



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

## TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Caracterización organoléptica y química de vinos Pinot noir fermentados con levaduras autóctonas y levaduras secas activas

Autor/es

MARIA TERESA SANZ VALERO

Director/es

Zenaida Guadalupe Mínguez y M<sup>a</sup> BELEN AYESTARÁN ITURBE

Facultad

Facultad de Ciencia y Tecnología

Titulación

Grado en Enología

Departamento

AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

Curso académico

2019-20



***Caracterización organoléptica y química de vinos Pinot noir fermentados con levaduras autóctonas y levaduras secas activas***, de MARIA TERESA SANZ VALERO

(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 TECNOLOGIA

## TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Enología

*CARACTERIZACIÓN ORGANOLÉPTICA Y QUÍMICA  
DE VINOS PINOT NOIR FERMENTADOS CON  
LEVADURAS AUTÓCTONAS Y LEVADURAS SECAS  
ACTIVAS*

Alumno:

María Teresa Sanz Valero

Tutores:

M<sup>a</sup> Belén Ayestarán Iturbe

Zenaida Guadalupe Mínguez

Valladolid, julio 2020

## Índice de contenido

Índice de contenido.....	1
AGRADECIMIENTOS.....	4
RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	9
A.    Estados Unidos en el mundo vitivinícola.....	9
B.    California.....	9
Valle del Napa.....	10
Russian River, Valle de Sonoma.....	11
Pinot noir.....	12
C.    Microbiología enológica.....	12
Inicios de la microbiología enológica.....	12
Técnica de aislamiento de levaduras secas activas.....	13
Problemática en el uso de levaduras secas activas.....	14
D.    Compuestos fenólicos.....	15
OBJETIVOS.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
A.    Materia prima.....	18
B.    Recogida, transporte y procesado de la uva.....	19
C.    Vinificación y toma de muestras.....	20
Fermentación alcohólica.....	20
Fermentación maloláctica.....	22
Toma de muestras.....	23
D.    Análisis de los parámetros generales de mosto y vino.....	24
E.    Análisis microbiológico.....	25
F.    Análisis estadístico.....	26
G.    Análisis sensorial.....	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
A.    Analítica de parámetros enológicos generales en encubado.....	28
B.    Cinética de fermentación alcohólica.....	29
C.    Análisis de parámetros enológicos generales tras fermentación maloláctica..	31
D.    Intensidad colorante e índice de polifenoles totales de los vinos.....	32
E.    Estudio microbiológico durante la fermentación alcohólica.....	34

F.	Polifenoles monómeros de los vinos .....	36
G.	Análisis organoléptico de los vinos .....	38
CONCLUSIONES.....		43
BIBLIOGRAFÍA .....		45

## Índice de figuras y tablas

Tabla 1: Propiedades de la levadura Assmanhaussen .....	21
Tabla 2: Fechas de las diferentes adiciones realizadas durante maceración-fermentación alcohólica y antes de fermentación maloláctica .....	22
Tabla 3: Nomenclatura utilizada para hacer referencia a las muestras tras fermentación maloláctica.....	23
Tabla 4: Fecha de muestreo para análisis de parámetros enológicos generales .....	24
Tabla 5: Fecha de muestreo para análisis microbiológico .....	24
Tabla 6: Datos de los parámetros enológicos generales de los dos mostos tras encubado .....	28
Tabla 7: Datos obtenidos tras las analíticas de los parámetros enológicos generales tras fermentación maloláctica .....	31
Tabla 8: Índice de polifenoles totales de los vinos (media $\pm$ desviación estándar) .....	32
Tabla 9: Índice de color de los vinos (media $\pm$ desviación estándar) .....	33
Tabla 10: Tonalidad en muestras inoculada y sin inocular (media $\pm$ desviación estándar) .....	33
Tabla 11: Población microbiológica encontrada en las muestras recogidas de los mostos inoculado y espontáneo durante el inicio de la fermentación alcohólica.....	34
Tabla 12: Población microbiológica encontrada en las muestras recogidas de los mostos inoculado y espontáneo en la mitad de la fermentación alcohólica .....	34
Tabla 13: Población microbiológica encontrada en las muestras recogidas de los vinos inoculado y espontáneo en el final de la fermentación alcohólica .....	35
Figura 1: Vista aérea viñedo variedad Pinot noir en el valle de Russian river.....	18
Figura 2: Vista de una de las calles del viñedo de Pinot noir en Russian river .....	19
Figura 3: <b>A.</b> Vista externa de los depósitos de 1000kg utilizados para la fermentación alcohólica; <b>B.</b> vista interna de uno de los depósitos donde se realizó la fermentación alcohólica .....	20
Figura 4: Ficha de cata utilizada para el análisis sensorial de los vinos estudiados.....	27
Figura 5: Evolución de los azúcares en BRIX durante el proceso de fermentación alcohólica en los mostos inoculado y espontáneo .....	29
Figura 6: Evolución de la temperatura en $^{\circ}\text{C}$ durante el proceso de fermentación alcohólica en los mostos inoculado y espontáneo .....	30
Figura 7: Concentración de los compuestos fenólicos en los vinos después de la fermentación maloláctica. ....	37
Figura 8: Fase visual del análisis sensorial de los vinos inoculado.....	40
Figura 9: Fase olfativa del análisis sensorial de los vinos inoculado y sin inocular .....	40
Figura 10: Fase gustativa del análisis sensorial de los vinos.....	41
Figura 11: Retronasal del análisis sensorial de los vinos inoculado y sin inocular.....	41
Figura 12: Resultados de la evaluación sensorial hedónica de los vinos inoculado y sin inocular .....	42

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco su ayuda para la consecución de este trabajo de fin de grado a la bodega “Bell wine cellars” por facilitarme todos los datos necesarios, así como por delegar en mi todo el proceso de vinificación y toma de muestras.

A mis tutoras Zenaida Guadalupe y M<sup>a</sup> Belén Ayestarán por su disponibilidad y ayuda en todo momento.

A la universidad de la Rioja por adaptarse tras los nuevos acontecimientos sucedidos en el mundo.

A mi padre Ladis, a mi hermano Nicolás y a mi pareja Alain, por apoyarme y animarme durante todas las etapas del proceso.

## RESUMEN

En este trabajo se compara la elaboración de vinos de la variedad Pinot noir inoculados con levaduras secas activas con las mismas elaboraciones sin inocular. Los objetivos son comparar la cinética de la fermentación alcohólica en cada vinificación y evaluar la población microbiológica en tres etapas de esta. Por otro lado, se analiza la diferencia en los parámetros enológicos generales entre los vinos obtenidos, así como en los compuestos fenólicos de los vinos inoculado y sin inocular y, finalmente, se realiza una comparación organoléptica en los vinos mediante una cata descriptiva y hedónica.

La materia prima procedente de un viñedo de 8 años situado en el valle de Russian River (CA) se vinificó paralelamente creando dos lotes diferentes, uno se inoculó con la levadura del género *Saccharomyces cerevisiae* "Assmanhaussen" (Casa comercial: SCOTT LABORATORIES) y la otra se llevó a cabo mediante una vinificación espontánea.

Se tomaron muestras en tres etapas de la fermentación (inicio, mitad y final de fermentación) y se realizó un análisis microbiológico. Así mismo, se tomaron muestras en el encubado y después de fermentación maloláctica para evaluar diferentes parámetros enológicos. Por último, se analizaron los compuestos fenólicos, así como el índice de color y el índice de polifenoles totales y se llevó a cabo un análisis sensorial de los vinos finales.

Los resultados microbiológicos evidenciaron que la levadura encargada de llevar a cabo la vinificación en ambas muestras fue *Saccharomyces cerevisiae*. En relación con la cinética de fermentación, se observó una fermentación más lenta en el caso de la muestra inoculada. Por otro lado, los resultados obtenidos en los parámetros enológicos generales después del encubado (brix, pH, acidez total, ácidos tartárico y málico, potasio, glucosa-fructosa, amonio, Alpha amino nitrógeno y grado probable) y después de la fermentación maloláctica (SO<sub>2</sub>, pH, acidez total y volátil, % alcohol, ácido málico y glucosa+fructosa), no mostraron diferencias importantes. En cuanto a los compuestos fenólicos, se observaron diferencias importantes en la concentración de polifenoles totales, malvidinas, antocianos totales, antocianos monómeros y taninos, así como en el ácido caftarico y la quercetina, siendo en todos ellos superior en la muestra sin inocular, probablemente debido al mayor tiempo en maceración post-fermentativa. Por otro lado, la cantidad de catequina encontrada fue superior en la muestra inoculada, y el ácido gálico fue similar en ambas muestras. Por último, los resultados obtenidos tras el análisis sensorial ponen de manifiesto que los vinos obtenidos fueron similares en la fase visual y en la preferencia hedónica. Por otro lado, se observó un perfil similar en la fase olfativa, aunque varió la intensidad aromática. Las mayores diferencias se encontraron en la fase gustativa, caracterizándose como más equilibrado el vino sin inocular, y en fase retronasal, donde se definió el vino sin inocular con

mayor complejidad. En la cata hedónica, los catadores se decantaron por el vino inoculado.

Como perspectivas de futuro destaca la necesidad de repetir el estudio más años consecutivos y realizar una identificación de las levaduras durante fermentación alcohólica a nivel de cepa, imprescindible para saber si realmente la implantación de la levadura inoculada ha sido exitosa.

**Palabras clave:**

California, vino, Pinot Noir, polifenoles, levaduras, vinificación, análisis sensorial, inoculación, fermentación.

## ABSTRACT

This final project compares the vinification of wines of the Pinot noir variety inoculated with active dry yeasts to the same non-inoculated elaborations. The objectives are to compare the kinetics of alcoholic fermentation in each vinification and to evaluate the microbiological population in three stages of it. On the other hand, is analyzed the difference in the general oenological parameters between the wines obtained, as well as in the phenolic compounds of the inoculated and non-inoculated wines and, finally, an organoleptic comparison is made in the wines by descriptive and hedonic tasting

The raw material is from an 8-year-old vineyard located in the Russian River valley (CA). It was vinified in parallel creating two different lots, one was inoculated with the yeast of the genus *Saccharomyces cerevisiae* whose commercial name is "Assmanhausen" (Commercial house: SCOTT LABORATORIES) and in the other one was carried out a spontaneous vinification.

Samples were taken at three stages of fermentation (start, middle and end of fermentation) and was performed a microbiological analysis. Likewise, samples were taken in the grape vat and after malolactic fermentation to evaluate different oenological parameters. Finally, phenolic compounds were analyzed, as well as the color index and the total polyphenol index, and a sensory analysis of the final wines was carried out.

The microbiological results showed that the yeast who has carried out the vinification in both samples was *Sacchamoryces cerevisie*. About the fermentation kinetics, a slower fermentation was observed in the case of the inoculated sample. On the other hand, the results obtained in the general oenological parameters after grape vat (brix, pH, total acidity, tartaric and malic acids, potassium, glucose-fructose, ammonia, Alpha amino nitrogen and probable degree) and after malolactic fermentation (SO<sub>2</sub>, pH, total and volatile acidity,% alcohol, malic acid and glucose + fructose), did not show important differences. Regarding phenolic compounds, important differences were observed in the concentration of total polyphenols, malvidins, total anthocyanins, monomeric anthocyanins and tannins, as well as in kaftaric acid and quercetin, being in all of them higher in the sample without inoculation, probably due to the longer time in post-fermentation maceration. On the other hand, the amount of catechin found was higher in the inoculated sample, and the gallic acid was similar in both samples. Finally, the results obtained after the sensory analysis show that the wines obtained were similar in the visual phase and in the hedonic preference. Also, a similar profile was observed in the olfactory phase, although the aromatic intensity was different. The greatest differences were found in the gustatory phase, characterizing the wine without inoculation as more balanced,

and in the retronasal phase the non-inoculated wine was defined with greater complexity. In the hedonic tasting, the tasters opted for the inoculated wine.

As future prospects, there is necessary to repeat the study for more consecutive years and identify the yeasts during alcoholic fermentation at the strain level, essential to know if the implantation of the inoculated yeast has really been successful and, therefore, the results they would be conclusive and truthful.

**Key words**

California, wine, Pinot Noir, polyphenols, yeasts, winemaking, sensory analysis, inoculation, fermentation.

## INTRODUCCIÓN

La fase experimental del presente trabajo de fin de grado se ha realizado en la bodega “Bell Wine Cellars” situada en Yountville, en el corazón del Valle del Napa.

Este valle se sitúa en el centro-oeste del estado americano de California, zona vitícola conocida mundialmente por sus vinos y su gran innovación en cuanto al marketing vitivinícola.

El estudio fue propuesto debido a la nueva adquisición de viñedo en una zona no cultivada con anterioridad por la bodega, por lo que la microbiota autóctona era desconocida.

