



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Influencia nutricional en las propiedades organolépticas y cinética fermentativa de vinos fermentados con levaduras seleccionadas.

Autor/es

VÍCTOR TALAYA ZAMORA

Director/es

ANTONIO TOMÁS PALACIOS GARCÍA y JESÚS MADRAZO MATEO ,

Facultad

Facultad de Ciencia y Tecnología

Titulación

Grado en Enología

Departamento

AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

Curso académico

2016-17



Influencia nutricional en las propiedades organolépticas y cinética fermentativa de vinos fermentados con levaduras seleccionadas., de VÍCTOR TALAYA ZAMORA

(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**

Facultad de Ciencia y Tecnología

Trabajo fin de grado

Grado en Enología

***Influencia nutricional en las propiedades organolépticas y
cinética fermentativa de vinos fermentados con levaduras
seleccionadas***

Alumno:

Víctor Talaya Zamora

Tutores:

Antonio Palacios García

Jesús de Madrazo Mateo

Logroño, Julio 2017.

Índice:

1. Agradecimientos -----	3
2. Resumen / Abstract -----	4-5
3. Introducción -----	6
3.1. Nutrición en el viñedo -----	6
3.2. Elaboración del vino en bodega -----	7
3.2.1. Micronutrientes -----	8
3.2.2. Función de los micronutrientes en la actividad de las levaduras -----	8
3.2.3. Disponibilidad de los micronutrientes en mostos -----	9
3.2.4. Adición de micronutrientes al mosto de uva -----	11
3.2.5. Paradas de fermentación -----	12
3.2.6. Nutrición orgánica e inorgánica -----	15
3.2.7. Necesidades nutricionales en la fermentación maloláctica -----	17
3.2.8. Disponibilidad de nutrientes determinada por las prácticas de vinificación-----	18
4. Objetivos del trabajo-----	19
5. Materiales y métodos -----	20
5.1. Vinificación -----	20
5.2. Análisis sensorial descriptivo -----	22
5.3. Fichas técnicas de los nutrientes -----	23
6. Resultados y discusión -----	25
6.1. Cinéticas fermentativas -----	25
6.2. Análisis completos -----	29
6.3. Análisis estadístico de componentes principales (ACP) -----	31
6.4. Determinación de compuestos volátiles mayoritarios y minoritarios en vino -	35
6.5. Análisis estadístico mediante ACP de los compuestos aromáticos activos ----	38
7. Conclusiones -----	40
8. Bibliografía -----	42

1. Agradecimientos

Este trabajo no podría haberse realizado sin los conocimientos adquiridos en el presente Grado, aportándome cada una de sus asignaturas las nociones necesarias para llevar a cabo esta experiencia.

La realización del presente trabajo final de Grado es fruto de orientaciones, sugerencias y estímulo del profesor D. Antonio Palacios García quien me ha conducido durante estos meses, mostrando su disposición ante las dudas que me han surgido durante la realización de este. Sin olvidar a D. Jesús de Madrazo Mateo enólogo de Viñedos del Contino y que me ha llevado de su mano de la mejor manera posible en la realización de mis prácticas curriculares, permitiéndome la utilizar una de sus experiencias para la realización de mi trabajo fin de Grado.

Por último no olvidar la colaboración imprescindible de la empresa Lallemand, tanto personalmente con la asistencia a catas de Raúl Herreros y Susana Baselga, como económicamente en cuanto a los productos enológicos y el pago de los diferentes análisis llevados a cabo durante el desarrollo de la experiencia.

A todos ellos muchas gracias, de corazón.

2. Resumen

El trabajo se ha llevado a cabo en la bodega *Viñedos del Contino*, titulado "Influencia nutricional en las propiedades organolépticas y cinética fermentativa de vinos fermentados con levaduras seleccionadas", se han elaborado tres depósitos llenados con uva lo más uniforme, de manera que fueran lo más parecido posibles en la analítica inicial. El depósito 21 ha sido elaborado con las prácticas utilizadas en la bodega de normal, y este la única nutrición que ha tenido es la proveniente del uso de Sulfosol (contiene SO₂ y bisulfito de amonio) nutrición inorgánica a la entrada de la uva. El depósito 20 en el que se quería ver la influencia de la adición de nutrientes, por lo que no se le suministró Sulfosol en la entrada de uva sino Solfosol (sin ningún aporte de nitrógeno), se adicionó Nutrient VIT Nature (nutrición 100% orgánica) al inicio de la fermentación y en 1/3 de la fermentación de nuevo Nutrient VIT Nature. Por último sobre el depósito 19 se utilizó Solfosol también, en el inicio de fermentación Nutrient VIT Nature y en un 1/3 de fermentación Nutrient VIT (mix de nutrición orgánica e inorgánica). Las dosis de estos nutrientes fueron de 20g/hL. Los tres depósitos han recibido los tratamientos de forma que fuera lo más similar posible, inoculando la misma levadura y haciendo los mismos tratamientos diarios.

Se ha comparado la evolución en sus cinéticas fermentativas, la analítica inicial y final obtenida, como la obtención del vino final con un análisis sensorial descriptivo (cata) y un análisis de aromas en laboratorio, intentando argumentar cual sería la nutrición más adecuada para la elaboración de vinos de calidad.

Palabras clave: nutrición, orgánica, inorgánica, cinética fermentativa, nitrógeno.

Abstract

This project titled “Nutritional influence of selected yeast fermenting wines in organoleptic properties and fermentative kinetic” was developed in ViñedosdelContino winery. Three different tanks were elaborated, filled up with the most uniform grapes as it was possible, so that the initial analytics were as similar as possible. Tank number 21 was elaborated with the techniques that are normally used in the winery, and the only nutrition that it had, came from the use of Sulfosol (contains SO₂ and ammonium bisulfite) inorganic nutrition at grape arrival. Tank number 20, in which the influence of nutrient addition was supposed to be seen, Sulfosol wasn’t added at grape arrival, Solfosol (without any nitrogen) was added instead together with Nutrient VIT Nature (100% organic nutrition) at the beginning of fermentation and with 1/3 of fermentation completed. At Last in tank number 19 Solfosol and Nutrient VIT Nature were used at the beginning of fermentation and Nutrient VIT (mixture of organic and inorganic Nutrition) with 1/3 of fermentation completed. Doses for each of these nutrients were 20g/Hl. Each of the three tanks received the treatments in the most homogenous way possible, inoculating the same yeast and doing the same daily treatments.

The evolution of fermentative kinetics, initial and final analytics, organoleptic properties and laboratory analysis of aromas of the elaborated wine were compared trying to demonstrate which one would be the most adequate for elaborating higher quality wines.

Key words: nutrition, organic, inorganic, fermentative kinetics, nitrogen.

3. Introducción.

3.1. Nutrición en el viñedo.

En el momento que hablamos de elaboración de vino nuestra cabeza no debe dirigirse a la bodega, ya que esto sería un error, puesto que sí, el vino se elabora en la bodega, pero este se obtiene a partir de la uva, la cual se produce, crece y desarrolla en el campo (viticultura), por tanto la elaboración del vino debe quedar claro que se inicia en el viñedo.

La maduración de la uva es un proceso complejo en el que intervienen biosíntesis, transportes, almacenamiento y transformaciones de diferentes elementos (*Ollat, 2002*). Cuando hacemos referencia a compuestos químicos importantes siempre aparecen los comunes como los azúcares y los ácidos orgánicos, pero no debemos olvidar que también tienen su papel, igual de importante, los compuestos secundarios como los fenoles y precursores de aromas, que participan en la calidad de la uva y del vino.

El trabajo en el viñedo y la intervención que podemos llevar a cabo sobre la materia prima nos ayudará a equilibrar la uva, siempre teniendo en cuenta el vino que se desee obtener. Como acabo de apuntar, una vez vendimiada la materia prima, estos factores y componentes solo podrán ser realizados en bodega por medio de la levadura y la nutrición más adecuada en función del producto que queramos obtener.

El metabolismo de la levadura supone una cantidad importante de reacciones bioquímicas, las cuales pueden alterar la composición del producto final, cambiando el perfil sensorial del vino. Los obtenidos a partir de la levadura serán una serie de productos secundarios como ésteres, alcoholes superiores, ésteres etílicos, ácidos grasos y otros como el diacetilo, el acetaldehído o el acetato de etilo, que conformaran en su conjunto y en compañía de otros el aroma del vino.

Hoy en día el aroma del vino podrá ser "obviado" por parte de la población, sin embargo está demostrado que es uno de los parámetros más importantes a la hora de valorar la calidad de un vino. Pues pequeñas variaciones en cantidades y cualidades aromáticas pueden dar todos los galardones a un vino, o bien quedarse en un vino corriente y correcto.

Es por esto que es de vital importancia saber tratar el producto en el campo, conocer la materia prima y partiendo de esta base, una vez que su recepción en bodega sea efectiva para ser elaborada, tomar las medidas oportunas para obtener el vino final deseado.

3.2.Elaboración del vino en bodega.

La utilización de nutrientes en enología no es una técnica que haya sido utilizada desde los inicios de la elaboración de vino, pero tampoco podríamos clasificarla como moderna. En continuación a lo anterior, cuando la materia prima llega a la bodega, ésta tiene la composición que ha desarrollado durante su crecimiento y maduración, y ahora debemos analizar los micronutrientes de los que dispone y carece para intentar suplementarlos con el objetivo de que no haya carencias de cara a la fermentación alcohólica y maloláctica, sí es que la hubiese.

Fermentación alcohólica:

Es un proceso en el que participan diferentes microorganismos, pero que cabría destacar por encima de todos la actuación de las levaduras, encargadas de convertir los azúcares presentes en la uva en alcohol + CO₂. Las propias levaduras comenzarán su desarrollo en un medio con azúcares, pero que a medida que evoluciona la fermentación en el medio va a ir apareciendo el alcohol y las levaduras deberán haberse desarrollado correctamente para no tener problemas y que ese medio hidroalcohólico no les afecte negativamente en exceso.

Las necesidades de nitrógeno y oxígeno han sido consideradas a estudio en numerosas ocasiones y con los avances obtenidos a nivel científico, se ha permitido resolver parte de los problemas que surgían en fermentación, como paradas de fermentación, desviaciones metabólicas, aparición de compuestos azufrados.

Durante la presente experiencia, uno de los objetivos del estudio ha sido valorar el papel que los micronutrientes tienen en los resultados finales de la vinificación.

3.2.1. Micronutrientes.

La palabra "micronutriente" se usa en enología para describir todas las sustancias que son utilizadas por los microorganismos del mosto y del vino, pero en pequeñas cantidades. Las vitaminas y minerales son los más importantes, estos actuarán frecuentemente como co-enzimas, haciendo posible la actividad de proteínas funcionales o tomando parte en los sistemas activos de transporte de membrana.

Según se indica en la bibliografía "*Los Micronutrientes en la Fermentación Alcohólica del Vino. Nutrientes convencionales frente a Nutrientes Orgánicos*", estos compuestos juegan un papel importante en la fisiología de los microorganismos de las industrias dedicadas a la producción de bebidas fermentables, pero que sin embargo han sido desatendidas desde hace mucho tiempo, aunque también es cierto que en los últimos años el interés por estos haya aumentado por la frecuencia de problemas de fermentaciones incompletas o lentas y a la necesidad cada vez más importante de evitar la formación de compuestos aromáticos desagradables.

