



Producción de sulfitos durante la fermentación de vinos blancos de 'Tardana' y rosados y tintos de 'Tempranillo' en la D.O. Utiel-Requena

J. MARTÍNEZ¹, C. CHIRIVELLA¹, J.L. ALEIXANDRE-TUDÓ², J.L. ALEIXANDRE³

(1) Instituto Tecnológico de Viticultura y Enología de Requena (Valencia, España)).

(2) Department of Viticulture and Enology (Stellenbosch University, South Africa).

(3) Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (Universitat Politècnica de Valencia, España).

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la producción de sulfitos de diferentes cepas de levaduras comerciales durante la fermentación de vinos blancos, rosados y tintos. Para ello se realizó una experiencia con vinos blancos de la variedad 'Tardana', y dos con vinos rosados y tintos de la variedad 'Tempranillo'. Se determinó el grado alcohólico, la acidez total, acidez volátil, pH, sulfuroso total, azúcares residuales, ácido málico, ácido láctico, ácido cítrico, y glicerol de los vinos, además de la intensidad colorante, el tono, la concentración de antocianos, y el índice de polifenoles totales en los vinos tintos. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la producción de sulfitos no superó valores medios de 1 mg/L, y que los valores de los parámetros analizados se encontraban dentro del rango de valores de los vinos de calidad. La fermentación se realizó con dos tipos de cepas de levaduras diferentes, observándose que la reinoculación a los 3 días del arranque de la fermentación daba origen al mínimo contenido de sulfitos.

Palabras clave: Sulfitos, levaduras comerciales, reinoculación, vinos blancos, rosados y tintos.

ABSTRACT

The production of sulphites during the fermentation of 'Tardana' white wines, and 'Tempranillo' rosé and red wines in the D.O. Utiel-Requena. In the present work, the production of sulphites from different commercial yeast strains during the fermentation of white, rosé and red wines was studied. For this, an experience was carried out with white wines of the 'Tardana' variety, and two with rosé and red wines of the 'Tempranillo' variety. The alcoholic degree, total acidity, volatile acidity, pH, total sulphurous, residual sugars, malic acid, lactic acid, citric acid, and glycerol of the wines were determined, in addition to the colour intensity, the tone, the concentration of anthocyanins, and the total polyphenol index in red wines. The results obtained showed that the production of sulphites did not exceed average values of 1 mg/L, and that the values of the analysed parameters were within the range of values of quality wines. The fermentation was carried out with two different types of yeast strains, observing that the re-inoculation 3 days after the start of the fermentation gave rise to the minimum content of sulphites.

Key words: Sulphites, commercial yeasts, re-inoculation, white, rosé and red wines.

El anhídrido sulfuroso (SO₂) comenzó a utilizarse como conservante hace aproximadamente unos 250 años, a finales del siglo XVIII. Hoy en día se usa ampliamente en el sector alimentario, especialmente en aquellos productos con bajos valores de pH, tales como zumos de frutas y bebidas fermentadas. Tradicionalmente, en el sector vinícola el sulfuroso se ha utilizado para controlar el desarrollo de microorganismos no deseados, así como para inhibir la oxidación enzimática mediante la acción de la polifenol-oxidasa (PPO). De este modo se controla el proceso oxidativo del vino, así como la aparición de fermentaciones alternativas (ALEIXANDRE y ALVAREZ, 2003).

No todo el anhídrido sulfuroso (o cualquiera de sus formas) presente en el vino procede por vía externa, ya que durante la fermentación alcohólica se forma como subproducto por la vía de reducción del sulfato. Las distintas cepas de levaduras se pueden clasificar en función de la cantidad de anhídrido sulfuroso que producen durante su metabolismo. El origen de la disparidad de producción de anhídrido sulfuroso de cada cepa de levadura es incierto, afirmando algunos autores que podría deberse a alteraciones o mutaciones de la enzima sulfito reductasa (WERNER *et al.*, 2009). La producción de sulfuroso por las levaduras es un aspecto importante para los productores de levaduras secas activas, siendo la gran mayoría de las levaduras del mercado productoras de SO₂ en cantidades inferiores a 20 mg/L.

El anhídrido sulfuroso está presente en el vino en varias formas, debido al complejo equilibrio químico que mantiene con el medio. Puede existir en estado libre (forma activa) o bien unido o combinado a otras moléculas (forma combinada), siendo la suma de las dos formas el sulfuroso total. Además, pese a que el rango de pH en el vino es relativamente pequeño (suele oscilar entre valores de 3 y 4), la concentración de las diferentes formas derivadas del sulfuroso depende directamente del pH, afectando a su grado de actividad, no siendo fácil calcular la cantidad precisa de sulfuroso de cada vino. En la práctica se tiende a utilizar concentraciones estándar de sulfuroso para cada tipo de vino, tratando de evitar utilizar cantidades excesivas de SO_2 , dada la aparición de alteraciones organolépticas no deseadas, y también porque puede suponer un riesgo para la salud, que se puede manifestar en forma de reacciones alérgicas diversas (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006; GUERRERO HIDALGO *et al.*, 2015a y 2015b). En este aspecto, la normativa, tanto española como europea, estipula que en el etiquetado de un vino debe constar la presencia de sulfitos si su concentración es superior a 10 mg/L (MAGRAMA, 2012).

El objetivo principal del presente trabajo fue determinar el comportamiento, en lo que a la producción de sulfuroso se refiere, de diferentes cepas de levaduras durante la fermentación de vinos blancos, rosados y tintos. Cuando la fermentación se realizó con dos tipos de cepas de levaduras diferentes, el objetivo fue establecer el momento óptimo de reinoculación de la segunda cepa para que la producción de sulfitos fuese mínima.