### A. Estados Unidos en el mundo vitivinícola

La gran extensión de terreno que abarcan los Estados Unidos de América conlleva una amplia variedad de suelos y microclimas, lo que ha permitido el desarrollo de una variedad de vinos muy elevada. Esto se traduce en que 45 de los 50 estados que conforman los Estados Unidos de América elaboran vino, aunque no en la misma proporción.

Se pueden distinguir cuatro regiones principales productoras de vino dentro del país, aunque en este trabajo nos hemos centrado tan solo en una de ellas, California. Estas regiones son:

- Estado de California
- Noroeste (Estados de Oregón y Washington)
- Noreste (Estado de Nueva York, Nueva Inglaterra, Nueva Jersey, Pennsylvania y Maryland)
- Sur y medio oeste

### B. California

La producción de vino data de hace más de 200 años. Este estado es famoso en el mundo de la enología ya que se emplean todas las técnicas posibles en cuanto a la viticultura y la vinificación. Así, podemos observar en cuanto a viticultura diferentes tipos de conducción de viñedo, diversas cubiertas vegetales y un amplio margen de densidad de plantación. Cabe destacar que la mayoría de los viñedos son cultivados por grandes empresas vitícolas y tan solo un pequeño porcentaje de la superficie pertenece a bodegas de elaboración.

En cuanto al campo de la enología, se observa un gran uso de productos enológicos (taninos, ácidos orgánicos, nutrientes orgánicos e inorgánicos, etc.), gran diversidad en cuanto al tamaño y edad de las barricas, así como con el tamaño y material de los depósitos.

En esta zona encontramos variedades tanto blancas como tintas. Entre las tintas destaca el Cabernet sauvignon como principal icono de los vinos californianos. Además, encontramos en auge el trabajo con Garnacha, Pinot noir, Petite verdot, Merlot, Cabernet franc, y sobre todo Syrah.

Por otro lado, las variedades blancas predominantes son el Sauvignon blanc y Chardonnay, acompañadas de variedades importadas de Europa como Riesling y Gewürztraminer, entre otras.

La amplia diversidad de variedades se debe, entre otros factores, al gran abanico de emplazamientos que se encuentran en este estado, repartidos en tres zonas climáticas principales:

- Zonas bajo la influencia del Océano Pacífico (costa oeste).
- Valle Central. Destaca por ser una zona de clima muy caluroso, donde variedades de ciclo largo consiguen madurar eficientemente, como la variedad Merlot.
- Cercanías de la Sierra Nevada (este). Destaca por ser una zona fresca donde se cultivan sobre todo variedades de ciclo corto, como Pinot noir.

Este trabajo se centra en los condados de Napa, incluido en la región Winkler IV y el de Sonoma en la región Winkler III, en la zona norte de la bahía de San Francisco y considerados el centro de la industria vinícola de calidad en Estados Unidos.

## **Valle del Napa**

El valle del Napa es una de las regiones vitícolas americanas más conocidas y de mayor prestigio a nivel mundial.

A diferencia de los países tradicionales, los cuales se basan en el “terroir”, es decir, en las diferencias que cada zona aporta a sus vinos por cultivarse en unas condiciones determinadas de microclima y suelo, y por las características personales que cada cultura ha ido aportando a sus vinos, en esta zona del nuevo mundo vitivinícola se produce un mayor interés por los aspectos técnicos del cultivo y de la vinificación.

A un área determinada de producción de vino, equivalente en Europa a una denominación de origen, en Estados Unidos se denomina AVA o “American Viticultural Area”. Así, la etiqueta de AVA del Valle del Napa tiene una delimitación

más política que física, cubriendo la mayor parte del condado de Napa, con una excepción en la zona noroeste, al otro lado del Lago Barryessa (Johnson, 1994).

Existen dos tipos de suelos en el Valle del Napa. Uno es franco con gravas, con un drenaje muy favorable y una buena capacidad de calentamiento, y que se encuentra en las partes bajas de las colinas, a lo largo de la periferia del valle. El segundo tipo de suelo es un suelo de tipo aluvial, con mayor contenido en arcilla, peor drenado y más fértil.

El clima no es uniforme en todo el valle, las montañas lo protegen en verano del extremo calor del Gran Valle Central y la influencia del océano Pacífico proporciona una brisa marina que a menudo llega a las zonas más bajas del condado.

Las precipitaciones, por otro lado, ocurren sobre todo entre noviembre y abril, siendo las precipitaciones anuales entre 500 y 1400mm (Yuste, 2000)

### **Russian River, Valle de Sonoma**

Russian River es un Área Vitícola Americana (AVA) en el condado de Sonoma, California. Presenta alrededor de una sexta parte del total del viñedo plantado en el Condado de Sonoma

Esta área es característica por su viticultura de alta calidad, otorgando a los vinos un aumento de prestigio y de precio.

El clima del valle de Russian River está determinado por la influencia del océano pacífico, el cual aporta frescor, favoreciendo la correcta maduración de variedades de ciclo corto, como lo es el Pinot noir. Se produce un aumento de la síntesis del ácido málico y la relación glucosa fructosa disminuye, ya que se sintetiza mayor cantidad de fructosa.

Así mismo la inversión térmica entre el día y la noche, hacen que aumente la síntesis de antocianos (Riberau-Gayón y col., 2003), es decir, se produce un aumento de color (interesante en la variedad Pinot noir).

El suelo es arcillo calcáreo, formado a partir del choque de las placas tectónicas de América del norte y el Pacífico hace millones de años. La arcilla es la partícula más pequeña de las tres que podemos encontrar en el suelo (arena, limo y arcilla) y es la única que tiene carga, siendo esta negativa.

Esta característica es buena porque todos los nutrientes excepto el fósforo tienen carga positiva, por lo que el suelo los va a retener. El problema que encontramos es que, al ser una partícula tan pequeña, se compacta mucho y retiene mucho el agua, por lo que los nutrientes no estarían disponibles para la planta, Este hecho se amortigua al ser también calcáreo, ya que la caliza son partículas muy grandes que aportan porosidad, disminuyendo la densidad y aportando drenaje al suelo.

## **Pinot noir**

La variedad Pinot Noir tiene origen en la Borgoña francesa, aunque está adaptada hoy en día a distintas regiones vitícolas de todo el mundo, sobre todo frías.

Esta variedad se caracteriza por dar vinos de color claro, cuerpo medio y bajo contenido tánico, debido a su fina piel y a sus bajos niveles de compuestos fenólicos.

Es una variedad de ciclo corto, siendo muy sensible a las temperaturas excesivas en verano que solean sus racimos y hace que pierda pronto sus hojas no consiguiendo la madurez óptima (Haeger, 2004).

El clon Pommard fue seleccionado por la Universidad de Davis. Su origen es europeo y se produjo un corte directo de un viñedo perteneciente al Chateau de Pommard en Francia. Se comenzó a plantar en el condado de Monterey en la década de 1970, y años más tarde se extendió por la costa oeste americana, destacando su cultivo en el Valle de Russian River. Este clon se caracteriza por tener mayor cantidad de color, dando vinos especiados y produciendo sensaciones táctiles más llamativas en boca (mayor síntesis de compuestos fenólicos) (Haeger, 2004).

## **C. Microbiología enológica**

### **Inicios de la microbiología enológica**

El vino tuvo mucho que ver con el nacimiento de la microbiología como disciplina científica, ya que fue estudiando el vino como el químico francés, Louis Pasteur, demostró la existencia de las levaduras y su protagonismo en dicho proceso.

Lo describió en 1857 en su famoso estudio “Mémoire sur la fermentation alcoolique” (Barnett, 2000). A partir de aquí elaboró la teoría del origen microbiano de las enfermedades infecciosas, suponiendo un gran avance sobre todo en medicina ya que se comenzó a comprender como actuaban los microorganismos patógenos que causaban gran cantidad de estas enfermedades.

Como bien es sabido hoy en día, en los caracteres organolépticos de un vino influyen factores edáficos, botánicos y climatológicos, así como la diversidad de levaduras que intervienen en la fermentación espontánea de los mostos. Por lo que es interesante seleccionar en cada caso la mejor levadura autóctona si se quieren realizar vinificaciones controladas.

Tras esta premisa, se comenzó a estudiar la posibilidad de aislar las levaduras existentes en diferentes zonas y seleccionar aquellas que actuaran de forma más adecuada al tipo de vino esperado o buscado.

## Técnica de aislamiento de levaduras secas activas

Como primera etapa del estudio se procede al aislamiento en cultivo puro de una población representativa de levaduras de un viñedo (suelo o capa de pruina en las bayas), de una fermentación espontánea, o de la población de la propia bodega debido a vinificaciones anteriores.

Posteriormente se identifican las levaduras mediante técnicas moleculares basadas en el estudio de distintas zonas de su ADN. Para la identificación molecular se utilizan dos técnicas: análisis de los patrones de restricción del ADN mitocondrial y amplificación de las secuencias delta, que permiten la clasificación de *S. cerevisiae* a nivel de cepa. Los aislados se agrupan de acuerdo con los resultados obtenidos por ambos métodos (Pujol, 2016).

El estudio se debe llevar a cabo varios años consecutivos con el fin de obtener una representación óptima de la biodiversidad de levaduras. En algunos casos, hay cepas que se repiten como mayoritarias en todos los años y en otros la variabilidad de población es muy elevada, pero siempre hay alguna/as que destacan por ser las más abundantes. Son éstas las que se seleccionan y conservan en colección para realizar pruebas de potencial enológico a nivel de laboratorio y posteriormente a escala experimental industrial en la propia bodega (Pujol, 2016).

Las primeras levaduras seleccionadas para uso enológico fueron comercializadas a principio del siglo XX, alcanzando en los años sesenta un importante desarrollo debido a la fabricación industrial de levaduras de panadería, bajo la forma de masa fresca y prensada. Su contenido de agua era elevado por lo que su conservación era limitada.

Más adelante, en la década de 1970, apareció la técnica de secado, surgiendo entonces lo que hoy conocemos como levaduras secas activas (LSC).

La técnica de fabricación de las levaduras secas activas se basa en las siguientes etapas: la primera es la preparación de materias primas, donde por una parte se multiplican en el laboratorio en volúmenes cada vez mayores las levaduras seleccionadas y por otra parte se prepara un medio de cultivo rico en azúcares, diluyendo las mismas en agua, acidificándola con ácido sulfúrico y añadiendo nutrientes o factores de crecimiento como minerales, nitrógeno amoniacal, tiamina... En ocasiones esta multiplicación se hace en presencia de anhídrido sulfuroso con objeto de que las levaduras se acomoden a esta sustancia, para que una vez rehidratadas se utilicen en la inoculación de mostos o vendimias sulfitadas (Hidalgo, 2003).

Se mezcla el mosto estéril con las levaduras multiplicadas y comienza la segunda fase de obtención de biomasa, aireando en continuo para favorecer la multiplicación de las levaduras en detrimento de la fermentación alcohólica, que en un periodo de 25-30 horas llega a su máxima población. El control de las condiciones de

multiplicación debe ser muy riguroso para obtener un producto de la mejor calidad posible, utilizando un volumen de aire estéril de 15 a 20m<sup>3</sup> por kg de levadura seca.

A continuación, en tercer lugar, la biomasa se separa del líquido mediante centrifugación, obteniéndose una solución concentrada de levaduras, que después de sucesivos lavados con agua pura, se reduce su humedad mediante filtros de prensa o rotativos a vacío, hasta llegar a contener un 30% de agua, conservándose esta masa a una temperatura de 2-3 °C.

La cuarta fase consiste en pasar la biomasa bajo presión a través de una matriz, donde por extrusión se conforma en forma de pequeños gránulos cilíndricos, siendo éstos a continuación secados por aire caliente, obteniendo un producto de 6 a 8% de humedad.

Por último, las levaduras secas fabricadas se envasan al vacío o en atmósfera inerte dentro de recipientes herméticos y se conservan a temperaturas bajas para su comercialización.

### **Problemática en el uso de levaduras secas activas**

En la elaboración de los vinos, una etapa fundamental es la fermentación alcohólica (FOH) la cual es una conversión bioquímica de los azúcares en etanol por acción de las levaduras (Barnett, 2000).

Tradicionalmente la elaboración de vinos se ha realizado a partir de fermentaciones de los mostos llevadas a cabo por cepas de levaduras endémicas residentes en las superficies de las uvas y en los equipos de las bodegas. La fermentación con levaduras autóctonas, llamada fermentación espontánea, es de gran interés ya que con ella se consiguen características organolépticas típicas de la zona. Sin embargo, la calidad del producto puede ser muy variable de un año a otro. Para evitar esta variabilidad, a finales de los años 50 se empezaron a utilizar inóculos de cultivos puros de levaduras secas activas de *S. cerevisiae* (ACE enología).

