alcohólica, por lo que el contenido de los mismos, condiciona tanto la velocidad, como la culminación del proceso (Mas et al., 2013).

En el mosto el nitrógeno se puede encontrar presente en forma inorgánica, principalmente amonio, y por otro lado de forma orgánica, compuesto por péptidos, aminoácidos y proteínas. No todas las formas tienen la misma disponibilidad para las levaduras, ya que, compuestos como los péptidos y las proteínas no se suelen considerar auténticas fuentes de nitrógeno debido a que son metabolizados excepcionalmente por las levaduras (Fleet et al., 1993), por otro lado, los aminoácidos son inestables como fuentes nitrogenadas (Mas et al., 2013).

En primer lugar se debe contar con un contenido en el mosto inicial de nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) para las levaduras, normalmente se estima una cantidad de entre 150-200 mg/L, para así asegurar un buen desarrollo de la fermentación alcohólica (Blouin et al., 2004). En la vinificación el NFA presenta un papel importante, siendo un factor nutricional durante el proceso de fermentación alcohólica, ya que presenta una función principal en el transporte de azúcares y en la síntesis proteica. Por otro lado, es un conjunto de compuestos formado por aminoácidos y el ión amonio, excepto la prolina, esencial para la biosíntesis de marcadores de calidad, como pueden ser los ésteres y los alcoholes por parte de la levadura.

Se estima que el mosto contiene la cantidad necesaria de materia nitrogenada para llevar a cabo la transformación de mosto de uva a vino. Esto permite que el desarrollo de la fermentación alcohólica, en la mayoría de los casos, no presente dificultades en su proceso, pero esta hipótesis en ciertas ocasiones no es la más acertada, como puede ser en vendimias pobres en contenido en nitrógeno, mostos que han sido excesivamente desfangados, o con gran cantidad de azúcares (Ribéreau-Gayon et al., 1999).

La adición de sustancias nitrogenadas al medio facilita que la fermentación alcohólica del mosto de uva se desarrolle sin ningún tipo de dificultad. Su incorporación puede prevenir paradas y ralentizaciones de la fermentación alcohólica, así como evitar la producción de ácido sulfhídrico. Además, su incorporación favorece la producción de aromas no varietales, y evita la producción de compuestos azufrados que provocan un olor desagradable, debido a que el origen de los problemas de aromas a reducción está enlazado con la carencia de nutrición nitrogenada en el medio. Es importante destacar que la forma de incorporar la nutrición nitrogenada a los mostos puede incrementar la formación de aromas varietales, debido a que los aminoácidos, presentes en la nutrición orgánica, realzan la complejidad aromática, incrementando los registros varietales. Una buena nutrición nitrogenada provoca una correcta actividad de las enzimas (proteínas) que son responsables de liberar precursores aromáticos presentes en la uva, incrementando los aromas varietales del vino (Navascúes et al., 2018)

Se debe tener en cuenta que la adición de nutrición nitrogenada, es aconsejable que se realice en primer lugar, antes de iniciar la fermentación alcohólica. Si se tiene en cuenta el perfil aromático, es aconsejable que sea nutrición orgánica, ya que se permite la expresión de los aromas varietales terpénicos y la síntesis de ésteres etílicos de ácidos grasos, los cuales presentan aromas agradables.

Por otro lado, las necesidades de NFA se pueden ver afectadas por distintos factores y/o parámetros, incrementándose con el aumento de la concentración de azúcares en el mosto (Jiranek et al., 1995). Además, pueden fluctuar de una forma significativa en función de la cepa de levadura utilizada, ya que algunas pueden llegar a requerir dos veces más de NFA, para fermentar el mismo mosto (Julien et al., 2001).

La deficiencia de NFA puede conducir a la disminución de la velocidad de fermentación y a paradas precoces de la misma, ya que el nitrógeno se utiliza en la biosíntesis de las proteínas que participan en el proceso de transporte de los azúcares (Bell et al., 2005).

1.3. INFLUENCIA DE LA CONSERVACIÓN

Las condiciones de conservación son importantes tanto en la calidad como en la composición del vino. Los factores que más pueden llegar a incidir negativamente en ella, son la humedad, la temperatura y las condiciones de luminosidad a las que se exponen los vinos.

Entre ellos, la temperatura de conservación puede provocar cambios en la composición fisicoquímica del vino. Los estudios realizados por la Estación de Viticultura y Enología de Navarra se han centrado en analizar la posible influencia de la temperatura sobre los parámetros del vino, realizando un seguimiento analítico en botella durante un periodo de 6 meses (Santamaría et al., 2009). Los resultados obtenidos a lo largo de este periodo indican que la temperatura afecta directamente a distintos parámetros analizados en el vino elaborado, entre ellos a la concentración de sulfuroso libre, total y al contenido de acetato de etilo. La conclusión final que se obtuvo es que la temperatura afecta a la calidad del vino y a su composición química.

Por otro lado, la temperatura de conservación podría modificar la población microbiana presente en el vino. La temperatura óptima para el desarrollo y el crecimiento de levaduras y bacterias oscila entorno los 22°C-27°C, reproduciéndose con mayor rapidez cuando la temperatura es de 25°C (Ramírez et al., 2011).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es evaluar la influencia de la ausencia de adición de anhídrido sulfuroso previa al embotellado en las características fisicoquímicas y microbiológicas de los vinos elaborados.

Para ello, se realizará un estudio comparativo de los vinos embotellados sin adición de anhídrido sulfuroso en diferentes condiciones de conservación, en presencia y/o ausencia de nutrición nitrogenada, así como con diferentes cepas de levaduras empleadas para la vinificación.

Por tanto, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la influencia de la presencia y/o ausencia de la adición de nutrición nitrogenada en la fermentación y conservación de los vinos.
- Evaluar la influencia de la cepa de levadura utilizada en las diferentes vinificaciones realizadas.
- Evaluar el efecto de la ausencia de incorporación de anhídrido sulfuroso en vinos conservados a 4°C realizando una comparación con el vino recién terminado.
- Evaluar la influencia del cambio de temperatura en los vinos sin incorporación de anhídrido sulfuroso.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UVA Y ELABORACIÓN DE VINOS

La vinificación se llevó a cabo con uva de la variedad Verdejo congelada de la campaña de vendimia 2017. Esta uva estuvo almacenada en cámaras frigoríficas de la E.T.S. de Ingenierías Agrarias de Palencia a una temperatura de -20°C hasta el momento de su utilización. Se trasladó a la bodega experimental de la Escuela para su procesado. La uva congelada se sacó de la cámara frigorífica una noche antes de empezar a procesarla, permitiendo que se descongelase. A continuación, se despalilló y estrujó. Para ello, se utilizó una despalilladora-estrujadora. La función de la despalilladora es separar los granos de uva de los raspones y la función de la estrujadora, consiste en la rotura del hollejo por presión, para que se desprenda la pulpa y se libere el jugo.

Se analizaron para su posterior corrección distintos parámetros del mosto de partida. Las correcciones que se aplicaron en el mosto de partida fueron las siguientes: sulfuroso libre (SO_2L), el cual se corrigió hasta 30 mg/L y acidez total que se llevó hasta 5g/L de ácido tartárico.

Una vez corregido el mosto de partida se procedió a poner en marcha el desfangado estático del mosto, este se realizó por frío a una temperatura de 8°C, durante 24 horas, una vez finalizó este proceso se repartió el vino en depósitos de 50 L de capacidad.

Se realizaron 12 microvinificaciones, de forma que cada ensayo se realizó por duplicado. Para cada vinificación se utilizó un depósito de acero inoxidable de 50 L en los que el volumen de mosto fue unos 30L por depósito.