Materiales y métodos

La uva se vendimió en cajas de 15 kilos descargándose en la tolva de la despalilladora-estrujadora, realizándose un prensado posterior con una prensa vertical de membrana en el caso de vino blanco o rosado, o la maceración-fermentación en el caso de vino tinto. El tratamiento y procesado de la uva siguió vías diferentes según se destinara a la elaboración de vino blanco, rosado o tinto, sobre todo en las etapas iniciales de maceración y prensado

En blancos, una vez separado el mosto de los hollejos y pepitas se depositó en recipientes de acero inoxidable de diferentes volúmenes (10, 30 y 50 L) para realizar el desfangado. Se adicionaron las enzimas pectolíticas (poligalacturonasa) de Novocclair Speed (Lamothe Abiet, 2019), el tanino gálico al alcohol (Lamothe Abiet, 2019) y la proteína de guisante (Green Fine Must, Lamothe Abiet, 2019) según las dosis especificadas por el fabricante para cada caso, siguiendo este orden, primero el tanino y después la proteína, para evitar que el tanino hiciera precipitar a la proteína añadida y no a la ya presente en el mosto. El mosto se dejó reposar en una cámara frigorífica a -3°C de temperatura durante 24–48 horas. Transcurrido este tiempo, se trasegó el líquido con una bomba manual a los recipientes de vidrio donde se llevó a cabo la fermentación (matraces de 2 litros o garrafas de 10 o 20 litros, dependiendo de la experiencia a realizar). El mosto se dejó a temperatura ambiente durante unas horas hasta que alcanzara la temperatura adecuada para inocular las levaduras, adicionando previamente el piro-sulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$, Lamothe Abiet, 2019) si la experiencia lo requiere.

Las levaduras secas activas comerciales utilizadas en las experiencias fueron: Concerto (*Kluyveromyces thermotolerans*), y Prelude (*Torulaspora delbrueckii*) (CHR HANSEN, 2019). También Excellence Bio-Nature (*Metschnikowia pulcherrima*), Excellence DS (*Saccharomyces cerevisiae*), Excellence FR (*Saccharomyces cerevisiae*), Excellence FTH (*Saccharomyces cerevisiae*), Excellence STR (*Saccharomyces cerevisiae*), Excellence XR (*Saccharomyces cerevisiae*), L.A. Bayanus (*Saccharomyces cerevisiae* bayanus cepa C12), L.A. Cerevisiae (*Saccharomyces cerevisiae* cepa Montrachet 522 Davis), y L.A. PM (*Saccharomyces cerevisiae*) (Lamothe Abiet, 2019).

Para los vinos blancos y rosados, los recipientes con el mosto-vino en fermentación se colocaron en una cámara frigorífica a temperatura entre 16 y 18°C . El seguimiento de la fermentación se realizó diariamente mediante medición del peso en una balanza. Transcurrido un tiempo, entre una y dos semanas, se inocularon las bacterias lácticas, utilizándose dos tipos



matholding group



IQV Agro España

Productos Top

por su imagen, formulación y prestigio

www.iqvagro.es



Desde 1935 al servicio de la Sanidad Vegetal

de bacterias: Viniflora Cine y Viniflora Oenos (CHR Hansen, 2019) ambas de la especie *Oenococcus oeni*, que difieren entre sí según sean citrato negativas o no, es decir, según produzcan la degradación del ácido cítrico durante la fermentación maloláctica o no. Las bacterias citrato negativas se utilizan para vinos blancos y rosados, ya que es especialmente interesante mantener el ácido cítrico intacto para conservar la frescura de los vinos. Para la realización de la fermentación maloláctica los recipientes se trasladaron a otra sala acondicionada con calefactores a 22°C.

Para la elaboración de vinos tintos, la uva despalillada y estrujada se recogió en recipientes de acero inoxidable, de 10, 30 y 50 litros de capacidad, para realizar allí la maceración y fermentación en contacto con los hollejos. Los aditivos añadidos previos a la fermentación fueron diferentes. En este caso, no se añadieron ni enzimas pectolíticas ni proteínas, únicamente taninos proantocianidínicos (Pro Tanin R, Lamothe Abiet, 2019) para evitar, entre otras cosas, la precipitación de la materia colorante y la oxidación del mosto-vino. Al igual que para los vinos blancos y rosados, si la experiencia lo requería se añadió también piro-sulfito de potasio. La temperatura de fermentación transcurrió entre 20 y 22°C, realizándose bazuqueos diarios. El prensado se realizó una semana después del arranque de la fermentación. La siembra de las bacterias lácticas se llevó a cabo a los 20 días de finalizada la fermentación con la misma especie (*Oenococcus oeni*), pero, a diferencia de las utilizadas para los vinos blancos y rosados, no fueron citrato negativas, es decir, degradan el ácido cítrico para producir diacetilo, un compuesto que da al vino untuosidad y volumen en boca, al contrario que la frescura y acidez que aporta el ácido cítrico. La fermentación maloláctica se realizó a la misma temperatura que para los vinos blancos y rosados.

Las determinaciones analíticas realizadas en los vinos fueron: grado alcohólico, acidez total, acidez volátil, pH, sulfuroso total, azúcares residuales, ácidos cítrico, málico y láctico, y glicerol (OIV, 2019), así como la intensidad colorante (OIV, 2019), la concentración de antocianos

(BLOUIN, 1992), y el índice de polifenoles totales (IPT) (RIBEREAU-GAYON *et al.*, 1972).

Las experiencias se realizaron por triplicado, para reforzar la validez de los resultados y permitir la reproducibilidad del experimento, y los análisis se repitieron dos veces. Así pues, si se observaban datos anómalos en una misma serie se podían descartar sin restar validez a los otros resultados.

Experiencia 1. Determinación de la influencia de la cepa de levadura en la producción de sulfitos durante la fermentación de un vino tinto de la variedad 'Tempranillo'.

En esta experiencia, inicialmente se procesó la uva en la despalilladora-estrujadora, y se distribuyó la pasta (hollejos y pepitas) y el mosto resultantes en cantidades homogéneas de aproximadamente 20 kg en depósitos de acero inoxidable de 30 L. A cada depósito se añadieron los aditivos en las dosis pertinentes, según el protocolo de elaboración de vinos tintos, esto es, taninos proantocianidínicos, las levaduras pertinentes, y, en el caso de la muestra testigo, una dosis estándar de anhídrido sulfuroso de 50 mg/L, correspondiente a 100 mg/L de piro-sulfito de potasio. El diseño de la Experiencia 1 se recoge en el Cuadro 1.