La selección y uso de levaduras seleccionadas de una zona vitícola, bodega o vinificación, puede ser un importante instrumento para mejorar las calidades sensoriales de un vino producido con variedades de esa zona. De hecho, estas levaduras indígenas son los microorganismos mejor adaptados a las características de la uva y del mosto de donde se han aislado y, por lo tanto, pueden ser capaces de exaltar las peculiaridades (aromas, estructura, color...) de un vino (Pujol, 2016)

Pero existen muchos casos en los que esta población indígena no es lo suficientemente viable como para llevar a cabo fermentaciones seguras, es decir, no se asegura la completa fermentación de los azúcares. Esto puede ser causado por el excesivo tratamiento con productos fitosanitarios del viñedo o por las características

propias del mismo (como lluvias, etc.). Ante este problema, muchas bodegas también han decidido el uso de levaduras secas activas (Hidalgo, 2003).

No obstante, a pesar de las ventajas que a priori tiene esta práctica, existe cierta reticencia a su utilización sistemática debido principalmente a que las cepas de levaduras que actualmente se comercializan son foráneas y además ampliamente usadas por muchas bodegas, lo que conlleva a una uniformización de la flora fermentativa en las distintas zonas productoras y a una pérdida de singularidad de los vinos.

## D. COMPUESTOS FENÓLICOS

En la uva encontramos gran cantidad de compuestos que contienen en su estructura grupos fenoles reactivos. Estos compuestos, se extraen durante la maceración (contacto mosto-hollejos) pasando al vino y aportándole unas determinadas características organolépticas (color, flavor, retrogusto, persistencia y cuerpo).

Químicamente, los compuestos fenólicos están formados por un anillo bencénico con uno o varios grupos hidroxilo, distinguiéndose dos grupos: fenoles flavonoides (esqueleto 2-fenil benzopirona) y fenoles no flavonoides (ácidos fenólicos)

Los compuestos flavonoides se localizan en la piel, semillas y el raspón de la uva, mientras que los no flavonoides los podemos encontrar también en la pulpa.

Los fenoles no flavonoides son ácidos fenólicos de dos tipos, ácidos benzóicos y ácidos cinámicos. Los ácidos benzóicos en vino se encuentran mayoritariamente en forma de ácido gálico, siríngico y p-hidroxicinámico, formando el ácido gálico junto a su dímero el ácido elágico, parte de los taninos hidrolizables, aportados por la madera durante la crianza.

Por otro lado, los ácidos cinámicos se encuentran mayoritariamente en la pulpa y pueden presentarse tanto de forma libre como esterificados con ácido tartárico y otros componentes del vino. Normalmente, la forma más usual en la uva es tomando formas de ésteres tartáricos. Entre estos compuestos encontramos el ácido caféico y su éster tartárico, siendo ambos los principales sustratos susceptibles a la oxidación en mostos por rutas enzimáticas. No afectan al color ni al sabor de manera directa, pero participan en la estabilización del color y su degradación da lugar a fenoles volátiles, causantes de posibles defectos en la fase olfativa (Zamora, 2003)

Así mismo, los fenoles flavonoides que encontramos en el vino tinto, abarcan los flavonoles, antocianos y flavanoles. Estos últimos incluyen los taninos condensados o proantocianidinas.

Los flavonoles son compuestos de color amarillo localizados en la piel de la uva en forma heterosídica (Adams, 2006). Son fácilmente extraíbles durante la vinificación, aunque cabe destacar que su disolución se ve favorecida en presencia de alcohol como solvente. Poseen un sabor amargo y un poder de copigmentación alto (Boulton, 2001; Schwarz y col., 2001) pudiendo formar parte en las reacciones de polimerización de los fenoles (Price y col., 1995). Los más usuales con la quercetina, kaempferol, miricetina y la isoramnetina.

Los antocianos o antocianinas son productos secundarios derivados de las rutas metabólicas llevadas a cabo por las plantas (Guadalupe, 2008). Se almacenan en las células del hollejo durante la maduración de las uvas tinta, siendo los responsables del color rojo azulado de su piel y de los vinos, a los que pasa mediante maceración. Estructuralmente se trata de heterósidos formados por la unión de un aglicon (no azúcar) la antocianidina, y de un azúcar, generalmente la glucosa. En variedades de *Vitis vinífera* los principales compuestos de esta familia encontrados son la malvidina, petunidina, y cianidina, siendo la más importante en cantidad la malvidina, considerándose la principal responsable del color de los vinos tintos.

Por otro lado, los flavanoles son compuestos muy importantes en cuanto a las características organolépticas que aportan a los vinos tintos. En la uva se encuentran como monómeros (catequina) o en otras formas con distinto nivel de polimerización (taninos condensados, procianidinas o proantocianidinas)

Los taninos hacen referencia a una amplia diversidad de compuestos fenólicos, aunque principalmente de dos tipos: proantocianidinas, procedentes de la uva; y taninos hidrolizables, procedentes de la crianza en madera (Cheynier y col).

Las procianidinas se caracterizan por ser responsables además de la astringencia, sabor amargo, cuerpo y estructura de los vinos tintos, de la tonalidad amarilla que aportan al color. Destaca que, mediante su combinación con los antocianos, influye en la estabilidad del color en vinos tintos criados en barrica (Vidal y col, 2002; Zamora, 2003). Así mismo, durante la vinificación y crianza, las proantocianidinas sufren diferentes reacciones de polimerización que afectan al nivel de astringencia y a la estabilidad del color del vino.

El grado de extracción de los diferentes compuestos fenólicos definirá en primer lugar el color durante la vinificación y su posterior evolución. Así mismo, determinará la astringencia o cuerpo del vino y su potencial de envejecimiento.

Los antocianos monómeros son los compuestos primarios responsables del color del vino tinto. Este color, depende sobre todo de los valores de pH y temperatura que tenga el vino. El color de los antocianos mantiene un equilibrio dependiente del pH (Brouillards y col., 1978). Con valores de pH típicos de vinos tintos (3,5-4,1) se encuentra un equilibrio entre las formas rojas, incoloras y azules de estos pigmentos. Además, la estabilidad de los antocianos depende de la temperatura, su propia estructura y la posible presencia de moléculas con las que podría combinarse.

## OBJETIVOS

Los principales objetivos de este trabajo de fin de grado son los siguientes:

- Llevar a cabo la vinificación con uva tinta de variedad Pinot noir. Se realizará una vinificación inoculada con levaduras secas activa y otra sin inocular.
- Comparar la cinética de la fermentación en cada vinificación.
- Evaluar la población microbiológica en tres etapas de la fermentación alcohólica.
- Comparar los parámetros enológicos generales entre los vinos obtenidos.
- Caracterizar fenólicamente los vinos inoculado y sin inocular.
- Comparar organolépticamente los vinos mediante una cata descriptiva y hedónica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Materia prima

El viñedo escogido para el estudio se trata de un viñedo de nueva adquisición por parte de la bodega Bell Wine Cellars, por lo que su microbiota autóctona es desconocida. Este viñedo se encuentra en el valle de Russian River, valle caracterizado por un clima frío influenciado por el océano Pacífico (Figura 1).

Se trata de un viñedo conducido en espaldera clásica con marco de plantación 1\*2,5 m, con riego por goteo y poda guyot (Figura 2).

Debido a la alta humedad ambiental y al riego por goteo, cabe destacar que este viñedo no llega a realizar una parada de crecimiento completa, así, en los meses de diciembre-enero, se observan pámpanos verdes en crecimiento. Este hecho nos indica también que la maduración será menos intensa debido a un agostamiento incorrecto.

Se trata de un viñedo plantado con la variedad Pinot noir, clon Pommard de 8 años.



Figura 1: Vista aérea viñedo variedad Pinot noir en el valle de Russian river



*Figura 2: Vista de una de las calles del viñedo de Pinot noir en Russian river*

## **B. Recogida, transporte y procesado de la uva**

La vendimia de Pinot noir se realizó a mano la madrugada del día 17 de septiembre del año 2019 en palots de 500kg (Figura 3A). Se procesaron 3,5 toneladas.

Cada palot fue volcado sobre la tolva de una cinta de selección manual (Figura 3B), donde tres operarios separaron los racimos en mal estado, aunque cabe destacar que el estado sanitario de la uva era óptimo.

Tras la cinta de selección, los racimos pasaron por una despalladora y la pasta resultante se llevó a 5 depósitos plásticos de 1000 kg mediante bomba peristáltica de vendimia. La totalidad de la vendimia se repartió equitativamente en cada depósito, siendo su contenido unitario de 0,7 toneladas.

En la bomba de vendimia se añadió la enzima pectolítica “Zym color” (Casa comercial: ENARTIS) a razón de 20g/tonelada. Esta enzima pectolítica posee gran cantidad de actividades secundarias que, al actuar en sinergia, aceleran e intensifican el proceso de extracción de los aromas varietales y sustancias polifenólicas, en particular antocianos y taninos, presentes en el hollejo de la uva.

También se añadió sulfuroso en formato “Winy” (Casa comercial: ENARTIS) disuelto en agua a razón de 30g/tonelada. Se trata de E224 metabisulfito de potasio.



*Figura 3: A. Vista externa de los depósitos de 1000kg utilizados para la fermentación alcohólica; B. vista interna de uno de los depósitos donde se realizó la fermentación alcohólica*

Cada depósito se mantuvo 3 días conservado con hielo seco (dióxido de carbono en estado sólido) para la realización de maceración prefermentativa. La cantidad adicionada fue de 0,5kg en cada depósito una vez al día.

### **C. Vinificación y toma de muestras**

#### **Fermentación alcohólica**

En este estudio se utilizaron 5 depósitos, de los cuales dos de ellos no se inocularon para que realizaran una fermentación espontánea. Los otros 3 depósitos se inocularon con la levadura “Assmanhausen” (Casa comercial: SCOTT LABORATORIES), típica de vinos Pinot Noir alemanes, a razón de 12,4 g/hL. Esta

levadura es una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que posee las características descritas en la Tabla 1.

Tabla 1: Propiedades de la levadura *Assmanhaussen*

<b>TOLERANCIA AL ALCOHOL</b>	<b>15%</b>
<b>FACTOR COMPETITIVO</b>	Sensible
<b>VELOCIDAD DE FERMENTACION</b>	Lenta
<b>COMPATIBILIDAD MALOLACTICA</b>	Buena
<b>TEMPERATURA MAXIMA</b>	30°C
<b>TEMPERATURA MINIMA</b>	20°C
<b>DEMANDA DE NUTRIENTES</b>	bajo

Así mismo, esta levadura mejora los olores especiados y frutales mientras aporta complejidad y favorece la extracción de color.

El día 21 de septiembre, se llevó a cabo la inoculación de los depósitos elegidos, se adicionaron en los tres depósitos inoculados nutrientes en el formato “Goferm” (Casa comercial: ENARTIS) a razón de 12,4g/hL, y tanto en los 3 inoculados, como en los 2 sin inocular, se adiciono ácido tartárico a razón de 0,25g/L. “Goferm” es un micronutriente natural de levadura. En los depósitos inoculados se adicionaron 13L de agua por depósito para intentar bajar los brix a 24.

Los días posteriores se realizaron 2 bazuqueos diarios a los depósitos inoculados, mientras se mantenían los depósitos sin inocular con hielo seco esperando a que comenzaran a fermentar y así evitando posibles contaminaciones bacterianas.

El día 22 de septiembre, se adicionaron nutrientes en formato “Nutriferm advance” (Casa comercial: ENARTIS) a razón de 100 g en cada depósito, en los depósitos inoculados.

Así mismo, el día 22 de septiembre, se observó la primera subida de temperatura y leve bajada de azúcares en los depósitos no inoculados, por lo que la fermentación alcohólica había comenzado.

El día 24 de septiembre se adiciono de nuevo “Nutriferm advance” en los depósitos no inoculados a razón de 100g en cada depósito, y el día 26 de septiembre se añadió “Nutriferm no stop” (Casa comercial: ENARTIS) a razón de 60g por depósito en todos los depósitos. “Nutriferm no stop” es un complejo seleccionado por su alta concentración en ácidos grasos insaturados de cadena larga, esteroides, micronutrientes y vitaminas esenciales que aumentan la viabilidad fermentativa de las levaduras.

Durante la fermentación, se realizaron dos bazuqueos manuales diarios, desinfectando el bazuqueador al cambiar de vino, buscando así evitar la contaminación microbiológica entre depósitos.

La duración de la fermentación alcohólica en el mosto inoculado fue de 12 días, por otro lado, la duración en el mosto sin inocular fue de 5 días. No se realizó enfriamiento o calentamiento del mosto en ninguna fase de la fermentación, tan solo se controló la evolución de esta cada día durante FOH.

El fin de la fermentación alcohólica se determinó teniendo en cuenta los brix analizados, a su vez, se realizó un análisis complementario llevado a cabo por la empresa “My enologist” para asegurar que la cantidad de glucosa-fructosa era la correcta. Para esta analítica utilizaron la tecnología de infrarrojos FOSS WineScan™.

El 2 de octubre, se drenaron todos los depósitos, separando en 3 barricas nuevas de Francois Ferrer el vino yema fermentado espontáneamente, y en 4 barricas nuevas de Francois Ferrer el vino yema fermentado con levaduras inoculadas. El vino prensa de ambos se separó, creándose otro lote que queda fuera del estudio.