3.2.2. Función de los micronutrientes en la actividad de las levaduras.

Se hace mención de algunos de los más relevantes:

- **Magnesio:** juega un papel central en el metabolismo fermentativo, activa numerosos enzimas glicolíticos, estimula la síntesis de ácidos grasos, regula la asimilación de otros iones, activa la función ATPasa de membrana. La deficiencia de Mg^{++} condiciona a las levaduras a producir más ácido acético y disminuir el rendimiento en la producción de alcohol. El magnesio desarrolla una función primordial en el crecimiento celular y en los mecanismos de gemación de levaduras. Su concentración óptima para las levaduras ronda los 50-100mg/L.
- **Manganeso:** tiene un papel importante en el metabolismo de las levaduras, en concentraciones suficientes la síntesis de proteínas y de tiamina se activan y consecuentemente la biomasa celular aumenta.
- **Zinc:** es un cofactor enzimático muy importante, para las enzimas GA3-(P)-deshidrogenasa, alcohol-deshidrogenasa y aldolasa. Su deficiencia afecta negativamente en el crecimiento celular y en la actividad fermentativa.

- **Cobre:** tiene efecto positivo sobre el contenido de proteínas celulares de las levaduras y sobre la glicólisis (0,06-0,09 mg/L), en concentraciones elevadas se vuelve negativo.
- **Biotina:** está involucrada en todas las reacciones de carboxilación y descarboxilación de levaduras, es decir la producción de acetyl-coenzima A y piruvato. Su deficiencia limita el crecimiento celular, daña membranas celulares y ocasiona una sobreproducción de ácidos grasos de cadena corta tóxicos.

3.2.3. Disponibilidad de los micronutrientes en mostos.

El contenido natural de micronutrientes en uvas, no suele ser el óptimo para el desarrollo de una buena fermentación. Se hace necesario considerar su disponibilidad efectiva, ya que tan solo es parte del contenido total el que va a poder ser asimilado por la levadura.

Por otro lado los minerales, independientemente de su concentración óptima que podría ser diferente en función de las condiciones del medio (contenido alto de azúcares, bajo pH, temperaturas extremas de fermentación...)

Lo que respecta a la quelación en el mosto de uva poco se sabe. En un medio complejo, los metales estarán presentes en diferentes formas, y estas formas no dependerán solamente del pH, sino también de la concentración y de las propiedades químicas de los aniones y de los compuestos quelantes de la solución.

Es por esto que, solo algunas de estas "formas" tendrá una influencia positiva o negativa sobre los microorganismos, mientras que el resto, que frecuentemente suele ser la mayoría, no tienen ningún efecto, aunque como he dicho representen la mayor parte del contenido total medido por absorción atómica (*Hughes et al.; 1991*).

Además, los compuestos del mosto de uva que podrán precipitar, quelar, unir o adsorber los metales, son numerosos y están presentes en concentraciones bastante altas: aniones inorgánicos (fosfato), aniones orgánicos (citrato y malato), aminoácidos, proteínas, péptidos, polifenoles etc...

Entre los cationes que son quelados más frecuentemente a causa de su tamaño y carga eléctrica, se han encontrado los cationes más importantes para las levaduras (Zn, Mn, Mg, Cu).

Considerando el número enorme de compuestos que pueden influir en la biodisponibilidad de los minerales, la amplia gama de concentraciones de cada uno de ellos y la combinación de condiciones, tales como pH y temperatura, resulta complicado calcular de forma aproximada cuantas formas tiene cada mineral y su concentración. Esto no ha sido considerado suficientemente y hace difícil la interpretación de la mayoría de investigaciones científicas.

Si continuamos observando factores que hacen todavía más complicada la comprensión del papel de micronutrientes en la cinética de la fermentación y en la calidad de vino: sería la competición microbiológica entre las levaduras responsables de la fermentación y todos los otros microorganismos contaminantes presentes en los mostos en condiciones de bodega.

Se sabe que antes de inocular las levaduras seleccionadas, las bacterias y levaduras contaminantes pueden crecer libremente: 10^3 células/mL cuando las uvas son sanas y se procesan rápido estando el equipo limpio, $10^6 - 10^7$ células/mL en condiciones opuestas. Estos microorganismos usan los nutrientes del mosto para crecer y se sabe que el contenido de nitrógeno disponible puede disminuir en pocas horas.

Teniendo en cuenta todo lo mencionado hasta ahora se puede entender que aún los mostos que naturalmente tienen una cantidad suficiente de micronutrientes, podrán perder una parte considerable de ellos, a causa de otros microorganismos u operaciones físico-químicas realizadas antes de la fermentación.

Es por esto que estos mostos pueden tener deficiencias, que pueden ser la causa de fermentaciones lentas o incompletas, rutas metabólicas colaterales que formarán subproductos, como el ácido acético, producción de compuestos del azufre o producción incompleta o deficitaria de compuestos aromáticos.

3.2.4. Adición de micronutrientes al mosto de uva.

Esta sería la base en que se centra mi trabajo. Para corregir los mostos de uva en sus posibles deficiencias de micronutrientes y realizar adiciones externas de cantidades definidas de minerales y vitaminas.

Como no está autorizado en la mayoría de países vitícolas agregar legalmente minerales o vitaminas a los mostos, Lallemand estudió una manera para usar levaduras *Saccharomyces cerevisiae* como fuente de micronutrientes.

En la propia composición natural de las levaduras del vino, hay contenido de vitaminas y minerales, que son relevantes desde el punto de vista nutritivo, y que pueden liberarse en el substrato gracias a la autólisis de las células.

La existencia de una amplia gama en la composición de levaduras, debido a la abundancia del medio donde se han desarrollado, da la oportunidad mezclando diferentes tipos de levaduras, agregar cantidades mayores de uno o más micronutrientes en particular.

Tabla 1. Contenido de algunos micronutrientes en *Saccharomyces cerevisiae*

MG/100G PESO SECO		MG/100G PESO SECO	
Magnesio	50 – 800	Tiamina	3 – 120
Manganeso	0,2 – 12	Riboflavina	0,5 – 4,5
Zinc	1,5 – 150	Niacina	4 – 64
Cobre	0,1 – 9,0	Piridoxina	0,2 – 6
Hierro	0,9 – 85	Biotina	0,04 – 7
Potasio	200 - 4500	Ácido Pantoténico	1,3 – 400
Calcio	12 - 760	Inositol	5 - 950

3.2.5. Paradas de fermentación.

En el apartado anterior habíamos definido como influyen los microorganismos predominantes en la fermentación alcohólica sobre las levaduras por ser la encargadas principales en dicho proceso, pero sin embargo habíamos dicho que convivían con otros microorganismos como son las bacterias lácticas y las bacterias acéticas que pueden influir según el momento en que actúen, positivamente o negativamente en la calidad organoléptica del vino.

Cuando se dice que aparecen problemas durante la fermentación alcohólica, es cuando su comienzo se retrasa o por otro lado la propia fermentación se detiene sin haber acabado por completo el proceso fermentativo, es decir, quedan azúcares que no han sido transformados en alcohol. Cuando este hecho se produce, el enólogo se enfrenta a un grave problema y es necesario actuar lo antes posible para comenzar la re-fermentación cuanto antes, ya que como se ha apuntado, todavía quedan azúcares en el medio y existe un grave riesgo de que las bacterias lácticas metabolicen los azúcares dando lugar a la aparición de un picado láctico aumentado la acidez volátil.

Se puede encontrar información muy extensa y desarrollada sobre paradas de fermentación, pero aquí se intentará focalizarla información sobre las causas más comunes y reales que vienen produciendo dicho suceso:

1. Una de las principales causas de problemas de fermentación es **la carencia de nutrientes en el mosto** (*Kunkee; 1991*). Es cierto, que este hecho es más difícil que suceda en vinos tintos, sin embargo el riesgo aumenta en blancos por las técnicas excesivas para obtener mostos muy limpios, que traen consigo la eliminación de gran parte de los nutrientes necesarios para el correcto desarrollo de las levaduras (*Lafon-Lafourcade; 1983*). Para compensar este problema se suelen añadir activadores de fermentación con el fin de suplir las posibles carencias en tiamina y nitrógeno asimilable (*Sablayrolles et al.; 1996*). Otra opción muy recomendada en vinos blancos sería la realización de una corta maceración pelicular o la adición de un pequeño porcentaje (1%) de burbas finas recuperadas después del desfangado.

Dada la importancia para el desarrollo de la fermentación alcohólica, el término nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) comprende los alfa-aminoácidos (AA), el amonio (NH_4) y es la parte del nitrógeno que la levadura enológica puede utilizar para llevar a cabo la fermentación de manera eficaz. La prolina es el único α -aminoácido (AA) libre que las levaduras no asimilan, a pesar de que es uno de los más abundantes en los mostos de uva.

$$\text{NFA} = \alpha\text{-aminoácidos libres} + \text{NH}_4 + \text{algunos péptidos pequeños}$$

Para orientarse en la cantidad necesaria de NFA se puede establecer rangos del siguiente modo, si la cantidad es inferior a 120mg/l, será muy probable que tenga lugar una parada de fermentación (*Bisson; 1999*). Si hay más de 150mg/l de nitrógeno asimilable la fermentación se desarrollará sin ningún problema, teniendo en cuenta siempre la cepa de levadura inoculada y el grado alcohólico probable. Por último, puesto que los extremos nunca fueron buenos, una cantidad superior a 400mg/l de nitrógeno asimilable, puede provocar riesgo de formación de carbamato de etilo, o incluso inestabilidad microbiológica.

Puede resultar de gran ayuda por tanto el conocimiento de la cantidad de nitrógeno asimilable, que se conocerá de forma sencilla en blancos, sin embargo en tintos nos resultara más complejo, dado que los hollejos pueden aportar nitrógeno asimilable que difícilmente se detectará en los análisis del mosto inicial.

2. Otra causa sería la **falta de aireación del mosto** o del vino en fermentación. Como bien es conocido las levaduras no necesitan oxígeno para su metabolismo fermentativo, sin embargo sí que lo precisan para llevar a cabo la síntesis de esteroides y los ácidos grasos insaturados de la membrana plasmática (*Henry, 1982*). Si no tienen el oxígeno no van a poder multiplicarse y por tanto la población de levaduras quedará reducida. Además haciendo referencia a lo tratado al inicio del trabajo, si no tienen un desarrollo adecuado y no han podido sintetizar las membranas correctamente, no aguantarán en un medio en el que el etanol va incrementándose y las levaduras tendrán serias dificultades para finalizar la fermentación alcohólica. Es por esto que es adecuado realizar remontado con aireación, sobre todo en los inicios de las fermentaciones.

3. Las **temperaturas extremas**, bien sean muy bajas o muy altas no son recomendables. Si la temperatura inicial del mosto es muy baja, tendrá lugar un retraso en el comienzo del proceso, siendo conveniente calentar el mosto. Por el contrario, si en el transcurso de la fermentación se alcanzan temperaturas muy altas, superiores a 30°C, puede complicarse el desarrollo de esta, ya que las levaduras fermentan a velocidades muy elevadas (*Ough, 1964*) provocando una acumulación intracelular de etanol que causaría la muerte de la célula. Es por esto que es vital el control de la temperatura de fermentación.
4. Los **mostos excesivamente ricos en azúcar** pueden provocar problemas en el inicio de la fermentación, puesto que estas altas concentraciones de azúcar inhiben a las levaduras (*Boulton et al.; 1996*). Al igual que al inicio la concentración de azúcares puede ser elevada, el alcohol también lo será al final, lo que puede provocar problemas para sobrevivir en tal presencia de alcohol, ya que es tóxico para las propias levaduras, provocándoles su muerte.
5. **Presencia en el mosto de pesticidas** utilizados en el tratamiento del viñedo. Estos pueden provocar toxicidad hacia las levaduras retrasando la fermentación o dando lugar a paradas. Sin embargo en la actualidad las nuevas generaciones de pesticidas son menos tóxicas para levaduras, y si se respetan los periodos de seguridad, no tiene por qué haber problemas.
6. **Antagonismo entre microorganismos**. Incluye toda la serie de procesos complejos que tienen lugar durante la vinificación. El conjunto de microorganismos presentes compiten entre ellos por los nutrientes del mosto. La capacidad para captar ciertos nutrientes limitantes o la resistencia a sustancias inhibitoras producidas por ellos mismos, por otros microorganismos o por la adición de sustancias como el SO₂ al mosto determinará el que se impongan unos u otros. Por lo general, la adición de SO₂ y la inoculación de una población de levaduras, les dará una ventaja adicional para el buen desarrollo de esta, sin olvidar que cuando hay retrasos o ralentizaciones en las fermentaciones, pueden desarrollarse otras levaduras y /o bacterias indígenas que alterarán el proceso.