En los casos en los que las levaduras iniciales fueron no *Saccharomyces*, esto es, Prelude, Concerto y Excellence Bio-Nature, fue necesario realizar una reinoculación de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* para poder finalizar la fermentación, puesto que el poder fermentativo y la tolerancia al alcohol de estas levaduras es relativamente bajo. En el caso de la Excellence Bio-Nature, la reinoculación se hizo a los 2-3 días del inicio de la fermentación, puesto que su tolerancia al alcohol en el medio es muy baja, apenas 2% vol de etanol. En el caso de las otras dos levaduras, Prelude y Concerto, se reinoculó aproximadamente a los 7 días del arranque de la fermentación. Los depósitos se bazuquearon diariamente para romper el sombrero de orujos y homogeneizar el medio. Asimismo, transcurridos unos 7 días desde el inicio de la fermentación se prensaron las pastas y se colocó el mosto-vino en garrafas de vidrio de 20 L, para que la fermentación siguiera su curso sin contacto con

Cuadro 1. Diseño de la Experiencia 1.

Muestra	Levadura comercial utilizada	Tipo de levadura
Prelude 1	Prelude	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
Prelude 2	+ Excellence FR	+ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Prelude 3		
Concerto 1	Concerto	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>
Concerto 2	+ Excellence FR	+ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Concerto 3		
Bio 1	Excellence Bio–Nature	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
Bio 2	+ Excellence FR	+ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Bio 3		
FR 1	Excellence FR	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
FR 2		
FR 3		
XR 1	Excellence XR	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
XR 2		
XR 3		
DS 1	Excellence DS	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
DS 2		
DS 3		
PM 1	L.A. PM	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
PM 2		
PM 3		
Bayanus 1	L.A. Bayanus	<i>Saccharomyces cerevisiae bayanus</i> , cepa C12
Bayanus 2		
Bayanus 3		
Testigo 1	Excellence FR + 50 mg/L SO ₂	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Testigo 2		
Testigo 3		

los sólidos. Transcurridos 20 días desde el prensado se inocularon las bacterias lácticas, y el trasiego final se realizó un mes después de la inoculación.

Experiencia 2. Determinación de la influencia de la cepa de levadura en la producción de sulfitos durante la fermentación de un vino rosado de la variedad ‘Tempranillo’.

Para esta experiencia se utilizó mosto de uva procedente de la misma partida empleada en la Experiencia 1. Se colocó el mosto en distintos

Cuadro 2. Diseño de la Experiencia 2.

Muestra	Levadura comercial utilizada	Tipo de levadura
Prelude 1	Prelude	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
Prelude 2		
Prelude 3		
Concerto 1	Concerto	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>
Concerto 2		
Concerto 3		
STR 1	Excellence STR	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
STR 2		
STR 3		
FTH 1	Excellence FTH	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
FTH 2		
FTH 3		
FR 1	Excellence FR	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
FR 2		
FR 3		
Davis 1	L.A. <i>Cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , cepa Montrachet 522 Davis
Davis 2		
Davis 3		

matraces de vidrio de 2 L, de forma que el diseño de la experiencia quedó según aparece en el Cuadro 2.

Experiencia 3. Determinación de la influencia de la cepa de levadura y del tiempo de reinoculación en la producción de sulfitos durante la fermentación de un vino blanco de la variedad Tardana.

Al tratarse de una variedad de maduración muy tardía (de ahí su nombre) y tiempo de vida prolongado (gracias al grosor de su piel), para el diseño de esta experiencia se tuvieron en cuenta los resultados de las otras dos experiencias que se realizaron con uva de maduración temprana.

Por norma general, las levaduras del tipo *Saccharomyces cerevisiae* son las que mayor resistencia al etanol presentan, siendo las mayoritarias en las etapas finales de fermentaciones espontáneas (RIBÉREAU–GAYON *et al.*, 2006). Así pues, al inocular una levadura no *Saccharomyces* para fermentar un mosto, se debe tener en cuenta

Cuadro 3. Diseño de la Experiencia 3.

Muestra	Tiempo de reinoculación	Levadura comercial utilizada	Tipo de levadura
DS-A	No procede	Excellence DS	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
DS-B			
DS-C			
Bio-DS-A	3 días	Excellence Bio-Nature + Excellence DS	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Bio-DS-B			
Bio-DS-C			
Concerto-A	No procede	Concerto	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i>
Concerto-B			
Concerto-C			
Con-DS3-A	3 días	Concerto + Excellence DS	<i>Kluyveromyces thermotolerans</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Con-DS3-B			
Con-DS3-C			
Con-DS5-A	5 días		
Con-DS5-B			
Con-DS5-C			
Con-DS7-A	7 días		
Con-DS7-B			
Con-DS7-C			
Prelude-A	No procede		
Prelude-B			
Prelude-C			
Pre-DS3-A	3 días	Prelude + Excellence DS	<i>Torulaspora delbrueckii</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Pre-DS3-B			
Pre-DS3-C			
Pre-DS5-A	5 días		
Pre-DS5-B			
Pre-DS5-C			
Pre-DS7-A	7 días		
Pre-DS7-B			
Pre-DS7-C			

ta que muy probablemente no tendrá suficiente tolerancia al etanol y no será capaz de finalizar la fermentación alcohólica, por lo que resulta imprescindible reinocular el medio con una levadura *Saccharomyces cerevisiae* para garantizar la finalización de la fermentación y que no queden restos de azúcares residuales en exceso, para evitar problemas durante la conservación.

Así pues, el diseño de esta experiencia siguió un patrón más complejo, puesto que, aunque el rango de levaduras utilizadas fue menor, se introdujo la variable del tiempo de reinoculación de la segunda levadura. Por un lado, se utilizaron levaduras puras de los tipos Concerto, Prelude y Excellence DS, y cultivos mixtos de Prelude y Concerto a los que se reinoculó Exce-

Biorreactores Patentados LEV2050®

Ahorro y mayor expresividad del vino

Biorreactores para la multiplicación de levaduras, bacterias lácticas y para la formación automatizada del pie de cuba (vino espumoso).

Ahorro | Calidad | Automatización | Seguridad y control



Cuadro 4. Valores medios de los parámetros analizados en los vinos de la Experiencia 1.