A fecha de 6 de octubre, se adiciono tanino en formato “Tan max nature” (Casa comercial: ENARTIS) a razón de 6,8g/barrica en ambos vinos, ya que se apreciaron aromas herbáceos. Este producto, es una mezcla de taninos condensados y elágicos estudiada para incrementar la limpieza y la complejidad olfativa de los vinos blancos y tintos. En particular, atenúa las notas herbáceas y de reducción, acentuando al mismo tiempo los aromas frutales y florales típicos de los vinos jóvenes

En la Tabla 2 se presenta las diferentes adiciones realizadas durante la maceración-fermentación alcohólica.

*Tabla 2: Fechas de las diferentes adiciones realizadas durante maceración-fermentación alcohólica y antes de fermentación maloláctica*

FECHA		ADICIONES
INOCULADO FOH	ESPONTANEO FOH	
21 de septiembre de 2019	<b>21 de septiembre de 2019</b>	Ácido tartárico
21 de septiembre de 2019	<b>21 de septiembre de 2019</b>	agua
21 de septiembre de 2019	-	Inoculación
21 de septiembre de 2019	21 de septiembre de 2019	Goferm
22 de septiembre de 2019	24 de septiembre de 2019	Nutriferm advance
26 de septiembre de 2019	26 de septiembre de 2019	Nutriferm no stop
6 octubre de 2019	6 octubre de 2019	Tan max nature

## **Fermentación maloláctica**

El día 17 de octubre se inocularon las 7 barricas de ambos vinos con bacterias lácticas “ML Silver” (Casa comercial: ENARTIS) en dosis 5g/barrica, añadiendo también nutrientes en formato “Nutriferm osmobacti” (Casa comercial: ENARTIS) a razón de 50g/barrica.

Enartis ML silver es una cepa de *Oenococcus Oeni* aislada en la región de Sonoma en California. Ha sido seleccionada por el departamento de investigación de

Enartis entre cientos cepas de diferentes vinos provenientes de todo el mundo. Destaca por su gran capacidad para llevar a cabo la fermentación maloláctica en vinos con alto contenido de alcohol o con pH bajo y funciona con la misma eficacia en vinos tintos y blancos. Así mismo produce un aroma limpio y afrutado y tiene la capacidad especial de reducir el característico aroma vegetal presente en algunos vinos.

Por otro lado, Enartis nutriferm osmobacti, mejora la tasa de supervivencia de las bacterias seleccionadas en el momento de la inoculación en el vino, promoviendo una fermentación maloláctica rápida y completa. Su composición es rica en polisacáridos parietales, aminoácidos, cofactores y vitaminas, también aumenta la disponibilidad de nutrientes en el vino y pone a las bacterias seleccionadas en condiciones de dominar a la flora indígena.

Tras la finalización de la fermentación maloláctica, determinada tras una analítica mediante el método enzimático para el análisis de ácido málico, el 25 de noviembre se realizó un trasiego desde las barricas a dos depósitos, homogeneizando cada lote por separado. La fermentación maloláctica tuvo una duración de 38 días aproximadamente.

Tras 24h, se volvieron a llenar las barricas, limpias y desinfectadas, con los vinos de cada lote y se sulfitaron a razón de 40ppm (40mg/L).

## Toma de muestras

En la toma de muestras diferenciamos dos tipos de muestras, las tomadas para el análisis de los parámetros enológicos generales y las recogidas para el análisis microbiológico.

Las muestras para las analíticas de los parámetros enológicos generales se tomaron al día siguiente del encubado y una vez finalizada la fermentación maloláctica.

El día siguiente al encubado se tomó una muestra de cada depósito, siendo los resultados de estas analíticas determinantes para el establecimiento de los dos lotes que se iban a estudiar, buscando la mayor homogeneidad posible.

Las muestras fueron etiquetados de la siguiente manera (Tabla 3).

*Tabla 3: Nomenclatura utilizada para hacer referencia a las muestras tras fermentación maloláctica*

Muestras	Nomenclatura
1- Espontáneo FOH	1-Esp
2- Espontáneo FOH	2-Esp
1- Inoculado FOH	1-Ino
2- Inoculado FOH	2-Ino
3- Inoculado FOH	3-Ino

Tras la fermentación maloláctica se tomó una muestra representativa de cada lote, para ello se tomaron muestras simples de cada barrica, que posteriormente se mezclaron y homogeneizaron. En la tabla 4 se presenta la nomenclatura de las muestras de vino tras la fermentación maloláctica:

Las muestras recogidas para el análisis microbiológico se recogieron en tres puntos de la fermentación alcohólica (Tabla 5). La primera fue recogida al inicio, se determinó la fecha de recogida en cada lote teniendo en cuenta la temperatura de la pasta y la bajada de azúcares leve (23 brix) de la misma.

Estas muestras se tomaron intentando que fuesen lo más representativas posibles, mezclando alícuotas de cada uno de los depósitos separados por lote. Estas muestras se etiquetaron y se congelaron a una temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$ .

La segunda toma de muestra se llevó a cabo con el mismo procedimiento que la primera, pero la fecha se determinó teniendo en cuenta tan solo la cantidad de azúcares, se buscó aquella fecha en la cual los azúcares se hubiesen reducido aproximadamente a la mitad (12 brix) y también se congelaron.

Por último, la tercera toma de muestra se recogió manteniendo el procedimiento, pero esta vez se estableció la fecha de recogida una vez los azúcares se habían consumido completamente (-0,5 brix).

*Tabla 4: Fecha de muestreo para análisis de parámetros enológicos generales*

FECHA	MUESTRA
19 de septiembre de 2019	ENCUBADO
26 de noviembre de 2019	FIN DE FML

*Tabla 5: Fecha de muestreo para análisis microbiológico*

FECHA		MUESTRA
INOCULADO	SIN INOCULAR	
22 de septiembre de 2019	22 de septiembre de 2019	INICIO DE FOH
25 de septiembre de 2019	27 de septiembre de 2019	MITAD DE FOH
2 de octubre de 2019	29 de septiembre de 2019	FIN DE FOH

#### **D. Análisis de los parámetros generales de mosto y vino**

Las muestras recogidas tras el encubado fueron analizadas por el laboratorio "MyEnologist" situado en Napa, Ca. Para ello utilizaron la tecnología de infrarrojos FOSS WineScan™. Se analizaron los grados brix (azúcar), acidez total (g/L), ácido tartárico (g/L) ácido málico (g/L) pH, potasio (mg/L), glu+fru (g/L), amonio (mg/L) y alpha amino nitrógeno (mg/L).

Por otro lado, tras la fermentación maloláctica se llevaron a cabo dos tipos de analíticas, unas realizadas en el laboratorio de la bodega (índice de color e índice de polifenoles totales) y otras realizadas por el laboratorio ETS, situado en Santa Helena, Ca.

Para analizar la intensidad colorante (IC) y el índice de polifenoles totales (IPT) de los vinos se utilizó el método de la OIV (Larousse, 1994) en el laboratorio de la bodega Bell Wine Cellars. Los análisis se hicieron con un espectrofotómetro CARY 300 Scan UV-VIS y cubetas de cuarzo de 1 cm y de 2mm de longitud de paso.

Por otro lado, el resto de las analíticas fueron realizadas por el laboratorio ETS. Este laboratorio utiliza instrumentos GC/MS (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas) y UHPLC “**triple quad**” (columna de cromatografía líquida) para las analíticas de compuestos fenólicos y tecnología de infrarrojos FOSS WineScan™ para el SO<sub>2</sub> libre (mg/L), pH, Acidez total, Acidez volátil, Alcohol (%), Ac. Málico (g/L), Glu+Fru (g/L).

## E. Análisis microbiológico

El análisis microbiológico de las muestras se llevó a cabo en el laboratorio de Biomakers, situado en Sacramento, Ca.

Para ello, utilizaron la tecnología de secuenciación seleccionando los genes marcadores 16S e ITS. La secuenciación se lleva a cabo con la tecnología MiSeq de Illumina, y los datos en bruto se analizan más a fondo con el pipeline® de Biome Makers. Los análisis se realizaron utilizando la plataforma BiomeMakers® (número de publicación de patente: WO2017096385, Biome Makers).

El DNA se purificó utilizando el kit DNeasy Powerlyzer Powersoil (Qiagen).

Las regiones 16S e ITS se amplificaron usando cebadores personalizados BiomeMakers® (patente WO2017096385).

Se generó un promedio de 150.000 lecturas por muestra utilizando una secuencia de pares de 2x300bp con una plataforma Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.).

Se usó una tubería bioinformática personalizada (patente WO2017096385, Biome Makers) para eliminar adaptadores y quimeras.

Después de eso, las lecturas se recortaron y los grupos OTU se realizaron con una identidad del 97%.

La asignación de la taxonomía y la estimación de la abundancia se obtuvo comparando grupos de Unidades de Taxonomía Operacional (OTU) obtenidos con la base de datos de la taxonomía BiomeMakers® (Patente WO2017096385)

Con esta técnica se obtiene una clasificación a nivel de especie, no evaluándose la cepa, por lo que no fue posible llevar a cabo un análisis de implantación.

## **F. Análisis estadístico**

Se calculó la media y la desviación típica del índice de polifenoles totales (IPT), intensidad colorante (IC) y de la tonalidad (T).

## **G. Análisis sensorial**

El análisis sensorial de los dos vinos después de la fermentación maloláctica se realizó en la Sala de Catas de la Universidad de La Rioja el día 11 de febrero de 2020. Dicha sala cumple los estándares que indica la norma ISO 8589 (1998).

El panel de cata estuvo constituido por 11 alumnos de la asignatura Ampliación de Análisis Sensorial del 4º curso del Grado de Enología, considerados por tanto con experiencia en el análisis sensorial.

A cada catador se le dio una ficha de cata (Figura 4) con los descriptores consensuados por los catadores en la sesión anterior. Se evaluaron las fases visual, olfativa y gustativa mediante una escala de 0 a 5, en la cual 0 equivalía a ausencia de percepción y 5 a la máxima percepción.

Además, se realizó una cata hedónica en la que se pidió que ordenaran los vinos según su preferencia.

Los vinos se presentaron a 18 °C en catavinos codificados de acuerdo con la norma ISO 3591 (1977).

		VALORACIÓN					
DESCRIPTOR	DEFINICIÓN	0	1	2	3	4	5
<b>VISUAL</b>							
Intensidad de color	Cantidad de color y pigmentación						
Tonalidad	De anaranjado (0) a violeta (5)						
Limpidez	De turbio (0) a cristalino (5)						
Brillo	Vivacidad de color						
<b>FASE OLFATIVA</b>							
Intensidad aromática	Intensidad aromática a copa parada						
Herbáceos	Vegetal, esparrago, musgo						
Fruta roja	Fresa, grosella, frambuesa, gominola						
Frutas negra	Mora, ciruela, aceitunas negras						
Fruta madura	Mermelada, compota, pasas						
Lácteos	Yogurt, mantequilla						
Frutos Secos	Avellana, almendras, piñón, maíz tostado						
Madera	Roble, café, vainilla, coco, tostados						
Especias	Clavo, pimienta, cedro, tabaco						
Regaliz	Regaliz						
Reducción	Cerrado, presencia de sulfuros						
Oxidación	Manzana, acetaldehído, brandy						
<b>FASE GUSTATIVA</b>							
Ácido	Acidez positiva						
Amargo	Sensación final amarga de los taninos						
Dulce	Ataque dulce en boca						
Volumen en boca	Graso, glicérico, redondo						
Calidez	Sensación alcohólica						
Astringente	Sensación de rugosidad, sequedad						
Tanicidad	0: taninos verdes, 5: taninos redondos						
Equilibrio	Armonía, entre el dulce, ácido y amargo						
<b>RETRONASAL</b>							
Afrutado	Afrutado de cualquier tipo, frutas						
Madera/Tostados	Roble, tostados, crianza en barrica						
Persistencia	Duración en el tiempo de la percepción retronasal						
Valoración global							

Figura 4: Ficha de cata utilizada para el análisis sensorial de los vinos estudiados

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. ANALÍTICA DE PARÁMETROS ENOLÓGICOS GENERALES EN ENCUBADO

Los datos del análisis de los parámetros enológicos generales de los mostos tras el encubado se recogen en la (Tabla 6).