7. **Efecto tóxico de los ácidos grasos de cadena corta.** Considerada esta como una de las principales causas de problemas en fermentación. Los más representativos son el octanoico y decanoico, ambos liberados por las propias levaduras. Para evitar la aparición de estos ácidos aparece como solución la utilización de cortezas de levadura. Estas son paredes celulares que cuando son añadidas al mosto/vino, fijan por absorción a los ácidos grasos detoxificando el medio. También se habla de que estas pueden actuar fijando residuos de pesticidas y portando nutrientes (*Muñoz y Ingledrew; 1990*).

En forma de resumen se concluye que las causas posibles que pueden conllevar a una parada fermentativa a veces no es por una única causa, sino por la conjunción de múltiples causas que al actuar de forma sinérgica amplían sus efectos inhibitorios sobre las levaduras.

3.2.6. Nutrición orgánica e inorgánica.

El nitrógeno es un factor clave cuyo impacto es determinante en la fermentación del vino, ya que es el nutriente más importante y, por consiguiente, influye en la cinética de la fermentación como en la calidad del mismo.

El nitrógeno es esencial para el crecimiento y metabolismo de las levaduras. En el proceso de vinificación, el NFA juega un papel central a dos niveles:

- Constituye un importante factor nutricional para las levaduras durante la fermentación alcohólica debido a su función en la síntesis proteica y en el transporte de azúcares.
- Es esencial para la biosíntesis de marcadores de calidad tales como los alcoholes y los ésteres por parte de la levadura enológica.

El nitrógeno puede añadirse en su forma inorgánica (amonio) u orgánica (aminoácidos). En el mosto una tercera parte del nitrógeno se encuentra en forma de amonio y dos terceras partes en forma de aminoácidos, aunque depende de la variedad y de las condiciones de cultivo.

El consumo de aminoácidos, a diferencia del consumo de amonio, no provoca poblaciones elevadas de levaduras, y esto es un efecto beneficioso en la conducción de fermentación alcohólica de vino, ya que poblaciones muy numerosas requieren mayor cantidad de nutrientes (vitaminas, minerales, esteroides, ácidos grasos y nitrógeno) cuya demanda es difícil de mantener hasta el agotamiento de los azúcares. Son estas carencias nutricionales las que provocan generaciones de levaduras sensibles al etanol que hacen ralentizar e incluso detener la cinética fermentativa. Y es que aunque la fermentación alcohólica llegue a su fin, el vino resultante se resiente cualitativamente, con incremento de la acidez volátil, olores a reducción y potencial aromático sensiblemente disminuido. Por ello es preferible realizar la fermentación alcohólica con poblaciones menos numerosas, pero sin deficiencias nutricionales, de tal forma que las últimas generaciones de levaduras que acaban los azúcares del mosto, tengan la suficiente vitalidad para agotar los azúcares y no produzcan metabólicos indeseables para la calidad del vino.

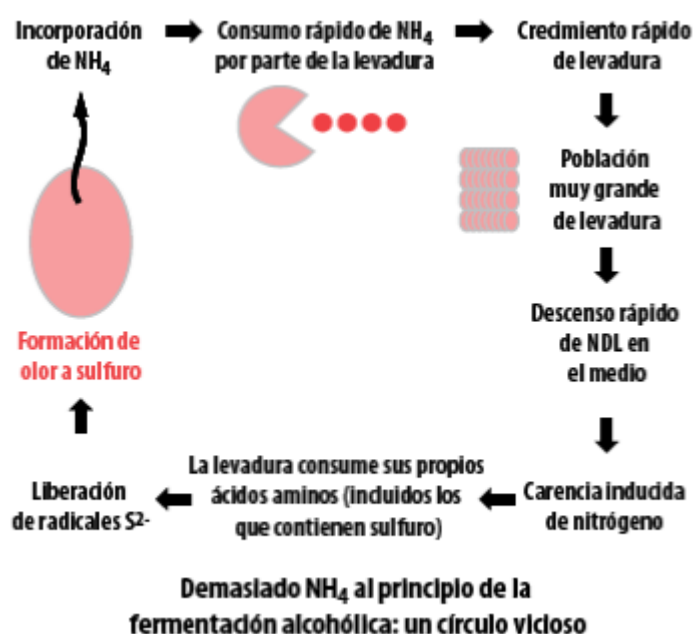
El nitrógeno proveniente de fuentes externas puede adicionarse del siguiente modo:

- Nitrógeno inorgánico: sales de amonio (DAP, DAS), las cuales se adicionan durante la fermentación alcohólica.
- Nitrógeno orgánico: proteínas, péptidos, tripéptidos y aminoácidos libres provenientes de la levadura (levadura inactiva y autolisado de levadura).

En cuanto al momento de la adición numerosos estudios han demostrado que no es recomendable realizar una sola adición de nitrógeno al comienzo de la fermentación, ya que esta ocasionará la presencia de una población de levaduras muy alta, un aumento repentino de la velocidad de fermentación acompañado de una reacción exotérmica (producción de calor) y un alto agotamiento del nitrógeno. Es por esto que se realizará una segunda adición a 1/3 de fermentación alcohólica, cuando la población de levaduras ha alcanzado su máximo, es decir, después del agotamiento del nitrógeno del mosto (la levadura lo ha consumido en su fase de multiplicación y de producción de biomasa), obteniéndose así los mayores beneficios para la tasa de fermentación y la cinética de esta.

Es aconsejable saber que si se añade simultáneamente amonio y nutrientes orgánicos, la levadura consume directamente el amonio, provocando como se ha dicho antes un exceso de multiplicación celular y una agotamiento de las levaduras antes de tiempo, dando así problemas de fermentación y olores a reducción. Por tanto concluye este apartado con que, si la adicción es de nutrientes orgánicos (aminoácidos) al inicio de fermentación se evita el exceso de multiplicación celular, menor producción de sulfhídrico, mayor intensidad aromática e incremento del carácter varietal.

Ilustración 1. Impacto de un uso excesivo de nitrógeno inorgánico al principio de la fermentación



3.2.7. Necesidades nutricionales en la fermentación maloláctica.

Durante la FML las condiciones de desarrollo para las BAL son difíciles. En el desarrollo de la FML se degradan entre 0,4 y 0,8 g/L de azúcares, de los cuales la mayoría son glucosa y fructosa, que son las principales fuentes de energía para el desarrollo bacteriano. La mayoría de los vinos cuentan con estas cantidades de azúcar para garantizar el desarrollo de la FML de forma completa.

Por lo que refiere a los compuestos nitrogenados, las BAL necesitaran aminoácidos, purinas, pirimidinas, vitaminas y minerales, lo que quiere decirnos que el contenido en nitrógeno del vino variará durante la FML, variando dichas necesidades en función de la cepa de BAL.

De todos los estudios realizados por Lallemand sobre las diferentes necesidades de 4 cepas comerciales de bacterias del ácido láctico, de un total de 13 aminoácidos, el ácido glutámico era imprescindible para todas las cepas, y por otro lado la metionina, serina, fenilamina y tirosina resultaron vitales para la mayoría de las cepas, el resto se consideraron importantes pero en menor medida que estos anteriormente nombrados.

Se ha demostrado que el desarrollo bacteriano y la FML se ven estimulados por la presencia de compuestos nitrogenados derivados de las levaduras, como pueden ser los péptidos y manoproteínas de la pared celular. Todos los medios no sintéticos de cultivo de BML deben suministrar extractos o autolisado de levadura a los organismos.

Para utilizar estos tipos complejos de fuente de nitrógeno para su crecimiento, las bacterias tienen que ser capaces de hidrolizarlos a sus subunidades, y de transportarlos a la célula.

3.2.8. Disponibilidad de nutrientes determinada por las prácticas de vinificación.

Como se ha dicho anteriormente con la clarificación de los vinos se eliminan nutrientes y partículas en suspensión que estimulan el desarrollo bacteriano, por tanto no se elimina tan solo una porción de las BAL, sino que se eliminan componentes que traerá consigo una reducción del desarrollo bacteriano potencial, que influirá en la calidad del vino. Durante el proceso de autólisis de la levadura, se liberan vitaminas y aminoácidos en el vino, y el mayor contacto con las lías asociadas al proceso enriquece el vino con micronutrientes que estimulan la FML.

Gerbaux ha demostrado que las condiciones del vino que estimulan la FML pueden inhibir el desarrollo de la levadura *Brettanomyces* nociva para la calidad sensorial del vino.

Está comprobado que si una levadura con altas necesidades de nutrientes realiza la fermentación alcohólica, se agotarán en el mosto los factores necesarios que permitan el desarrollo de BAL, y por tanto sería conveniente la adición de un nutriente bacteriano. Y si un mosto de por sí ya tiene una concentración de nutrientes baja, con la producción de SO₂ por parte de la levadura se creará un ambiente que dificultará el desarrollo de FML.

4. Objetivos del trabajo:

La situación actual del consumo de vino en el mundo está en permanente cambio. Cada día consumidores de a pie demandan una mayor calidad en el vino consumido, y es por esto que no se debe de parar de realizar experiencias, ensayos, pruebas y todo lo que esté en nuestras manos para obtener la máxima calidad para nuestros vinos. Por un lado partiendo de la mejor materia prima posible y posteriormente aplicar todos nuestros cuidados y técnicas en elaboración, crianza y embotellado.

Como principal objetivo de este trabajo fin de Grado se ha marcado el comprobar cómo influye la nutrición durante la elaboración de vino en las cualidades organolépticas y en la evolución fermentativa.

-En primer lugar verificar la influencia de activadores de fermentación sobre la cinética fermentativa de levaduras y bacterias.

-Comprobar la evolución o efecto de esta nutrición sobre ellas durante todo el proceso de elaboración.

-Influencia y diferenciación según Nutrición Orgánica y Nutrición Inorgánica a nivel sensorial en vinos de alta gama.

5. Materiales y Métodos

5.1. Vinificación:

Los depósitos fueron llenados de la forma más uniforme que se pudo. La uva llegó en remolques de 2000 kg aproximadamente y cada tolva que fue llenada con un remolque era dividida en los tres depósitos repartiendo 700Kg a cada depósito. De esta manera las zonas de la parcela más maduras como las menos maduras, quedaron repartidas en los tres depósitos. El 10 de Octubre comenzó el llenado de estos depósitos con 2.050 Kg de Graciano perteneciente a la parcela Cabo Conejos y 4.200 Kg de Tempranillo de la parcela Parecillas. El llenado final fue durante la mañana del día 11 con otros 2.100Kg de Tempranillo de la parcela Parecillas y por último 2.100 Kg de Tempranillo de la parcela Santa María. Una vez completados con la uva despallada y estrujada se llevó a cabo un remontado de 10 minutos y se cogió una muestra de mosto que fue analizado en los Laboratorios Excell Ibérica.