Parámetros	Prelude	Concerto	Excellence XR	Excelece FR	(LA) PM	(LA) Bayanus	Bio Nature	Excellence DS	Testigo FR con SO ₂
Grado alcohólico (% vol)	12,71±0,22	12,90±0,05	12,68±0,34	13,09±0,27	12,66±0,48	12,50±0,14	12,41±0,21	12,59±0,47	12,95±0,29
Acidez Total (g/L ac. tartárico)	5,79±0,08	6,26±0,66	5,16±0,20	5,50±0,05	4,74±0,10	4,61±0,15	5,29±0,08	5,26±0,17	5,60±0,39
Acidez volátil (g/L ac. acético)	0,68±0,10	0,63±0,11	0,31±0,02	0,60±0,06	0,46±0,03	0,40±0,03	0,56±0,04	0,33±0,02	0,41±0,01
pH	3,74±0,03	3,71±0,05	3,86±0,04	3,72±0,04	3,79±0,04	3,77±0,04	3,74±0,03	3,86±0,07	3,74±0,09
SO ₂ Total (mg/L)	3,10±2,40	0,90±0,80	2,00±1,80	1,60±1,90	2,40±1,70	2,30±2,20	1,90±2,10	0,30±0,40	18,80±5,10
Azúcares res. (g/L)	1,45±1,02	3,34±3,92	0,45±0,11	1,02±0,53	0,90±0,14	0,96±0,11	0,53±0,17	0,67±0,11	0,65±0,14
Ácido cítrico (g/L)	0,10±0,02	0,16±0,02	0,21±0,02	0,09±0,02	0,20±0,02	0,19±0,02	0,10±0,02	0,16±0,02	0,19±0,01
Ácido málico (g/L)	0,23±0,05	0,22±0,05	0,61±0,05	0,15±0,06	0,26±0,04	0,29±0,03	0,17±0,04	0,54±0,06	0,94±0,45
Ácido láctico (g/L)	2,15±0,08	2,48±0,19	1,85±0,03	2,12±0,08	1,75±0,02	1,65±0,08	2,12±0,01	2,09±0,05	1,55±0,31
Glicerol (g/L)	9,62±0,91	10,42±0,98	7,71±0,23	9,48±0,40	8,69±0,16	9,67±0,21	8,83±0,42	8,62±0,42	9,30±0,67
Índice de Color	7,70±0,86	8,59±0,31	10,43±0,37	8,23±1,01	9,11±0,90	7,80±1,04	8,32±0,50	10,36±0,32	8,11±0,80
Tonalidad	0,59±0,04	0,55±0,02	0,57±0,01	0,58±0,00	0,60±0,00	0,58±0,01	0,59±0,02	0,56±0,02	0,55±0,04
Antocianos (mg/L)	445,3±16,2	464,1±18,7	456,3±25,5	490,9±11,5	451,2±58,7	434,2±46,8	443,3±2,00	488,2±38,9	505,7±36,7
IPT	43,06±0,58	44,33±0,48	48,91±1,70	46,08±2,73	44,90±4,26	40,26±4,47	43,53±1,99	46,61±3,24	46,36±1,48

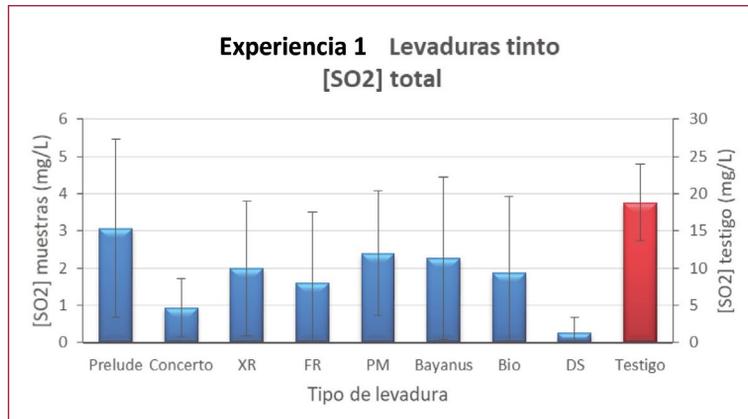


Figura 1. Evolución de los valores de sulfuroso total de los vinos de la Experiencia 1.

llence DS a los tres días (Pre-DS3 y Con-DS3), a los cinco días (Pre-DS5 y Con-DS5), y a los siete días (Pre-DS7 y Con-DS7). Por último, se estudió la combinación de levaduras Excelente Bio-Nature con Excellence DS, reinoculando la segunda levadura únicamente a los tres días del arranque de la fermentación, debido al bajo umbral de tolerancia al alcohol de la primera. La distribución de los ensayos aparece en el Cuadro 3.

Resultados y discusión

Todos los datos de los resultados experimentales han sido sometidos a un tratamiento estadístico para determinar su representatividad. Así pues, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA simple) para cada experiencia y cada rango de datos, tomando diferentes intervalos de confianza, de más a menos amplio, desde un 95% hasta un 99,9%, esto es, tomando un nivel de significación α desde 0,05 hasta 0,001. Para todos

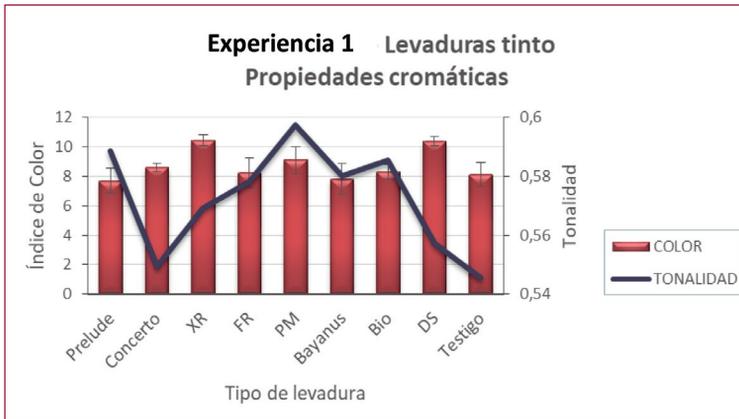


Figura 2. Evolución de los valores de las características cromáticas de los vinos de la Experiencia 1.