Tabla 6: Datos de los parámetros enológicos generales de los dos mostos tras encubado

MUESTRAS	INOCULADO FOH	ESPONTANEO FOH
<b>BRIX</b>	24,97±0,67	24,60±0,14
<b>ACIDEZ TOTAL (g/L de H<sub>2</sub>T)</b>	4,43±0,06	4,45±0,07
<b>ACIDO TARTARICO (g/L)</b>	3,77±0,15	3,90±0,14
<b>ACIDO MALICO (g/L)</b>	1,23±0,23	1,30±0,14
<b>pH</b>	3,57±0,01	3,57±0,01
<b>POTASIO (mg/L)</b>	1562,00±31,19	1619,50±47,38
<b>AZÚCARES (g/L de glucosa+fructosa)</b>	283,73±8,60	278,85±1,63
<b>AMONIO (mg/L)</b>	33,67±2,52	31,50±0,71
<b>ALPHA AMINO NITRÓGENO (mg/L)</b>	167,67±2,52	173,00±2,83
<b>GRADO PROBABLE</b>	14,79±0,45	14,54±0,10

Como se puede observar en la tabla 6, los parámetros analizados en los diferentes depósitos son bastante similares. En cuando al grado brix y a la cantidad de glucosa+fructosa, se observa una concentración bastante elevada en todos los depósitos, especialmente en los inoculados, por lo que se decidió añadir 13 litros de agua en cada uno de estos (técnica ilegal en España, pero legal en Estados Unidos) para rebajar el grado probable de 14,8 (24,97 brix) a 14,1 (24 brix) y que la fermentación fuese más segura, reduciendo riesgos de paradas.

Así mismo, la acidez total era algo baja, por lo que se adiciono acido tartárico a razón de 0,25g/L para elevarla y así bajar unas décimas el pH.

Por otro lado, la concentración de potasio se consideró correcta, ya que si hubiera sido mucho mayor hubiera conllevado una posible pérdida de la calidad del vino final, al reducir el nivel de ácido tartárico libre, incrementando el pH, y así, provocando inestabilidad en el vino.

En cuanto al nitrógeno, encontramos que tanto el amonio como el alfa amino nitrógeno (FAN) eran algo bajos, por lo que se tomó la decisión de adicionar nutrientes durante la fermentación para elevar su contenido y mejorar así el desarrollo y metabolismo de las levaduras.

## B. CINÉTICA DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

Para analizar la evolución de la fermentación alcohólica se estudiaron cuatro parámetros:

- El tiempo de arranque de la FOH: se definió como el tiempo transcurrido desde el encubado hasta que las levaduras comenzaron a consumir los azúcares del mosto y, por tanto, comenzaron a descender los brix de este.
- El tiempo de fermentación, desde el arranque de la FOH hasta que los brix alcanzaron un valor negativo ( $t_{\text{FOH}} 100\%$ ).
- El tiempo a mitad de fermentación, desde el arranque de la FOH hasta que los brix alcanzaron el valor medio entre los brix iniciales y finales ( $t_{\text{FOH}} 50\%$ ).
- La evolución de la temperatura durante el tiempo de fermentación alcohólica, ya que dicha temperatura condiciona la velocidad a la que las levaduras consumirán los azúcares transformándolos en etanol.

El parámetro de referencia para el estudio de la evolución de la FOH fueron los grados BRUX, cuya evolución en los mostos inoculados y sin inocular se puede observar en la figura 5.

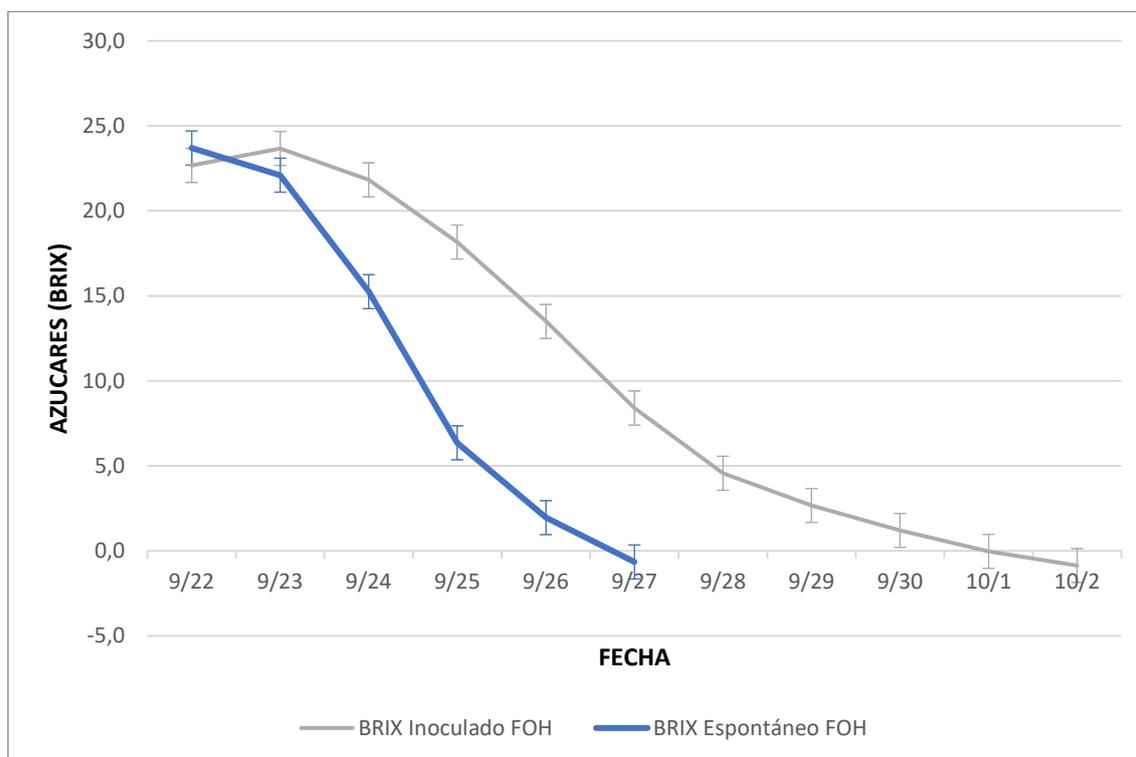


Figura 5: Evolución de los azúcares en BRUX durante el proceso de fermentación alcohólica en los mostos inoculado y espontáneo

El tFOH 50% fue, en valor medio, de 4 y de 2 días, en los en los mostos inoculado y sin inocular, respectivamente. Por lo tanto, se puede concluir que los mostos inoculados tardaron más tiempo (contado a partir del arranque de la FOH) en alcanzar el valor medio entre los brix iniciales y finales.

El tFOH 100% fue, en valor medio, de 10 y de 5 días, en los en los mostos inoculado y sin inocular, respectivamente. Por lo tanto, se puede concluir que los mostos sin inocular tardaron menos tiempo (contado a partir del arranque de la FOH) en consumir todos los azúcares.

El factor más determinante en la velocidad de fermentación de los depósitos del ensayo fue la temperatura. En la figura 6 se muestra como ha sido su evolución en ambas vinificaciones.

En el momento en que los depósitos alcanzaron el valor medio entre los brix iniciales y finales, fue cuando mayor temperatura alcanzaron los depósitos (Figura 6).

La temperatura máxima del depósito sin inocular fue 2°C superior a la del depósito inoculado: 27,3°C del depósito sin inocular frente a los 25,9°C del depósito inoculado (Figura 6).

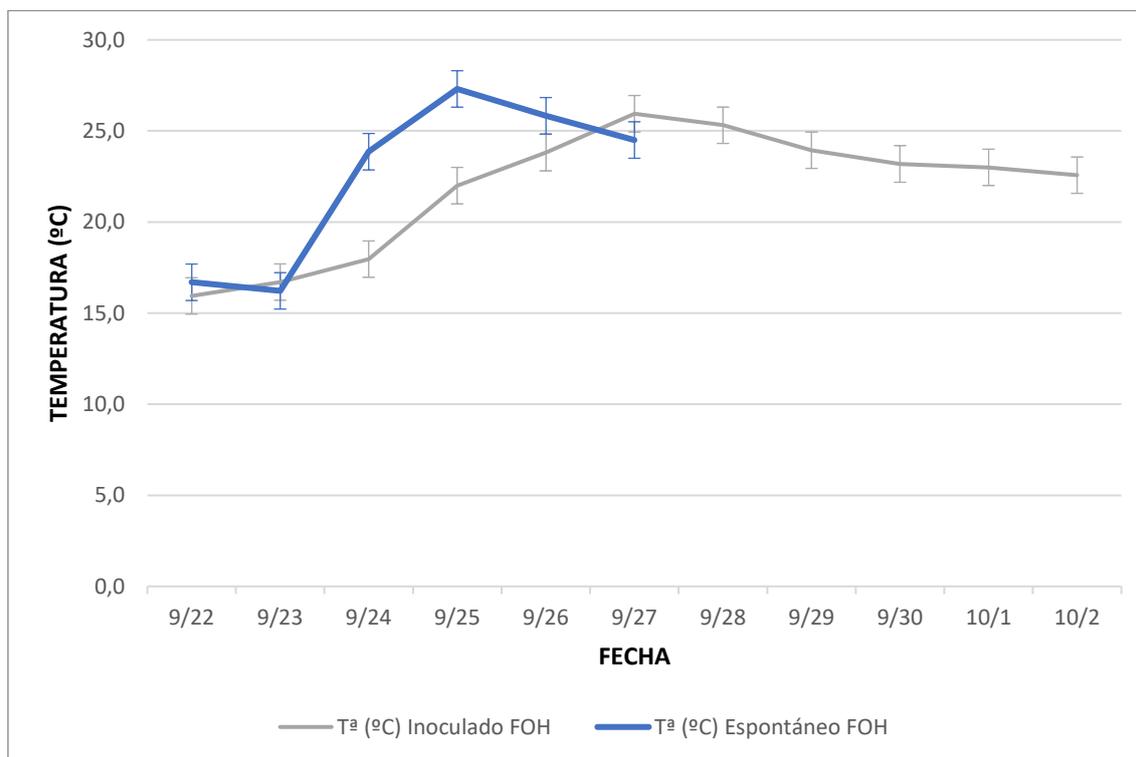


Figura 6: Evolución de la temperatura en °C durante el proceso de fermentación alcohólica en los mostos inoculado y espontáneo

Se observa un comienzo paralelo los dos primeros días coincidiendo con la fase de latencia, seguido de un aumento exponencial alto de la temperatura en el mosto sin inocular y un aumento más ligero en el mosto inoculado. Estos datos nos indican que

la fase de crecimiento exponencial fue más rápida en el mosto no inoculado, llevando a cabo la actividad fermentativa en menor tiempo.

Debido a la adición de agua en los depósitos inoculados, se observa una subida de azúcares entre los días 22 y 23 de septiembre, este dato, nos indica que la fermentación ya había comenzado y se estaba extrayendo mosto azucarado del interior de las bayas, lo que hizo que aumentara su concentración total.

Cabe destacar que ambas muestras estuvieron el mismo tiempo en maceración prefermentativa aproximadamente, aunque tan solo la muestra de sin inocular se mantuvo con hielo seco hasta el día 22. Se observa que la muestra sin inocular tardó un día más en dar signos evidentes de su comienzo, pero teniendo en cuenta los grados brix, ambas comenzaron a consumirlos prácticamente al mismo tiempo. Por otro lado, la muestra sin inocular permaneció más tiempo en maceración post-fermentativa, ya que finalizó antes el consumo de azúcares y se descubrió el mismo día que la muestra inoculada.

### C. ANÁLISIS DE PARÁMETROS ENOLÓGICOS GENERALES TRAS FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA

*Tabla 7: Datos obtenidos tras las analíticas de los parámetros enológicos generales tras fermentación maloláctica*

	<b>INOCULADO FOH</b>	<b>ESPONTÁNEO FOH</b>
<b>SO<sub>2</sub> libre (mg/L)</b>	0,00	2,00
<b>pH</b>	3,54	3,56
<b>Acidez total (g/mL h<sub>2</sub>t)</b>	0,67	0,61
<b>Acidez volátil (g/L ac acético)</b>	0,03	0,02
<b>Alcohol (%)</b>	14,13	14,49
<b>Ac. Málico (g/L)</b>	>0,05	>0,05
<b>Glucosa-Fructosa (g/L)</b>	0,40	0,10

Los resultados obtenidos tras analizar las muestras después de fermentación maloláctica, son bastante homogéneos. No hay diferencia en sulfuroso libre y en contenido glucosa+fructosa. El sulfuroso libre es muy bajo en ambos, resultado esperado en una muestra tomada tras finalización de la fermentación maloláctica. La glu+fru es menor de 1 en ambos, por lo que ambos son vinos secos, según la legislación española.

La acidez total, el pH y la acidez volátil son similares en ambas muestras. Así mismo, el valor de acidez volátil indica que tanto la fermentación alcohólica como la maloláctica han sido realizadas de manera satisfactoria.

Por otro lado, comparando estos datos con los obtenidos en otros estudios utilizando esta misma variedad, se evidencia que los valores de pH y glucosa-fructosa, coinciden con dichos estudios (Sepúlveda, 2009; Sepúlveda, 2014) mientras que los valores de acidez total y grado alcohólico son superiores, lo que puede deberse a la diferencia climática entre los lugares de cultivo de la materia prima para los diferentes estudios, más cálida en el valle de Russian River, que en la zona chilena del estudio mencionado.