3.1.1. MICROORGANISMOS

El estudio se realizó con tres cepas diferentes de levadura de especie *S.cerevisiae*, las cuales se denominaron levadura M.1, levadura M2 y levadura control. En el caso de levadura M.1 y levadura M.2 se corresponden con cepas comerciales de carácter novedoso, cuyo comportamiento en la vinificación elaborada con variedad de uva Verdejo se quiere comprobar. Por otro lado, levadura control, es una cepa comercial de la casa Agrovín, Viniferm REVELACIÓN, con una fase de latencia corta, una velocidad de fermentación rápida, baja producción de anhídrido sulfuroso, y baja producción de ácido acético (Agrovín). Se pretende establecer una comparación entre levadura M.1 y levadura M.2 con levadura control en la elaboración de vino de uva Verdejo.

3.1.2. NUTRICIÓN

Las vinificaciones elaboradas con levadura control, levadura M.1 y M.2 se realizaron en presencia y/o ausencia de nutrición nitrogenada.

La nutrición nitrogenada en forma orgánica se aplicó en momentos previos al inicio de la fermentación alcohólica, con una dosis de 50 g/HL. Esta adición se aplicó para conseguir un correcto desarrollo de la fermentación alcohólica, y así evitar posibles paradas de fermentación o fermentaciones lentas.

De las 12 microvinificaciones, 6 de ellas tuvieron incorporación de nutrición, las otras 6 realizaron el proceso de fermentación alcohólica en ausencia de la misma.

3.2. CONTROL DE LA CINÉTICA FERMENTATIVA

El seguimiento de la cinética fermentativa se llevó a cabo diariamente mediante la toma de densidad y temperatura de los diferentes depósitos, realizando dos medidas diarias de estos parámetros.

Para favorecer la activación de las levaduras se realizaron pequeños bazuqueos en los diferentes ensayos. Una vez que las densidades comenzaron a estabilizarse entorno los 997 g/L, se consideró que la fermentación alcohólica había finalizado.

3.2.1. CONSERVACIÓN Y TOMA DE MUESTRAS

La fermentación alcohólica finalizó el día 22 de marzo de 2018, en este momento se procedió a embotellar el vino terminado.

El vino se mantuvo en la cámara de refrigeración durante 9 meses, después parte del vino se conservó a la misma temperatura y otra parte se sometió a temperatura ambiente. Además, tras finalizar la fermentación alcohólica, se conservaron congeladas varias botellas de los vinos obtenidos, para su posterior análisis.

Tras los 21 días de permanencia a 4°C o a temperatura ambiente (21°C), se procedió al análisis de todos los vinos, incluidos los que se mantenían congelados desde que finalizó la fermentación.

3.3. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

El análisis microbiológico de los vinos se realizó mediante siembra en medios de cultivo, recuento y observación macroscópica y microscópica de las colonias obtenidas.

3.3.1. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo empleados se describen a continuación. Todos ellos se esterilizaron antes de su uso en un autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Para el crecimiento de las levaduras se utilizó el medio YPD 1% (p/v) de extracto de levadura (Labkem), 2% (p/v) de peptona bacteriológica (Panreac), 2% (p/v) de glucosa y 1,5% (p/v) de agar (BD BactoTM Agar), pH 6,5 ± 0,2.

Para el crecimiento de bacterias acéticas se utilizó el medio de manitol 0,5% (p/v) de extracto de levadura (Labkem), 0,3% (p/v) de peptona bacteriológica (Panreac), 2,5% (p/v) de manitol, y 1,5% (p/v) de agar (BD BactoTM Agar). Este medio permite el crecimiento de las bacterias acéticas Gram (-), en cambio las Gram (+) son más exigentes y no crecen en este medio.

El medio MRS (PanReacAppliCherm), apto para el recuento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas. Su composición es la siguiente: 2,0g/L de di-amonio hidrógeno citrato, 8,0 g/l de extracto de carne, 4,0 g/L de extracto de levadura, 20,0 g/L de D(+)-glucosa, 0,2 g/L de magnesio sulfato, 10,0 g/L de peptona bacteriológica, 2,0 g/L de di-potasio hidrógeno fosfato, 5,0 g/L de sodio acetato, 1,0 g/L de tween 80 y un pH para el medio de $6,2 \pm 0,2$.

3.3.2. SIEMBRA

Para realizar la siembra para el cultivo de microorganismos, el vino se homogenizó bien antes de tomar la muestra de las botellas pertenecientes a las distintas vinificaciones realizadas y se sembró en profundidad en placas Petri en medios YPD, MRS y manitol.

La siembra de las placas Petri se llevó a cabo en una campana de flujo laminar (INDELAB), en condiciones de asepsia, para evitar posibles contaminaciones. Una vez sembradas, se incubaron a 26°C en una estufa, durante 5-7 días.

3.3.3. RECUENTO E IDENTIFICACIÓN

El recuento de levaduras contenido en el vino, se realizó siguiendo los métodos analíticos oficiales establecidos por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV/OENO 206/2010).

La observación de los microorganismos se realizó directamente de las placas sembradas en los diferentes medios sólidos (YPD, MRS y manitol), las colonias se tomaron con un asa de siembra y en un portaobjetos se depositó una gota de agua estéril sobre la que se realizó la extensión de las colonias.

Por otro lado, el recuento se realizó de forma macroscópica, además esta forma de observación permitió describir el tamaño de las colonias, su aspecto, transparencia, coloración... Se contabilizaron las colonias presentes en el medio sólido de las distintas placas sembradas. Es importante tener en cuenta, que las placas que no cuenten con una población de entre 10-300 colonias no se consideraron un resultado significativo, ya que el margen de error estadístico es bastante alto. Tampoco se tomará como resultado, las placas que presenten más de 300 colonias, ya que se imposibilita el recuento de las mismas. Los resultados se expresan como UFC/mL (unidades formadoras de colonias/mL).

La morfología se determinó a través de la observación en microscopio de todas las extensiones tomadas de las colonias de los medios preparados con el vino elaborado, en sus diferentes formas de conservación. Para la observación microscópica se empleó un microscopio LeicaDM750 y se utilizaron los objetivos 40x y 100x.

3.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.4.1. ACIDEZ VOLÁTIL

La acidez volátil se determinó por el método de García Tena (García et al., 2000), en un destilador de la casa comercial GAB, denominado microdestilador o volatímetro.

Se basa en una destilación fraccionada de 11 mL de vino, y valoración separada de las fracciones recogidas. El primer volumen se recoge en una probeta de 5,1 mL y el segundo en probeta de 3,2 mL. Este último se valora con una disolución de NaOH, 01N de factor conocido (García et al., 2000).

La acidez volátil se expresa como g/L de ácido acético.

3.4.2. ACIDEZ TOTAL

La acidez total es la suma de los ácidos valorables cuando se lleva el pH a 7 añadiendo la solución alcalina valorada (OIV-AS-313-01-ACITOT).

La determinación de la acidez total se realizó a través del método oficial, el método potenciométrico. Este consiste en una valoración volumétrica ácido-base con NaOH, mediante la lectura con un pH-metro hasta llegar a $\text{pH}=7,00 \pm 0,5$.

La acidez total se expresa como g/L de ácido tartárico.

3.4.3. pH

El pH se determinó una vez finalizada la fermentación alcohólica mediante un pH-metro (Crison).

3.4.4. ANHÍDRIDO SULFUROSO TOTAL

La determinación de anhídrido sulfuroso total se realizó mediante el método Ripper, el fundamento se basa en realizar una iodometría, el anhídrido sulfuroso es oxidado en medio ácido por el iodo I_2 . La cantidad de iodo gastada hasta oxidar completamente el anhídrido sulfuroso nos indicará su concentración en el vino.

El anhídrido sulfuroso se expresa como mg/L.