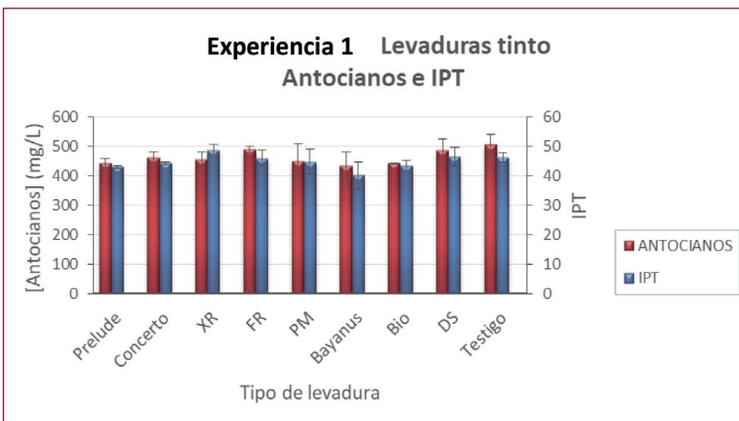


Figura 3. Evolución de los valores de antocianos e IPT de los vinos de la Experiencia 1.

los casos se obtuvo un *p*-valor menor al nivel de significación fijado en cada caso, con lo que se determinó que todos los valores experimentales son estadísticamente significativos, es decir, que no existen diferencias debidas al azar.

Experiencia 1

Los valores medios de los parámetros analizados en los vinos de esta experiencia vienen expuestos en el Cuadro 4.

Los datos experimentales de las concentraciones de sulfuroso total de la Experiencia 1 se recogen en la Figura 1, donde se observa una gran disparidad en los datos de las mismas series, reflejado en valores elevados de las desviaciones típicas. Esto es debido al método de determinación del anhídrido sulfuroso (método oficial o método de Paul), ya que se trata de una metodología discreta, puesto que la determinación del sulfu-

roso total se realiza por valoración "gota a gota" con una base débil. Así pues, dado que una gota de solución valorante corresponde aproximadamente a unos 0,8 mg/L de SO₂, si las concentraciones totales de SO₂ en el medio son muy bajas (inferiores a 3 mg/L), una diferencia de una o dos gotas de solución valorante entre muestras de la misma serie dió resultados muy dispares, con lo que la desviación típica que se obtuvo estará dentro del orden de la media aritmética.

Las diferencias entre la producción de sulfuroso de las diferentes levaduras, tanto *Saccharomyces* como no *Saccharomyces*, son mínimas, puesto que las concentraciones de sulfuroso total son menores de 3 mg/L en todos los casos, excepto, lógicamente, en el testigo. No obstante, es de destacar que para el caso de la levadura comercial Excellence DS (*Saccharomyces cerevisiae*) la concentración de sulfuroso total es prácticamen-

Cuadro 5. Valores medios de los parámetros analizados en los vinos de la Experiencia 2.

Parámetros	Prelude	Concerto	Excellence STR	Excellence FTH	Excellence FR	522 Davis
Grao alcohólico (% vol)	13,03±0,04	13,19±0,09	13,25±0,05	13,18±0,04	13,10±0,03	13,19±0,04
Acidez Total (g/L ac. tartárico)	5,33±0,13	4,69±0,16	4,36±0,05	4,68±0,06	4,95±0,05	4,43±0,11
Acidez volátil (g/L ac. acético)	0,78±0,02	0,63±0,06	0,40±0,01	0,61±0,01	0,51±0,02	0,56±0,03
pH	3,51±0,02	3,51±0,01	3,54±0,02	3,48±0,02	3,49±0,01	3,48±0,02
SO ₂ Total (mg/L)	13,20±3,81	6,53±1,28	10,13±0,65	8,93±4,09	5,33±1,09	4,27±1,40
Azúcares residuales (g/L)	3,05±0,26	2,15±1,38	0,59±0,11	2,72±0,41	1,75±0,34	3,07±0,44
Ácido cítrico (g/L)	0,35±0,01	0,31±0,01	0,35±0,02	0,33±0,01	0,32±0,01	0,33±0,01
Ácido málico (g/L)	0,00±0,00	0,00±0,00	0,08±0,04	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Ácido láctico (g/L)	2,26±0,04	1,97±0,06	1,70±0,02	1,98±0,02	2,26±0,02	1,91±0,07
Glicerol (g/L)	6,27±0,18	6,68±0,08	6,68±0,15	6,04±0,28	7,05±0,11	5,16±0,29

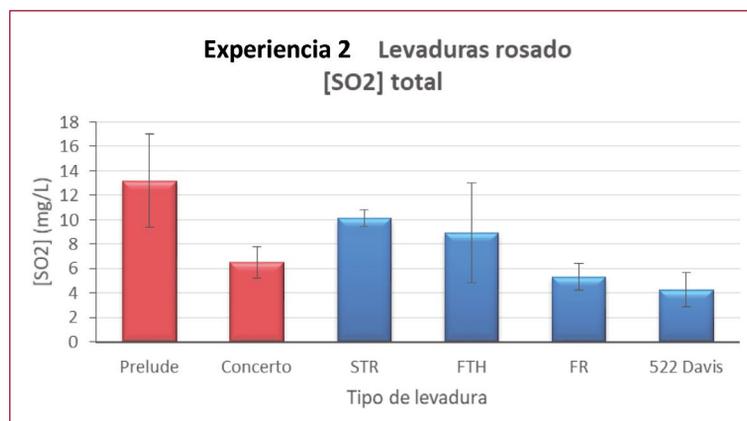


Figura 4. Evolución de los valores de sulfuroso total de los vinos de la Experiencia 2.

te nula. Además, contrastando con los datos recogidos en el Cuadro 1, presenta uno de los valores más bajos de acidez volátil de entre todas las muestras; los valores de las concentraciones de ácido láctico y glicerol son aceptables, pero, por el contrario, presenta una baja acidez total y un pH alto, el mayor de todas las muestras. Finalmente, para poder reafirmar la elección de esta levadura se analizaron también las propiedades cromáticas, concentración de antocianos e IPT de las diferentes muestras, cuya evolución de los valores obtenidos se recogen en las Figuras 2 y 3.

