



**UNIVERSIDAD JUAN AGUSTIN MAZA**

**Facultad de ingeniería y enología**

**Licenciatura en enología**

**IMPACTO ORGANOLEPTICO CAUSADO POR LA VARIACION  
DE CONSTITUYENTES NUTRICIONALES, EN LA  
FERMENTACION DE UN VINO CABERNET SAUVIGNON**

**ORGANOLEPTIC IMPACT CAUSED BY THE VARIATION IN  
NUTRITIONAL CONSTITUENTS IN THE FERMENTATION OF A  
CABERNET SAUVIGNON WINE**

**Alumno: Federico Miguel Muñoz**

**Tutor: Ing. Agr. Carla Aruani**

**Tutor metodológico: Lic. Guillermo Gallardo**

**MENDOZA, ARGENTINA 2021**

## **Información institucional**

Mediante la presente Tesina de grado y la defensa oral de la misma aspiro al título de Licenciado en enología.

Alumno: Federico Miguel Muñoz

DNI: 40.271.499

Matricula: 804

**Fecha del examen final:** 24 de Noviembre de 2021

**Calificación:** 10 (Diez)

**Docentes del Tribunal Evaluador:** Lic. Rene Juez

Lic. Pablo Blasco

## Dedicatoria y agradecimientos

Uno siempre está en deuda  
con aquellos seres queridos  
que en todo momento,  
dan la vida por nosotros,  
dando su amor incondicional y  
haciendo un esfuerzo inigualable  
para mejorar nuestro bienestar.

En primera instancia  
agradezco inmensamente  
con todo mi corazón  
a mis padres, por estar siempre conmigo  
acompañándome y apoyándome  
en mis decisiones y proyectos,  
a mis formadores y guías docentes  
que realmente son apasionados por su trabajo,  
gracias a ellos, y en especial a mi tutora Carla Aruani,  
que me transmitieron en todo momento  
sus conocimientos y sobre todo la motivación  
no solo para finalizar esta etapa de mi vida,  
sino también para ser un apasionado  
de esta hermosa carrera enológica.

**F.M.M**

## **Resumen**

En la actualidad se observa que el mercado mundial de vino, está generando una tendencia hacia un consumo de vinos más jóvenes y frutados, predominando compuestos volátiles propios del varietal, generados durante la fermentación. Por lo que el siguiente trabajo, se centró en buscar un tipo de nutriente que permita expresar al máximo el potencial aromático de las levaduras ***Saccharomyces Cerevisiae***, en cuanto a los aromas secundarios que se obtienen durante la fermentación alcohólica, donde principalmente se encuentran; alcoholes superiores, esteres de acetato, esteres etílicos y esteres etílicos de ácidos grasos de cadena media, que son las sustancias odoríferas encargadas de aportar las diferentes notas aromáticas que destacan el perfil de un vino terminado.

Se comparó el efecto que tiene la adición de diferentes fuentes nitrogenadas, mediante el uso de una sola cepa de levadura comercial, en el varietal Cabernet Sauvignon, donde la única variante fue el tipo de nutriente empleado, utilizando en primer lugar un testigo con nitrógeno natural aportado por el viñedo, un compuesto totalmente inorgánico a base de fosfato diamónico, levaduras inactivas en carácter de nutriente 100% orgánico y un preparado comercial mixto compuesto por fosfato de amónico, paredes de levaduras, tiamina y pantotenato. El resto de los parámetros se mantuvieron constantes para evitar alguna influencia de forma directa o indirecta sobre el producto terminado.

Los resultados obtenidos muestran que la adición de nutrientes orgánicos e inorgánicos mezclados, no solo conducen a un incremento en la cinética fermentativa, sino que también, actúan generando diferencias significativas sobre el perfil sensorial de un vino, en los atributos; bordo, mermelada de frutas, frutos negros y dulzor, otorgando cierto equilibrio aromático, con una mayor tasa de preferencia.

**Palabras claves:** *Saccharomyces cerevisiae* – nutrición - fermentación – aromas – esteres.

**Correo electrónico:** fedemiguelmunoz@hotmail.com

## **Abstract**

At present, it is observed that the world wine market is generating a trend towards a younger and more fruity wine consumption, predominantly volatile compounds typical of the varietal, generated during fermentation. Therefore, the following work focused on looking for a type of nutrient that allows to express to the maximum the aromatic potential of ***Saccharomyces Cerevisiae*** yeasts, in terms of secondary aromas obtained during alcoholic fermentation, where they are mainly found; higher alcohols, acetate esters, ethyl esters and ethyl esters of medium chain fatty acids, which are the odoriferous substances responsible for providing the different aromatic notes that highlight the profile of a finished wine.

The effect of the addition of different nitrogen sources was compared, by using a single commercial yeast strain, in the Cabernet Sauvignon varietal, where the only variant was the type of nutrient used, first using a control with natural nitrogen provided by the vineyard, a totally inorganic compound based on diammonium phosphate, inactive yeasts as a 100% organic nutrient and a mixed commercial preparation made up of ammonium phosphate, yeast walls, thiamine and pantothenate. The rest of the parameters were kept constant to avoid any direct or indirect influence on the finished product.

The results obtained show that the addition of mixed organic and inorganic nutrients not only leads to an increase in the fermentation kinetics, but also, they act by generating significant differences on the sensory profile of a wine, in the attributes; board, fruit jam, black fruits and sweetness, granting a certain aromatic balance, with a higher rate of preference.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae* - nutrition - fermentation - aromas – esters.

## Índice General:

Resumen .....	3
Palabras claves .....	3
Abstract.....	4
Keywords .....	4
Introducción.....	9
<b>Capítulo I</b> .....	<b>13</b>
Levaduras.....	13
Fases de crecimiento.....	14
Fase de latencia.....	14
Fase exponencial.....	14
Fase estacionaria.....	14
Fase de muerte .....	14
Metabolismo de azúcares .....	14
Fermentación alcohólica .....	15
Fermentación gliceropirúvica.....	16
Factores que afectan el crecimiento y desarrollo .....	16
Temperatura .....	16
NPA .....	16
Presión osmótica.....	17
Oxígeno .....	17
Clarificación/desfangado.....	17
Activadores fermentativos.....	17
Vitaminas .....	18
Ácidos grasos insaturados de cadena larga.....	18
Esteroles.....	19
Extractos de levaduras .....	20
Inhibidores fermentativos.....	20
Efecto del etanol .....	20
Efecto de la temperatura .....	20
Efecto del pH.....	20
Efecto de pesticidas .....	21
Efecto de ácidos grasos de cadena corta .....	21
Levadura Seca Activa (LSA).....	21
Fase de rehidratación.....	22

Compuestos nitrogenados .....	22
Factores que modifican la concentración.....	24
Mecanismo de asimilación .....	24
Amonio.....	25
Aminoácidos.....	25
Clasificación según grado de absorción.....	27
Absorción rápida .....	27
Absorción lenta .....	27
Absorción cuando no hay presencia de ninguno de los anteriores .....	27
Absorción completamente nula .....	27
Estructura molecular de (L-) Aminoácidos encontrados en el vino, según investigaciones científicas citadas al final de la biografía.....	28
Sobredosis nutritiva .....	28
Carencia nutritiva.....	29
Dosis referenciales y estimativas .....	29
Efectos de la asimilación de nitrógeno.....	30
Multiplicación celular (Biomasa).....	30
Cinética fermentativa.....	30
Compuestos aromáticos.....	31
Alcoholes superiores .....	31
Ácidos de cadena ramificada.....	32
Ésteres de acetato.....	32
Ésteres etílicos .....	33
Ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena media .....	34
Metabolismo genético .....	34
<b>Capítulo II</b> .....	37
Planteo de hipótesis.....	37
Justificación y relevancia.....	37
Objetivo general.....	37
Objetivos específicos.....	37
Diseño, población y muestreo.....	37
Recolección y molienda.....	38
Fermentación alcohólica .....	38
Nutrición .....	40
Tratamientos.....	40
Tipos de nutrientes .....	40

Descube y prensado.....	41
Trasiegos y conservación .....	42
Análisis químico y correcciones.....	42
Diseño metodológico .....	43
Análisis sensorial descriptivo cualitativo .....	43
Panel Sensorial .....	44
Análisis estadístico .....	45
<b>Capítulo III .....</b>	<b>46</b>
Resultados.....	46
Análisis químico .....	49
Análisis sensorial .....	50
Matiz bordó.....	53
Mermelada de frutas .....	54
Frutos Negros.....	56
Dulzor.....	56
Preferencia de tratamientos .....	58
Conclusión.....	59
Referencias bibliográficas .....	62



## Índice de Figuras:

Figura 1 - Esquema adaptado por Federico Miguel Muñoz, sobre "Vía de glucólisis y fermentación alcohólica" .....	15
Figura 2 - Fernández, G. [Imagen]. [citado el 20 de febrero de 2021].....	28
Figura 3 - Biosíntesis de ésteres de acetato .....	32
Figura 4 - Biosíntesis de ésteres etílicos.....	33
Figura 5 - Biosíntesis de ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena media (MCFA) .....	34
Figura 6 - Esquema adaptado por Federico Miguel Muñoz, sobre el metabolismo fermentativo de la levadura & "Concentraci on of the main volatile fermentation products associated with the Ehrlich pathway" .....	35
Figura 7 - Vasijas de fermentación correctamente identificadas. ....	39
Figura 8 – Correcciones en laboratorio central de la Universidad Juan Agustín Maza. ....	43
Figura 9 - Temperaturas obtenidas durante el transcurso de la fermentación alcohólica. ....	46
Figura 10 - Cinética fermentativa (consumo de azúcares reductores, expresado en grados baume).....	47
Figura 11 - Consumo de azúcares por día. ....	48
Figura 12 - Comparación de análisis químicos obtenidos por cada microvinificación.....	49
Figura 13 - Comparación discriminada por cada tipo de análisis químico.....	50
Figura 14 - Variabilidad de las repeticiones, en cuanto a los atributos sensoriales. ....	51
Figura 15 - Diferencias sensoriales obtenidas en los tratamientos (Medias LS).....	51
Figura 16 - Medias (LS) de tratamientos obtenidas en la fase visual en cuanto al atributo "bordo" (1=Testigo; 2= Fosfato Diamónico; 3= Levaduras Inactivas; 4=Mezcla Comercial). ....	53
Figura 17 - Análisis comparativo de los atributos analizados en la "fase visual".....	54
Figura 18 - Medias (LS) de tratamientos obtenidas en la fase olfativa en cuanto al atributo "mermelada de frutas". ....	54
Figura 19 - Análisis comparativo de los atributos analizados en la "fase olfativa".....	55
Figura 20 - Medias (LS) de tratamientos obtenidas en la fase olfativa en cuanto al atributo "frutos negros".....	56
Figura 21 - Medias (LS) de tratamientos obtenidas en la fase gustativa en cuanto al atributo "dulzor".....	57
Figura 22 - Análisis comparativo de los atributos analizados en la "fase gustativa". ....	57
Figura 23 - Tendencia preferencial de los tratamientos investigados. ....	58
Figura 24 - Preferencia porcentual de los 4 tratamientos realizados. ....	58

## Índice de Tablas:

Tabla 1 - Listado alfabético de aminoácidos presentes en el vino .....	28
Tabla 2 - Sustancias aromáticas fermentativas, producidas por <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> .....	36
Tabla 3 - Diagrama de agregados nutritivos.....	41
Tabla 4 - Codificación de tratamientos.....	44
Tabla 5 - Cinética fermentativa de los tratamientos .....	47
Tabla 6 - Consumo de azúcares diarios, expresado en grados baume (B°) .....	48
Tabla 7 - Datos analíticos obtenidos en las microvinificaciones.....	49
Tabla 8 - Análisis de la varianza - ANOVA $\alpha = 5\%$ , Tukey (HSD) & Fisher (LSD).....	52
Tabla 9 - Tratamientos. / Fisher (LSD) / Diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95%  .....	52

## Introducción

La mayoría de los compuestos volátiles y no volátiles presentes en los vinos, se los encuentran en estado libre o glicosidado, en las vacuolas de las células (aromas primarios), puntualmente en el mesocarpio y pericarpio, inmediatamente debajo de la piel de las bayas (Esti 2006) [1] es decir, unidos a una molécula de azúcar, las cuales, gracias a reacciones enzimáticas y metabólicas llevadas a cabo por las levaduras durante la fermentación alcohólica, les permitirán ser liberadas al medio, dependiendo de su volatilidad y umbral de detección, podrán ser percibidas con mayor o menor facilidad. Durante esta etapa, además de la transformación de azúcares, se produce una asimilación y transformación de sustancias nitrogenadas, que serán expulsadas al medio en forma de compuestos aromáticos.