Se observa que el grado alcohólico en el vino sin inocular, coincide con el grado probable analizado tras el encubado, por otro lado, en el vino inoculado, el grado alcohólico es menor al probable, hecho que pone de manifiesto la eficacia de la adición de agua.

Se observa que el ácido málico es muy bajo, lo que indica que ambas muestras realizaron correctamente la fermentación maloláctica.

Así mismo, los valores en cuanto acidez volátil, en el presente estudio, presenta valores mucho menores que en los estudios comparados, esto puede deberse al perfecto estado sanitario de la uva en vendimia, y a la correcta vinificación y conservación del posterior vino.

Con estos datos se puede concluir que no se encuentran diferencias entre los parámetros analizados derivados de la inoculación, o la no inoculación del mosto.

#### **D. INTENSIDAD COLORANTE E ÍNDICE DE POLIFENOLES TOTALES DE LOS VINOS**

El día 12 de diciembre de 2019, tras la fermentación maloláctica y el sulfitado de los dos vinos analizados, se analizó la intensidad colorante y el índice de polifenoles totales en las muestras procedentes de las barricas.

En la tabla 8 se muestran los datos obtenidos tras analizar el índice de polifenoles totales mediante la medida de la absorbancia a 280nm.

*Tabla 8: Índice de polifenoles totales de los vinos (media  $\pm$  desviación estándar)*

ID	A280	IPT <sup>2</sup>
ESPONTANEO FOH	0,921 $\pm$ 0,015	46,03 $\pm$ 0,742
INOCULADO FOH	0,812 $\pm$ 0,011	40,60 $\pm$ 0,571

*Se ha utilizado un factor de dilución F= 1/50.*

Se observa un valor superior de IPT en el vino sin inocular (46,03 $\pm$ 0,742) en comparación con el inoculado (40,60 $\pm$ 0,571).

A esta longitud de onda (280nm) el núcleo bencénico de los compuestos polifenólicos tiene su máximo de absorbancia (Zamora, 2003) por lo que estos resultados nos indican que se ha producido una extracción mayor de compuestos

fenólicos debida sobre todo a la mayor duración de la maceración prefermentativa y post-fermentativa en esta muestra.

Tabla 9: Índice de color de los vinos (media  $\pm$  desviación estándar)

ID	A420	A520	A620	IC <sup>3</sup>
ESPONTANEO FOH	1,286 $\pm$ 0,010	1,967 $\pm$ 0,010	0,375 $\pm$ 0,001	7,25 $\pm$ 0,031
INOCULADO FOH	1,045 $\pm$ 0,040	1,500 $\pm$ 0,060	0,307 $\pm$ 0,015	5,71 $\pm$ 0,234

Se ha utilizado un factor de dilución  $F= 1/2$ .

Así mismo, analizando los resultados obtenidos en cuanto a la intensidad colorante (Tabla 9), encontramos que al igual que en el IPT, los valores son mayores en el vino sin inocular (7,25 $\pm$ 0,031) que en el inoculado (5,71 $\pm$ 0,234). Este hecho reafirma la idea de la mayor extracción de compuestos fenólicos en el vino sin inocular ya que ha sufrido una mayor maceración tanto prefermentativa como post-fermentativa.

Por otro lado, según otros estudios, se considera que la intensidad colorante es baja, encontrando valores de hasta 18, en vinificaciones con una maceración prefermentativa a temperaturas de congelación (Sepúlveda, 2009), pero dentro del rango en vinificaciones donde las maceraciones no han sido tan extremas (Sepúlveda, 2014).

Tabla 10: Tonalidad en muestras inoculada y sin inocular (media  $\pm$  desviación estándar)

	A420	A520	T <sup>4</sup>
ESPONTANEO FOH	1,286 $\pm$ 0,010	1,967 $\pm$ 0,010	0,65 $\pm$ 0,001
INOCULADO FOH	1,045 $\pm$ 0,040	1,500 $\pm$ 0,060	0,70 $\pm$ 0,001

Se ha utilizado un factor de dilución  $F= 1/50$ . <sup>2</sup>IPT: índice de polifenoles totales como A280 nm; <sup>3</sup>IC: intensidad colorante como suma de A420, A520 y A620 nm; <sup>4</sup>Tonalidad: A420/A520. El número de repeticiones fue dos ( $n=2$ ).

En cuanto a la tonalidad (Tabla 10), se observa una ligera diferencia en la cantidad de pigmentos amarillos (A420) y de pigmentos rojos (A520), más elevado en ambos casos en el vino sin inocular, así como en la tonalidad. La mayor concentración de pigmentos rojos en la muestra sin inocular se debe a la mayor extracción de antocianos durante la maceración prefermentativa, siendo este compuesto el principal responsable del color rojo.

En este caso, los valores de la tonalidad en ambas muestras también coinciden con las obtenidas en estudios anteriores, con un valor medio de aproximadamente 0,6 (Sepúlveda, 2014).

## E. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO DURANTE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

Tabla 11: Población microbiológica encontrada en las muestras recogidas de los mostos inoculado y espontáneo durante el inicio de la fermentación alcohólica

	INOCULADO FOH	ESPONTANEO FOH
<b>INICIO DE FOH</b>	<p>&lt;1% <i>Saccharomyces</i></p> <p>60% no <i>Saccharomyces</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 40% <i>Hanseniaspora uvarum</i></li> <li>• 12,4% <i>Metschnikowia pulcherrima</i></li> <li>• 5,6% <i>Metschnikowia sp.</i></li> <li>• 2,5% <i>Candida parapsilosis</i></li> </ul> <p>39% otras levaduras</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 36,6% <i>Aureobasidium Pullulans</i></li> <li>• 2,7% <i>Metschnikowia chrysoperlae</i></li> </ul>	<p>&lt;1% <i>Saccharomyces cerevisiae</i></p> <p>89% no <i>Saccharomyces</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 44,6 <i>Hanseniaspora uvarum</i></li> <li>• 37,5% <i>Metschnikowia pulcherrima</i></li> <li>• 6,8% <i>Metschnikowia sp.</i></li> </ul> <p>10% otras levaduras</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 8,3% <i>Aureobasidium pullulans</i></li> <li>• 2,5% <i>Metschnikowia chrysoperlae</i></li> </ul>

Tabla 12: Población microbiológica encontrada en las muestras recogidas de los mostos inoculado y espontáneo en la mitad de la fermentación alcohólica

	INOCULADO FOH	ESPONTANEO FOH
<b>MITAD DE FOH</b>	<p>53% <i>Saccharomyces</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 29,1% <i>Saccharomyces kudriavzevii</i></li> <li>• 24,7% <i>Saccharomyces cerevisiae</i></li> </ul> <p>12% no <i>Saccharomyces</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 12% <i>Hanseniaspora uvarum</i></li> </ul> <p>33% otras levaduras</p> <p>33% <i>Aureobasidium pullulans</i></p>	<p>34% <i>Saccharomyces</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 4% <i>Saccharomyces cerevisiae</i></li> </ul> <p>62% no <i>Saccharomyces</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 49,7% <i>Hanseniaspora uvarum</i></li> <li>• 12,4% <i>Metschnikowia pulcherrima</i></li> </ul> <p>3% otras levaduras</p> <p>3% <i>Aureobasidium pullulans</i></p>

Tabla 13: Población microbiológica encontrada en las muestras recogidas de los vinos inoculado y espontáneo en el final de la fermentación alcohólica

	INOCULADO FOH	ESPONTANEO FOH
FINAL DE FOH	72% <i>Saccharomyces</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 54% <i>Saccharomyces cerevisiae</i></li> <li>• 18,3% <i>Saccharomyces kudriavzevii</i></li> </ul> <1% no <i>Saccharomyces</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;1% <i>Metschnikowia pulcherrima</i></li> </ul> 27% otras levaduras 27,5% <i>Aureobasidium pullulans</i>	45% <i>Saccharomyces</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 45% <i>Saccharomyces cerevisiae</i></li> </ul> 26% no <i>Saccharomyces</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 26% <i>hanseniaspora uvarum</i></li> </ul> 28% otras levaduras 28% <i>Aureobasidium pullulans</i>

En las tablas 11, 12 y 13 se presenta la evolución de la población microbiana desde el inicio hasta el final de la fermentación alcohólica.

Si nos centramos en las muestras tomadas del mosto inoculado, al inicio de la fermentación alcohólica, podemos apreciar como las poblaciones de las levaduras *S. cerevisiae* son inferiores al 1% a pesar de haberse añadido una importante cantidad de inóculo. Como se describe en la literatura, las levaduras que inician el proceso fermentativo son las levaduras de tipo no *Saccharomyces*, y conforme el grado alcohólico comienza a elevarse, estas levaduras van desapareciendo como puede apreciarse en los datos mostrados en las tablas 12 y 13; a partir del momento de plena fermentación alcohólica es *Saccharomyces* el género predominante (53%).

Observando los datos microbiológicos obtenidos de las muestras tomadas al final de la fermentación del mosto inoculado, se puede ver que es *Saccharomyces cerevisiae* la levadura mayoritaria (72%). Como el estudio de implantación no se llevó a cabo, no podemos afirmar que las cepas de *S. cerevisiae* detectadas sean las del inóculo añadido.

En el caso del mosto que llevó a cabo la fermentación de forma espontánea se observa que, en el inicio del proceso, al igual que en el mosto inoculado, las levaduras mayoritarias son las de tipo no *Saccharomyces*, hecho que se repite en el momento de plena fermentación alcohólica (no *Saccharomyces* 62%), aunque se observa un ligero aumento de la población de levaduras *Saccharomyces* hasta un 34%.

Es al final de la fermentación donde se aprecia un aumento de la población de *Saccharomyces cerevisiae*, aunque en ningún momento llega a ser la levadura mayoritaria.

Como dato llamativo se observa que las poblaciones de *Aureobasidium pullulans* están presentes en todas las muestras analizadas del mosto inoculado y que en el caso del mosto de fermentación espontánea es ligeramente más alta su población, al final de la fermentación.

## F. POLIFENOLES MONÓMEROS DE LOS VINOS

En la Figura 7 se muestra la concentración de diferentes compuestos fenólicos analizados en las muestras estudiadas.

El ácido gálico se encuentra en las células de la pulpa, por lo que su extracción, tan solo depende del manejo mecánico que haya sufrido la uva. Este hecho se evidencia en los resultados obtenidos (Figura 7), ya que las concentraciones en ambos vinos son iguales, hecho que se explica ya que ambos han sufrido el mismo procesado.

La catequina, es uno de los principales flavonoles monómeros de la uva, este compuesto aporta astringencia y amargor a los vinos. Se detecta una superioridad en la muestra inoculada, lo cual podría deberse a que en la muestra espontánea se ha producido una mayor condensación para formar taninos.

Por otro lado, en cuanto a los taninos, se observa en la Figura 7 que la concentración en el vino sin inocular es mayor. Este hecho, era el esperado, ya que la extracción de los taninos se realiza en disolución hidroalcohólica, y el vino sin inocular, se sangró el mismo día que el inoculado, pero acabó su fermentación mucho antes, por lo que, en estos días de diferencia, se produjo una mayor extracción por maceración post-fermentativa (Cassasa y col., 2007). Comparando este resultado con el obtenido analizando el IPT, se constata, que la extracción producida en la muestra no inoculada ha sido mayor que en la inoculada.

El ácido caftárico, por su parte es un ácido cinámico esterificado con ácido tartárico. Su concentración es mayor en la muestra espontánea, lo cual indica que el color de esta muestra sería ligeramente más estable en el tiempo por fenómenos de copigmentación (Guadalupe y col., 2008).

Los flavonoles son polifenoles de color amarillo. A esta familia pertenece la quercetina, cuyo valor se observa ligeramente mayor en la muestra espontánea debido a que para su disolución precisa de contenido en alcohol, ya que es poco hidrosoluble. Por este motivo tras identificar una mayor maceración post-fermentativa en medio hidroalcohólico de la muestra espontánea, es consecuente que la concentración en la muestra espontánea sea superior.