En ellas se observa que, a excepción de la muestra testigo, la levadura Excellence DS presenta valores óptimos tanto de índice de color (segunda más alta tras la Excellence XR) como de tonalidad (segunda más baja tras la Concer-

to), así como de concentración de antocianos (segunda más alta tras la Excellence FR) e IPT (segunda más alta tras la Excellence XR).

Por tanto, la levadura óptima para este ensayo es la Excellence DS (*Saccharomyces cerevisiae*), puesto que la cantidad de sulfuroso generada durante la fermentación alcohólica es prácticamente nula, además de presentar valores excelentes en los principales parámetros físico-químicos determinados.

Experiencia 2

Los valores medios de los parámetros analizados en los vinos de esta experiencia vienen expuestos en el Cuadro 5.

La evolución de los datos experimentales de las concentraciones de sulfuroso total de la Ex-

®

AW

Araw®



ARAW®

TUS UVAS SON LAS MÁS BUSCADAS

PRODUCTO DESARROLLADO POR EDEN RESEARCH EXCLUSIVAMENTE PARA SIPCAM

- Fungicida de origen natural registrado.
- Excelente control de oídio y botritis.
- Máxima protección hasta el final.



sipcamiberia.es

Uso reservado a agricultores y aplicadores profesionales. Lea siempre la etiqueta antes de usar el producto y siga las instrucciones.

SIPCAM
IBERIA

Cuadro 6. Valores medios de los parámetros analizados en los vinos de la Experiencia 3.

Parámetros	DS	Bio-DS	Concerto	CON-DS3	CON-DS5	CON-DS7	Prelude	PRE-DS-3	PRE-DS5	PRE-DS-7
Grado alcohólico (% vol)	11,77±0,08	11,70±0,09	11,87±0,02	11,70±0,08	11,74±0,04	11,69±0,03	11,85±0,05	11,78±0,03	11,76±0,06	11,76±0,02
Acidez Total (g/L ac. tartárico)	4,44±0,34	4,51±0,13	4,28±0,08	4,45±0,06	4,32±0,05	4,27±0,06	4,56±0,03	4,83±0,05	4,74±0,08	4,69±0,08
Acidez volátil (g/L ac. acético)	0,44±0,05	0,51±0,03	0,45±0,02	0,49±0,01	0,48±0,01	0,46±0,02	0,50±0,01	0,54±0,01	0,54±0,01	0,53±0,03
pH	3,58±0,09	3,62±0,03	3,59±0,02	3,61±0,01	3,62±0,02	3,60±0,02	3,59±0,02	3,61±0,01	3,61±0,02	3,63±0,01
SO ₂ Total (mg/L)	6,00±1,00	8,70±1,10	6,40±0,90	6,00±1,60	10,50±1,20	19,50±0,40	7,10±1,90	4,10±0,30	3,70±0,40	9,90±1,40
Azúcares residuales (g/L)	0,43±0,15	0,53±0,17	0,48±0,15	0,59±0,18	0,56±0,20	0,58±0,08	0,69±0,08	0,58±0,15	0,69±0,19	0,82±0,09
Ácido cítrico (g/L)	0,30±0,02	0,27±0,02	0,28±0,01	0,27±0,03	0,28±0,02	0,27±0,02	0,32±0,01	0,30±0,01	0,30±0,01	0,30±0,01
Ácido málico (g/L)	0,14±0,08	0,18±0,07	0,08±0,04	0,17±0,03	0,15±0,04	0,16±0,04	0,11±0,04	0,18±0,02	0,19±0,05	0,22±0,03
Ácido láctico (g/L)	2,07±0,15	1,98±0,05	2,00±0,03	2,00±0,04	1,96±0,05	1,93±0,03	2,10±0,02	2,17±0,02	2,11±0,02	2,08±0,03
Glicerol (g/L)	4,59±1,14	4,97±0,47	3,72±0,29	4,34±0,12	4,09±0,23	3,73±0,18	4,47±0,14	5,38±0,08	4,85±0,15	4,78±0,15

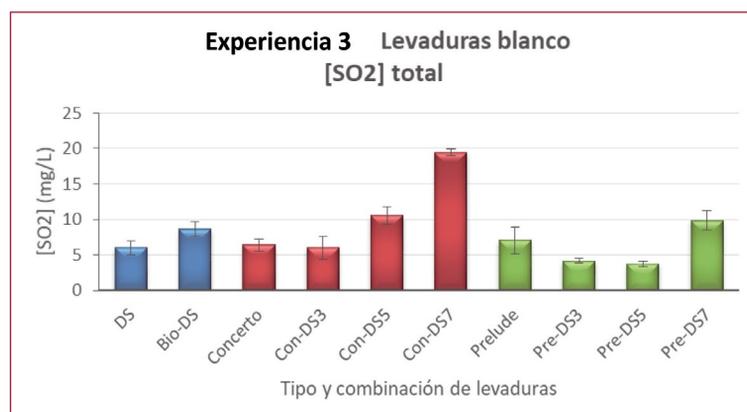


Figura 5. Evolución de los valores de sulfuroso total de los vinos de la Experiencia 3.

perencia 2 se recogen en la *Figura 4*. En ella se observa que, para las levaduras no *Saccharomyces*, la *Torulaspora delbrueckii* (Prelude) produce mayor cantidad de sulfitos que la *Kluyveromyces thermotolerans* (Concerto), de forma análoga a la experiencia anterior. Respecto a las *Saccharomyces cerevisiae*, el rango de producción de sulfitos varía desde unos 4 mg/L de la cepa Montrachet 522 Davis hasta unos 10 mg/L de la Excellence STR.

Atendiendo a los datos experimentales del *Cuadro 5*, se observa que en todos los casos (excepto en la cepa Excellence STR) las fermentaciones han resultado incompletas, puesto que quedan azúcares residuales en cantidades superiores a 2

g/L en la mayoría de casos. Por otra parte, pese a que la cepa Montrachet 522 Davis ha sido la que menos sulfitos ha producido, en el resto de parámetros físico-químicos no destaca precisamente, puesto que presenta la segunda acidez total más baja, la segunda acidez volátil más alta, la mayor cantidad de azúcares residuales (más de 3 g/L) y la producción más baja de glicerol.