Estos aromas son más conocidos como aromas secundarios, muy buscados por consumidores actuales, que apuntan a beber vinos más **jóvenes y frutados**, con mayor expresión aromática, que rápidamente recuerde el varietal que se está degustando. Por tal motivo las empresas vitivinícolas, buscan en todo momento satisfacer estas necesidades del consumidor, en un mercado tan competitivo y de amplio porfolio, con productos de excelentísima calidad.

Por lo que el siguiente proyecto de tesis consta de una investigación aplicada y experimental, obteniendo resultados que refuercen los hallazgos obtenidos hasta la actualidad, centrado en el metabolismo fermentativo y aromático de ***Saccharomyces Cerevisiae***. Buscando determinar el impacto que tiene el agregado de diferentes nutrientes comerciales, actualmente comercializados en Argentina, sobre el perfil de aromas secundarios generados durante el transcurso de la fermentación alcohólica de un mosto tinto Cabernet Sauvignon – cosecha 2019, de la Zona Este Junín – Provincia de Mendoza, Argentina.

¿Puede influenciar el tipo de nutriente utilizado en la fase fermentativa, sobre el perfil aromático y sensorial de un vino tinto?

¿Existe relación entre el NPA del mosto y los aromas fermentativos producidos?

¿La sobredosis nutritiva, genera algún efecto en la etapa fermentativa?

¿Mejora o perjudica la composición aromática?

Algunos de los principales factores para obtener vinos muy aromáticos, son primordialmente; el estado sanitario de la uva, la variedad, las condiciones climáticas, el terroir y el manejo de la canopia, si se analiza desde el punto de vista agronómico, pero no se puede dejar de lado la fracción microbiológica, ya que será la responsable en su totalidad, del desarrollo de estos **aromas fermentativos**, obtenidos, gracias al metabolismo y la genética de la cepa de levadura utilizada y/o desarrollada. Acompañado de técnicas e insumos enológicos para su elaboración, siendo este último un factor fundamental y central de la investigación.

Lo cual se puede evidenciar en un estudio llevado a cabo hace algunos años (Liang 2013) [2] sobre un vino tinto Cabernet Sauvignon, en donde se realizaron microvinificaciones con 12 cepas de levaduras autóctonas y se obtuvieron **perfiles aromáticos totalmente distintos** unos de otros, con una notable presencia tanto de esteroides como de alcoholes superiores, concidiendo con (Regodón Mateos 2006; Gutierrez 2015) [3,4] quienes lograron demostrar, la influencia y relevancia que tiene la cepa de levadura sobre los compuestos volátiles obtenidos en una elaboración, que aun con diferentes varietales de uvas y diferentes condiciones de fermentación, **“se obtiene vinos más homogéneos al utilizar la misma cepa de levadura, que cuando se realizan con diversas cepas”**.

La levadura, focalizando en la cepa ***Saccharomyces Cerevisiae*** se la encuentra naturalmente en los mostos de uva y emplea como fuente primaria de alimentación, los azúcares (hexosas); glucosa y fructosa, que son compuestos degradables, los cuales le sirven como principales fuentes de carbono y alimento energético (Ribereau-Gayon 2003) [5]. Otros constituyentes nutritivos, asimilables y fundamentales para su desarrollo, son los compuestos nitrogenados, entre ellos podemos citar; el **amonio, aminoácidos, polipéptidos y proteínas**, cuyos tenores van a depender exclusivamente de la cepa, del medio, las condiciones de cultivo, la densidad de plantación, suelo, clima, madurez y las fertilizaciones realizadas (Rapp 1995) [6].

El nitrógeno es un substrato limitante para el crecimiento y la multiplicación celular, aunque este va a depender primordialmente de la **fente nitrogenada**

**asimilada**, ya que la levadura es capaz de sintetizar solo los compuestos necesarios para poder crecer y desarrollarse en el medio. La concentración y composición del nutriente utilizado son de vital importancia, no solo para el metabolismo, sino también a nivel sensorial, por las cualidades y los compuestos aromáticos que se pueden obtener durante el transcurso de la fermentación alcohólica.

Se puede observar en varias investigaciones y comparaciones realizadas por (Torrea 2011; Barbosa 2012; Barbosa 2009) [7,8,9] que las suplementaciones con diversas fuentes nitrogenadas tanto en vinos blancos como tintos, generan grandes efectos en la concentración de sustancias volátiles y no volátiles, presentes en los finales de fermentación, las cuales, en su totalidad, hacen de la complejidad de un vino, tanto para enriquecerlo u opacarlo. Entre ellos podemos citar; **alcoholes superiores, ácidos grasos de cadena media, ácidos de cadena ramificada, esteres etílicos, esteres de acetato y esteres etílicos de ácidos grasos de cadena media**. No solo se observan cambios a nivel sensorial, sino que también una mayor tasa de crecimiento celular y actividad enzimática, con diferentes fuentes nitrogenadas (Godoy Danesi 2006) [10].

Los **aminoácidos** desempeñan importantes funciones fisiológicas y efectos sensoriales, al transformándose mediante la vía metabólica Ehrlich en alcoholes superiores y ácidos de cadena ramificada, que finalmente desencadenaran en la biosíntesis de ésteres aromáticos (Kato 2011; Reinal) [11,13].

En investigaciones más recientes, se puso a prueba el impacto de las concentraciones y composiciones de las fuentes nitrogenadas, utilizadas durante las diferentes fases de la cinética fermentativa, en base a la producción de sustancias volátiles agradables, y nuevamente pusieron en evidencia, que una adición de nitrógeno, no solo estimula la cinética fermentativa, aumentando la biomasa de microorganismos y reduciendo los tiempos de fermentación, sino también contribuye en gran medida a la síntesis y complejidad del perfil aromático de un vino. (Gutiérrez 2015; Rapp 1995; Torrea 2011; Barbosa 2012; Barbosa 2009; Reinal; Granes 2006; Barrajon 2011; Šuklje 2016; Martínez-Moreno 2014; Pei-Tong 2018; Duc 2020) [4,6,7,8,9,13,16,18,19,20,21,22].

Los compuestos aromáticos secundarios y/o fermentativos, se ven muy influenciados por los constituyentes del mosto y sobre todo por la revelación y expresión de los **genes** de la levadura, encargados de sintetizar y asimilar ciertos compuestos amoniacales y aminoacídicos (Pei-Tong 2018) [21]. Es importante destacar que no solo los nutrientes son importantes para el desarrollo de las levaduras, también se deben citar; **vitaminas, ácidos grasos de cadena larga, esteroides** y **oxígeno**, que de igual forma intervienen y favorecen el proceso fermentativo. (Landolfo 2010; Fornairon-Bonnefond 2003; Sablayrolles 1996; Perez-Vazquez 2005) [23,24,25,26].

En el **primer capítulo** se desarrolla el marco teórico de las levaduras, con las especies y cepas que existen en la actualidad, focalizando el estudio sobre el metabolismo de la cepa ***Saccharomyces Cerevisiae***. Su alimentación carbonada y nitrogenada para desarrollarse y competir en el medio. Y los compuestos aromáticos sintetizados a partir de su genética y sustancias nutritivas asimiladas.

En el **segundo capítulo** se encuentra la hipótesis y objetivos, detallando técnicas y procedimientos que se emplearon para llevar a cabo toda la investigación (marco metodológico) iniciando desde la cosecha del fruto, seguido de la fermentación con los tratamientos nutritivos realizados, hasta llegar al análisis descriptivo y estadístico, para visualizar las diferencias significativas percibidas.

En el **tercer capítulo** se detallan los resultados obtenidos, desde el punto de vista fermentativo, analítico y sensorial. Empleando el análisis de la varianza (ANOVA), la prueba de Tukey y Diferencia Minina de Medias (Fisher). Se presenta la conclusión obtenida, en base a diferencias que se presentaron en la fase visual, gustativa y olfativa.

## Capítulo I

### Levaduras

Hongos unicelulares eucariotas de tamaño microscópico que se reproducen por gemación, aeróbicos, con un metabolismo quimio-heterótrofo, que obtienen su energía por degradación de compuestos orgánicos (Ribereau-Gayon 2003) [5]. Se encuentran conviniendo con otros microorganismos, en la microbiota de la baya, colonizando hollejos en los viñedos. Actualmente se conocen diferentes especies y cepas de levaduras fermentativas, que enológica se las conocen como “levaduras indígenas”, terminología que no es aplicada a una sola cepa transformadora de azúcares, sino que consta de un conjunto de especies y géneros, que, por sus características morfológicas y genéticas, se las ha podido diferenciar e identificar con una mayor precisión.

A continuación, se nombran un grupo de géneros de levaduras que se encuentran en los mostos de uvas; **Schizosaccharomyces**, **Dekkera**, **Pichia**, **Zygosaccharomyces**, **Candida**, **Kloeckera**, **Saccharomycodes**, **Brettanomyces**, **Hanseniaspora**, **Hansenula**, **Torulaspora** y finalmente **Saccharomyces** que será el género de mayor importancia a la hora de realizar una elaboración, ya que, por sus características fisiológicas se encargara de llevar acabo la fermentación alcohólica, gracias a su gran poder fermentativo, resistencia al alcohol y al anhídrido sulfuroso (SO<sub>2</sub>).

Dentro de este último grupo, se encuentran 5 subgéneros; **Saccharomyces uvarum**, **S. oviformis**, **S. bailii**, **S. cerevisiae** que tiene un elevado poder dominante en un medio y por último **S. bayanus** como la cepa más extravagante, en cuanto a su elevada resistencia al etanol, incluso utilizada en ocasiones, para reiniciar paradas fermentativas con pocos gramos de azúcar, en condiciones muy adversas, con elevada presencia de toxinas y alcoholes.

La investigación se focalizo en el género Saccharomyces, y dentro de este grupo, **Saccharomyce Cerevisiae**, ya que es por excelencia la mejor cepa para llevar a cabo el proceso fermentativo, no solo por su adaptación y dominancia del medio, sino también por las características sensoriales que esta aporta al producto.

## **Fases de crecimiento**

### **Fase de latencia**

Tiempo de adaptación a las nuevas condiciones del medio, ya que los microorganismos se encuentran colonizando las bayas de forma aeróbica, y al estrujarse, durante el proceso de molienda, se genera la liberación y homogeneización del sólido-líquido modificando completamente el medio al que las levaduras estaban adaptadas, siendo el primer factor fundamental el cambio de pH a un medio ácido, rondando valores de 3.5, seguido de una competencia microbiana por ganar y colonizar el medio.

### **Fase exponencial**

Momento en el cual las células comienzan a reproducirse y multiplicarse de forma acelerada, la cual va a depender sumamente de factores genéticos, ambientales, nutritivos, térmicos y competitivos entre los microorganismos presentes.