3.4.5. GRADO ALCOHÓLICO

Para realizar este tipo de determinación se utilizó el método ebullométrico, mediante el uso de un ebullómetro y de un termómetro contrastado de 86-100°C, con apreciación de 0,05°C. El fundamento se basa en la diferencia que existe entre los puntos de ebullición del agua y el alcohol y se realiza de forma eficaz con los ebullómetros de fácil manejo.

El grado alcohólico se expresa como grado alcohólico volumétrico, %vol.

3.4.6. NITRÓGENO FÁCILMENTE ASIMILABLE

El índice de formol Aerny, J, 1995 nos ofrece una estimación sencilla tanto de los aminoácidos libres como del amonio. El fundamento de este método consiste en que el nitrógeno amónico y α -amino, reacciona con formaldehído liberando $2H^+$ que se valoran con hidróxido sódico.

Para realizar la determinación de nitrógeno fácilmente asimilable de los vinos se realizó un ajuste del pH de la solución del formaldehído con NaOH 0,1M a pH 8,5, por otro lado en un vaso de precipitados se añadieron 25 mL de vino, a cuya muestra también se le ajustó el pH a 8,5 con NaOH 0,1M, posteriormente se añadió 10 mL de formaldehído con pH ajustado y se mezclaron. Tras 1 minuto a temperatura ambiente, se realizó una valoración con hidróxido sódico 0,25 M hasta que el pH fuese 8,1.

El valor de NFA se expresa como mg de N/L.

3.4.7. AZÚCARES REDUCTORES

Los azúcares reductores de los vinos obtenidos, se determinaron por el método de Rebelein, el cual su fundamento se basa en una oxidación de los azúcares reductores que existen en el vino, mediante una disolución de cobre divalente en medio alcalino y en ebullición. Se añadieron en un matraz los siguientes compuestos, 2mL de vino, 1mL de solución cúprica y 5 mL de solución alcalina de sal de Seignette, a mayores se incorporaron perlas de vidrio en el matraz.

Una vez calentado, contando 2 minutos desde que comienza la ebullición, se dejó enfriar y se añadió de forma sucesiva los siguientes reactivos, según el método seguido (10 mL de yoduro de potasio, 30% p/v, 10 ml de ácido sulfúrico 16% p/v y 10 mL de almidón 2%). Se realizó por último una valoración con tiosulfato sódico hasta conseguir un viraje a color blanco marfil.

Este valor obtenido se expresa como g/L de azúcares reductores.

4. RESULTADOS

Todos los análisis se realizaron por triplicado, en cada valor se expresa la media aritmética de los tres valores, acompañados de su desviación estándar.

Todos los datos obtenidos de los análisis del vino se evaluaron a través de un análisis de varianza (ANOVA), para ello se ha utilizado el programa estadístico STATGRAPHICS centurión XVII (17.01.0012).

4.1. CINÉTICA FERMENTATIVA

Se realizó un control de la cinética fermentativa mediante un seguimiento de los parámetros de densidad y temperatura. El objetivo principal fue, establecer una comparación entre las cinéticas, en función de los ensayos que llevan incorporado un aporte de nutrientes y de los que no, además de conocer el comportamiento de las dos cepas experimentales.

La inoculación de las diferentes cepas de *S.cerevisiae* y la incorporación de nutrición se realizó simultáneamente.

Todas las medidas de densidad representadas en la figura 2 se realizaron por duplicado.

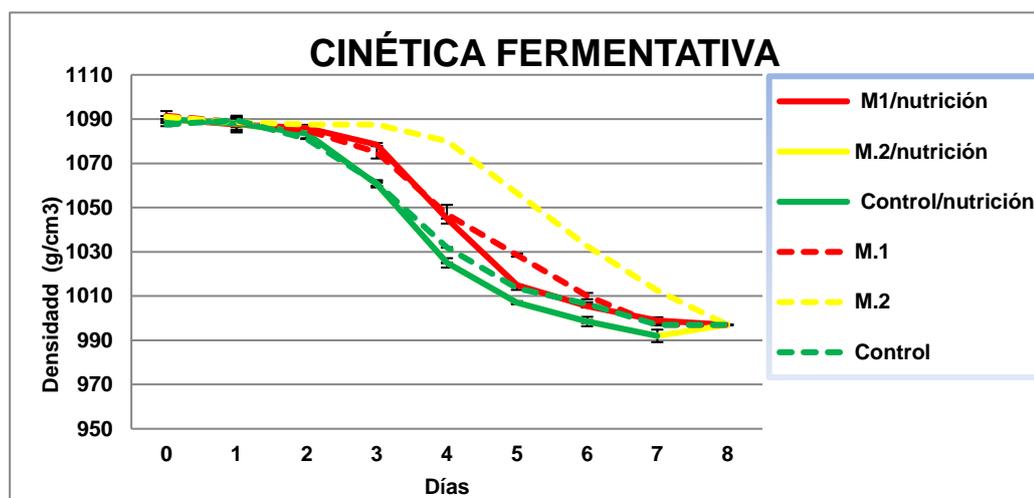


Figura 2. Control de la cinética fermentativa de los diferentes ensayos estudiados. Los ensayos son: Control con o sin adición de nutrición, M.1 con o sin adición de nutrición y M.2 con o sin adición de nutrición.

Como se puede observar en la figura 2 se pueden encontrar diferencias en las cinéticas fermentativas de los ensayos. La disimilitud más significativa que se puede encontrar en las curvas representadas, es la incorporación o no de nutrición nitrogenada en los distintos ensayos.

En primer lugar, se comprobó que el inicio de la fermentación alcohólica en todos los ensayos los comenzó el día 1. Sin embargo, se apreciaron disimilitudes significativas en la bajada de la densidad entre las distintas cinéticas fermentativas hasta el día 3, en el que se comienzan a observar una serie de fluctuaciones en la curva de densidad de cada uno de los ensayos.

Se pueden observar diferencias entre la cinética fermentativa en el caso de la cepa de levadura M.2 en función de la presencia/ausencia de nutrición. Los resultados indican que sus necesidades nutricionales son elevadas, ya que la cinética llevada a cabo por la levadura M.2 sin nutrición muestra una cinética más lenta, y una bajada de densidad más ralentizada que la cepa de levadura M.2 que cuenta con incorporación de nutrición.

En cambio, en el caso de las cinéticas llevadas a cabo por levadura control y M.1, no presentan diferencias significativas, lo que indica que la incorporación de nutrición nitrogenada influye de manera poco significativa pudiendo realizar correctamente la fermentación alcohólica sin la incorporación de nutrientes al medio. Cabe destacar que la cinética fermentativa de la levadura control y M.2 con nutrición se solapan.

Todos los ensayos finalizaron con una densidad de 997 g/cm^3 en el mismo periodo de tiempo, por lo que pese a las diferencias en las cinéticas fermentativas que presentan, la fermentación concluyó el día 9 para todas ellas, ya que, las levaduras consumieron los nutrientes necesarios y transformaron los azúcares presentes en etanol, aunque hay que tener en cuenta que casi siempre quedan azúcares residuales en el vino. Todas las cinéticas finalizaron de forma correcta, sin presentar problemas durante su transcurso independientemente de la levadura empleada y de la nutrición añadida.

4.2. ANÁLISIS MICROBIANO

Tradicionalmente, los métodos utilizados para la identificación y caracterización de especies y cepas de levaduras se han basado en sus características morfológicas, sexuales, y bioquímicas (Kreger-Van Rij, 1984; Barnet et al., 1990).



Figura 1. Placa Petri de medio YPD. Observación y recuento de la población microbiana.

Para el análisis microbiológico, se realizó un examen macroscópico y microscópico de los cultivos, el primero nos permitió conocer el aspecto de las colonias, y el segundo la morfología de los microorganismos vínicos utilizando el microscopio.