Así pues, en este caso, a diferencia de la experiencia anterior, la levadura que menor cantidad de sulfitos produce no es la más competitiva para el resto de parámetros físico-químicos, por lo que habría que cuestionarse su interés desde el punto de vista práctico y si sería conveniente su aplicación en el futuro.

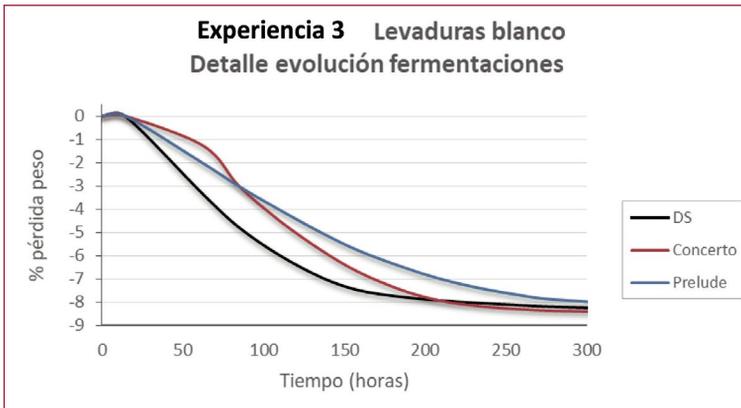


Figura 6. Evolución de las fermentaciones realizadas con una sola levadura en la Experiencia 3.

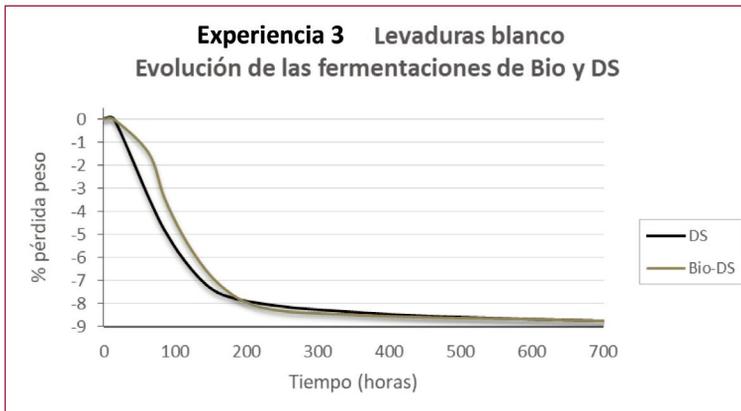


Figura 7. Evolución de las fermentaciones de Bio y Bio+DS en la Experiencia 3.

Experiencia 3

Los valores medios de los parámetros analizados en los vinos de esta experiencia vienen expuestos en el Cuadro 6.

Los datos experimentales de las concentraciones de sulfuroso total en los vinos de la Experiencia 3 se recogen en la Figura 5. En ella se observa que, para las fermentaciones con levaduras puras (Excellence DS, Concerto y Prelude), es decir, sin reinoculación de una segunda levadura, las cantidades de sulfuroso producidas al final de la fermentación son prácticamente constantes en los tres casos. Para el caso de la Concerto, se observa una tendencia al alza en la generación de sulfitos por parte de las levaduras cuanto más tiempo pasa hasta la reinoculación de la segunda levadura, mientras que para el caso de la Prelude, con cinéticas de fermentación más lentas, la generación de sulfitos disminuye conforme avanza el

tiempo de reinoculación, y vuelve a subir para el tiempo de reinoculación máximo.

Por norma general, al reinocular el medio con una levadura *Saccharomyces cerevisiae*, más competitiva y con mayor poder fermentativo, las levaduras iniciales deberían competir con estas por los nutrientes. Para ratificar esta hipótesis y determinar si en esta experiencia la competencia de las levaduras afecta a la cinética de fermentación, y, en consecuencia, a la generación de sulfitos, se representan los datos en las Figuras 6, 7, 8 y 9, para cada tipo y combinación de levaduras, así como para las fermentaciones con una única levadura.

En la Figura 6 de las fermentaciones con una sola levadura se observa que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Excellence DS) presenta un metabolismo mucho más rápido que las demás, con una rampa de fermentación mucho más



Figura 8. Evolución de las fermentaciones de Concerto y Concerto+DS en la Experiencia 3.

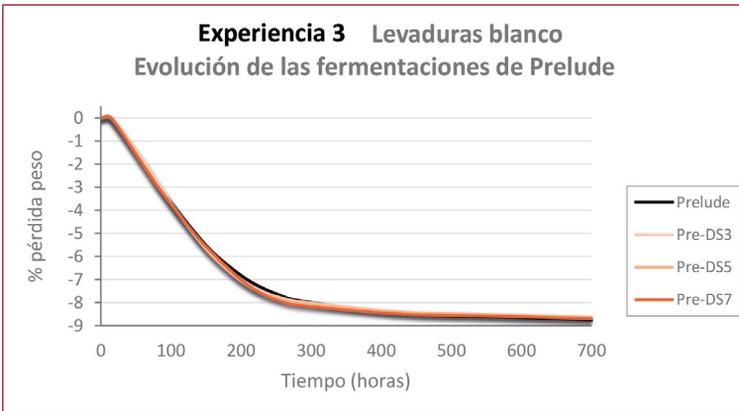


Figura 9. Evolución de las fermentaciones de Prelude y Prelude+DS de la Experiencia 3.

acusada. Por el contrario, la levadura *Torulasporea delbrueckii* (Prelude) presenta un metabolismo mucho más lento y suavizado a lo largo de toda la fermentación, mientras que la levadura *Kluyveromyces thermotolerans* (Concerto) presenta una fase de latencia más acusada, por lo que inicia la fermentación de forma lenta y progresiva hasta llegar al umbral de las 75 horas (3 días), tras lo cual su metabolismo se acelera y supera a la Prelude.

La Figura 7 muestra que el comportamiento de la *Metschnikowia pulcherrima* (Excellence Bio-Nature) es análogo a la *Kluyveromyces thermotolerans* (Concerto) del caso anterior, es decir, un inicio de fermentación lento y progresivo que se ve acelerado bruscamente tras la inoculación, transcurridas unas 72 horas, y posterior adaptación al medio de la *Saccharomyces cerevisiae*, momento en el que la cinética de fermentación

presenta una rampa prácticamente idéntica al caso de la fermentación únicamente con *Saccharomyces cerevisiae*.