Durante el llenado de los depósitos se le suministraron 5 Kg de Ácido Tartárico +900 ml de Sulfosol (Amonio y sulfuroso) al depósito 21, que es el producto habitualmente utilizado en la bodega. Por otro lado se añadió 5 Kg de Ácido Tartárico + 2.800 mL de Sulfosol (sin ningún componente nitrogenado, solo sulfuroso) a los depósitos 19 y 20, que son los que iban a recibir nutrientes durante su fermentación.

El **día 11 de Octubre** por la tarde se le suministró al inicio del remontado a cada depósito 2 Kg de Booster Rouge (polisacárido para fijación de color) y antes de finalizar el remontado se inocularon los tres depósitos con 2 Kg de levadura seca activa (LSA)LalvinD-254. Todos los productos son de la casa canadiense Lallemand, empresa participante en la experiencia como sponsor.

El **día 12 de Octubre** se realizó, como es habitual al principio de todas las fermentaciones en Viñedos del Contino, un remontado con aire durante 20 minutos por la mañana y otro por la tarde, con una bajada muy leve de densidad.

El **día 13 de Octubre** igualmente se realizó un remontado con aire durante 20 minutos, tanto por la mañana como por la tarde. Bajando la densidad alrededor de 6 puntos se da por iniciada la fermentación como tal, por tanto en el remontado de la tarde se adicionó Nutrient VIT Nature a una dosis de 20 g/hL tanto al depósito 19 como 20.

El **día 14 de Octubre** se realizó un remontado con aire durante 20 minutos por la mañana y por la tarde en los depósitos 19 y 20, sobre los que había subido la temperatura hasta los 22°C y bajado la densidad a 1070. Sobre el depósito 21 se realizó el primer delestage, puesto que su densidad había disminuido ya a 1060 mg/L una temperatura de 24°C.

El **día 15 de Octubre** se realiza delestage a los depósitos 19 y 20 con una densidad de 1052, un poco más tarde que para el depósito 21, teniendo en cuenta que el día de antes con 1070 de densidad, se decidió esperar al día 15 de Octubre. Los depósitos 19 y 20 habían alcanzado 1/3 de la fermentación de azúcares y por tanto, se les suministró la segunda dosis de nutrientes. Al depósito 19 20g/hL de Nutrient VIT y al depósito 20 20g/hL de Nutrient VIT Nature. Este día el depósito 21 había experimentado una bajada de densidad hasta 1038 mg/L y un aumento de temperatura hasta 26°C, por lo que se hizo un remontado aireado matutino durante 15 minutos.

El **día 16 de Octubre** se realizó el último remontado con aire durante 20 minutos a los tres depósitos. Continúa bajando la densidad y subiendo la temperatura hasta los 27-28°C, controlando para que no sobrepase los 28°C, ya que a temperaturas superiores las levaduras pueden empezar a sufrir.

El **día 17 de Octubre** los depósitos alcanzan una densidad de 1020-1010 y es en este momento cuando se dejan de lado los remontados aireados para realizar remontados directos. La fermentación comienza a decaer y la producción de CO₂ también, por tanto, la introducción de O₂ no interesa, por lo que se hacen remontados sin la introducción de aire para evitar oxidaciones. Se continuó así con estos remontados directos hasta el momento en que se dieron por acabadas las fermentaciones. En el caso del depósito 19 con un densidad de 992,7 el día 23 de Octubre. El depósito 20 el con una densidad de 992,8 día 23 y el depósito 21 con una densidad de 993,7 el día 23.

Para tener aislados cada uno de los depósitos y continuar viendo su evolución, se extrajeron dos barricas de la misma tonelería y mismo tostado. También se llenaron dos bombonas de 15 L de cada depósito para llevar a cabo el relleno de las barricas debido a las mermas que se producen durante la crianza. De estas barricas hemos ido catando continuamente para ver las evoluciones e igualmente de estas fueron extraídas las muestras para la cata final.

5.2. Análisis sensorial descriptivo.

-Fichas de cata: proporcionadas por Laboratorios Excell Ibérica S.L. y obtenida mediante Perfil de Libre elección (Free Choise Profiling, FCP), siendo así lo más completa posible para realizar el estudio con la mayor exactitud y detalle posible en vinos tintos.

-Panel de catadores: representado por un grupo de catadores expertos, 5 compañeros de 4º curso del Grado de Enología, Susana como representante de la empresa Lallemand, Jesús de Madrazo (enólogo de Bodegas Viñedos del Contino), Antonio Palacios (tutor y profesor experto en cata en la UR). También tuvimos la oportunidad de aprovechar la visita de los alumnos del Máster de Viticultura de la Politécnica de Madrid, por lo que también hicieron la cata de los tres vinos. Por supuesto fue una cata totalmente a ciegas.

-La cata tuvo lugar en la sala de catas de la Bodega Viñedos del Contino. Como he dicho anteriormente las tres botellas estaban totalmente tapadas, a cada una se le asignó una letra y se sirvieron. Se explicó en qué consiste la experiencia, (un vino testigo, típico elaborado en la propia bodega, luego otro vino con nutrición 100% orgánica, y por último un vino con nutrición orgánica e inorgánica de forma simultánea). Durante la cata se anotan y expresan los resultados sensoriales por medio de complementación de las fichas de cata las diferencias que observaban en dichos vinos. A posteriori han sido utilizadas estas fichas de cata para realizar un análisis estadístico.

-Análisis estadístico realizado mediante el software estadístico XLSTAT 2014 con el que se puede realizar el análisis de datos multivariantes (PCA, DA, CA, MCA, MDS), pruebas de correlación, pruebas paramétricas, pruebas no paramétricas, ANOVA, ANCOVA y los árboles. Herramienta muy completa y de gran utilidad especializada en factores estadísticos provenientes del análisis sensorial.

5.3. Fichas técnicas de los nutrientes.

Ilustración 2. Ficha Técnica Nutrient VIT Nature

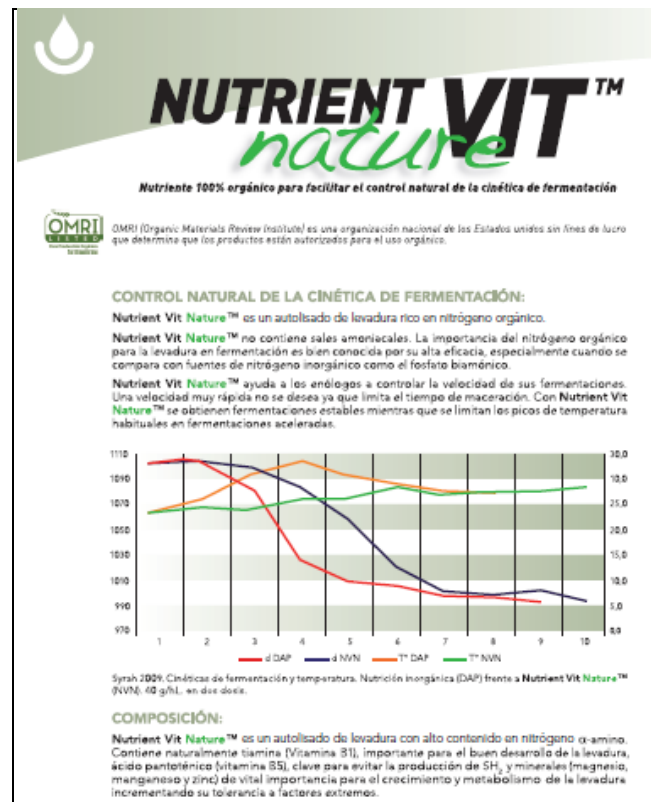



Ilustración 3. Ficha Técnica Nutrient VIT Nature



Ilustración 4. Ficha Técnica Nutrient VIT



NUTRIENT VIT™

Activador de fermentación complejo

Nutrient Vit™ es un activador de fermentación complejo que ejerce un efecto preventivo y corrector de las carencias específicas de los mostos.

ASEGURAR UNA FERMENTACIÓN COMPLETA SIN DESVIACIONES SENSORIALES:
Junto con otras causas bien conocidas (temperatura de fermentación mal controlada, inadecuada adaptación de las levaduras al medio, grado alcohólico elevado,...) las carencias en nutrientes y/o la presencia de sustancias tóxicas o inhibidores del crecimiento son causa habitual de las paradas de fermentación.

El nitrógeno asimilable, que incluye sales de amonio (N inorgánico) y aminoácidos (N orgánico), es necesario para la síntesis de proteínas y desarrollo de la levadura.


Añadido al mosto Nutrient Vit™ aporta a la levadura nitrógeno fácilmente asimilable, además de factores de crecimiento esenciales:

- Compensando deficiencias cada vez más habituales.
- Limitando la acción de inhibidores de origen microbiano (ácidos grasos), así como de sustancias tóxicas de origen exógeno (fungicidas).
- Disminuyendo el efecto de la ausencia de coalescentes en el caso de mostos excesivamente desfangados.
- Logrando una cinética más regular y rápida.
- Evitando desviaciones sensoriales originadas por la levaduras, como acidez volátil y compuestos azufrados.
- Mejorando la fracción aromática y gustativa del vino.

COMPOSICIÓN:
Nutrient Vit™ está compuesto por:

- Levaduras inactivadas, como fuente de:
 - Nitrógeno orgánico (aminoácidos asimilables, esteroides y ácidos grasos poliinsaturados).
 - Vitaminas esenciales para el crecimiento, como ácido pantotérico, biotina, ácido fólico y riboflavina. La deficiencia de vitaminas es origen de desviaciones fermentativas y sensoriales.
 - Minerales esenciales (Mg, Mn, Zn) para el metabolismo de la levadura incrementando su tolerancia al etanol y a temperatura y regulando la formación de alcohol y ésteres.
- Sales minerales, fosfato y sulfato biomónico que constituyen un aporte de nitrógeno inorgánico de fácil asimilación para la síntesis de sus propias proteínas y enzimas que preservan la multiplicación celular.
- Tiamina (Vitamina B1), esencial para el buen desarrollo de la levadura. Es un coenzima de la descarboxilación de cetoácidos, limitando la producción de compuestos con grupos carbonilo (ácido pirúvico, acetaldehído, ...).

Ilustración 5. Ficha Técnica Nutrient VIT



NUTRIENT VIT™

Activador de fermentación complejo

APLICACIONES:

- Nutrient Vit™ se emplea en la fermentación de uvas tintas y mostos rosados y blancos.
- Prevención de paradas de fermentación.
- Optimización del perfil organoléptico del vino al prevenir desviaciones sensoriales y aporte de fuentes ricas en aminoácidos esenciales.

DOSIS Y MODO DE EMPLEO:

- La dosis de empleo media es de 30-40 g/hL. Dosis máxima autorizada CE: 40 g/hL.
- Una dosis de 30 g/hL de Nutrient Vit™, aporta 42 mg/L de NFA.
- Adicionar Nutrient Vit™ alrededor del primer 1/3 de la fermentación alcohólica durante un remojado con aireación para su correcta homogenización. Si la carencia en nitrógeno en el mosto es elevada, adicionar Nutrient Vit™ en dos etapas; tan pronto haya comenzado la fermentación y al primer tercio de la misma.
- Disolver en 10 veces su peso en agua o mosto facilitando su correcta homogenización en todo el volumen del depósito.
- En caso de parada de fermentación, adicionar Nutrient Vit™ en todas las fases de aclimatación de la levadura.