La observación microscópica se realizó en fresco, es decir visualizamos el microorganismo en una suspensión microbiana, para ello se tomaron colonias en cada medio sólido de la placa Petri de todos los ensayos realizados, situando la muestra tomada de cada medio en un portaobjetos, añadiéndole una gota de agua y a su vez cubriéndose con un portaobjetos, para así poder observar mediante el microscopio las posibles formas microbianas del medio.

Esta observación nos permite comprobar la presencia de microorganismos en los diferentes medios, constatar si hay diversidad, determinar su morfología y observar su comportamiento.

El recuento y observación de la población microbiana se realizó una vez pasado un periodo de tiempo (5-7 días) de incubación a 26°C, permitiendo así el crecimiento microbiano. La observación a microscopio nos permitió comprobar, que el crecimiento en los diferentes medios, fue únicamente de levaduras, las cuales tras su examen a microscopio presentaron una morfología similar en todos ellos. Una vez observado el crecimiento en los diferentes medios, se procedió a realizar el recuento. En la Tabla 3 se expresan los resultados obtenidos a través del recuento del crecimiento microbiano en medio YPD. En los casos en los que el recuento de la población de levaduras es inferior a 10^2 UFC/ml, la población de levaduras no es significativa, según las pautas propuestas en la resolución de la OIV/OENO 206/2010.

Tabla 3. Recuento de la población microbiana de levaduras en el medio YPD

Tª	CON NUTRICIÓN (UFC/ml)			SIN NUTRICIÓN (UFC/ml)		
	Control	M.1	M.2	Control	M.1	M.2
4°C	*	$>3 \times 10^2 \pm 0,7 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2 \pm 0,9 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2 \pm 0,6 \times 10^2$	$>3 \times 10^2 \pm 0,7 \times 10^2$	$>3 \times 10^2 \pm 0,7 \times 10^2$
AMBIENTE	*	$1 \times 10^2 \pm 0,7 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2 \pm 0,8 \times 10^2$	*	$2,2 \times 10^2 \pm 0,7 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2 \pm 0,6 \times 10^2$

Control (con y sin nutrición), M.1 (con y sin nutrición) y M.2 (con y sin nutrición). * No significativo

Tras analizar los datos representados en la tabla 3, se puede hablar de dos factores clave que marcan la diferencia en el crecimiento de la población microbiana en los diferentes medios.

En primer lugar, los diferentes vinos embotellados permanecieron conservados a 4°C durante nueve meses, lo que indica que la población que está presente en los distintos ensayos elaborados, es la población residual presente tras finalizar la fermentación alcohólica, por lo que los 9 meses de conservación a 4°C no han sido suficientes para inhibir las levaduras en su totalidad. La exposición a temperatura ambiente y a 4°C de estos vinos no muestra cambios significativos en la población de levaduras, debido a que el desarrollo microbiológico no se ha visto influido.

En los datos representados, se puede comprobar que la población de levadura control ha sido inferior a la de las levaduras experimentales, por lo que el crecimiento ha sido mayor en el caso de las últimas, quedando más población microbiana residual.

Por otro lado, respecto al vino terminado, que fue congelado una vez finalizada la fermentación alcohólica, no aporta datos significantes, ya que a temperaturas bajo cero no se posibilita el crecimiento microbiano en los vinos, por lo que al no haber crecimiento, no se realizó un análisis microbiológico a los 9 meses.

4.3. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

En las siguientes tablas (tabla 4 y 5) se muestran los valores obtenidos de los diferentes análisis realizados a los vinos, teniendo en cuenta la temperatura de conservación y la presencia/ausencia de nutrición.

Los parámetros que determinan la idoneidad del mosto y del vino, de acuerdo a los estándares de legalidad y la calidad del vino finalizado, son el azúcar, la densidad, el grado alcohólico, el pH, la acidez total, la acidez volátil, el anhídrido sulfuroso y el color (Jackson & Lombard, 1993).

Se realizó un análisis estadístico mediante análisis de varianza (ANOVA) con los datos obtenidos de los análisis de los vinos. El objetivo principal fue comprobar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes parámetros fisicoquímicos estudiados en el vino.

El vino terminado se conservó congelado hasta su análisis, lo que pudo provocar modificaciones en los valores obtenidos de algunos parámetros, como son el pH o la acidez total tras la conservación. Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas tanto en los ensayos de vino terminado como en los ensayos de vino conservado a 4°C y temperatura ambiente, en los siguientes parámetros: acidez total, acidez volátil y pH.

En el presente estudio solo se valorarán estos tres parámetros fisicoquímicos debido a que el resto de parámetros no nos aportan diferencias significativas.

A continuación, se explican los resultados obtenidos de cada uno de los parámetros analizados, teniendo en cuenta, tanto el tipo de levadura empleada en cada elaboración, como la temperatura a la que fueron conservados los diferentes ensayos y la adición o no de nutrición nitrogenada al medio.

RESULTADOS ANALÍTICOS DE VINO TERMINADO Y VINO CONSERVADO A 4°C

Tabla 4. Resultados analíticos significativos entre vino terminado y vino conservado a 4°C.

Parámetros fisicoquímicos	Temperatura de conservación	Con nutrición			Sin nutrición		
		Control	M.1	M.2	Control	M.1	M.2
ACIDEZ TOTAL (g/L TH ₂)	Vino terminado	5,3 ±0,18a	4,9 ±0,08a	4,9 ±0,09a	4,8 ±0,09b	5,4 ±0,09b	4,7±0,10a
	Vino a 4°C	5,3 ±0,15a	4,6 ±0,12a	4,6 ±0,10a	5,3 ±0,10a	4,8 ±0,10a	4,6±0,05a
ACIDEZ VOLÁTIL (g/L a. acético)	Vino terminado	0,08 ±0,05a	0,07±0,005a	0,07±0,10a	0,19±0,05d	0,08±0,2a	0,08±0,001a
	Vino a 4°C	0,08±0,004a	0,08 ±0,05a	0,08 ±0,01a	0,1±0,004b	0,1 ±0,05b	0,1±0,005b
pH	Vino terminado	3,26±0,6a	3,48±0,45c	3,27±0,85a	3,15±0,09a	3,15±0,09a	3,24±0,06b
	Vino a 4°C	3,2±0,19ab	3,27±0,03a	3,32±0,04ab	3,2±0,04a	3,33±0,02b	3,23±0,11a

Control (con y sin nutrición), M.1 (con y sin nutrición) y M.2 (con y sin nutrición). Letras diferentes dentro de un mismo parámetro fisicoquímico significa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En la tabla 4 se expresan los resultados obtenidos de las analíticas efectuadas a los vinos, tanto conservados a 4°C, como vino terminado. El análisis de los resultados se centrará en observar las posibles diferencias significativas en los siguientes parámetros: acidez total, acidez volátil y pH.

Los resultados obtenidos de la acidez total en los diferentes ensayos muestran diferencias significativas en los vinos elaborados en presencia o ausencia de nutrición. Se aprecian cambios significativos entre el vino terminado y el vino conservado a 4°C de temperatura. El vino terminado ha podido dar lugar a la formación de un precipitado de ácido tartárico debido a la baja temperatura a la que se conservó, pudiendo provocar diferencias en los resultados obtenidos entre los diferentes vinos. Según Vejnar (1971) en sus estudios demuestra que la precipitación de ácido tartárico es muy común en vinos que no han sido estabilizados por frío en momentos previos a su almacenaje.

Los resultados obtenidos muestran niveles bajos de acidez volátil en vino terminado. Asimismo, el vino conservado a 4°C, presenta diferencias significativas respecto los resultados obtenidos de acidez volátil de vino terminado, viéndose un ligero aumento en los que no llevaban incorporación de nutrientes en el medio, ya que la levadura ha podido necesitar más cantidad de nutrición nitrogenada para desarrollarse y transformar el azúcar en etanol, por lo que ha podido tomar una ruta metabólica alternativa, generando productos secundarios indeseados, provocando un ligero aumento en el contenido de ácido acético.