Por último, en las Figuras 8 y 9 de las fermentaciones de Prelude y Concerto no se observan comportamientos drásticamente diferentes en función del tiempo de reinoculación de la segunda levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En todo caso, se observa que la cinética de fermentación es ligeramente más lenta en la fermentación con una única levadura que en las fermentaciones con reinoculaciones con *Saccharomyces cerevisiae*, aunque la diferencia es muy pequeña.

De las figuras anteriores puede deducirse que las velocidades de fermentación vienen fuertemente influenciadas por la levadura inoculada inicialmente. Esto puede ser debido a que estas primeras levaduras disponen de todos los nutrientes del medio, que no estarán disponibles

para las segundas levaduras hasta que las primeras entren en fase de muerte y sufran la autólisis. Aun así, la concentración de nutrientes en este momento será muy inferior a las cantidades disponibles inicialmente.

En definitiva, una vez hechas las puntualizaciones cinéticas de las fermentaciones, y si se considera que las levaduras pueden recurrir a procesos sulfato-reductores como fuente de obtención de energía cuando se agotan los azúcares, se podría aseverar que cuando la reinoculación con *Saccharomyces cerevisiae* se produce de forma tardía, estas levaduras proceden a agotar los azúcares del mosto sin haber estado expuestas durante mucho tiempo a la acción biocida del etanol, con lo que serán levaduras mucho más activas que podrán recurrir a otras fuentes, en este caso a la vía sulfato-reductora, para producir energía. Esto explicaría que cuanto más tiempo se tarde en reinocular el medio con la segunda levadura, mayores niveles de sulfitos se tendrían en los vinos elaborados.

Conclusiones

Se han podido determinar las levaduras comerciales óptimas durante la fermentación para tres tipos de vinos diferentes, atendiendo a parámetros de producción de sulfitos y características físico-químicas. Para vinos tintos, la levadura Excellence DS (*Saccharomyces cerevisiae*) no genera sulfitos durante la fermentación alcohólica, además de presentar valores muy buenos en las principales características físico-químicas de los vinos. También se ha puesto en evidencia que en caso de realizar una fermentación con dos tipos de levaduras diferentes (iniciando la fermentación con una no *Saccharomyces* y reinoculando posteriormente con una *Saccharomyces cerevisiae*), el momento óptimo de reinoculación, para una producción mínima de sulfitos, es a los 3 días desde el arranque de la fermentación, pudiendo demorarse hasta los 5 días en el mejor de los casos. •

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento al Servicio de Producción Ecológica, Innovación y Tecnología de la Consellería de Agricultura, Medio Ambiente,

Cambio Climático y Desarrollo Rural de la Generalitat Valenciana por habernos dado la oportunidad de realizar el trabajo en sus instalaciones de la Bodega Experimental del Instituto Tecnológico de Viticultura y Enología de Requena (Valencia).

Bibliografía

- ALEIXANDRE BENAVENT, J. L., ÁLVAREZ CANO, I. (2003). Tecnología Enológica (Manuales científico-técnicos). Madrid. Ed. Síntesis.
- BLOUIN, J. (1992). Techniques d'analyses des moûts et des vins. Paris. Ed. Dujardin Salleron.
- CHR HANSEN (2019). Bacterias enológicas, visto el 27 de junio de 2019, <https://www.chr-hansen.com/es/food-cultures-and-enzymes/fermented-beverages/cards/collection-cards/oenological-bacteria>
- CHR HANSEN (2019). Levaduras especiales para elaboración avanzada de vino, visto el 27 de junio de 2019, <https://www.chr-hansen.com/es/food-cultures-and-enzymes/fermented-beverages/cards/collection-cards/speciality-yeast>
- GUERRERO HIDALGO, R. F., CANTOS VILLAR, E., PUERTAS GARCÍA, B., ORTIZ SOMOVILLA, H. (2015a). Sulfuroso en la Elaboración de Vinos. Alternativas.
- GUERRERO, R. F. & CANTOS-VILLAR, E. (2015b). Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Trends in Food Science and Technology*, 42(1), 27-43.
- LAMOTHE-ABIET (2019). Clarificantes, visto el 27 de junio de 2019, <https://www.lamothe-abiet.com/es/gamma-de-productos/lamothe-abiet-clarificantes/>
- LAMOTHE-ABIET (2019). Enzimas, visto el 27 de junio de 2019, <https://www.lamothe-abiet.com/es/gamma-de-productos/lamothe-abiet-enzimas/>
- LAMOTHE-ABIET (2019). Estabilizadores, visto el 27 de junio de 2019, <https://www.lamothe-abiet.com/es/gamma-de-productos/lamothe-abiet-estabilizadores/>
- LAMOTHE-ABIET (2019). Levaduras, visto el 27 de junio de 2019, <https://www.lamothe-abiet.com/es/gamma-de-productos/lamothe-abiet-levaduras/>
- LAMOTHE-ABIET (2019). Taninos, visto el 27 de junio de 2019, <https://www.lamothe-abiet.com/es/gamma-de-productos/lamothe-abiet-taninos/>
- MAGRAMA (2012). Etiquetado y presentación de productos vitícolas, visto el 27 de junio de 2019, https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/publicaciones/ Etiquetado_Productos_Vitcolas_tcm30-89511.pdf
- OIV (2019). Métodos de análisis, visto el 27 de junio de 2019, <http://www.oiv.int/es/normas-y-documentos-tecnicos/metodos-de-analisis/>
- RIBÉREAU-GAYON, P., DUBOURDIEU, D., DONÈCHE, B., LONVAUD, A. (2006). Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications. 2nd edition. Chichester. Ed. John Wiley & Sons, Ltd.
- WERNER, M., RAUHUT, D., COTTEREAU, P. (2009). Levaduras y producción natural de anhídrido sulfuroso, visto el 27 de junio de 2019, <https://www.infowine.com/intranet/libretto/libretto7368-01-1.pdf>