PRESENTACIÓN Y CONSERVACIÓN:

- Bales de 2,5 kg y 10 kg
- Para preservar la máxima actividad es muy importante conservar en lugar fresco y seco.
- La vida útil del producto a la temperatura de almacenamiento recomendada es de 4 años desde la fecha de producción.

ASPECTO FÍSICO:
Granulado de color beige.

En esta experiencia se decidió por parte de la empresa Lallemand y el enólogo Jesús de Madrazo utilizar una dosis de nutrientes de 20 g/hL. Teniendo en cuenta que los depósitos se llenaron con 10.500 Kg de uva que multiplicado por 0,70 (rendimiento), en litros serían unos 7.350 L. Por tanto, la dosis que se suministró de los diferentes nutrientes en los depósitos 19 y 20 son 1478gramos en cada adición. Nutrientes suministrados en bolsas de 2,5 Kg.

El coste de los nutrientes es el siguiente (ver fichas técnicas en ilustración 2-5):

-Nutrient VIT Nature: 32,90 € + IVA

-Nutrient VIT: 11,90 € + IVA

El cálculo del coste invertido en nutrientes es el siguiente.

Depósito 19:

1478 g Nutrient VIT Nature + 1478 g Nutrient VIT= 23.53 € + 8.51 € = 32.04€

Depósito 20:

1478 g Nutrient VIT Nature + 1478 g Nutrient VIT Nature= 23.53 € + 23.53 € =
= 47.06 €

Depósito 21:

Nutrición inorgánica (sulfosol)= 3 €

Ilustración 6. Depósitos de la experiencia.



6. Resultados y discusión

6.1. Cinéticas fermentativas.

Depósito 19

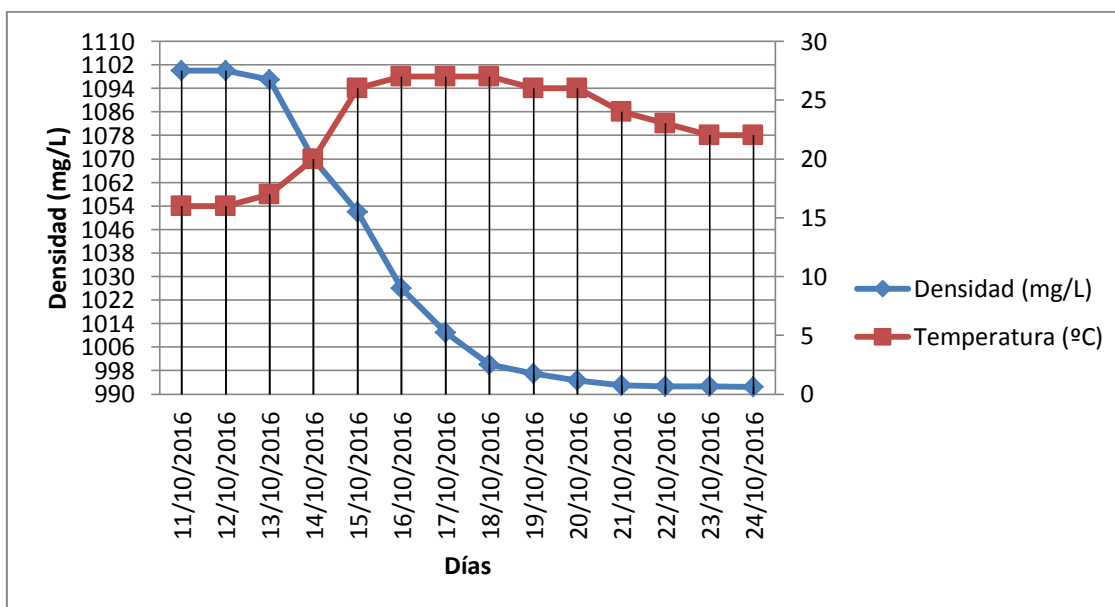
Tabla 2. Seguimiento diario de fermentación.

Fecha	Densidad (mg/L)	Temperatura (°C)
11/10/2016	1100	16
12/10/2016	1100	16
13/10/2016	1097	17
14/10/2016	1070	20
15/10/2016	1052	26
16/10/2016	1026	27
17/10/2016	1011	27
18/10/2016	1000	27
19/10/2016	997	26
20/10/2016	994,6	26
21/10/2016	993	24
22/10/2016	992,6	23
23/10/2016	992,6	22
24/10/2016	992,5	22

1^a Dosis de Nutrient VIT Nature

2^a Dosis de Nutrient VIT

Ilustración 7. Representación de la evolución fermentativa del depósito 19.



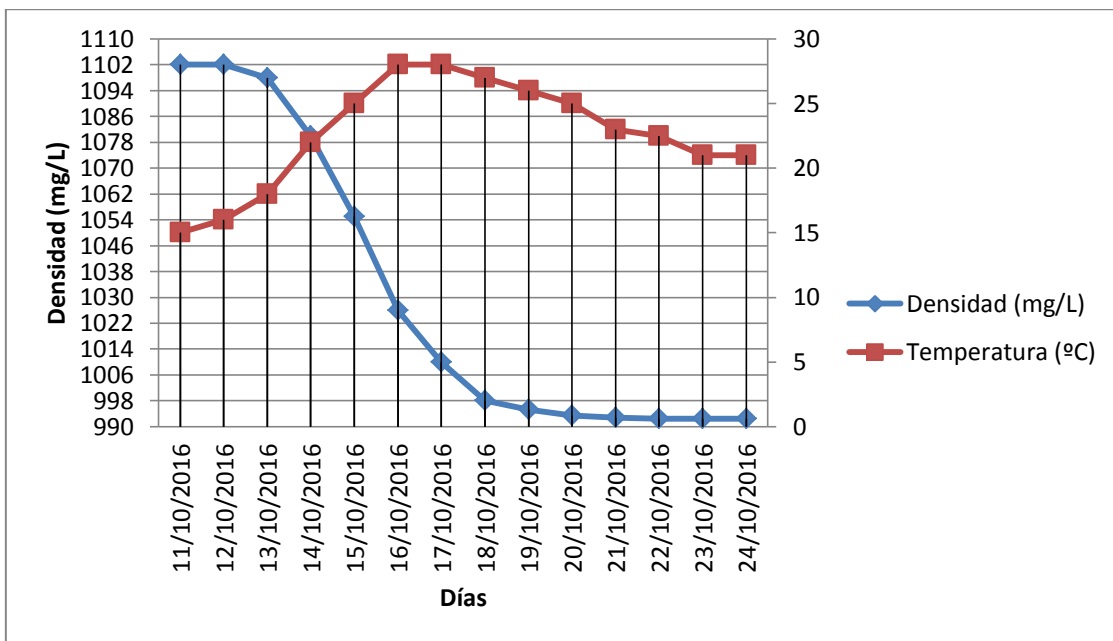
El depósito 19 (ver tabla 2 e ilustración 7) tiene al inicio nutrición orgánica y pasado un 1/3 de fermentación se le suministra un nutriente complejo orgánico/inorgánico. En cuanto a su cinética puede observarse que es bastante similar al depósito 20. Esta nutrición inorgánica es utilizada principalmente para el desarrollo y crecimiento de una mayor población de levaduras, que en este caso no sería demasiado necesario puesto que puede observarse como la población es adecuada para realizar dicha fermentación. Después se analizaron por cata.

Depósito 20

Tabla 3. Seguimiento diario de fermentación.

Fecha	Densidad (mg/L)	Temperatura (°C)	
11/10/2016	1102	15	
12/10/2016	1102	16	
13/10/2016	1098	18	→ 1ª Dosis de Nutrient VIT Nature
14/10/2016	1080	22	
15/10/2016	1055	25	→ 2ª Dosis de Nutrient VIT Nature
16/10/2016	1026	28	
17/10/2016	1010	28	
18/10/2016	998	27	
19/10/2016	995,3	26	
20/10/2016	993,5	25	
21/10/2016	992,8	23	
22/10/2016	992,5	22,5	
23/10/2016	992,5	21	
24/10/2016	992,4	21	

Ilustración 8. Representación de la evolución fermentativa del depósito 20.



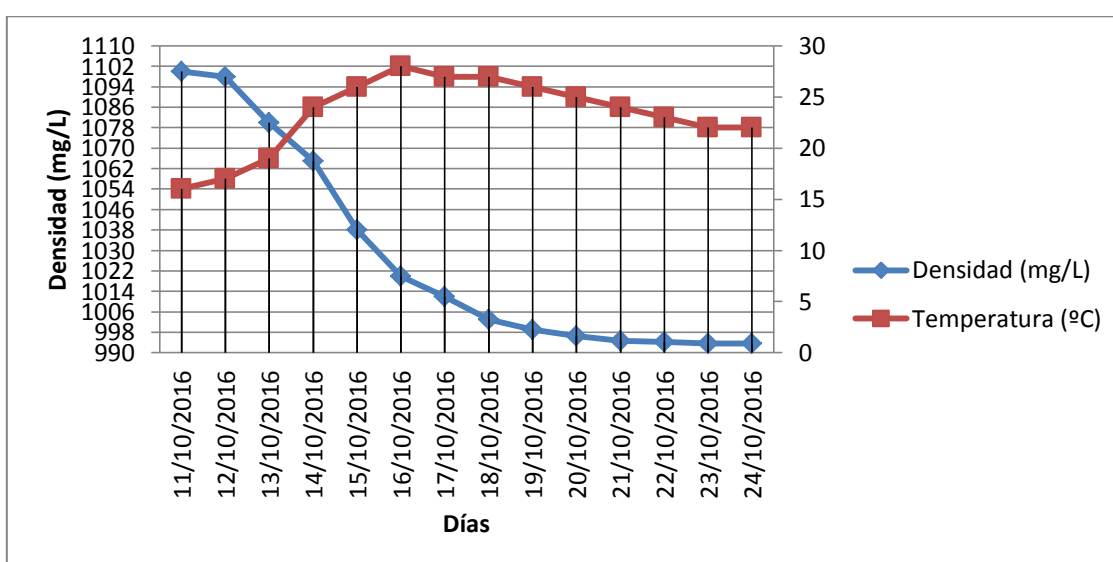
El depósito 20 (ver tabla 3 e ilustración 8) tuvo una nutrición orgánica al 100% y desarrolló una cinética correcta como se puede ver en la gráfica, quedando con una densidad de 992,4. Su inicio es normal, sin estar ralentizado ni acelerado por ningún nutriente o cualquier otra adición.

Depósito 21

Tabla 4. Seguimiento diario de fermentación.

Fecha	Densidad (mg/L)	Temperatura (°C)
11/10/2016	1100	16
12/10/2016	1098	17
13/10/2016	1080	19
14/10/2016	1065	24
15/10/2016	1038	26
16/10/2016	1020	28
17/10/2016	1012	27
18/10/2016	1003	27
19/10/2016	999	26
20/10/2016	996,5	25
21/10/2016	994,7	24
22/10/2016	994,2	23
23/10/2016	993,7	22
24/10/2016	993,7	22

Ilustración 9. Representación de la evolución fermentativa del depósito 21.



El depósito 21 (ver tabla 4 e ilustración 9) es el depósito testigo, el cual ha sido elaborado sin adiciones nutricionales y se ha seguido el procedimiento normal utilizado en la bodega. En la entrada de la uva se le añade Sulfosol que contiene bisulfito de amonio, es decir, se le suministra SO_2 y nitrógeno amoniacal al mismo tiempo. Con este nitrógeno amoniacal se potencia el desarrollo de la población de levaduras, que no se sabe si es totalmente adecuado, puesto que puede ser que la población de levaduras aumente en exceso y a posteriori haya competencia entre las propias levaduras. Se puede observar como la densidad ha comenzado a disminuir inmediatamente por esa mayor población de levaduras, que sin embargo al final la fermentación se dio por acabada con una densidad de 993,7, es decir, un vino con un mayor porcentaje de azúcar que los anteriores.