### **Fase estacionaria**

Cuando la población de levaduras ha alcanzado su máximo valor posible, con la mayor cantidad de microorganismos vivos, atravesando un medio donde comienza a presentarse cierta acumulación de compuestos tóxicos, un elevado porcentaje de alcohol producido, presencia de ácidos grasos de cadena corta, carencia nutritiva y deficiencia de oxígeno.

### **Fase de muerte**

La cantidad de microorganismos vivos en esta fase, comienza a decaer por disminución de la viabilidad, ocasionando una disminución de la cinética fermentativa hasta su finalización, pero en ciertas ocasiones y dependiendo del medio, puede conllevar a paradas fermentativas, por la acumulación de toxinas citadas en la fase anterior.

### **Metabolismo de azúcares**

Las levaduras al ser microorganismos quimio-heterótrofos, necesitan de nutrientes para poder multiplicarse y crecer, por lo que realizan fosforilaciones oxidativas totales o parciales, para poder obtener energía para sus funciones vitales. Degradando azúcares por dos vías, según exista la presencia o ausencia de oxígeno, conllevando a una fermentación o respiración.

Dicha transformación de azúcares, solo corresponde a hexosas fermentecibles, ya que las pentosas no son asimiladas, ni puede ser reducidas por las levaduras.

### Fermentación alcohólica

Los procesos metabólicos de las levaduras, comienzan con el transporte y la degradación catabólica de los azúcares presentes en el mosto, en forma de glucosa y fructosa, siendo este último asimilado con mayor dificultad. También se pueden encontrar algunos restos de sacarosa, que previamente deben ser desdoblados enzimáticamente por la acción de una enzima invertasa, para ser asimilados correctamente.

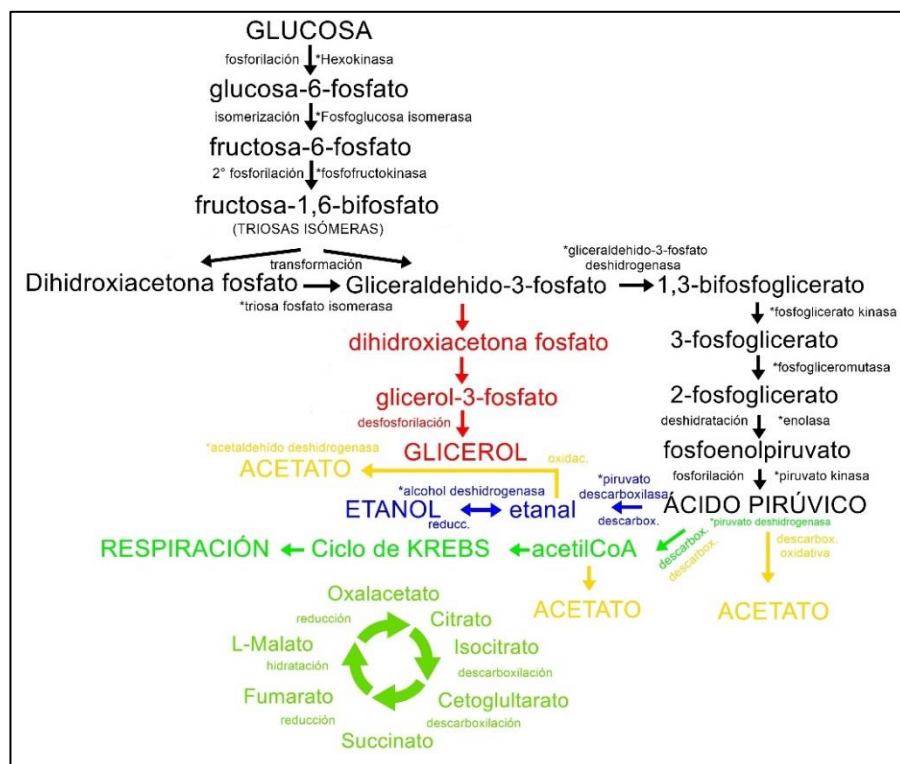


Figura 1 - Esquema adaptado por Federico Miguel Muñoz, sobre "Vía de glucólisis y fermentación alcohólica"

Fuente: Rivéreau-Gayon 2003 [5]

Una vez transportada la glucosa al interior de la célula (Figura 1), es rápidamente fosforilada e isomerizada para obtener 2 triosas, que mediante una transformación y conversión se obtendrá 1,3 bifosfoglicerato, que a través de las enzimas fosfoglicerato kinasa y fosfogliceromutasa, seguido de una deshidratación, se producirá fosfoenolpiruvato y posteriormente ácido pirúvico.

A partir de este último compuesto, se dividen 2 caminos metabólicos, donde ante la presencia de oxígeno, se genera la respiración celular realizada en las mitocondrias gracias a el Ciclo de Krebs, donde el ácido pirúvico es oxidado



hasta la obtención de anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>) más agua (H<sub>2</sub>O) y en ausencia de oxígeno, se lleva a cabo la fermentación alcohólica, donde ese ácido pirúvico, es descarboxilado gracias a la acción de la enzima piruvato descarboxilasa, en acetaldehído (etanol) y finalmente mediante una reducción, la obtención de etanol.

### **Fermentación gliceropirúvica**

El producto final de esta vía, es la síntesis del glicerol, más conocido como glicerina, la cual se genera de forma lenta pero continua durante el transcurso de la fermentación alcohólica, en los primeros gramos de azúcar transformados.

Es el segundo compuesto de importancia, seguido del etanol. Su formación es a partir de una desfosforilación del glicerol-3-fosfato, proveniente del gliceraldehído-3-fosfato durante la transformación de triosas. Generalmente se lo puede encontrar en valores que oscilan los 6-10 gr/lit, cuyo valor va a depender exclusivamente del medio, las temperaturas de fermentación y de la cepa desarrollada.

### **Factores que afectan el crecimiento y desarrollo**

**Temperatura:** Normalmente las levaduras se desarrollan con valores que oscilan los 16-24 °C, empleando valores más elevados en vinificaciones tintas y algo más bajos para la conservación de aromas en el caso de una elaboración blanca y/o rosada. Es importante recordar que tanto valores demasiados elevados como bajos, afectan en gran medida la cinética fermentativa, pudiendo generar en ambos casos paradas fermentativas.

En el caso de valores superiores a los 22°C se observa una cinética que tiende a incrementarse proporcionalmente y por lo tanto acelerando la transformación de azúcares, ocurriendo lo opuesto ante una disminución de temperatura por valores debajo de los 15°C, provocando fermentaciones muy ralentizadas y por consiguiente una prolongación en los tiempos de fermentación.

**NPA:** Nitrógeno prontamente asimilable o fácilmente asimilable (NFA), es un conjunto de compuestos químicos a base de nitrógeno; α-aminoácidos, amonio y algunos pequeños péptidos, que son sustancias determinantes para llevar a cabo la síntesis proteica y el transporte de azúcares.

Normalmente la necesidad nutritiva va a depender de varios factores, citando en primer lugar, la cepa de levadura utilizada y si es de tipo “indígena” o “seleccionada”, existiendo cepas que demandan elevadas dosis de nitrógeno e incluso otras que tienen una necesidad nutritiva prácticamente baja.

**Presión osmótica:** Generada por la concentración de azúcares reductores; glucosa y fructosa, principal fuente de carbono que predomina en dosis elevadas en los mostos. Encontrando valores que superan fácilmente los 230 gr/lit de azúcares reductores de forma natural producidos por la vid, incrementándose a medida que transcurre el ciclo de maduración de las bayas, pudiendo obtenerse valores muy por encima de los 300 gr/lit en el caso de vinificaciones especiales, como cosechas tardías o para la elaboración de mostos concentrados y/o rectificadas.

**Oxígeno:** Factor químico fundamental para el metabolismo de los microorganismos aeróbicos, ya que no es posible su desarrollo en ausencia total de este, lo necesitan primordialmente para la respiración y la obtención de esteroides y ácidos grasos insaturados de cadena larga que son factores vitales para la supervivencia y fluidez de la membrana.

**Clarificación/desfangado:** Trabajo de limpieza física y/o química la cual debe controlarse bien los niveles de turbiedad en los mostos (NTU), ya que una excesiva limpieza conlleva a efectos opuestos al deseado, ocasionando un importante empobrecimiento del mosto en sustancias nitrogenadas (NPA), esteroides y ácidos grasos fundamentales para la viabilidad celular.

### **Activadores fermentativos**

Compuestos que se encuentran a nivel de rastros, pero que sirven como grandes factores de supervivencia para las levaduras, en ocasiones llegan a ser de vital importancia para su desarrollo en un medio tan hostil como un mosto en fermentación, repleto de toxinas que afectan vitalidad, como; alcoholes, ácidos grasos de cadena corta, pH sumamente bajos, elevada presión osmótica y una importante anaerobiosis.

Estos compuestos se encargan sobre todo de asegurar una buena permeabilidad de la membrana plasmática, para favorecer los intercambios con el medio.

## Vitaminas

Sustancias orgánicas que se encuentran en los zumos de uva, con valores extremadamente bajos, en ocasiones expresadas en nanogramos, de gran importancia para un crecimiento óptimo. Entre ellas se encuentran; **tiamina** (B<sub>1</sub>) la cual se consume durante las primeras horas y es un cofactor catalítico que participa en reacciones de descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico, aminoácidos y  $\alpha$ -cetoglutárico, **riboflavina** (B<sub>2</sub>) coenzima de varias reacciones implicadas en la respiración celular, **nicotinamida** (B<sub>3</sub>) componente de cofactores NAD y NADP intervinientes en reacciones de deshidrogenación, **ácido pantoténico** (B<sub>5</sub>) precursor de la biosíntesis de CoenzimaA y reacciones de acetilación, **piridoxina** (B<sub>6</sub>) coenzima que actúa en reacciones de transaminación, descarboxilación y desaminación de aminoácidos, **biotina** (B<sub>7</sub>) cofactor de carboxilasas que afectan la tasa de crecimiento, induciendo glucoquinasas y reprimiendo fosfoenolpiruvato carboxiquinasas, **ácido fólico** (B<sub>9</sub>), **cobalamina** (B<sub>12</sub>) e **inositol/mioinositol** (B<sub>H</sub>) que mejora el crecimiento celular, aumentando fluidez y fosfolipídicos de la membrana celular (fosfatidilinositol).

## Ácidos grasos insaturados de cadena larga

Sustancias ácidas carboxílicas, de naturaleza grasa, constituidos por 14, 16 o 18 átomos de carbono lineales, donde principalmente se encuentran; **ácido oleico** (C18), **ácido linoleico** (C18), **ácido linolénico** (C18) en menor medida **ácido palmitoleico** (C16) los cuales se van a ir consumiendo hasta el final de la primera fermentación, aunque no todos tienen los mismos efectos sobre la integridad de la membrana celular.

Estos compuestos tienen gran importancia durante la fermentación alcohólica ya que pueden ser generados por las mismas levaduras, cedidos al medio durante las maceraciones prefermentativas gracias a la fricción de los hollejos (pruina) o directamente incorporados de forma exógena durante la elaboración mediante nutrientes orgánicos. Cuya función principal es incrementar la integridad de la membrana plasmática, variando el flujo de protones y por consiguiente aumentando la viabilidad y la biomasa de levaduras cuando existen condiciones de anaerobiosis.

Su biosíntesis se realiza mediante sucesivas condensaciones del AcetilCoA, previamente existiendo una activación de este, al incorporar un grupo carboxilo a la molécula, transformándola en malonil-CoA (3 carbonos), siendo este último el dador de 2 átomos de carbono de forma continua.

Obteniéndose así, el complejo acetil-malonil, que mediante sucesivas reacciones de descarboxilación, oxido-reducción, deshidratación y nuevamente oxido-reducción, se obtendrá ácidos grasos de 4,6,8 y múltiplos de dos carbonos hasta la obtención de palmitato (16 carbonos), donde la enzima no condensa más reacciones y es liberado al medio citoplasmático. Pudiendo sufrir una serie de reacciones gracias al malonil-CoA presente + oxígeno ( $O_2$ ), para generar una elongación, obteniendo finalmente Oleil CoA (18 carbonos). Es importante recordar que estas reacciones generan una importante demanda energética. El acetilCoA proviene de excedentes en la degradación de glúcidos (glucolisis) o de esqueletos aminoacídicos.