Cabe destacar la posible influencia del tipo de levadura empleada en la subida de acidez volátil, según autores como Hidalgo (2019) las levaduras son capaces de formar cantidades apreciables de ácido acético durante la fermentación alcohólica a través de dos vías bioquímicas, en primer lugar a partir de ácido pirúvico y en segundo a partir del acetaldehído, por lo tanto las levaduras que forman menos concentración de ácido acético es debido a que sintetizan mayor cantidad de ácido pirúvico.

Por último el pH presenta diferencias significativas entre los resultados obtenidos de vino terminado y vino conservado a 4°C, se debe de tener en cuenta que el parámetro de la acidez total va altamente relacionado con el pH, y en este caso un descenso en el contenido de ácido tartárico ha provocado un incremento en el valor del pH, por ello, los resultados entre ambos vinos presentan variaciones estadísticas entre ellos.

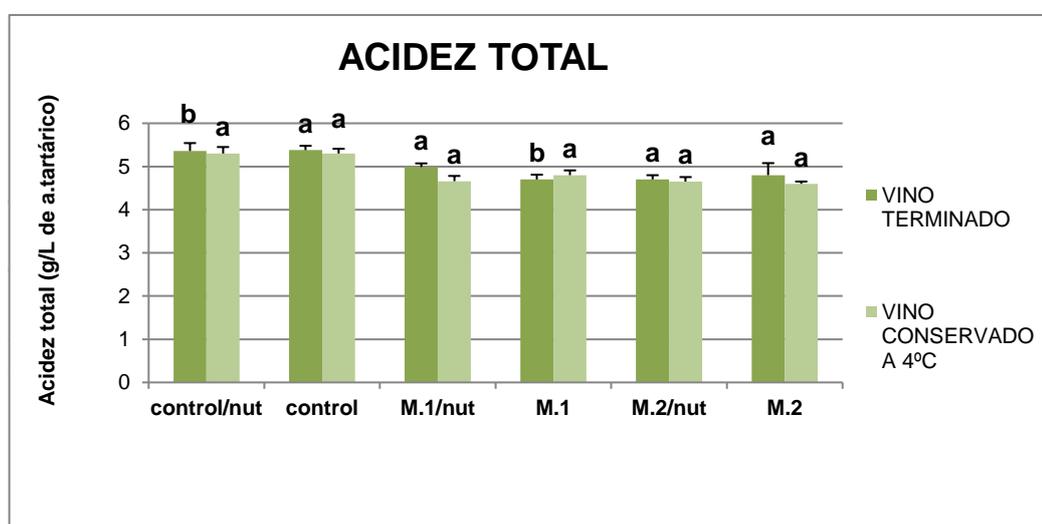


Figura 3. Valores medios de acidez total en vino terminado y vino conservado a 4°C.

Se puede comprobar en la figura 3 y en la tabla 5, que los resultados obtenidos muestran diferencias significativas entre los ensayos, debido a que al permanecer un periodo de tiempo largo a temperaturas bajas, ha dado como resultado valores similares en este parámetro, la precipitación de bitartrato potásico ha podido influir en la cantidad de ácido tartárico y pH del medio.

Los valores obtenidos son válidos en vino blanco, ya que se encuentran en torno los 5 g/L- 6 g/L, aún así es deseable que los valores sean un poco más altos. Otros autores en sus estudios afirman que los valores del vino fluctúan generalmente entre 6,0 y 7,0 g/L de ácido tartárico (Oreglia et al., 2000).

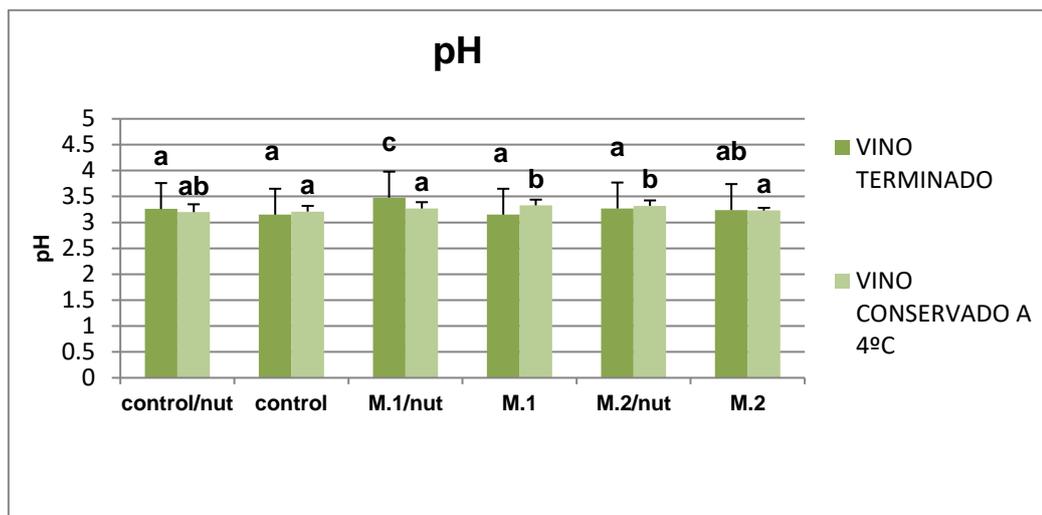


Figura 4. Valores medios de pH en vino conservado a 4°C y vino a temperatura ambiente.

Los valores de pH van altamente relacionados con la cantidad de ácido tartárico y málico que contiene el medio, una reducción y/o descenso de este último parámetro implica un aumento del pH, como se puede observar en la figura 5.

Ambos factores son importantes para mantener la calidad del vino, por lo que es importante destacar que los vinos, es aconsejable que posean valores de pH más bajos y un contenido en ácido tartárico mayor, para así evitar posibles contaminaciones bacterianas, y mejorar la efectividad de compuestos como el anhídrido sulfuroso. Estando de acuerdo con los resultados obtenidos por Santamaría et al., 2005 en los que pH inferiores han proporcionado una mayor estabilidad microbiológica.

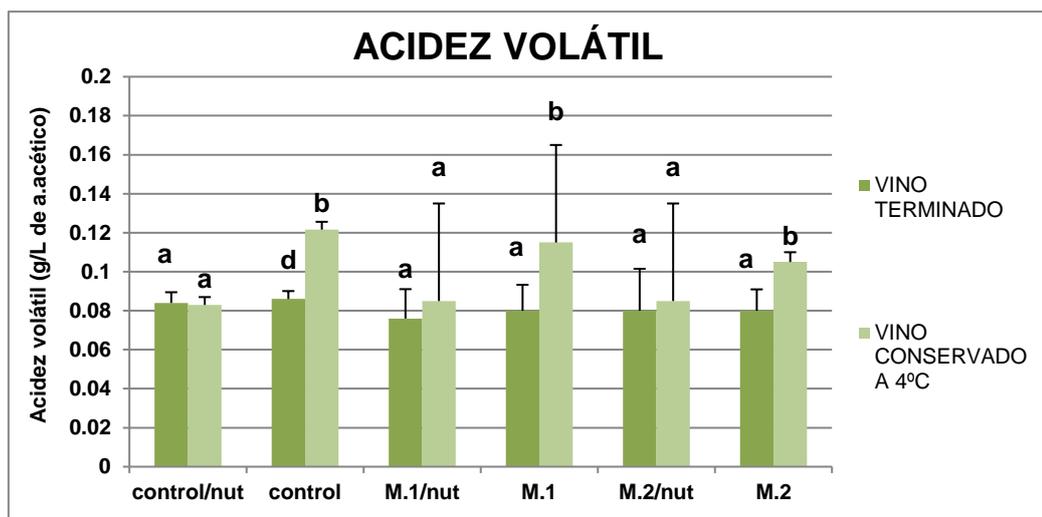


Figura 5. Valores medios de acidez volátil en vino terminado y vino conservado a 4°C.