6.2. Análisis completos.

En el mosto de partida encontramos los siguientes valores (ver tabla 5).

Tabla 5. Análisis iniciales del mosto.

ANÁLISIS MOSTO INICIAL									
Depósito	Fecha	Kilos	Grado Probable	NFA	pH	AT	Ácido Málico	Ácido TH2	Ácido Láctico
9719	13/10/2016	10560	13,8	190	3,37	5,3	1,3	4,9	0,1
9720	13/10/2016	10560	13,8	196	3,39	5,3	1,3	4,8	0,1
7921	13/10/2016	10560	13,4	186	3,26	5,7	1,2	5,3	0,1

Como se ve en la tabla los análisis son muy similares (ver tabla 5). Por lo que respecta al NFA, que sería el valor que más interesa conocer para saber si el mosto tiene el nitrógeno asimilable necesario para tener un buen desarrollo de fermentación. En nuestro caso son valores idóneos para un buen desarrollo de la fermentación, ya que ronda entre 190 y 200 mg/L, según se ha visto en los estudios con valores superiores a 150 mg/L son valores correctos.

Tabla 6. Análisis iniciales del mosto.

ANÁLISIS MOSTO INICIAL						
Depósito	IPT	I. Color	420	520	620	SO ₂ L/T
9719	27,9	5,83	1,86	3,45	0,52	11/19
9720	30,2	9,28	3,7	4,87	0,71	13/21
7921	31,7	11,4	5,98	4,78	0,64	16/19

Fin de Fermentación Alcohólica.

Tabla 7. Análisis Fin de Fermentación Alcohólica.

ANÁLISIS FIN FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA							
Depósito	Fecha	AZ	Grado Alcohólico	pH	AV	AT	AT TH2
9719	24/10/2016	2,15	14,5	3,435	0,37	4,58	7,01
9720	24/10/2016	1,65	14,445	3,42	0,345	4,69	7,17
9721	24/10/2016	3,6	14,07	3,435	0,425	4,60	7,04

Según indicaba la densidad, la cantidad de azúcares en el final de la fermentación alcohólica en el depósito 21 es superior a los otros dos, debido a que estos azúcares ya no pudieron ser consumidos por las propias levaduras. Otro dato que ha variado en el depósito 21 (testigo) con respecto a los otros dos es la acidez volátil, siendo un punto superior (ver tabla 7).

Tabla 8. Análisis Fin de Fermentación Alcohólica.

ANÁLISIS FIN FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA				
Depósito	Fecha	Ac. Máfico	IPT	Int. color
9719	24/10/2016	1,05	65	25,445
9720	24/10/2016	1,1	66,55	25,4755
9721	24/10/2016	1,1	66,95	25,316

Fin de Fermentación maloláctica.

Tabla 9. Análisis Fin de Fermentación Maloláctica.

ANALISIS FIN FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA								
Depósito	Fecha	AZ	Grado Alcohólico	pH	AV	AT	AT TH2	Ac. láctico
9719	07/12/2016	1,3	14,58	3,515	0,505	3,886	5,945	0,7
9720	07/12/2016	1,4	14,5	3,485	0,44	4,059	6,21	0,7
9721	07/12/2016	1,4	14,24	3,505	0,58	3,899	5,965	0,7

Al final se observa que los azúcares han quedado en concentraciones parecidas en los tres casos y la acidez volátil continua ligeramente más alta en el caso del depósito testigo (21). El ácido málico como era de esperar desapareció por completo en los tres depósitos, apareciendo en todos una concentración 0,7 mg/L en ácido láctico (ver tabla 9).

Tabla 10. Análisis Fin de Fermentación maloláctica

ANALISIS FIN FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA					
Depósito	Fecha	IPT	Int. color	N ₂ AMÍNICO	AMONIO
9719	07/12/2016	64,4	19,0935	47,7	16
9720	07/12/2016	64,6	20,1825	53	14
9721	07/12/2016	63,3	17,8795	57,6	15

El índice de color que era idéntico previo a la fermentación maloláctica (ver tabla 10), se observa que tras ésta ha disminuido en todos pero especialmente se ha reducido en el depósito 21.

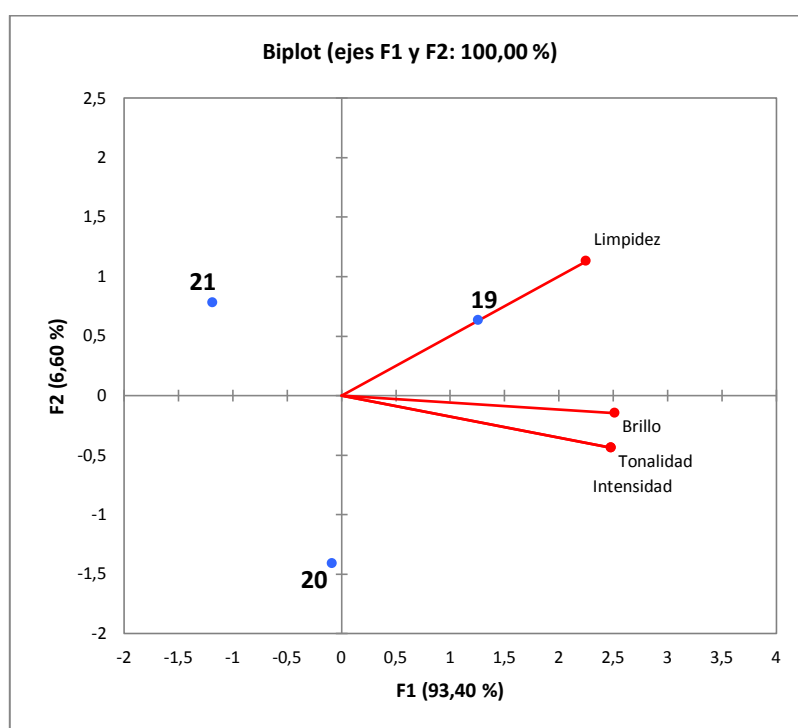
Como se puede observar en la tabla, los contenidos en amino, nitrógeno inorgánico, más elevados se encuentran en la muestra testigo. No se presentan diferencias a nivel de nitrógeno asimilable orgánico.

6.3. Análisis estadístico de componentes principales (ACP)

Se ha realizado unos análisis estadísticos multifactoriales empleando el software XLSTAT 2014, exponiéndose los resultados en modo de gráficas biplot a continuación.

- ACP Vista:

Ilustración 10. Análisis de Componentes Principales (ACP) de la fase visual de las diferentes muestras en función de su nutrición.

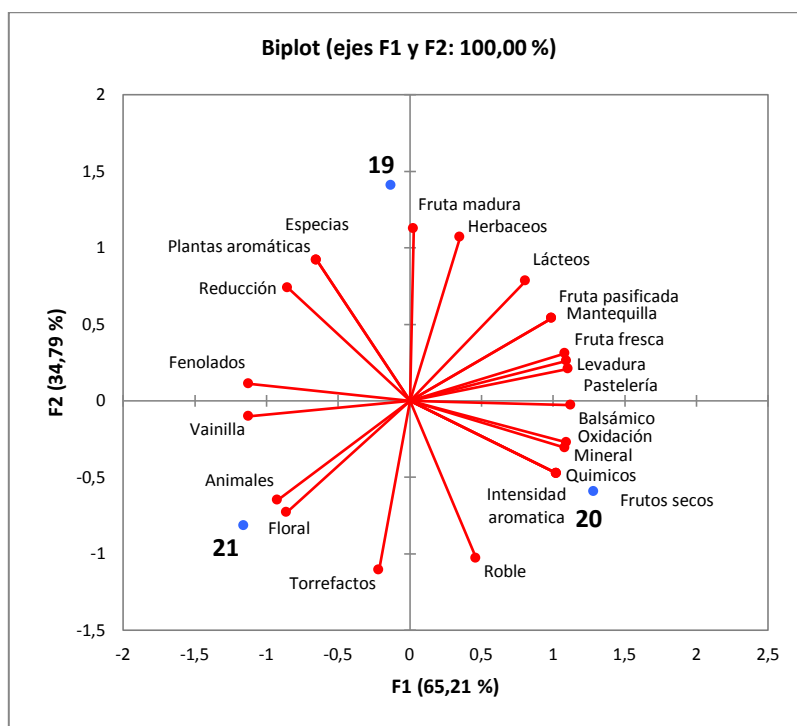


La ilustración 10 representa el espacio ACP de la fase visual de los vinos y las variables en función de la nutrición utilizada. Los vinos situados en la dimensión vectorial definida por estos dos factores (F1 y F2) representaron el 100% de la variación total.

Entre el vino testigo (21) y los vinos con nutrición (19 y 20), destaca el vino 19, el cual ha recibido una nutrición mixta (orgánica e inorgánica) y destaca por ser el más próximo en valores de limpidez, brillo, tonalidad o intensidad. En menor grado de proximidad aparece el vino 20 y el vino 21 que sería el más alejado de estos parámetros.

- **ACP Aroma:**

Ilustración 11. Análisis de Componentes Principales (ACP) de la fase aromática de las diferentes muestras en función de su nutrición.

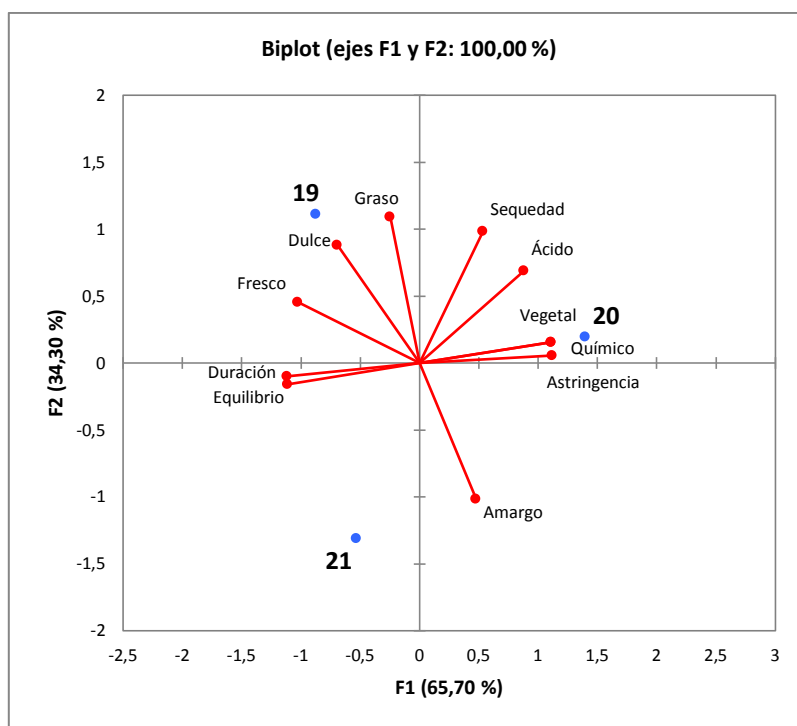


La ilustración 11 representa en el espacio factorial ACP de la fase aromática de los vinos y los atributos aromáticos en función de la nutrición utilizada. Los vinos situados en la dimensión vectorial definida por estos dos factores (F1 y F2) representaron el 100% de la variación total, siendo este un valor muy fiable a nivel de la interpretación de la varianza

Ahora se asignan los descriptores más próximos para cada uno de los vinos. En el vino 19 destacan la fruta madura, especias, plantas aromáticas, algo de reducción, herbáceos y lácteos, junto con toques de fruta pasificada. En el vino 20 destacan los frutos secos, mineral, cierto aroma balsámico y roble y con alguna nota de oxidación. Para acabar destacamos en el vino 21, que poseé aromas torrefactos, vainilla, animales, floral y algo de toques fenolados.