También existen otros tipos de ácidos grasos de cadena corta, que son intermedios de reacción liberados prematuramente de 6, 8 y 10 átomos de carbono, y cumplen una función completamente opuesta e inhibitoria.

### **Esteroles**

Compuestos orgánicos naturales de supervivencia clave para la integridad de la membrana plasmática, como los ácidos grasos citados anteriormente. Cuya biosíntesis va a estar ligada a la presencia de oxígeno, donde se lo incorpora realizando remontajes abiertos para favorecer el metabolismo de estas sustancias de forma natural. Gracias a la unión de 2 moléculas de AcetilCoA para obtener AcetoAcetil CoA iniciando la vía del mevalonato hasta la síntesis de; **escualeno** seguido de **lanosterol**, **zymosterol** y finalmente **ergosterol**.

Las rutas metabólicas de estas sustancias de supervivencia (ácidos grasos insaturados de cadena larga y esteroles) están estrechamente ligadas a reacciones de fosforilación, ya que “inactivan” su biosíntesis.

Caso contrario cuando se produce la respiración celular, ya que la formación de citrato “activa” la enzima AcetilCoA Carboxilasa, catalizadora de malonil CoA, precursor de ácidos grasos.

## **Extractos de levaduras**

Normalmente las industrias que comercializan este tipo de insumos, los presentan en formatos puros o mezclas pre-establecidas por cada empresa, cuyas bases están compuestas por facciones biológicas intracelulares de levaduras, después de su autólisis, en mayor o menor grado de pureza, lo cual fijará su costo final.

Se puede encontrar nutrientes compuestos por **autólisis de levaduras** (ricos en esteroides, ácidos grasos insaturados de cadena larga, aminoácidos, vitaminas, minerales, oligoelementos y polisacáridos), **levaduras inactivas** (que también aportan macro y micronutrientes, con un importante efecto antioxidante), y **paredes celulares** (liberan manoproteínas y ofrecen un efecto detoxificante ya que tienen un importante grado de absorción).

## **Inhibidores fermentativos**

### **Efecto del etanol**

Afecta directamente la permeabilidad de la membrana plasmática por interacción en cabezas de fosfolípidos y proteínas, acelerando el flujo y el sistema de transporte de protones ( $H^+$ ), acidificando el interior de la célula (modificando el pH intracelular), ocasionando una disminución de la viabilidad y asimilación de sustancias nitrogenadas.

### **Efecto de la temperatura**

Temperaturas moderadas oscilando los 15-25 grados  $C^\circ$  solo modifican la cinética fermentativa acelerando o disminuyendo la degradación de azúcares y por consiguiente la generación de anhídrido carbónico ( $CO_2$ ), pero valores por encima de estos, no solo ocasionan un acelerado proceso de intercambios entre la célula y el medio, sino que también provocan una desnaturalización proteica, con posibles paradas de fermentación y volatilización de aromas, mediante la fricción ascendente del  $CO_2$  liberado.

### **Efecto del pH**

Los valores de pH intracelular, se ven afectados directamente por el funcionamiento de la enzima ATPasa encargada del transporte activo de los compuestos externos e internos de la célula, por lo que un incorrecto funcionamiento, ocasiona una mayor fluidez de la membrana, con acelerados

intercambios con el medio, provocando una disminución desmedida del pH, (acidificando) y por lo tanto modificando neutralidad y viabilidad celular.

### **Efecto de pesticidas**

Fungicidas a base de tiazoles o imidazoles que fueron agregados durante curaciones en viñedos, que se encargan de bloquear la biosíntesis de esteroides y ácidos grasos insaturados de cadena larga, alterando la fluidez de la membrana plasmática. Normalmente suelen estar presentes, cuando no se respetan los tiempos de carencia en los agregados antes de vendimia y por lo tanto se trasladan a los mostos durante la molienda.

### **Efecto de ácidos grasos de cadena corta**

Sustancias tóxicas excretadas por las mismas levaduras, durante el metabolismo fermentativo en mayor o menor proporción, dependiendo de las condiciones medio. La toxicidad está relacionada por la alta liposolubilidad, penetrando la célula y disociándose internamente, modificando por consecuencia el pH intracelular, ocasionando una inhibición en el intercambio con el medio. Por lo que las levaduras continúan con su actividad enzimática pero no pueden asimilar fuentes de carbono (azúcares reductores).

La biosíntesis se lleva a cabo mediante la condensación repetitiva de AcetilCoA durante la formación de ácidos grasos, siendo intermediarios de reacción, liberados prematuramente. Entre estas sustancias, se encuentran; **ácido hexanoico** (C6), **ácido octanoico** (C8) y **ácido decanoico** (C10).

### **Levadura Seca Activa (LSA)**

Levaduras de origen natural, extraídas de diferentes zonas vitivinícolas del mundo, las cuales fueron previamente aisladas, purificadas, identificadas, seleccionadas y replicadas, según diversos intereses enológicos. Tales como; acelerado inicio fermentativo, consumo homogéneo de azúcares, elevada resistencia al alcohol, presencia de factor killer, baja producción de espuma y acidez volátil, mayor o menor demanda de nitrógeno prontamente asimilable (NPA) y en la actualidad se siguen aislando cepas más específicas en cuanto a su capacidad de revelar y expresar aromas fermentativos que representen a cada varietal en cuestión o simplemente neutras.

Para facilitar su comercialización, son sometidas a un proceso de deshidratación mediante un secado y post-tamizado, en formas de gránulos redondos, delgados bastoncillos o en polvo, para asegurar un sencillo agregado.

### **Fase de rehidratación**

Proceso más importante para las levaduras comerciales (LSA), el cual consiste en re-establecer las condiciones similares que estas convivían previamente, antes de pasar por el proceso de deshidratación-tamizado, que por consiguiente ocasiona una ruptura del equilibrio celular, ya que, durante ese proceso de secado, las células pasaron bruscamente de una humedad relativa de entre 70-80% a valores que oscilan 4-6% ocasionando una importante rugosidad en la superficie de las membranas plasmáticas.

La técnica se basa en hidratar, en un medio acuoso libre de SO<sub>2</sub> o restos de pesticidas, a temperaturas cercanas a 35-37°C ya sea directamente con agua templada (H<sub>2</sub>O) o solución de mosto diluido de bajo tenor azucarino, para no ocasionar un choque osmótico. Luego durante un determinado lapso (15 a 20 minutos) las levaduras ya pueden soportar cierta disminución de temperatura, empleando pequeñas fracciones de mosto, para descender algunos grados centígrados (°C) hasta llegar a un valor próximo de la vasija a cultivar, siempre y cuando no se genere un gradiente de temperatura  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ , ya que desencadenaría un shock térmico, ocasionando la muerte y por consiguiente disminuyendo en gran porcentaje la viabilidad celular.

La durabilidad de la fase de hidratación según diferentes autores e incluso de las empresas distribuidoras y fabricantes de levaduras secas (LSA), recomiendan no supere más de 45min, sin la presencia de compuestos carbonados en el medio (azúcares), ya que una vez finalizada la fase de hidratación, la célula rápidamente comienza a buscar alimento y de no estar presente en el medio, comienza a degradar sus propios constituyentes nutricionales, ocasionando el proceso de autólisis con descenso de viabilidad.

### **Compuestos nitrogenados**

La alimentación nitrogenada esta provista de una fracción **inorgánica** constituida principalmente por **amonio** y **orgánica** compuesta por **aminoácidos**, pequeños **péptidos** y **polipéptidos**, muy necesarios para la generación de proteínas y

componentes vitales, por lo que el nitrógeno es un factor clave para la multiplicación y la actividad fisiológica de las levaduras.

La concentración en el medio, va a estar ligada estrechamente con el estado de madurez, la vid, la zona de cultivo, densidad de plantación, fertilizaciones y condiciones climáticas del año. Por lo que posiblemente ha de ser necesario en algunas ocasiones, realizar correcciones de nitrógeno prontamente asimilable al mosto (NPA) ya sea en formato **orgánico, inorgánico o combinaciones**, para restaurar parcialmente la síntesis proteica y generar una reactivación en el transporte de azúcares. Dicho transporte se lleva a cabo mediante enzimas permeasas que regulan los ingresos y egresos, a través de la membrana plasmática y ser posteriormente metabolizados.

La levadura absorbe rápidamente el nitrógeno del medio, rondando valores que van del 50 al 80% siendo metabolizado en las primeras 10 a 15hs. Obviamente no todas las cepas son igualmente reactivas frente a las fuentes nitrogenadas.

Es importante destacar que estos microorganismos tienen una mayor afinidad y poder de asimilación por los compuestos **inorgánicos** (amonio), el ingreso de este compuesto a la célula a diferencia de los aminoácidos conlleva un determinado gasto energético, mediante un correcto funcionamiento de la membrana, la cual se verá ciertamente influenciada ante la presencia de alcohol en el medio.

Una condición nutritiva óptima va a depender primordialmente de las necesidades de cada cepa y sobre todo del tipo de nutriente disponible en el medio, generando no solo una buena cinética fermentativa, con mayor presencia de biomasa y resistencia, sino que también, permitiendo que la levadura desarrolle todo su potencial enológico.

El nitrógeno es un substrato limitante para el crecimiento y la multiplicación celular, aunque este va a depender primordialmente de la **fente nitrogenada asimilada**, ya que la levadura es capaz de sintetizar solo los compuestos necesarios para poder crecer y desarrollarse en el medio. La concentración y composición del nutriente utilizado son de vital importancia, no solo para el metabolismo, sino también a nivel sensorial, por las cualidades y los compuestos



aromáticos que se pueden obtener durante el transcurso de la fermentación alcohólica.

Se puede observar en varias investigaciones y comparaciones realizadas por (Torrea 2011; Barbosa 2012; Barbosa 2009) [7,8,9] que las suplementaciones con diversas fuentes nitrogenadas tanto en vinos blancos como tintos, generan grandes efectos en la concentración de sustancias volátiles y no volátiles, presentes en los finales de fermentación, las cuales, en su totalidad, hacen de la complejidad de un vino, tanto para enriquecerlo u opacarlo. Entre ellos podemos citar; **alcoholes superiores, ácidos grasos de cadena media, ácidos de cadena ramificada, esterres etílicos, esterres de acetato y esterres etílicos de ácidos grasos de cadena media.**

No solo se observan cambios a nivel sensorial, sino que también una mayor tasa de crecimiento celular y actividad enzimática, con diferentes fuentes nitrogenadas (Godoy Danesi 2006) [10]. Por lo que el uso de diferentes fuentes nutritivas, da como resultado la producción de divergentes perfiles aromáticos y cinéticas fermentativas (Barbosa 2012) [8].

### **Factores que modifican la concentración**

Los contenidos de dichas sustancias, pueden variar fuertemente según las condiciones climáticas del año, entre ello podemos citar; la pluviometría y, sobre todo, el ciclo fenológico de la vid, ya que una carencia de madurez, incrementa los valores de compuestos nitrogenados en general.

Otros factores que modifican la composición son; el tipo de suelo cultivado, la fertilización otorgada, el varietal, su portainjerto y el estado sanitario de la materia prima.

### **Mecanismo de asimilación**

Es un mecanismo de selección, que se lo conoce como represión catabólica por nitrógeno (NCR), la cual se caracteriza por ser una capacidad celular, de detectar la presencia de fuentes nitrogenadas y desencadenar una serie de señales, que culminan con la activación de los genes involucrados en el transporte y metabolismo de fuentes altamente nutritivas. Tienen la capacidad de generar una represión de aquellos genes implicados en el transporte y utilización de fuentes más pobres nutritivamente.