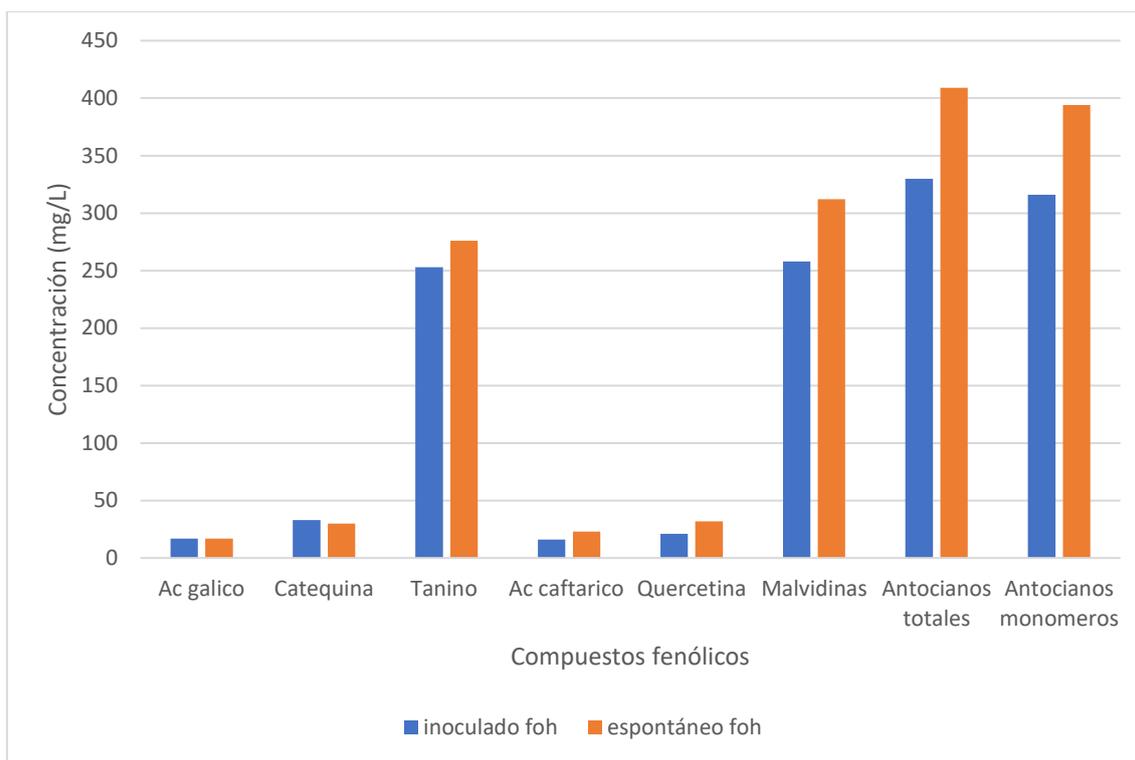


Figura 7: Concentración de los compuestos fenólicos en los vinos después de la fermentación maloláctica.

*Malvidina: malvidina-3-glucosido.*

Los resultados en cuanto a antocianos, especialmente malvidina-3-glucósido, nos indican una mayor extracción de estos en la muestra espontánea, lo que pone de manifiesto que la maceración prefermentativa produce vinos con mayor cantidad de este tipo de compuestos (Álvarez y col., 2005).

Los antocianos monómeros o antocianos libres son los responsables del color rojo azulado de los vinos jóvenes (Kennedy y col., 2006), ya que son compuestos que reaccionan fácilmente con el resto de los compuestos fenólicos y, por tanto, se va perdiendo esa tonalidad en aumento del marrón y el rojo durante el envejecimiento.

Como se observa en la figura 7, la concentración de antocianos monómeros es mayor en la muestra sin inocular, resultado coincidente con el obtenido en el IC, cuyo valor es mayor en la muestra sin inocular y con la cantidad de pigmentos rojos medidos mediante absorbancia a 520nm, los cuales están presentes en mayor proporción una vez más, en la muestra sin inocular. Este hecho, se debe a que estos fenoles, son más solubles en la fase acuosa, por lo tanto, se extrajeron en mayor medida durante la maceración prefermentativa, y puesto que esta tuvo una mayor duración en el mosto sin inocular, al haber arrancado un poco más tarde, su contenido es mayor en esta muestra.

Así mismo, cabe destacar que los antocianos son los principales responsables del color característico de los vinos tintos, independientemente de su envejecimiento (Gao y col., 1997).

## G. ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO DE LOS VINOS

En las figuras 8, 9, 10 y 11 se representan los resultados obtenidos tras la cata final de los dos vinos.

En las fases visual, olfativa y retronasal se han comparado los descriptores que cumplían el requisito de haber sido detectados por al menos 5 catadores

En la figura 8 observamos la evaluación de la fase visual de los vinos inoculado y sin inocular. Observamos la gran similitud entre ambas, aunque se detecta una leve diferencia en cuanto a intensidad de color, la cual es un poco más elevada en el vino inoculado.

Los datos obtenidos, son equiparables a los obtenidos en otros estudios, donde se consideró la apariencia como “buena” con una media de 4,2 puntos (Sepúlveda, 2009), mientras que la media obtenida del presente estudio presenta un valor de  $4,0 \pm 0,1$ .

En la fase olfativa, representada en la Figura 9, se una diferencia notable entre ambos vinos. Así, en el vino, destacan los aromas a roble, herbáceos y fruta fresca. Por otro lado, en la muestra sin inocular encontramos una mayor puntuación en todos los descriptores, destacando además las notas lácticas.

Estos datos, muestran tanto diferencias como similitudes. En la muestra espontánea, la media general de la fase olfativa toma un valor de  $2,7 \pm 0,1$ , teniendo en el estudio comparativo el mismo valor, considerándose como “leve-normal” (Sepúlveda, 2009). Por otro lado, en cuanto al vino inoculado, se encuentra que la valoración es mucho menor, por lo que la levadura no ha conseguido extraer todo el potencial aromático.

En la fase gustativa (Figura 10), el amargor, la duración, la sequedad y la entrada dulce muestran valores similares en ambos vinos.

Por otro lado, la acidez, la frescura, la sensación grasa, la astringencia, las sensaciones químicas y el equilibrio muestran diferencias significativas. En todos los descriptores anteriores encontramos valores más elevados en el vino sin inocular, excepto en cuanto a frescura, donde se valora más positivamente el vino inoculado.

En el estudio comparativo, encontramos una vez más coincidencias. Se comparan los parámetros dulzor, astringencia, acidez y duración. Los datos obtenidos en el presente estudio en cuanto a dulzor nos indican valores de 2,1 y 2,4 para las muestras espontánea e inoculada respectivamente, siendo el valor obtenido en el estudio comparativo de 2 (Sepúlveda, 2009), por lo que podemos considerar que ambas muestras mantienen el perfil típico de vinos Pinot Noir.

En cuanto a acidez, el valor obtenido en el estudio comparativo (Sepúlveda, 2009) es de 3,5, y en nuestro estudio es de 0,2 y 2,5 en las muestras espontánea e inoculada, respectivamente, por lo que encontramos que la acidez detectada en boca es menor en ambas muestras del presente estudio, especialmente la muestra espontánea. Esta gran diferencia podría explicarse debido al tiempo en madera que han sufrido las muestras espontánea e inoculada de este estudio, que ha otorgado a los vinos mayor redondez y equilibrio, o al menos ha enmascarado de cierta manera de acidez, ya que químicamente su valor es superior a las muestras comparativas (Sepúlveda, 2009), esta misma explicación podría razonar los valores en cuanto a astringencia, los cuales son 2,1 y 1,3 en las muestras espontánea e inoculada respectivamente, mientras que en la muestra comparativa (Sepúlveda, 2009) adquiere un valor de 2,8.

Se destaca, que en general el perfil organoléptico de las muestras del presente estudio, son equiparables a los perfiles encontrados en estudios anteriores enfocados a la variedad Pinot Noir.

Como evaluación general de la fase gustativa, se ha encontrado una mayor afinidad por el perfil del vino sin inocular, considerándose más complejo en retronasal (Figura 11) y equilibrado en boca (Figura 10).

En la fase retronasal del análisis organoléptico (Figura 11), se observa una superioridad destacable del vino sin inocular en los principales descriptores, considerándose más complejo, aunque también se observa el carácter herbáceo como defecto.

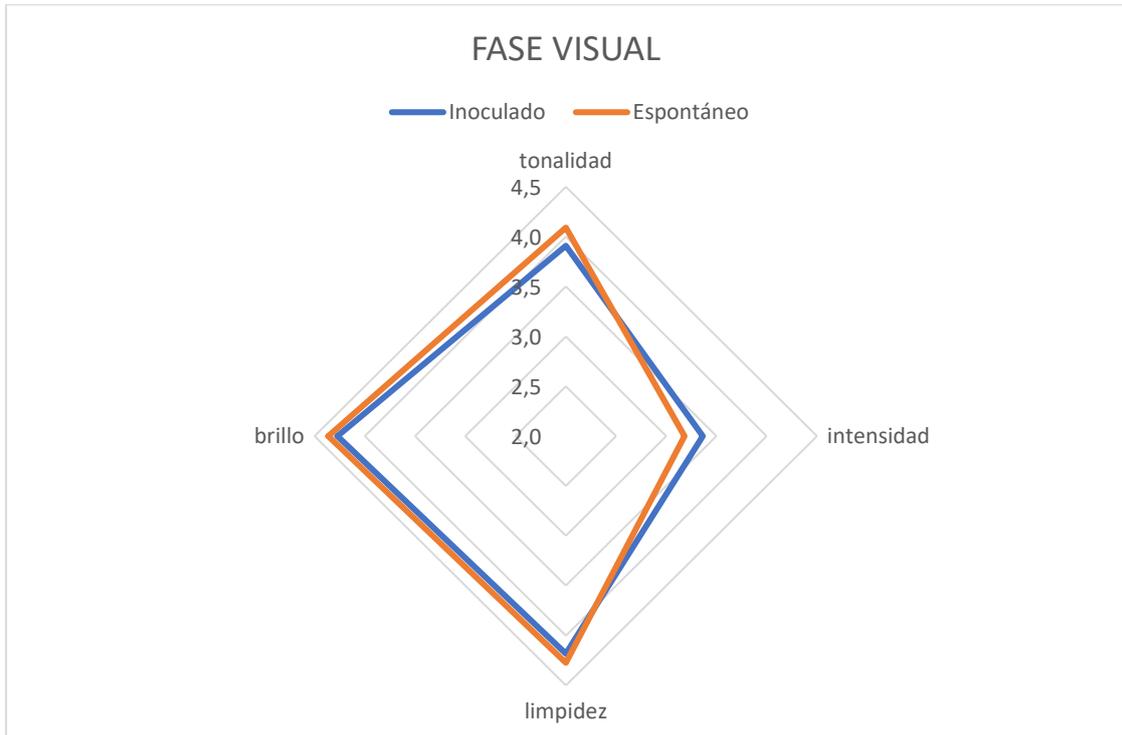


Figura 8: Fase visual del análisis sensorial de los vinos inoculado

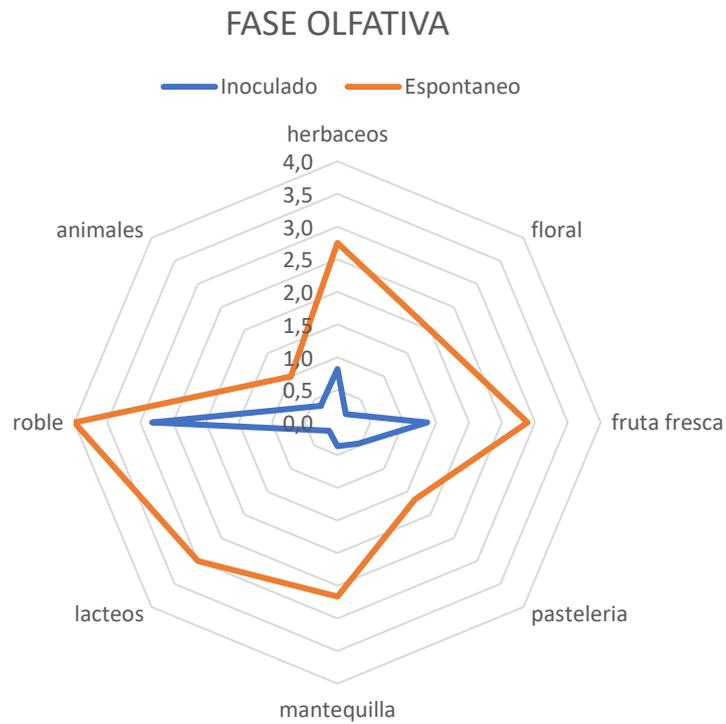


Figura 9: Fase olfativa del análisis sensorial de los vinos inoculado y sin inocular