- **ACP Boca:**

Ilustración 12. Análisis de Componentes Principales (ACP) de la fase gustativa de las diferentes muestras en función del tipo de nutrición.

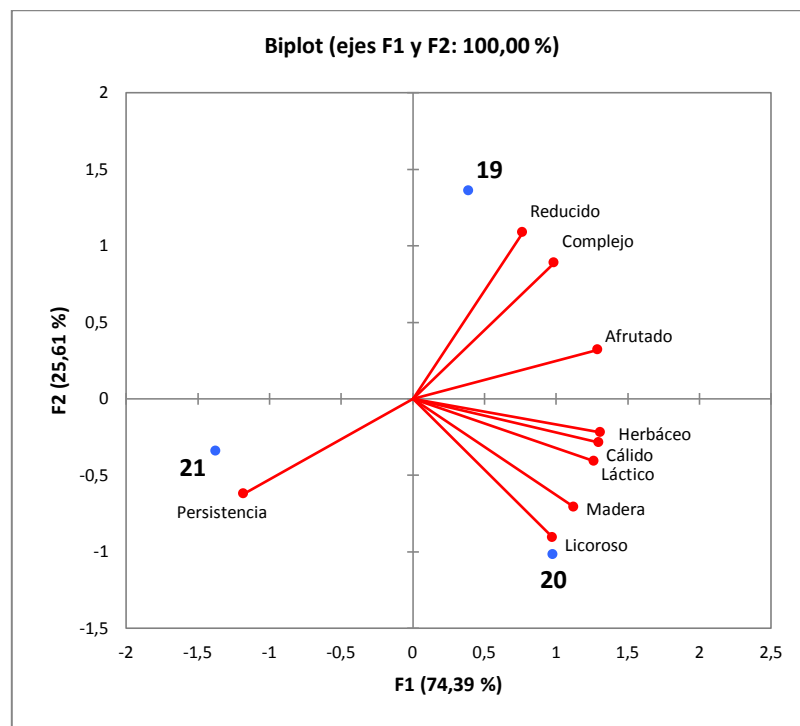


La ilustración 12 representa el espacio factorial ACP de la fase gustativa de los vinos en función de la nutrición utilizada. En este caso la dimensión vectorial definida por estos dos factores (F1 y F2) representa el 100%, siendo por tanto una vez más muy fiable.

En la fase gustativa podríamos destacar en el vino 19 (nutrición orgánica e inorgánica), como un vino más dulce en su entrada, con un leve sequedad que desaparece convirtiéndose en un vino graso y fresco a la vez, y también teniendo mayor duración y equilibrio, que son dos atributos imprescindibles de vinos de calidad, como son los de Viñedos del Contino. Por otro lado, tenemos el vino 20 (nutrición orgánica 100%), en el que podemos destacar marcadores en boca como vegetal, químico y cierta astringencia, pero con una buena acidez, lo que indica que será un vino potente y perfectamente apto para su guarda. Por último hablar del vino 21 (sin nutrición), el cual tiene pocos marcadores referentes en la gráfica, si podemos mencionar alguno sería su duración y equilibrio en boca, con alguna nota de amargor.

- **ACP Retronasal:**

Ilustración 13. Análisis de Componentes Principales (ACP) de la fase retronasal de las diferentes muestras en función del tipo de nutrición.



La ilustración 13 representa el espacio factorial ACP de la fase retronasal en función del tipo de nutrición utilizada. Los vinos situados en la dimensión vectorial definida por estos dos factores (F1 y F2) representan el 100% de la variación total.

En este caso si tenemos que destacar algún vino, sería el 20 (nutrición orgánica 100%), con descriptores en retronasal de licoroso, madera y notas lácticas, de vino cálido y algo herbáceo. Por otro lado, el vino 19 (nutrición mixta orgánica-inorgánica) aparece como algo reducido, pero complejo y con ciertos recuerdos afrutados. Por último, en la gráfica únicamente aparece el descriptor de persistencia para describir el vino 21(testigo), que no es nada malo, pero comparándolo con los otros dos queda pobre sin ningún otro descriptor a su lado.

6.4. Determinación de compuestos volátiles mayoritarios y minoritarios en vino

Tabla 11. Aromas varietales

Ref. Laboratorio	Umbral	2017-05-643-01	2017-05-644-01	2017-05-645-01
Ref. Cliente	/	19	20	21
GRUPOS VARIETALES				
(*) Linalol	25	1,95	2,2	2,47
(*) β -Citronelol	100	5,44	4,26	6,87
(*) Geraniol	20	nd	nd	nd
(*) α -Terpeniol	250	0,75	0,68	0,83
(*) α -Ionona	2,6	nd	nd	nd
(*) β -Ionona	0,09	0,12	0,13	0,14
(*) β -Damascenona	0,05	3,27	2,94	3,33
(*) Nerol	400	nd	nd	nd
(*) Eucaliptol	1	nd	nd	nd
(*) Limoneno	200	0,57	0,52	0,54

(*) $\mu\text{g/L}$, nd: no detectado, Concentraciones superiores a los respectivos umbrales de olfacción

Tabla 12. Aromas prefermentativos

Ref. Laboratorio	Umbral	05-643-01	05-644-01	05-645-01
Ref. Cliente	/	19	20	21
GRUPOS PRE-FERMENTATIVOS				
1-Hexanol	8	2,11	2,26	1,99
(*) 3-Hexanol	90	nd	nd	nd
2-butanol	5	0,019	0,035	0,023
(*) Hexanal	10000	3,05	4,97	5,48
c-2-hexen-1-ol	0,4	0,005	0,005	0,006
c-3-hexen-1-ol	0,4	0,063	0,066	0,065
t-2-hexen-1-ol	0,4	nd	nd	nd
t-3-hexen-1-ol	0,4	0,044	0,049	0,045
(*) E-2-Hexenal	17	nd	nd	nd

(*) $\mu\text{g/L}$, nd: no detectado, Concentraciones superiores a los respectivos umbrales de olfacción

Tabla 13. Aromas fermentativos

Ref. Laboratorio	Umbral	2017-05-643-01	2017-05-644-01	2017-05-645-01
Ref. Cliente	/	19	20	21
GRUPOS FERMENTATIVOS				
Ácido propiónico	8,1	2,25	2,38	2,32
Ácido butírico	0,173	1,49	1,52	1,55
Ácido isobutírico	2,3	2,47	2,84	3,43
Ácido isovalérico	0,033	2,07	1,97	2,64
Ácido valérico	0,1	0,014	0,016	0,022
Ácido hexanoico	0,42	4,86	4,92	4,4
Ácido heptanoico	3	0,075	0,074	0,078
Ácido octanoico	0,5	2,87	2,7	2,94
Ácido decanoico	1	0,84	0,72	0,82
(*)etilfenilacetato	250	27,6	24,7	24,1
Acetato de hexilo	1,5	0,005	0,003	0,003
Succi. de dietilo	200	3,42	3,61	4,32
(*) Isovalerato de etilo	3	17,2	16,7	21,9
β-Feniletanol	14	nd	nd	nd
Alcohol bencílico	200	0,11	0,1	0,09
Acet. de isoamilo	0,03	0,34	0,28	0,29
Butirato de etilo	0,125	0,15	0,14	0,15
γ-Butirolactona	35	14,2	13,7	14,9
Decanoato de etilo	0,2	0,09	0,07	0,1
Hexanoa. de etilo	0,062	0,54	0,5	0,5
Lactato de etilo	154	86,2	82,9	87,1
Octanoa. de etilo	0,58	0,48	0,4	0,48
(*) Heptanoato de etilo	100	1,3	1,44	1,5
(*) Pelargonato de etilo	200	0,33	0,34	0,44
Dodecanoato de etilo	1,5	0,66	0,57	1,38
(*) Acet. de fenilo	100	nd	nd	nd
Piruvato de etilo	0,2	0,045	0,052	0,031
(*) 1-Pentanol	8000	50	52,6	49
(*) 1-Heptanol	1000	55,6	56,8	46
(*) 1-Octanol	120	97,2	100	106

(*) µg/L, nd: no detectado, Concentraciones superiores a los respectivos umbrales de olfacción

Tabla 14. Aromas de envejecimiento

Ref. Laboratorio	Umbral	05-643-01	05-644-01	05-645-01
Ref. Cliente	/	19	20	21
GRUPOS ENVEJECIMIENTO				
(*) Guayacol	9,5	13,2	15,2	11,4
(*) 4-Etilguayacol	33	10	2,68	28,7
(*) t-whiskylactona	790	18,8	29,6	33,4
(*) c-whiskylactona	67	316	366	280
(*) Eugenol	500	13,9	17,6	15,2
(*) 4-Etilfenol	450	28,8	3,38	48,1
(*) Benzaldehído	2000	1,91	1,94	1,81
(*) γ -nonalactona	30	28,8	20	21,7
(*) γ -decalactona	88	152	169	137
(*) γ -octalactona	400	nd	nd	nd
(*) γ -undecalactona	5000	373	371	379
(*) γ -dodecalactona	5000	10,9	10,5	8,91
(*) δ -decalactona	386	1,71	1,69	1,8
(*) Furfural	14000	2551	4630	2700
(*) 5-Metilfurfural	20000	3777	716	510
(*) Fenilacetaldehído	1	7,57	7,89	5,92
(*) 4-Vinilfenol	1500	191	110	104
(*) 4- Vinilguayacol	380	nd	nd	nd
(*) Etil-2-metil-butanoato	18,7	9,49	9,04	18,6

(*) $\mu\text{g/L}$, nd: no detectado, Concentraciones superiores a los respectivos umbrales de olfacción

6.5. Análisis estadístico mediante ACP de los compuestos aromáticos activos

Una vez presentados todos los compuestos aromáticos clasificados según sus grupos, se han elaborado análisis estadísticos multifactoriales empleando el software XLSTAT 2014 exponiéndose el resultado en modo de gráfica biplot. En este caso se han utilizado los compuestos cuyas concentraciones son superiores a los respectivos umbrales de olfacción, con valores representados por unidades olfativas superiores a la unidad.