Los resultados que se muestran en la figura 7 presentan unos niveles bajos de ácido acético, debido a las temperaturas bajas a las que se mantuvo el vino durante 9 meses, ya que las bajas temperaturas ralentizan la proliferación microbiana en el vino.

También destacar que los ensayos que no han contado con nutrición han presentado valores de acidez volátil ligeramente más altos, debido a que al no tener nutrición nitrogenada ha provocado la formación de acidez volátil, ya que las condiciones durante la fermentación alcohólica han sido más complicadas para las levaduras.

Se observan valores más altos en el contenido de ácido acético en vino conservado a 4°C que en vino terminado, pudiendo deberse a una posible alteración microbiológica que conlleva un aumento de las temperaturas, teniendo en cuenta que las levaduras presentes en el medio han podido producir ácido acético como metabolito secundario debido a que las condiciones de fermentación en botella ha podido favorecer la producción de ácido acético ya que las condiciones fueron adversas.

Por último, destacar que el tipo de levadura utilizada en cada caso ha podido influir en la producción de ácido acético durante la fermentación alcohólica, pese a que en los resultados obtenidos no se ven claras diferencias entre una levadura u otra, otros estudios afirman que en vinos con baja carga microbiana, que no han sido contaminados por bacterias del ácido acético, la mayor parte de la acidez volátil que contiene el vino es resultado de la fermentación alcohólica del mosto por las levaduras y depende de la especie utilizada (Millan y Ortega et al., 1999).

RESULTADOS ANALÍTICOS DE VINO CONSERVADO A 4°C Y TEMPERATURA AMBIENTE.

Tabla 5. Resultados analíticos significativos entre vino conservado a 4°C y a Tª ambiente.

Parámetros fisicoquímicos	Temperatura de conservación	Con nutrición			Sin nutrición		
		Control	M.1	M.2	Control	M.1	M.2
ACIDEZ TOTAL (g/L TH ₂)	Vino Tª ambiente	5,5 ±0,11a	4,7 ±0,16a	4,7 ±0,09a	4,8 ±0,09b	5,2 ±0,07b	4,6±0,9a
	Vino a 4°C	5,3 ±0,15a	4,6 ±0,12a	4,6 ±0,10a	5,3 ±0,10a	4,8 ±0,10a	4,6±0,05a
ACIDEZ VOLÁTIL (g/L a. acético)	Vino Tª ambiente	0,19 ±0,11d	0,08±0,005a	0,07±0,10a	0,17±0,10d	0,07±0,23a	0,08±0,01a
	Vino a 4°C	0,08±0,004a	0,08 ±0,05a	0,08 ±0,01a	0,1±0,004b	0,1 ±0,05b	0,1±0,005b
pH	Vino Tª ambiente	3,38±0,45a	3,52±0,027b	3,71±0,18b	3,53±0,024c	3,67±0,05c	3,24±0,06b
	Vino a 4°C	3,2±0,19ab	3,27±0,03a	3,32±0,04ab	3,2±0,04a	3,33±0,02b	3,23±0,11a

Control (con y sin nutrición), M.1 (con y sin nutrición) y M.2 (con y sin nutrición). Letras diferentes dentro de un mismo parámetro físico-químico significa diferencias estadísticamente significativas ($n < 0.05$).

En la tabla 5, se encuentran los resultados obtenidos entre las analíticas de los vinos conservados a 4°C durante 9 meses y 21 días, y vinos conservados a temperatura ambiente, los cuales pasaron 9 meses conservados a 4°C, y pasaron 21 días expuestos a 21°C. Por lo que los resultados que nos pueden resultar de interés tras ser sometidos a un estudio estadístico son los siguientes: acidez total, acidez volátil y pH.

La acidez total presenta diferencias estadísticas significativas entre los ensayos control y M.1 sin nutrición, esto ha podido deberse a que los vinos conservados durante 21 días a temperatura ambiente muestran un aumento de pH mucho mayor en comparación con los vinos conservados a 4°C, esto se puede deber a cambios producidos por una posible actividad microbiana. A mayores tener en cuenta que la concentración de ácido tartárico disminuye al aumentar el pH, coincidiendo con otros autores en sus estudios, en los cuales muestran en sus ensayos realizados una clara disminución de la acidez total junto con un aumento del pH (Ribeiro et al., 2009).

Otro de los factores que han mostrado diferencias significativas es la acidez volátil, los vinos conservados a temperatura ambiente mostraron una subida en los valores en comparación con el vino conservado a 4°C, esto se puede deber a la presencia de bacterias acéticas, que, aunque a la hora de observar las placas no parecían haber proliferado, han podido estar presentes, provocando un aumento en este compuesto al desarrollarse con más facilidad a temperaturas altas. Como indican en otros trabajos, la presencia de bacterias en el medio, al finalizar la fermentación alcohólica, puede aumentar el contenido de ácido acético y formar compuestos indeseables (Seguin Moreau et al., 2011).

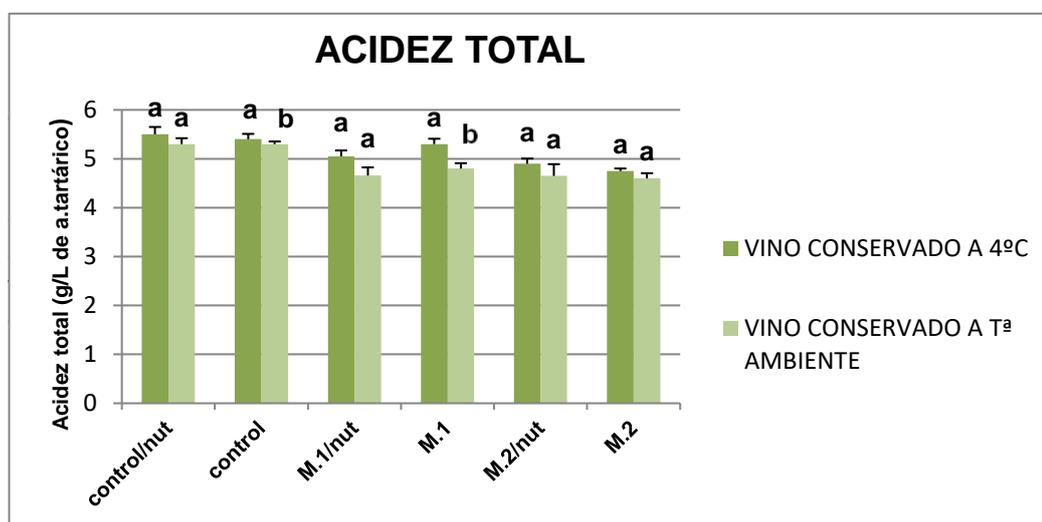


Figura 6. Valores medios de acidez total en vino conservado a 4°C y vino a temperatura ambiente.

Los datos representados en la figura 4 muestran los resultados analíticos correspondientes a vino conservado a 4°C y vino a temperatura ambiente, estos no presentaron diferencias significativas importantes, pero si unos valores ligeramente más altos en vino conservado a 4°C.

Es muy importante destacar la relación que presenta la acidez total y el pH, ya que a mayor pH los valores de acidez total tienden a disminuir, y viceversa. Aparte de la importancia de dicha relación, podemos comprobar que presenta diferencias estadísticamente significativas.