El nitrógeno es incorporado a otros compuestos nitrogenados, que pueden ser tanto estructurales como funcionales, citando; aminoácidos, péptidos, polipéptidos, proteínas y vitaminas.

### **Amonio**

Puede estar suplementado de forma exógena como un nutriente comercial (fosfato diamónico - sulfato de amonio) o derivado de la degradación catabólica de otros compuestos nitrogenados del medio, obteniendo así, **iones amonio** ( $\text{NH}_4^+$ ), los cuales pueden asimilarse directamente a algunos aminoácidos (glutamato o glutamina), los cuales se comportan como donadores del grupo amino, hacia otros aminoácidos.

La vía de asimilación es llevada a cabo gracias a enzimas; glutamato deshidrogenasa, glutamina sintetasa y glutamato sintetasa, que se encargarán de obtener **glutamina**, importante precursor de varias vías metabólicas como; asparagina, triptófano, arginina, histidina, entre otros.



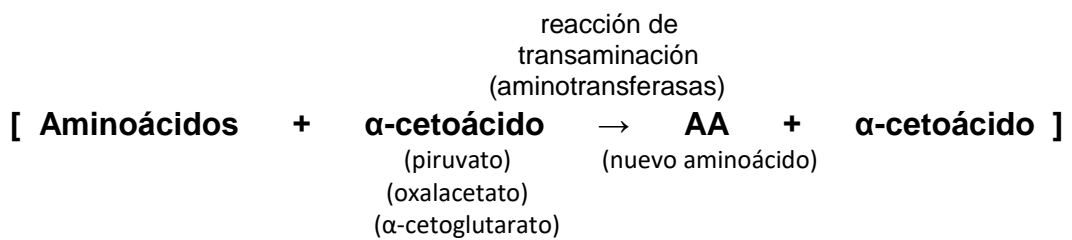
Este aminoácido formado, puede reaccionar con otros compuestos  $\alpha$ -cetoácidos, para transferir el grupo amino a un nuevo aminoácido (transaminación).

### **Aminoácidos**

A la inversa del nitrógeno amoniacal, la concentración aminoácidos, se ve en aumento a medida que transcurre la maduración fenológica de la vid. El valor nutricional de estos compuestos, es muy superior en comparación de una sustancia inorgánica (**amonio**), por lo que desempeñan una función fundamental durante el transcurso de la fermentación alcohólica para la síntesis proteica de las levaduras (Kato 2011) [11], ya que durante el transcurso de la primera fermentación se puede evidenciar notables alteraciones en las concentraciones de los mismos, a modo de ejemplo se puede citar un estudio realizado por (Gutierrez 2015) [4] donde prueba que la presencia de **arginina**, no solo afecta generando un incremento de la biomasa, sino que también acelerando la cinética fermentativa, e incluso otorgando un importante efecto osmoprotector en ***Saccharomyces Cerevisiae***, generando resultados muy positivos en

comparación con otros aminoácidos, en cuanto a la presencia de elevadas concentraciones de azúcares reductores (Noti 2018) [12].

El principal compuesto predominante es la glutamina, siguiendo arginina (osmoprotector nutricional), la cual permanece un mayor tiempo en el medio, permitiendo la viabilidad celular en finales fermentativos, este último, es precursor de ornitina, ácido aspártico, prolina (no asimilable) y ácido glutámico. Durante el transcurso de la maduración la prolina, sufre un cierto incremento y en menor medida serina y alanina. El resto de los aminoácidos, se mantienen estables en el tiempo. El catabolismo de estas sustancias, está compuesta por varias vías alternativas, en las que se incluyen reacciones de desaminación, transaminación y descarboxilación, obteniendo como producto final **NH<sub>4</sub><sup>+</sup>** y **glutamato**. Aunque no todos los aminoácidos, necesitan transaminarse.



Su asimilación se lleva a cabo de forma lenta y paulatina, siempre en función de las necesidades nutricionales que demanden las levaduras, por lo que, a diferencia del **amonio**, estos compuestos no generan altas poblaciones de levaduras, pero si, aportan un elevado valor nutricional.

Algunos **aminoácidos ramificados** como la **leucina**, **isoleucina** y **valina**, participan transformándose mediante la vía Ehrlich en aldehídos, gracias a reacciones de transaminación y descarboxilación. Los esqueletos carbonados desaminados ( $\alpha$ -cetoácidos), provenientes del proceso catabólico, antes de ser excretados al medio, son convertidos mediante vía metabólica Ehrlich, en **alcoholes superiores** o **ácidos de cadena ramificada**, dependiendo si hay una reacciones de reducción u oxidación y finalmente ser transformadas en sus correspondiente esteres aromáticos (etílicos o de acetatos), citando entre ellos; acetato 2-metil propilo, 2-metil propanoato de etilo, acetato 2-metil butilo, 2-metil butanoato de etilo, acetato 3-metil butilo o 3-metil butanoato de etilo, entre otros (Gutiérrez 2015; Torrea 2011; Reinal) [4,7,13]. Por tal motivo, los compuestos

aromáticos secundarios y/o fermentativos, derivan de forma directa o indirectamente del catabolismo de estas sustancias aminoacídicas.

Si bien, ***Saccharomyces cerevisiae*** no tiene necesidad de recibir aminoácidos para su alimentación, si es capaz de sintetizarlos en base a sus necesidades, aunque no todos puede ser asimilados de igual forma (Ribereau-Gayon 2003; Valero 2001) [5,14], como es el caso de la **prolina** que directamente no es asimilada por este tipo de microorganismos (Fornairon-Bonnefond 2002; Granés 2006; Bataillon 1996) [15,16,17].

En investigaciones más recientes, varios científicos pusieron a prueba el impacto de las concentraciones y composiciones de las fuentes nitrogenadas, utilizadas durante las diferentes fases de la cinética fermentativa, en base a la producción de sustancias volátiles agradables, y nuevamente pusieron en evidencia, que una adición de nitrógeno en mostos sintéticos, no solo estimula la cinética fermentativa, aumentando la biomasa de microorganismos y reduciendo los tiempos de fermentación, sino también contribuye en gran medida a la síntesis y complejidad del perfil aromático de un vino. (Gutiérrez 2015; Rapp 1995; Torrea 2011; Barbosa 2012; Barbosa 2009; Reinal; Granes 2006; Barrajon 2011; Šuklje 2016; Martínez-Moreno 2014; Pei-Tong 2018; Duc 2020) [4,6,7,8,9,13,16,18,19,20,21,22].

### **Clasificación según grado de absorción**

#### **Absorción rápida**

Arginina, ácido aspártico, asparagina, glutamina, isoleucina, leucina, lisina, serina, treonina

#### **Absorción lenta**

Ácido glutámico, alanina, histidina, metionina, fenilalanina, valina

#### **Absorción cuando no hay presencia de ninguno de los anteriores**

Glicina, triptófano, tirosina

#### **Absorción completamente nula**

Prolina

Tabla 1 - Listado alfabético de aminoácidos presentes en el vino

Arginina	Alanina	Ac. Glutámico
Ac. $\gamma$ -aminobutírico	Ac. Aspártico	Asparagina
Cisteína (Azufrado)	Fenilalanina	Glicina
Glutamina	Histidina	Isoleucina
Leucina	Lisina	Metionina (Azufrado)
Prolina (No asimilable)	Serina	Triptofano
Treonina	Tirosina	Valina

Fuente: Rivéreau-Gayon 2003 [5]

## Estructura molecular de (L-) Aminoácidos encontrados en el vino, según investigaciones científicas citadas al final de la biografía.

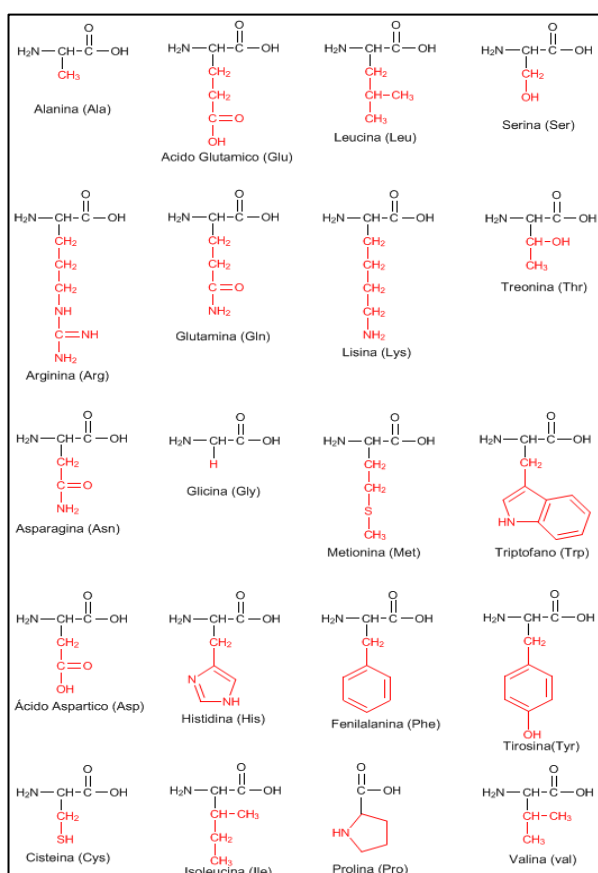


Figura 2 - Fernández, G. [Imagen]. [citado el 20 de febrero de 2021]

Fuente: <https://www.quimicaorganica.org/aminoacidos-peptidos/527-los-20-aminoacidos-que-componen-las-proteinas.html>

## Sobredosis nutritiva

Para ambos casos, tanto las sustancias orgánicas (aminoácidos) como inorgánicas (amonio) ya sea de forma natural o por agregados exógenos, en ningún caso es positivo valores exageradamente elevados, ya que no solo generaran un cierto efecto abrupto sobre la cinética fermentativa, con mayor cantidad de biomasa sin control, sino que también ocasiona una represión

indirecta de las sustancias aromáticas (ésteres), a causa de una inhibición retroalimentaria y un bloqueo enzimático, que conllevan a una anulación de la absorción aminoacídica, dejando una importante carga residual de sustancias nitrogenadas en el medio. Teniendo en cuenta dicho factor, la carga microbiana presente y los tenores azucarinos, no es un factor positivo, por la posibilidad que existe, de desarrollarse microorganismos indeseables en el medio, que generen un deterioro de la calidad sensorial del producto, con un incremento de la acidez volátil.

### **Carencia nutritiva**

La presencia de nutrientes es fundamental para el desarrollo y metabolismo de las levaduras, por lo que valores moderados de nitrógeno prontamente asimilable (NPA/NFA) son fundamentales para llevar a cabo la transformación de azúcares, rondando valores de 200-300 mg/lit.

La escasez conlleva a un consumo de sustancias de reserva, compuestas por aminoácidos, lo que genera la formación de sustancias volátiles desagradables, citando; ácido sulfhídrico, el cual se lo reconoce vulgarmente como olor a “huevo podrido”. Proveniente de una degradación de aminoácidos azufrados como la metionina o cisteína, generando la liberación de radicales azufrados, mediante la enzima cistein-desulfitasa, que en un medio ácido como lo es un mosto, libre de hidrogeniones ( $H^+$ ), se obtiene la formación de  $H_2S$ .

La generación de estas sustancias son un buen indicador sensorial, de posibles riesgos de paradas fermentativas, para estar alerta y realizar oportunas correcciones, teniendo en cuenta todos los inconvenientes enológicos y económicos que esto conlleva.