Ilustración 14. Análisis de Componentes Principales (ACP) de la fase aromática (análisis laboratorio) de las diferentes muestras en función del tipo de nutrición

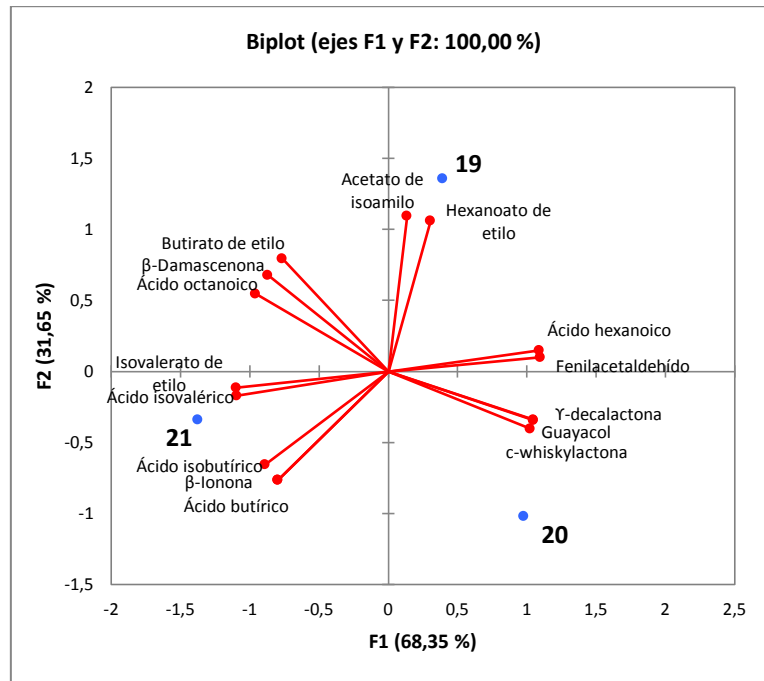
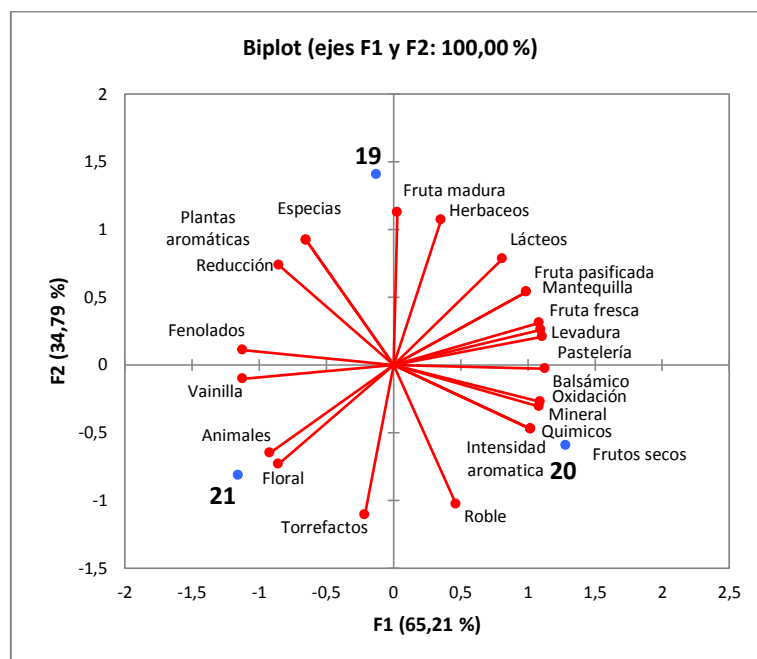


Ilustración 15. Análisis de Componentes Principales (ACP) de la fase aromática (análisis sensorial descriptivo) de las diferentes muestras en función del tipo de nutrición.



La ilustración 14 representa el espacio ACP de la fase aromática (análisis de aromas en laboratorio), de los vinos según el tipo de nutrición. Una vez más los vinos situados en la dimensión vectorial definida por los dos factores (F1 y F2) representa el 100% de la variación total, lo que indica que es muy fiable a nivel de la explicación de la varianza.

Como se indica en el título del epígrafe se trata de identificar si los descriptores utilizados en el análisis sensorial descriptivo coinciden con los identificados en el análisis de aromas llevado a cabo en Laboratorios Excell Ibérica.

En primer lugar para el vino 19, empezando por el acetato de isoamilo o el hexanoato de etilo, como bien se identificó en cata, serían los compuestos del descriptor fruta madura, lo que es bastante lógico al tratarse de ésteres de origen fermentativo. Por otro lado, el fenilacetaldehído con olor de plantas aromáticas, y por último destacar el ácido hexanoico con aromas herbáceos. Lo que coincide muy bien con los resultados expuestos arriba.

Siguiendo con el vino 20, los descriptores encontrados como roble aparecen en la analítica representados por *c*-wiskylactonas, y como químicos y de toques de oxidación, encontramos los identificados como γ -decalactona.

En el vino 21 los aromas florales vienen dados por la β -ionona. Los aromas fenolados o animales (que en el vino pueden provenir de una contaminación por parte de *brettanomyces*), están representados por el ácido isovalérico. Por último destacar los descriptores de vainilla y torrefactos, que van asociados a ácidos grasos como ácido isobutírico u octanoico entre otros.

7. Conclusiones.

La nutrición en enología es una práctica muy interesante y eficaz, como ha quedado demostrado en este trabajo según los resultados obtenidos.

En primer lugar, debido a lo que respecta a la cinética de fermentación en cuanto a sus buenos resultados. De ésta forma, los nutrientes son imprescindibles en ciertas situaciones, por ejemplo cuando la uva que entra en bodega en mal estado y con un contenido muy reducido en amonio y aminoácidos, en concentraciones inferiores a 120 mg/L, lo que puede traer consigo fermentaciones problemáticas, ralentizadas o paradas de fermentación y es por ello que en estos casos sería muy adecuado el suministro de nutrición orgánica (aminoácidos) para suplir esas deficiencias y con esto, ayudar a las propias levaduras a su multiplicación y a desarrollar un número adecuado y acorde al medio en el que se van a desarrollar.

En éste caso la uva llegó en condiciones extraordinarias de sanidad y composición química, con unos niveles de FAN en torno a 180 mg/L, por lo que en el caso del depósito testigo al que se le añade sulfosol (que contiene amonio y sulfuroso) a la entrada de la uva, no hubiera sido necesario, porque más que ayudar, puede perjudicaren el desarrollo excesivo de levaduras, creando competencia entre ellas.

Los tres depósitos han tenido una cinética de fermentación adecuada, únicamente depósito 21 (testigo) ha tenido un inicio más rápido con bajadas de densidad más repentinas al comienzo debido a la nutrición inorgánica. Al final de la fermentación los tres depósitos han acabado correctamente, quedando el depósito 21 un punto más de azúcar residual, con una densidad de 993,7 mg/L, debido a la competencia entre levaduras y la escasez de nutrientes. Los depósitos 19 y 20 no tienen ese aporte "innecesario" de amonio al inicio, por lo que no hay un desarrollo excesivo de levaduras y su densidad final ha sido de 992,5 y 992,4 respectivamente, con una población de levaduras adecuada. Estos, sin embargo, si tienen un aporte orgánico (aminoácidos) que ayudan a reducir la producción excesiva de compuestos no deseados en el vino (como el acetato de etilo, hexanol y sulfuros) y resaltan la expresión de compuestos aromáticos positivos.

Por otro lado respecto al análisis sensorial y en función de la nutrición realizada, podemos concluir que ha habido una perfecta conjunción entre los descriptores encontrados en el análisis sensorial descriptivo (cata) y el propio análisis de aromas realizado en el laboratorio, lo que quiere decir que los vinos han expuesto en cata los caracteres correspondientes a los compuestos que predominaban en ellos.

A modo de resumen se recuerda el perfil de cada vino en función de su nutrición:

- **Vino 19:** el cual tiene nutrición orgánica 100% al inicio y al 1/3 de fermentación lleva mezcla de nutrición orgánica-inorgánica, aparecen descriptores en la fase aromática como especias, fruta madura, algo de plantas, herbáceos o lácteos. En boca tiene una entrada dulce y grasa, acompañada de esa frescura duración y equilibrio.
- **Vino 20:** con nutrición orgánica 100% tanto al inicio como al 1/3 de fermentación, destacan en la fase aromática recuerdos minerales, frutos secos, químico y roble. En boca algo vegetal y astringente en su entrada, con una acidez marcada y cierto amargor.
- **Vino 21:** únicamente tiene como adición el porcentaje de amonio presente en el Sulfosol al inicio del proceso, sin tener ninguna otra adición nutritiva posteriormente. Este ha quedado clasificado como el vino más pobre en atributos positivos. Aun así, en nariz aparecen descriptores como vainilla, floral y algo de torrefactos junto con toques animales. En boca pocos descriptores aparecen cercanos a este, pero podría ser un vino con un buen equilibrio y larga duración, con algún toque de amargor.

Con la cata descriptiva realizada, el vino más puntuado y seleccionado como preferido ha sido el vino 19, con una nutrición orgánica al inicio y mix (orgánica-inorgánica) al 1/3 de fermentación. Además, en el cálculo de costes este no fue el depósito que más inversión económica necesitó en su elaboración, sino que fue el vino 20. Por lo que es muy interesante dicha nutrición para la obtención de vinos de calidad.

8. Bibliografía

1. -Referencia 1. <http://www.oenoblog.info/2011/09/como-obtener-el-maximo-potencial-en-un-vino-durante-la-fermentacion>.
2. -Referencia 2. Antonio Palacios, Laura Santiago, Anne O-Julien, Gianni Trioli, Laurent Dulau, Carlos Macías, Gloria Rasines, Paula Rodríguez., (2002) *“Los Micronutrientes en la Fermentación Alcohólica del Vino. Nutrientes convencionales frente a Nutrientes Orgánicos”*. Revista Tecnológica de Vino. Nº 7, paginas 43-47.
3. -Referencia 3. Cabanis J.-C., Flancy C., 1998. *Acides organiques, substances minérales, vitamines, lipides. Oenologie, fondements scientifiques et technologiques*. Coordonnateur Claude Flanzky, Ed. Lavoisier, Partie I, Chap.1, 4-39.
4. -Referencia 4. Monk P.R., Costello P.J., 1984. *Effect of ammonium phosphate and vitamin mixtures on yeast growth in preserved grape juice*. Food Techn. Australia, 36(1), 25-28.
5. -Referencia 5. Fernando Zamora. *“Fermentaciones difíciles; Influencia del metabolismo lipídico”* Unidad de Enología del CeRTA. Departamento de Bioquímica y Biotecnología. Facultad de Enología de Tarragona. Universidad Rovira i Virgili.
6. -Referencia 6. Kunkee R.E., (1991). Relationship between nitrogen content of must and sluggish fermentation. *Proceedings os the International Symposium of Nitrogen in Grapes and Wine*, 18-19 de Juny de 1991, Seattle, Washington. Davis CA: American Society for Enology and Viticulture, 148-155.
7. -Referencia 7. Fort F.M., (1997). *“Estudi de la influencia del coure i la diclofluanida sobre la cinètica fermentativa i el metabolisme de Saccharomyces cerevisiae.”* Tesi Doctoral, Facultat de Química, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona.
8. -Referencia 8. Laure F, Lafon-Lafourcade S. y Ribèreau-Gayon P., (1984). *Relation entre les difficultes de fermentation et certaines activites enzymatiques de la levure*. *Connaissance Vigne Vin*, 18, 4, 219-224.

9. -Referencia 9. <http://www.lallemandwine.com/wp-content/uploads/2017/02/WE8-ESP.pdf>
10. -Referencia 10. <http://www.interempresas.net/Vitivinicola/Articulos/137586-nutricion-organica-en-fermentacion-alcoholica-imprescindible-para-calidad-de-vinos.html>
11. -Referencia 11. http://www.enoreports.com/enoreports/pdf/lallemand_nov10.pdf
12. -Referencia 12. Dr. Sibylle Krieger, (2007). "*Necesidades nutricionales de la bacteria maloláctica*".
13. -Referencia 13. Remize, F., Y. Augagneur, M. Guilloux-Benatier, y J. Guzzo. 2004. Effect of nitrogen limitation and nature of feed upon *Oenococcus oeni* metabolism and extracellular protein production. J. Appl. Microbiol. Online publication date: 8 December 2004.
14. -Referencia 14. Lallemand Winemaking Update Number 2, 2004.
15. - Referencia 15. Pejin D., Razmovski R., 1996. "*Continuous cultivation of Saccharomyces cerevisiae at different biotin concentrations in nutrient media*". Journal Applied Bacteriology, 80, 53-55.