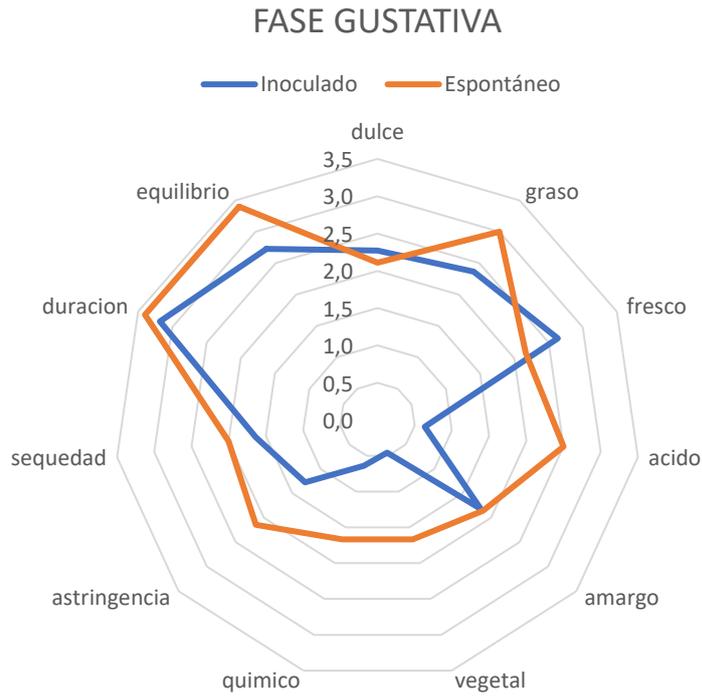


Figura 10: Fase gustativa del análisis sensorial de los vinos

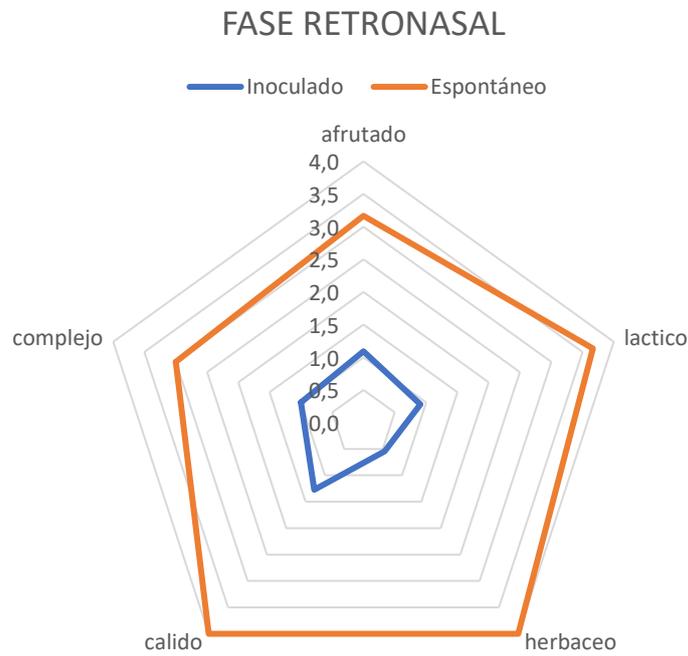
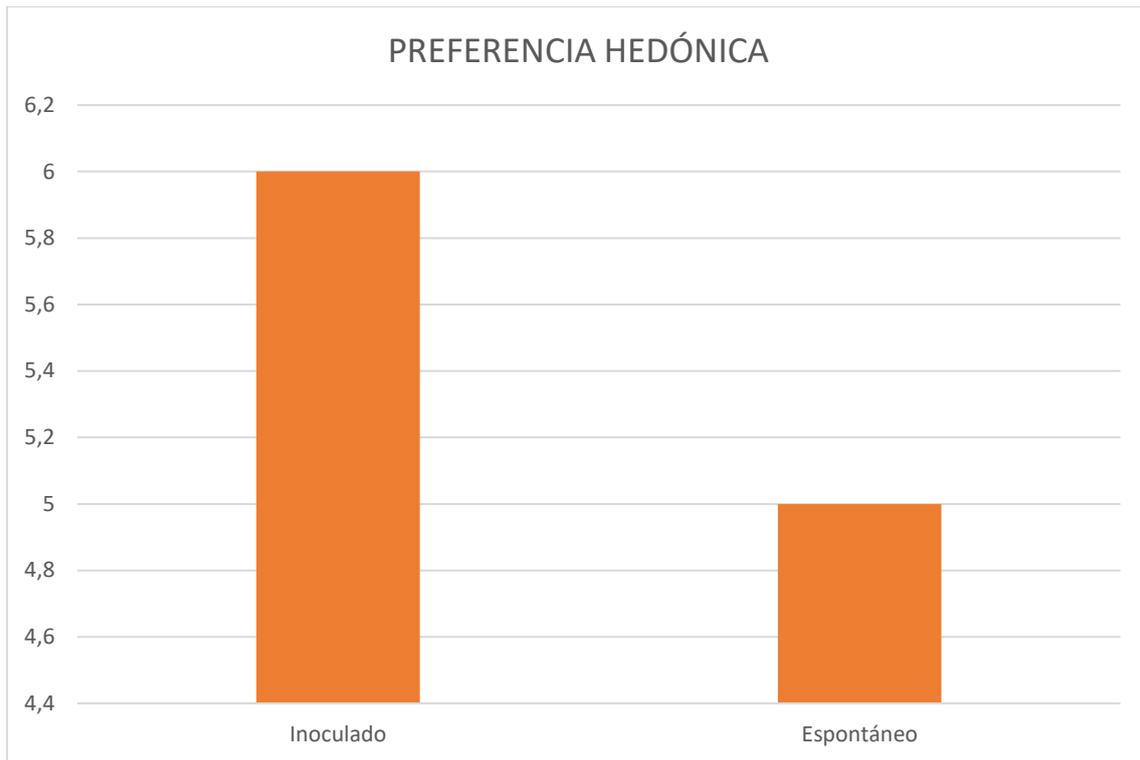


Figura 11: Retronasal del análisis sensorial de los vinos inoculado y sin inocular



*Figura 12: Resultados de la evaluación sensorial hedónica de los vinos inoculado y sin inocular*

Por último, la evaluación hedónica (figura 11) de ambas muestras ha sido muy similar, siendo favorecido el vino inoculado con 6 votos, frente a 5 del no inoculado.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el ensayo del presente Trabajo Fin de Grado han permitido concluir que:

- No se encontraron diferencias importantes en los parámetros enológicos brix, pH, acidez total, ácidos tartárico y málico, potasio, glucosa-fructosa, amonio, Alpha amino nitrógeno y grado probable, tras el encubado.
- Se observaron diferencias importantes en cuanto a la cinética de fermentación, que duró 5 días menos en la muestra sin inocular que en la inoculada.
- Los parámetros enológicos generales SO<sub>2</sub>, pH, acidez total y volátil, % alcohol, ácido málico y glucosa+fructosa tras fermentación maloláctica, no mostraron diferencias importantes entre ambas vinificaciones.
- El índice de polifenoles totales (IPT), presentó un valor superior en la muestra sin inocular frente a la muestra inoculada,  $46,03 \pm 0,742$  frente a  $40,60 \pm 0,571$ , respectivamente.
- La intensidad colorante presentó diferencias entre ambas muestras, siendo más elevado su valor en la muestra espontánea que en la muestra inoculada.
- Los resultados microbiológicos permiten asegurar que la levadura que ha llevado a cabo la mayor parte de la fermentación ha sido en ambas muestras *Saccharomyces cerevisiae*. Se deberían realizar nuevos estudios que evidencien esta implantación, estudiando la población a nivel de cepa, para así conseguir saber qué cepa de levadura ha realizado la fermentación y si realmente se ha implantado la levadura inoculada en dicha muestra.
- En relación con los polifenoles, se observaron diferencias importantes en la concentración de polifenoles totales, malvidinas, antocianos totales, antocianos monómeros y taninos, así como en ácido caftárico y la quercetina, siendo en todos ellos superior en la muestra sin inocular en comparación a la inoculada. Por otro lado, la cantidad de catequina fue superior en la muestra inoculada, y el ácido gálico similar en ambas muestras. Estos datos evidencian un contenido fenólico mayor en la muestra sin inocular debido a una mayor extracción en la maceración pre-fermentativa y post-fermentativa.
- El análisis sensorial pone de manifiesto que los vinos obtenidos son similares en la fase visual y en la preferencia hedónica. Por otro lado, se observa un perfil similar en fase olfativa, aunque varía la intensidad aromática del mismo. Las mayores diferencias se encontraron en la fase gustativa, caracterizándose como más equilibrado el vino sin inocular, y en la fase retronasal, donde se evaluó el vino sin inocular con una mayor complejidad.

Para la toma de decisión en cuanto a si es favorable la inoculación del mosto obtenido en la parcela problema, o si por el contrario es viable dejar que la fermentación se

realice espontáneamente con levaduras autóctonas, sería necesario repetir el estudio varios años consecutivos, así como evaluar el envejecimiento de las diferentes muestras.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ACE enología (2001). Color y compuestos fenólicos. VI Jornadas Científicas 2001. Grupos de investigación enológica.
2. Adams, D.O. (2006). Phenolics and ripening in grape berries. *Am. J. Enol. Vitic*, 57; pp 249-256.
3. Álvarez, I.; Aleixadre, M.; Garcia, M.; Lizama, V. (2005). Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compound in Monastrell red wines. *Anal. Chim. Acta*. 563; pp 109-115
4. Barnett, J. (2000). A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries. Review. School of biological sciences. University of east Anglia, Norwich, UK; pp 1850-1880
5. Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *Am. J. Enol. Vitic*. 52; pp 67-84.
6. Brouillards, R.; Delaporte, B.; Dubois, J.E. (1978). Chemistry of anthocyanin pigments. 3. Relaxation amplitudes in pH jump experiments. *J. Am. Chem. Soc.* 100; pp 6200-6205.
7. Cañibano, M. (2012). Efecto del perfil fenólico sobre las características antioxidantes de vinos tintos. Trabajo de fin de máster. Universidad de Valladolid.
8. Cassasa, F.; Sari, S.; Avagnina, S.; Jofré, V.; Fanzone, M.; Catania, C. (2007). Influencia de dos técnicas de maceración sobre la composición polifenólica, aromática y las características organolépticas de vinos C.V Merlot. Centro de estudios de Enología – EEA Mendoza, Argentina. [www.infowine.com](http://www.infowine.com). Revista internet de viticultura y enología.
9. Cheynier, V.; Moutounet, M.; Sarni-Manchado, P. Los compuestos fenólicos. En *Enología: fundamentos científicos tecnológicos*; Coordinador Flanzys, C.; AMV Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, España, 200; pp 114-136.
10. Gao, L.; Girard, B.; Mazza, G.; Reynolds, A.G. (1997). Changes in Anthocyanins and Color Characteristics of Pinot Noir Wines during Different Vinification Processes. *J. Agric Food Chem* 45; pp 2003-2008.
11. Guadalupe, Z. (2008). Manoproteínas y enzimas en la extracción y estabilidad del color de vinos de tempranillo. Tesis doctoral, Universidad de La Rioja, Logroño, España.
12. Haeger, J. W. (2004). North American pinot noir. Libro. University of California Press. Los Angeles, California; pp 250-375
13. Hidalgo Togorés, J. (2003). Tratado de Enología Tomos I y II. Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, España.
14. Johnson, H. (1994). The World atlas of wine. London: Mitchell Beazley Ltd.
15. Kennedy, J; Saucier, C; Glories, Y. (2006). Grape and wine phenolics; history and perspective. *Am. J. Enol. Vitic*, 57; pp 239-248.
16. Larousse. (1994). Larousse encyclopedia of wine. Paris.

17. MORENO J. J. Y PEINADO R. A. (2010). Química enológica. Ed. AMV ediciones y Mundi-prensa. Madrid.
18. OIV: Office International de la Vigne et du Vin. International Analysis Methods of Wines and Musts (1990); OIV: París, Francia.
19. Price, S. F.; Watson, B. T.; Valladao, M. Vineyard and winery effects on wine phenolics. Flavanols in Oregon Pinot Noir. En Proceedings of the Ninth Australian Wine Industry Technical Conference, Adelaide; Sotckley, C. S., Sas, A. N., Johnstone, R. S., Lee, T. H (Eds.); 1995; pp 93-97.
20. Pujol, A. P. (2016). Selección de levaduras autóctonas como herramienta para la producción de vinos singulares y de terroir. Interempresas.net; Artículo vitivinícola.
21. Ribereau-gayon, P.; Dubourdieu, D.; Doneche, B. (2003). Tratado de enología: microbiología del vino. Vinificaciones. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires (Argentina).
22. Schwarz, M.; Picazo-Bacete, J. J.; Winterhalter, P.; Hermosin-Gutierrez, I. (2001). Effects of copigments and grape cultivar on the color of red wines fermented after addition of copigments. J. Agric. Food Chem. 53; pp 8372-8381.
23. Sepúlveda, A. (2009). Características de vinos tintos pinot noir producidos con cepas autóctonas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas del Valle del Maule. Trabajo fin de grado. Santiago de Chile, Universidad de Chile.
24. Sepúlveda, C. (2014). Caracterización física y química de vino elaborado a partir de distintos clones del C.V Pinot Noir. Tesis. Santiago de Chile, Universidad de Chile.
25. Vidal, S.; cartlade, D.; Souquet, J. M.; Fulcrand, H.; Cheynier, V. (2002). Changes in proanthocyanidin length in wine like model solutions. J. Agric. Food Chem. 50; pp 2261-2266.
26. Yuste, J. (2000). La viticultura en el valle del Napa (California). Revista agropecuaria y ganadera, N° 811, 2000; pp 50-58
27. Zamora, F. (2003). El color del vino tinto. En elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos. Madrid, España: AMV Ediciones Mundi-Prensa.