### **Dosis referenciales y estimativas**

30 gr/Hl (fosfato diamónico) → 60 ppm NPA

30 gr/Hl (levaduras inactivas) → 15 ppm NPA (4 veces menor aporte)

Como podemos evidenciar en los siguientes datos estimativos, según autores como Riverau-Gayon y Togores entre otros, los aportes de nitrógeno fácilmente o prontamente asimilables (NPA o NFA) son 4 veces mayor cuando se agregan sustancias exógenas de naturaleza inorgánica, normalmente comercializado

bajo forma de sales; fosfato diamónico o biamónico, en comparación con los nutrientes orgánicos derivados de las levaduras, (cortezas, levaduras inactivas, paredes celulares o mezclas comerciales).

Se debe destacar que, si bien el aporte es mucho menor, en relación a los valores generados de NPA, su valor nutricional es mucho mayor, para el metabolismo de las levaduras, ya que brinda todas las sustancias vitales para su desarrollo.

## **Efectos de la asimilación de nitrógeno**

### **Multiplicación celular (Biomasa)**

Se incrementa cuando las sustancias nitrogenadas son asimiladas al comienzo de la fermentación (durante fase exponencial). Una parte es incorporada en las proteínas estructurales, necesarias para la construcción de nuevas células.

Un exceso de sustancias nitrogenadas tanto de forma natural como exógena, ocasiona una elevada población de levaduras, con una gran tasa de mortalidad, a causa de una aceleración desmedida de la cinética fermentativa, con aumentos de temperaturas y competencias por la supervivencia en el medio. Provocando un rápido agostamiento de las sustancias nitrogenadas, alcanzando prontamente la carencia nutricional y liberando compuestos azufrados al medio.

### **Cinética fermentativa**

El nitrógeno permite la síntesis de proteínas que aseguran el transporte de azúcares hacia el interior de la célula donde serán transformados mediante la glucólisis, en alcohol (etanol).

Estas proteínas son degradadas durante todo el proceso fermentativo, necesitando una continua renovación para concluir la transformación, con la dificultad que conlleva poder absorber sustancias nitrogenadas en un medio, que paulatinamente se ve enriqueciendo en alcohol, toxinas y ausencia de oxígeno, lo cual explica, porque los aportes nutricionales tardíos, son menos eficaces, que un aporte temprano.

## **Compuestos aromáticos**

Conjunto de sustancias volátiles que componen organolépticamente un vino, cuyos tenores van a estar influenciados directamente por el medio fermentativo (presión osmótica, NPA, pH, Oxígeno, temperaturas, tiempo de fermentación) y sobre todo el metabolismo y la genética de la cepa de levadura utilizada.

El catabolismo y la dosificación de las sustancias nitrogenadas, como fuente nutritiva (aminoácidos ramificados) está estrechamente ligado a los compuestos volátiles generados durante el transcurso de la fermentación alcohólica, citando; alcoholes superiores, ácidos de cadena ramificada, esteres de acetato, esteres etílicos y esteres etílicos de ácidos grasos de cadena media.

## **Alcoholes superiores**

Su biosíntesis se lleva a cabo en la vía Ehrlich durante la fermentación alcohólica, mediante reacciones de transaminación y descarboxilación de aminoácidos ramificados, obteniendo un compuesto intermedio con un grupo carbonilo (aldehído), el cual sufrirá una “reducción” para la obtención de su correspondiente alcohol superior.

Su concentración en el medio va a estar ligada a dos factores; turbidez (NTU), ya que valores extremadamente bajos, conllevan a un arrastre de sustancias nitrogenadas (NPA) provocando una carencia nutricional con mayor presencia de alcoholes superiores y el factor temperatura ya que valores fermentativos demasiado elevados, ocasionan un aumento abrupto de la cinética, con mayor producción de alcoholes superiores. Esto va a depender de la genética de cada cepa de levadura empleada, los genes implicados en llevar a cabo la biosíntesis de estas sustancias son: GAP1, BAP2, BAT1, BAT2, PDC1, PDC5, PDC6, PDC10, ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH5 y ARO10.

La presencia en bajas concentraciones (<300 ppm), presentan cierto carácter acomplexante, pero en dosis elevadas, produce un efecto totalmente opuesto. Entre ellos podemos citar;

- Metionol
- Propanol
- Pentanol
- 4-metil pentanol



- 3-metil pentanol
- Isobutanol
- Butanol
- 2-feniletanol
- Heptanol
- Octanol (Alcohol Caprílico)
- Hexanol (Alcohol Caproico)
- 2-metil propanol (Isobutanol)
- 2-metil butanol (Alcohol Amílico)
- 3-metil butanol (Alcohol Isoamílico)

### Ácidos de cadena ramificada

La biosíntesis de estas sustancias está estrechamente ligada a la vía de obtención de alcoholes superiores (Ehrlich), ya que es semejante hasta la obtención de un aldehído, variando solamente en la última reacción, que en vez de ser una “reducción”, se produce una “oxidación”. Otorgando compuestos con olores fuertes y negativos que recuerdan a mantequilla agria y notas rancias.

- Ácido butanoico
- Ácido 2-metil propanoico (Ácido Isobutírico)
- Ácido 2-metil butanoico
- Ácido 3-metil butanoico (Ácido Isovalérico)

### Ésteres de acetato

La formación de ésteres aromáticos, se llevan a cabo durante la fermentación alcohólica como resultado final de la vía Ehrlich (Figura 3), mediante la interacción del AcetilCoA con un Alcohol Superior en un medio ácido (mosto), gracias a la acción de las enzimas Alcohol Acetil Transferasas, codificada por los genes ATF1, ATF2, EEB1 y EHT1.

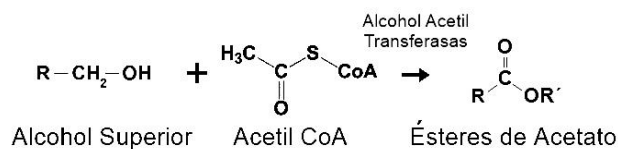


Figura 3 - Biosíntesis de ésteres de acetato

Fuente: Elaboración propia

Responsables de proporcionar olores frutales y florales muy agregables, que recuerdan a plátanos, manzanas, peras, naranjas, rosas, etc. Estas sustancias tienden a disminuir rápidamente con el paso del tiempo, debido a reacciones hidrolíticas, las cuales están condicionadas por las temperaturas y el pH del medio. Entre ellas, se pueden citar;

- Acetato 3-metil butilo (Acetato de Isoamilo)
- Acetato 2-metil propilo (Acetato de Isobutilo)
- Acetato de amilo
- Acetato de 2-feniletilo
- Acetato metil propilo
- Acetato 2-metil butilo
- Acetato de hexilo
- Acetato de octilo
- Acetato de nonilo
- Acetato de geranilo

### Ésteres etílicos

Al igual que los esteres de acetato, también tienen un rol fundamental sobre los aromas vínicos, aportando notas frutales y tropicales, a partir de la degradación de aminoácidos ramificados vía Ehrlich (leucina, isoleucina, valina). Cuya síntesis se lleva a cabo mediante las enzimas Alcohol Acil Transferasas, y va a depender de los co-sustratos; AcilCoA y etanol (Figura 4).

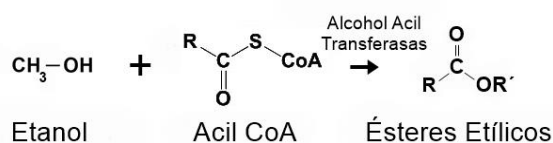


Figura 4 - Biosíntesis de ésteres etílicos

Fuente: Elaboración propia

A diferencia de otros esteres, tienen la capacidad de conservarse e incluso incrementarse muy lentamente en el tiempo, entre ellos se encuentran;

- 2-metil propanoato de etilo (Isobutirato de etilo)
- 2-metil butanoato de etilo (Butirato de etilo)
- 3-metil butanoato de etilo
- Isovalerianato de etilo

## Ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena media

Sustancias volátiles formadas (Figura 5) a partir de etanol y ácidos grasos de cadena media con un grupo acilo Coenzima A (MCFA-CoA), gracias a la acción de las etanol acil transferasas.

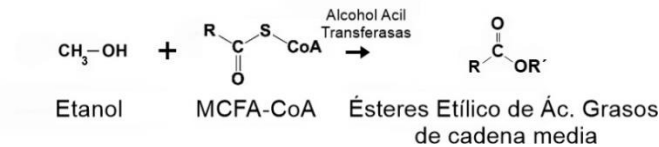


Figura 5 - Biosíntesis de ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena media (MCFA)

Fuente: Elaboración propia

Al igual que los esteres de alcoholes superiores (esteres de acetato), también tienden a disminuir en el tiempo, pero de una forma más paulatina y sin desvanecerse en su totalidad. Aportando aromas muy frutados y frescos, entre ellos se citan;

- Hexanoato de etilo (Caproato de etilo)
- Octanoato de etilo (Caprilato de etilo)
- Decanoato de etilo (Caprato de etilo)
- Propanoato de etilo (Propionato de etilo)
- Butanoato de etilo (Butirato de etilo)

## Metabolismo genético

Como se puede evidenciar tanto los constituyentes como la nutrición en sí, son factores fundamentales para el desarrollo de las levaduras. Los compuestos aromáticos secundarios y/o fermentativos, se ven muy influenciados por los constituyentes del mosto y sobre todo por la revelación y expresión de los **genes** de la levadura, encargados de sintetizar y asimilar ciertos compuestos amoniacales y aminoácidos, como la **leucina**, **isoleucina** y **valina** (aminoácidos ramificados).

Entre ellos podemos citar permeasas; **GAP1**, **BAP2**, **BAP3**, alcohol deshidrogenasas; **ADH1**, descarboxilasas; **PDC1**, **ARO10** y aminotransferasas; **BAT1** y **BAT2** que son los genes responsables de transaminar aminoácidos y biosintetizar **alcoholes superiores**, que finalmente serán convertidos en esteres aromáticos, mediante enzimas etanol acil y acetil transferasas codificadas por **ATF1**, **ATF2**, **EEB1** y **EHT1** (Pei-Tong 2018) [21].

Como se puede observar en el siguiente grafico resumen (Figura 6) las vías metabólicas de las levaduras, son netamente complejas y en cadena. Por lo que la obtención de un compuesto aromático, conlleva la transformación y/o desviación de miles de reacciones bioquímicas, tanto para llevar a cabo la transformación de azúcares, como la obtención de energía, supervivencia, competencia o multiplicación celular.