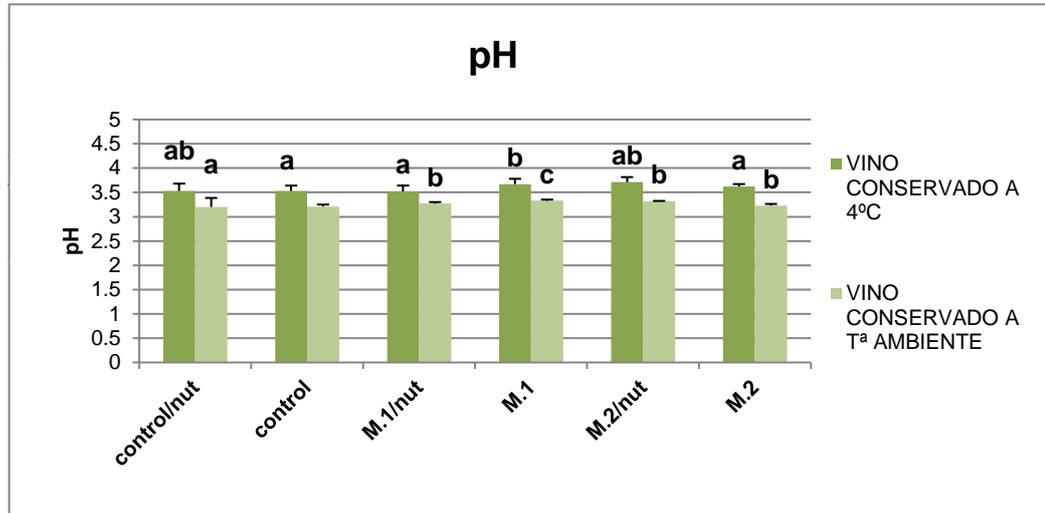


Figura 7. Valores medios de pH en vino conservado a 4°C y vino a temperatura ambiente.

La figura 6 se muestra que el pH es más bajo en vino conservado a temperatura ambiente que el obtenido en los vinos conservados a 4°C, es importante destacar que el descenso de la acidez total ha podido provocar un aumento en el pH, en otros estudios realizados demuestran que la reducción de ácido tartárico puede dar como resultado un incremento del pH tanto en mosto, como en vino (Gámez et al., 2018).

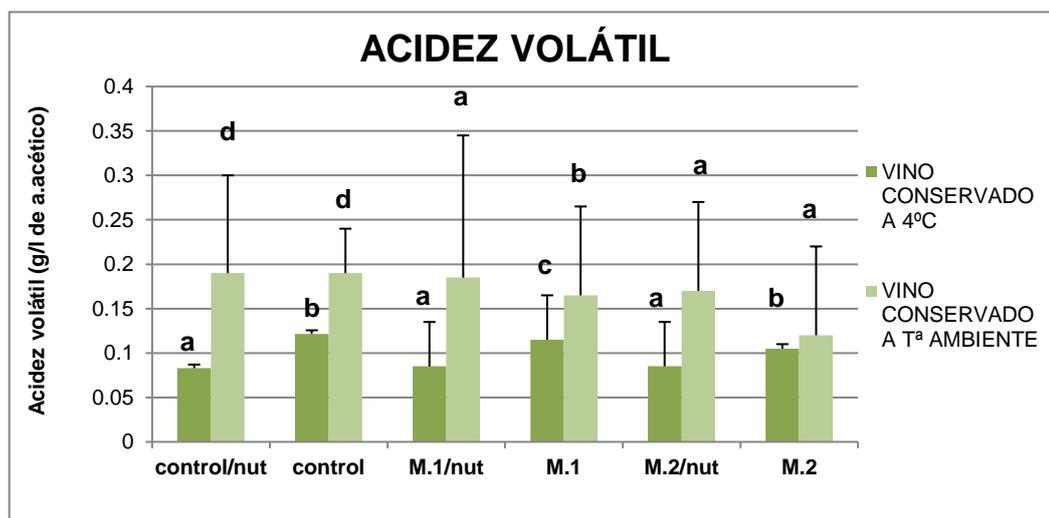


Figura 8. Valores medios de acidez volátil vino conservado a 4°C y vino a temperatura ambiente.

La acidez volátil entre vino conservado a 4°C y vino conservado a temperatura ambiente, muestra diferencias significativas importantes entre ellos. La acidez volátil en vino conservado a temperatura ambiente sufre un aumento importante, esto es debido a que pese haber estado 9 meses conservado a 4°C, la exposición durante 21 días a temperatura ambiente ha podido permitir la proliferación de bacterias en el medio, provocando un aumento en el contenido de ácido acético en los vinos, según otros estudios se puede llegar a formar ácido acético de forma anormal en caso de alteraciones de los vinos (Peynaud et al., 1984).

Destacar que durante la conservación a temperatura ambiente la posible proliferación bacteriana ha podido provocar la oxidación del etanol que contiene el vino a ácido acético, o incluso este ácido acético ha podido llegar a formarse durante reacciones químicas en el proceso de la fermentación alcohólica, como indica en sus estudios (Mareca et al., 1983).

De la misma forma la nutrición nitrogenada ha influido directamente, los vinos que no llevaban dicha incorporación presentan más cantidad de ácido acético que los ensayos que llevaban incorporada la nutrición nitrogenada, por lo que como indica Giudici, 1992a otros factores que influyen directamente a la formación de ácido acético en el medio son, la cantidad de azúcares presentes y la concentración de materia nitrogenada durante la fermentación alcohólica.

4.3.1. ANHÍDRIDO SULFUROSO TOTAL

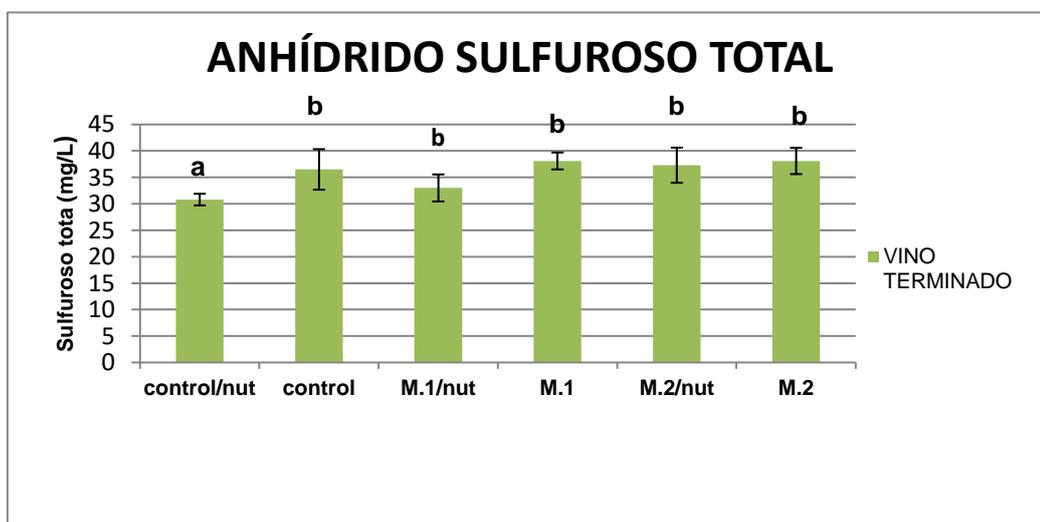


Figura 8. Expresión de los valores medios de anhídrido sulfuroso total en vino terminado.

La determinación del contenido de anhídrido sulfuroso se realizó en los vinos terminados para conocer la concentración disponible de este compuesto una vez pasado el periodo de tiempo de 9 meses, y determinar la posible influencia que ha podido provocar la ausencia de incorporación del mismo.

Los valores obtenidos del anhídrido sulfuroso total en vino terminado, mostraron valores muy bajos, por lo que el medio pudo estar desprotegido frente a ataques microbiológicos o posibles contaminaciones, el vino al congelarse una vez embotellado, pudo prevenir dicha proliferación microbiana.