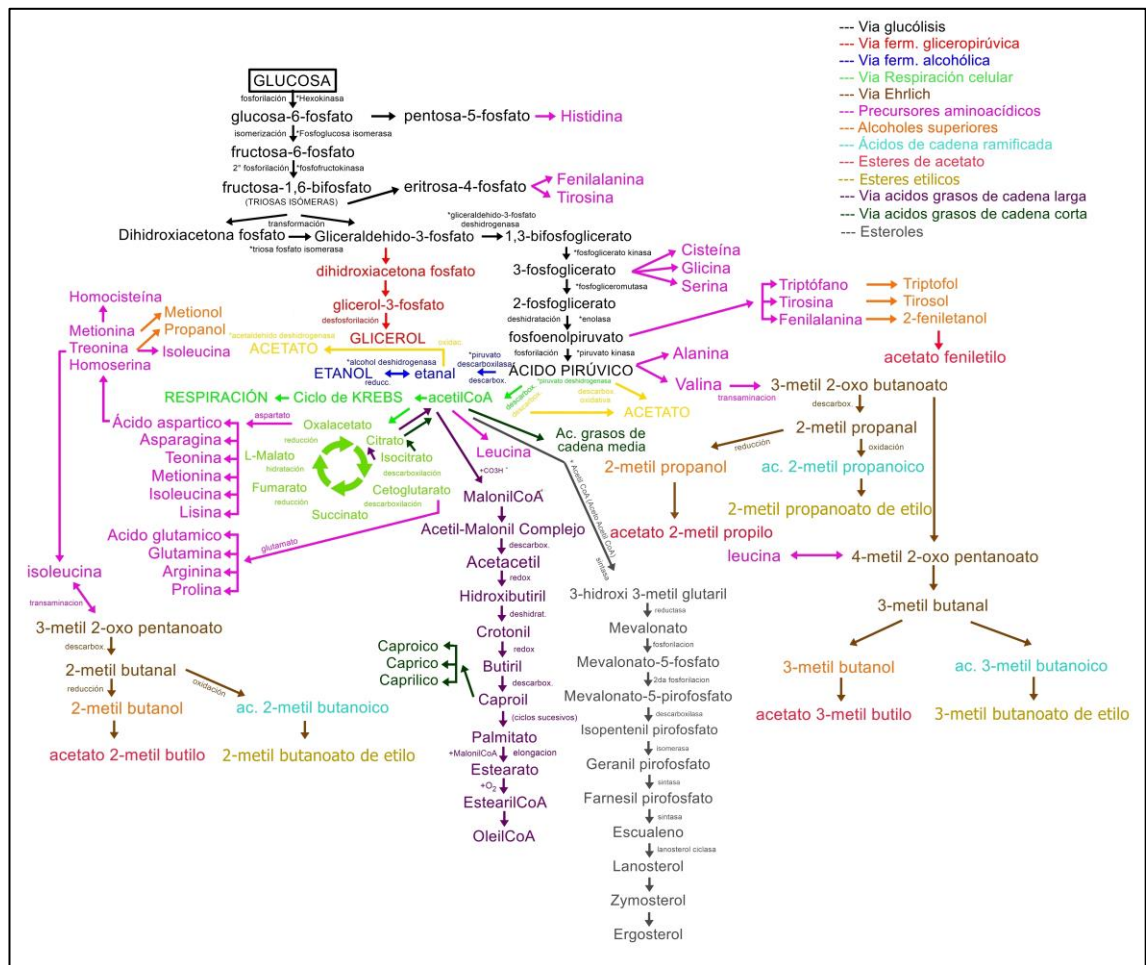


Figura 6 - Esquema adaptado por Federico Miguel Muñoz, sobre el metabolismo fermentativo de la levadura & "Concentración of the main volatile fermentation products associated with the Ehrlich pathway"

Fuente: Torrea 2011 [7]

Es decir, que son múltiples los factores y reacciones, que influyen de forma directa o indirectamente sobre el perfil volátil de un vino, además de su genética en sí (Tabla 2). Teniendo en cuenta que todo esto, se lleva a cabo en simultáneo durante el desarrollo de la fermentación alcohólica.

Tabla 2 - Sustancias aromáticas fermentativas, producidas por *Saccharomyces Cerevisiae*

GENES CODIFICADORES	Reacciones de obtención	Aromas	Nomenclatura IUPAC
GAP 1 / BAP 2 / BAP 3 (permeasas) BAT 1 / BAT 2 (aminotransferasas) PDC 1 / PDC 5 / PDC 6 / ARO 10 (descarboxilasas) ADH 1 / ADH 2 / ADH 3 / ADH 4 / ADH 5 (alcohol deshidrogenasas)	Transaminación → Descarboxilación → Reducción	Alcoholes Superiores	Metionol Octanol (alc. caprílico) Hexanol (alc. caprílico) 2-metil propanol (isobutanol) 2-metil butanol (alc. amílico) 3-metil butanol (alc. isoamílico) 2-fenil etanol
	Transaminación → Descarboxilación → Oxidación	Acidos de cadena ramificada	Ac. 2-metil propanoico Ac. 2-metil butanoico Ac. 3-metil butanoico (ac. isovalerico)
ACC 1 FAS 1 OLE 1	Condensación repetitiva de AcetilCoA en cadenas de acidos grasos, liberandose prematuramente	Acidos grasos de cadena media	Ac. Hexanoico (caprílico) Ac. Decanoico (cáprico) Ac. Octanoico (caprílico) Acetato 3-metil butilo (acetato de isoamilo) Acetato de amilo Acetato 2-feniletilo Acetato metilpropilo Acetato 2-metilpropilo (acetato de isobutilo) Acetato 2-metil butilo Acetato de etilo Acetato de hexilo
ATF 1 / ATF 2 (alcohol acil transferasas) EEB 1 / EHT 1 (etanol acil transferasas)	Alcohol Superior + AcetilCoA (mediante enzimas alcohol acetil transferasas)	Esteres de acetato	2-metil propanoato de etilo (isobutirato de etilo) 2-metil butanoato de etilo (butirato de etilo) 3-metil butanoato de etilo
	Etanol + AcilCoA (mediante enzimas alcohol acil transferasas)	Esteres etilicos	Hexanoato de etilo (caproato de etilo) Octanoato de etilo (caprilato de etilo) Decanoato de etilo (caprato de etilo) Propanoato de etilo (propionato de etilo) Butanoato de etilo (butirato de etilo)
	Ac. grasos de cadena media-CoA + Etanol (mediante Acil-CoA deshidrogenasa o etanol acil transferasas)	Esteres etilicos de acidos grasos de cadena media	

Fuente: elaboración propia, mediante recopilaciones de artículos científicos

Es importante destacar que no solo los nutrientes orgánicos e inorgánicos son únicamente importantes para el desarrollo de las levaduras, también se deben citar; **vitaminas, ácidos grasos de cadena larga, esteroides** y sobre todo el **oxígeno**, que de igual forma intervienen y favorecen el proceso fermentativo.

Primordialmente el oxígeno es un factor fundamental para el desarrollo, ya que ***Saccharomyces Cerevisiae*** al encontrarse en un medio tan estresante y anaeróbico como lo es la fermentación alcohólica, necesita del mismo para la biosíntesis lipídica de esteroides y ácidos grasos insaturados de cadena larga, factores de supervivencia que ayudan a enriquecer sus membranas plasmáticas y favorecer el intercambio con el medio, pudiendo así incrementar la viabilidad celular y por consiguiente la biomasa (Valero 2001; Landolfo 2010; Fornairon-Bonnefond 2003) [14,23,24] que ante la presencia de nitrógeno disponible en el medio, ya sea de forma natural o adicionada, generara una mayor efectividad sobre la vitalidad y el desarrollo de las mismas (Sablayrolles 1996) [25].

En el caso de las sustancias **vitamínicas**, actúan de cofactores, ya que las levaduras son capaces de sintetizarlas por sí mismas, ante una carencia en el medio, la **tiamina**, entre otras, es una de las más importantes, ya que un aumento de su concentración, ocasiona un incremento de la biomasa y por consiguiente de la tasa fermentativa, también se pueden citar efectos de la **biotina** que actúa como un cofactor de carboxilasas, involucradas en el metabolismo de carbohidratos (Bataillon 1996; Perez-Vazquez 2005) [17,26] revelando el importante impacto vitamínico que existe de estas sustancias.

## Capítulo II

### Planteo de hipótesis

El uso de diferentes nutrientes durante la etapa de fermentación, ya sean de naturaleza orgánica, inorgánica o mixta, producen diferencias significativas en los perfiles aromáticos de un vino terminado.

### Justificación y relevancia

Poder tener la posibilidad de variar en tipo de nutriente utilizado durante la etapa fermentativa, no solo por las diferencias que este puede otorgar sensorialmente, sino que también, tener un mayor margen de costos variables por elaboración, teniendo en cuenta que se está hablando de productos nitrogenados de elevado valor comercial, con importantes segmentos de precios según su composición.

### Objetivo general

- Analizar el impacto que tiene la nutrición de la levadura ***Saccharomyces Cerevisiae*** durante la fase fermentativa, sobre los compuestos aromáticos secundarios generados en un vino tinto.

### Objetivos específicos

- Determinar si existen diferencias significativas sensoriales y químicas entre los tratamientos realizados.
- Poder combinar diferentes tipos de nutrientes, para optimizar la cinética fermentativa y disminuir costos de producción, a causa de dosificaciones genéricas, con posibles carencias o sobredosis.

### Diseño, población y muestreo

Actualmente existe un paradigma de que los aromas fermentativos están ligados a la genética de la cepa de levadura empleada. Por lo que esta investigación, consta de un enfoque aplicado y experimental, para poder resolver dichos paradigmas de aromas secundarios tan buscados enológico, para el consumidor de vino. Los atributos de los tratamientos se determinaron previamente en una mesa redonda de degustación, compuesta por 5 panelistas expertos y posteriormente analizados por un grupo de 15 panelistas entrenados.

Donde se analizó visual, olfativa y gustativamente y mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con un 5% significancia, prueba de Tukey y diferencias de medias (Fisher) se determinaron las diferencias significativas percibidas.

## **Recolección y molienda**

Se implementó un mosto de uva Cabernet Sauvignon 2019 recolectado de forma manual en tachos plásticos de aproximadamente 20 kilogramos, proveniente de viñedos conducidos por espaldero, ubicados en la zona este de Mendoza, distrito Barriales a metros de la ciudad de Junín. El traslado del producto, se llevó a cabo implementando el uso de carpas, hasta su llegada a la bodega, la cual se ubica en la región de Lujan de Cuyo – Ciudad de Mendoza, Argentina.

Se procedió a realizar una selección de racimos que se encontraran en óptimo estado sanitario, para posteriormente realizar una homogeneización de los mismos en un bin plástico de 600 lts., previamente llevado a cabo mediante el uso de una despalladora-estrujadora ENOVENETA TOP15A.

Una vez movilizado todo el producto, gracias a una bomba de vendimia a pistón, se procedió al llenado de 8 vasijas plásticas de 25 litros de capacidad, las cuales fueron con antelación desinfectadas y taradas, para obtener exactamente 19,5 kg/vasija, con el fin de lograr que las relaciones solido/liquido sean lo más equitativas posible.

Una vez finalizado el llenado, se procedió a realizar un sulfitado, con metabisulfito de potasio a razón de 9,5 gr/hl para evitar un desarrollo de microorganismos indeseables en el medio, principalmente de levaduras indígenas. Al día siguiente, se toma muestras de las vasijas para realizar un análisis químico del mosto, el cual fue brindado por la empresa MAG SRL según los métodos analíticos establecidos por la OIV, arrojando los siguientes valores; primordialmente; 249 mg/lit de nitrógeno prontamente asimilable (NPA), pH 4.26, 23.8 °Brix y una acidez total de 3.01 gr/lit expresado en ácido tartárico.

Tomando en cuenta los valores observados, rápidamente se procedió a corregir el pH, utilizando ácido tartárico natural, con una pureza del 99,8 %, comercializado por la empresa Derivados Vínicos SA, con una dosis de 6 gr/lit para obtener valores próximos a 3.6 - 3.7.

## **Fermentación alcohólica**

Posteriormente al llenado, se preparó el pie de cuba con una sola cepa de levadura seca activa (LSA), previamente hidratada según protocolo establecido por la empresa proveedora Oenobrand SAS, la cual se designará en todo



momento durante la investigación, bajo las siglas “SCA4”. Las dosis utilizadas por cada vasija, fueron de 40 gr/HI y se inoculo a una temperatura inicial de 10°C.

Al día siguiente, se observó que la temperatura en cada recipiente (Figura 7) se había incrementado levemente arrojando valores que superaban los 10°C iniciales, rondando los 12-13 °C y una lectura expresada en grados Baume de 13, por lo ya se observaba actividad metabólica. Si se toma en cuenta los 23,8° Brix iniciales obtenidos analíticamente, se estaría frente a un alcohol potencial de aproximadamente 14% v/v.

Transcurridas 24 horas, no solo se ratificó la actividad fermentativa por la presencia de anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>) y la correspondiente formación del sombrero, sino también, por los valores arrojados en las lecturas de grados baume, que arrojaban valores por debajo de 12°B.