La cantidad presente de anhídrido sulfuroso, también ha podido verse afectada por otros factores, como indica Caldentey et al., 1994 en sus estudios, ya que la capacidad productora de anhídrido sulfuroso puede verse afectada por otros factores, como son la nutrición, la temperatura de conservación, la glucosa...reflejándose dicha influencia en los resultados analíticos.

5. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el presente estudio se llegaron a las siguientes conclusiones:

- La ausencia/presencia de nutrición incorporada en el medio provocó diferencias significativas en las cinéticas fermentativas a lo largo del proceso de fermentación alcohólica, mostrando diferencias entre las cepas de levadura que precisaban el aporte de nutrición nitrogenada y las que no.
- La falta de adición de anhídrido sulfuroso respecto la población microbiana de los diferentes ensayos no ha mostrado evidencias en los resultados obtenidos, viéndose más influenciada dicha población por la temperatura de conservación y la incorporación o ausencia de nutrición nitrogenada al medio.
- La ausencia de anhídrido sulfuroso en los vinos conservados a 4°C no ha influido en los diferentes parámetros que conforman el vino, pero estos si han tenido una estrecha relación con la incorporación de nutrición nitrogenada al medio, ya que su ausencia puede originar problemas en el desarrollo de la población de levaduras dando lugar a la formación de productos no deseados como en este caso, el aumento en el contenido de ácido acético. Por otro lado depende del tipo de cepa utilizada en la elaboración, ya que ha podido influir en la formación de distintos compuestos, en este caso, según los resultados obtenidos un aumento en la acidez volátil.
- La ausencia de anhídrido sulfuroso en los parámetros analíticos tras someter el vino a temperatura ambiente, respecto al conservado a 4°C no ha provocado diferencias entre los resultados obtenidos. En el caso del contenido de ácido acético, ha sido mayor en los vinos conservados a temperatura ambiente, ya que la exposición a dicha temperatura ha podido influir directamente en su concentración, a mayores estos cambios dependen directamente de la incorporación o ausencia de nutrición nitrogenada, ya que es un factor que influye directamente en el contenido de este compuesto.
- La influencia de temperatura ha provocado cambios en los distintos parámetros (pH, acidez total y acidez volátil) de los diferentes ensayos.

6. BIBLIOGRAFÍA

Bashan, Y. (2013). Inoculant formulations are essential for successful inoculation with plant growth-promoting bacteria and business opportunities. *Indian Phytopath*, 64, 739-743.

Bell, J., & Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, (11), 242-295.

Caldentey, P. (1992). *Formación de compuestos sulfurados volátiles durante la fermentación alcohólica*. *American Wine Society Journal*, 11-12, 40-44.

Fleet, G. H. (1993). *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Switzerland.

Gómez, M. (s. f.). Udio de la composición físico-química y del color de vinos blancos jóvenes de Tenerife contraetiquetados. *Jornadas técnicas Vitivinícolas Canarias*, (1-11), 2-9.

Guerrero, R. F., Garcia-Parrilla, M. C., Puertas, B., & Cantos-Villar, E. (2005). Wine, resveratrol and health: A review. *Natural product communications*, 4(5), 635-658.

Hidalgo. (2019). *Tratados de enología*. Madrid: Mundi-Prensa.

Izquierdo-Canas, P. M., López-Martín, R., García-Romero, E., González-Arenzana, L., Mínguez-Sanz, S., Chatonnet, P., & Puig-Pujol, A. (2018). Effect of kaolin silver complex on the control of populations of *Brettanomyces* and acetic acid bacteria in wine. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 1823-1831.

Muñoz, R., Moreno-Arribas, M.-V., & De las Rivas, B. (2005). In microbiología del vino. En A. Carrascosa, R. Muñoz, & R. González (Eds.), *Bacterias Lácticas* (pp. 231-272). Madrid: AMV.

Nart, E., Martín, L., Puxeu, M., & Hidalgo, C. (2015). Evaluación de alternativas, para la elaboración de vinos de alta calidad. 5. http://vitec.wine/wp-content/uploads/2017/10/Semana-Vitvinícola_Artículo-Sulfuroso-VITEC.pdf

NegueruelaSuberviola, A. I., Echávarri Granado, J. F., Ayala Zurbano, F., & Lomas Esteban, A. M. (1995). Colorimetría En Vinos. In Zubia. *Monografías*, 7p. 151–166.

Ough, C. S., Kunkee, R. E., Vilas, M. R., Bordeu, E., & Huang M. C. (1988). The interaction of sulfur dioxide, pH, and dimethyl dicarbonate on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* Montrachet and *Leuconostocoenos* MCW. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 279-282.

Raynal, C., Wardrop, F., Languet, P., Suárez, C., Heras Manso, J. M., Dummont, A., & Julien-Ortiz, A. (2011). Fermentación controlada mediante la inoculación secuencial de una levadura “no-Saccharomyces” y de una levadura “*Saccharomyces Cerevisiae*”, una herramienta innovadora para el enólogo. *Alimentaria: Revista de Tecnología e Higiene de Los Alimentos*, 428, 83–92.

Ribéreau-Gayon, P., D. Dubourdieu, B. Donèche and A. Lonvaud. 2006. *Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications*. 497 p. Second Edition. John Wiley & Sons. New Jersey, USA.

Ribereau-Gayon P. 1985. New developments in wine microbiology. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 1-10.

Robles Calderón, R., Feliciano Muñoz, O., & Chirre Flores, J. H. (2016). Estudio del consumo de azúcares reductores durante la fermentación alcohólica del mosto de uva Italia para la obtención de vino blanco. *Industrial Data*, 19(2), 104. <https://doi.org/10.15381/idata.v19i2.12842>

Ruiz-Moreno, M.J., Raposo, R., Cayuela, J.M., Zafrilla, P., Piñeiro, Z., Moreno-Rojas, J.M.,...Cantos Villar, E. (2015). Valorization of grape stems. *Industrial crops and Products*, 63, 152-157. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.016>.

Santamaría,E.,Moya,L., Berrueta,J., Suberviola,J.,GómezCordovés. (2009). Efecto de la temperatura en la calidad organoléptica y composición química del vino. XXIV reunión anual del grupo de trabajo de experimentación en viticultura y enología. IMIDRA

Serrano, A. F., Moya, L., Ordoñez, A., Gómez-Cordovés, C., &Suberviola, J. (2010). XXVReunión Anual Del Grupo De Trabajo De Experimentación En Viticultura Y Enología. Estudio Del Efecto de Una Nueva Técnica de Regeneración de Barricas En La Calidad Organoléptica y Composición Del Vino, 1–14.

Suárez, C., Palacios, A., Santiago, L., Santamaría, P., López., R., Gutiérrez, A. R., 2003. Efecto del uso de levaduras inactivas en las paradas de fermentación. Influencia de los ácidos grasos en el desarrollo de la fermentación alcohólica. *La semana vitivinícola*. (2990), 4134-4140.

Tel, F. (2006). Puech, influencia de las condiciones de conservación del vino en botella, 33(0), 1–8.

Vally, H., N. L. A. Misso and V. Madan. 2009. Clinical effects of sulphite additives. *Clinical& Experimental Allergy* 39: 1643-1651.

Werner, M., Rauhut, D., &Cottureau, P. (2009). Levaduras Y Produccion Natural De Anhídrido Sulfuroso. 1–5.

Werner, M., R. D. (2009). Control de la temperatura. *Código de Buenas Prácticas Vitivinícolas Ecológicas*, 2006, 192–195. <https://www.infowine.com/docs/-Orw ES bassa.pdf>

Zironi, R., P. Romano, G. Suzzi, F. Battistutta y G. Comi. 1993. Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniasporaguilliermondii* or *Kloeckeraapiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *BiotechLetters* 15:235-238.