*Figura 7 - Vasijas de fermentación correctamente identificadas.*

*Fuente: Registro propio*

La fermentación en sí, se prolongó aproximadamente 12 días para llegar a rastro de azúcar, donde diariamente se realizaron remontajes en forma de pissages para hundir el sombrero e intervenir lo menos posible, sin generar una excesiva fricción del hollejo. Luego se procedía a tomar lecturas de temperatura y baume para analizar la cinética fermentativa, donde se corroboro que las temperaturas



diarias en cada microvinificación siempre oscilaron entre los 12°C a 14°C sin sobresaltos y el consumo de azúcares fue regular en los 8 ensayos realizados. Se observó un leve adelanto fermentativo en las elaboraciones identificadas como “R2” y “R4”, acercándose más rápidamente al azúcar residual, pero prácticamente la cinética fermentativa en general, fue regular en todas las vinificaciones.

### **Nutrición**

Una vez iniciado el proceso fermentativo a las 48 hs, se procedió a realizar el agregado de nutrientes, es aquí donde se focalizará el centro de la investigación, por tal motivo se determina este primer tiempo de agregado, para asegurar que el medio ya se encuentre dominado en su totalidad por la cepa de levadura inoculada “SCA4” y así evitar desviaciones, con el destino nutritivo.

La dosis utilizada fue de 30 gr/Hl la cual fue fraccionada en 2 etapas de 15 gr/hl cada una, la primera al 2<sup>do</sup> día de iniciada la fermentación alcohólica y el resto, en el promedio de fermentación.

Para el agregado de cada etapa, se utilizó una balanza granataria, para pesar la dosis determinada de cada nutriente, la cual se diluyo 1/10 partes de agua, a temperatura ambiente y se procedió a realizar el agregado, unitariamente vasija por vasija, aprovechando los remontajes realizados para su correcta homogeneización.

### **Tratamientos**

#### **Tipos de nutrientes**

Se realizaron 8 microvinificaciones, de las cuales comprenden los 4 ensayos con sus correspondientes duplicados, para asegurar una repetitividad en la investigación. Las dos primeras elaboraciones identificadas con las letras “TK1” y “R1” simbolizan la muestra testigo inicial y su respectiva repetición, a las cuales no se le realizaron ningún agregado exógeno, simplemente tuvieron su (NPA) natural obtenido desde el viñedo, es decir 249 mg/lit de nitrógeno prontamente asimilable. En cambio, las muestras marcadas como “TK2” y “R2” se procedió a realizar un agregado de nitrógeno inorgánico, en forma de 100% fosfato diamónico.

El resto de las vinificaciones también se dosificaron de nitrógeno exógeno, pero bajo una forma orgánica, para el caso “TK3” y su repetición “R3” se utilizó 100% **levaduras inactivas** comercializadas por la empresa francesa Lallemand, y para las últimas muestras “TK4” y “R4” se trataron con un **preparado comercial** fabricado por la empresa AEB Group de origen italiano, el cual estaba compuesto básicamente por; fosfato diamónico, cortezas de levaduras, tiamina, pantotenato y celulosa, el cual designaremos en todo momento, como el nutriente más complejo, en cuanto a su composición. En el siguiente cuadro se observa detalladamente como se procedió a realizar el agregado de las dosis pre-establecidas (Tabla 3).

Tabla 3 - Diagrama de agregados nutritivos

N°	Tipo	2° día de fermentación	Promedio fermentación	Dosis total
TK 1	Testigo (249 mg/lit NPA)	Sin agregado	Sin agregado	Testigo
R1	Testigo (249 mg/lit NPA)	Sin agregado	Sin agregado	Testigo
TK 2	Fosfato diamónico (FD)	15 gr/Hl	15 gr/Hl	30 gr/Hl
R2	Fosfato diamónico (FD)	15 gr/Hl	15 gr/Hl	30 gr/Hl
TK 3	Levaduras inactivas (LI)	15 gr/Hl	15 gr/Hl	30 gr/Hl
R3	Levaduras inactivas (LI)	15 gr/Hl	15 gr/Hl	30 gr/Hl
TK 4	Mezcla comercial (MC)	15 gr/Hl	15 gr/Hl	30 gr/Hl
R4	Mezcla comercial (MC)	15 gr/Hl	15 gr/Hl	30 gr/Hl

Fuente: Elaboración propia

### Descube y prensado

Una vez finalizado el proceso fermentativo al transcurso de 12 días, se realizaron los desvines correspondientes, por desnivel, utilizando los grifos inferiores de las vasijas, trasvasando el vino obtenido a damajuanas de vidrio, de 5 litros de capacidad, correctamente identificadas y separadas por tipo de nutriente utilizado. Para continuar con el prensado de los hollejos, se realizó de forma manual y suave para evitar grandes extracciones, recolectándose en botellas de vidrio, separadas del producto desvinado, evitando así, algún posible enriquecimiento polifenólico de forma indirecta por una sobreextracción durante el prensado, ocasionando inoportunamente alguna modificación sensorial que pudiese intervenir en la investigación.

### **Trasiegos y conservación**

Los ensayos experimentales se guardaron en forma vertical, cerrados correctamente, a una temperatura controlada, con valores que rondaron próximamente los 14 a 16°C bajo ambiente de bodega, al abrigo del aire, luz y humedad. Sin intervenciones físicas, ni movimientos de borras.

Transcurrido 2 meses de guarda, se realiza el primer (1º) trasiego del vino obtenido a bolsas herméticas (bag in box) de 3,5 litros de capacidad, identificados de una forma trazable de acuerdo al tratamiento realizado.

Al cabo de 3 meses posteriores en iguales condiciones de conservación, se efectuó el segundo (2º) y último movimiento del producto a nuevos envases bag in box identificados, e inmediatamente se realizó una corrección de SO<sub>2</sub> libre con metabisulfito de potasio, para llegar a valores de 40 ppm.

### **Análisis químico y correcciones**

Una vez estrujado y homogeneizado previamente el mosto, se realizó un análisis de nitrógeno prontamente asimilable (NPA), pH, grados Brix y acidez total, mediante técnicas analíticas internacionales establecidas y aprobadas por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) y el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV), ente regulador argentino.

Los valores arrojados fueron los siguientes; 249 mg/lit de NPA, pH 4.26, 23.8 °Brix y una acidez total de 3.01 gr/lit expresado en ácido tartárico. Por lo que inmediatamente se procedió a realizar una corrección de pH, empleando ácido tartárico natural comercializado por la empresa Derivados Vínicos SA, a razón de 6 gr/lit para obtener valores próximos a 3.6 - 3.7.

En cuanto al análisis químico final de la investigación, se llevó a cabo una vez realizado el segundo (2º) trasiego de las microvinificaciones, mediante un equipo Win and Grape Scan FT 120 – Foss, para uvas, mostos, vinos y FIAstar™ 5000 Analyzer para la obtención del anhídrido sulfuroso libre y total (SO<sub>2</sub>) para realizar las correcciones oportunas y elevar la fracción libre a 40 mg/lit mediante el uso de metabisulfito de potasio, elaborado y comercializado por la industria química Juan Messina SA.

La corrección se llevó a cabo bolsa por bolsa de Bag In Box (Figura 8), pesando exactamente cada dosis correspondiente, en una balanza analítica correctamente calibrada, en el laboratorio central de la Universidad Juan Agustín Maza.



*Figura 8 – Correcciones en laboratorio central de la Universidad Juan Agustín Maza.*

*Fuente: Registro propio*

## **Diseño metodológico**

### **Análisis sensorial descriptivo cualitativo**

Para poder continuar con el análisis sensorial de las microvinificaciones obtenidas, se realizó previamente una mesa redonda de degustación profesional, compuesta por 5 expertos que constituyen en la actualidad, el panel sensorial del Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV) perteneciente al Departamento de Estudios Enológicos y Sensoriales, para identificar mediante muestras codificadas, todos los atributos a medir en los 4 tratamientos en cuestión. Llevada a cabo en un laboratorio de análisis sensorial que cumple con los requisitos de norma IRAM 20003:95 acreditado por el organismo regulador argentino (OAA) donde se determinó y percibió, la siguiente lista.

- En **fase visual**: color granate, rojo y bordó.
- En **fase olfativa**: aromas que recuerdan a pimienta, pimentón dulce, mermelada de fruta, higo, ciruela pasa, frutos negros, chocolate y aceituna negra.
- En **fase gustativa**: acidez, dulzor, amargor y astringencia.

Estos datos permitieron elaborar una planilla de degustación online y específica, para analizar los resultados sensoriales de la investigación, mediante el uso de la plataforma **Google Forms** (software administrativo de encuestas) creado por la empresa multinacional Google. Dicha planilla fue otorgada a cada miembro del panel, compuesto por panelistas entrenados.

### Panel Sensorial

Se utilizó dos paneles sensoriales para la obtención de datos, el primero conformado por 5 panelistas profesionales, que componen el área de investigación y análisis sensorial del Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV) con el cual se realizó la búsqueda de todos los atributos a analizar y el segundo constituido por 15 estudiantes entrenados, que se encuentran finalizando el 4<sup>to</sup> año de la carrera Licenciatura en enología, en la Universidad Juan Agustín Maza. Con un total de 15 panelistas entrenados (6 mujeres y 9 hombres), se procedió a entregar a cada participante un total de 8 frascos de vidrios codificados, que contenían los 4 tratamientos en cuestión y sus correspondientes repeticiones, siendo cada uno de 30ml de capacidad y de color ámbar, para la preservación de las características sensoriales del vino a analizar. A continuación, se observa un cuadro resumen, con todos los tratamientos realizados y sus correspondientes códigos (Tabla 4).

*Tabla 4 - Codificación de tratamientos*

*(T\*=Testigo; FD\*= Fosfato Diamónico; LI\*= Levaduras Inactivas; MC\*=Mezcla Comercial)*

Muestras	Tratamientos	Códigos
TK1	T	718
R1	T	684
TK2	FD	627
R2	FD	954
TK3	LI	295
R3	LI	613
TK4	MC	592
R4	MC	257

*Fuente: Elaboración propia*

Acompañado de una planilla de degustación online y un link virtual, se redirecciono a cada panelista, el formulario donde figuraban discriminados todos los atributos previamente identificados por el panel profesional citado.

La planilla estaba diseñada exclusivamente para analizar sensorialmente, muestra por muestra, en cuanto a la intensidad percibida, en una escala del 0 al 10, siendo cero (0) una percepción prácticamente nula.

Entre ella se encontraban los siguientes aromas predeterminados en la ronda de degustación profesional; pimienta, pimentón dulce, mermelada de fruta, higo, ciruela pasa, frutos negros, chocolate y aceituna negra.

La degustación se realizó en dos etapas, en primera instancia se degustaron los 4 tratamientos codificados, con un breve cuestionario al final, acerca de que muestra gusto más al panelista y que las ordene en forma decreciente en base a su agrado, siendo la primera muestra la que más gusto. Luego mediante un leve receso de 15 minutos para relajar los sentidos y beber un poco de agua, se continuó analizando las cuatro repeticiones correspondientes.

### **Análisis estadístico**

Para poder observar si existían diferencias significativas entre los tratamientos realizados, se implementó el análisis de la varianza (ANOVA) usando un nivel de significancia del 5%, es decir resultados con un valor de ( $P \leq 0,05$ ) mediante el software XLSTAT (versión 2014) complemento estadístico de Excel, a partir de los datos obtenidos en las planillas de degustación online entregadas a los panelistas de forma virtual. También se aplicó la Prueba de Tukey y el análisis de Diferencia Minina de Medias (Fisher) con el objetivo de determinar cuáles tratamientos difieren de manera significativa entre sí y en que atributo puntualmente.

### Capítulo III

#### Resultados

Desde el punto de vista cinético, la **fermentación alcohólica** mostro patrones regulares en todos los tratamientos y las temperaturas en general oscilaron entre 12 °C a 14 °C, por lo que puede observarse una variación constante de la misma. (Figura 9)

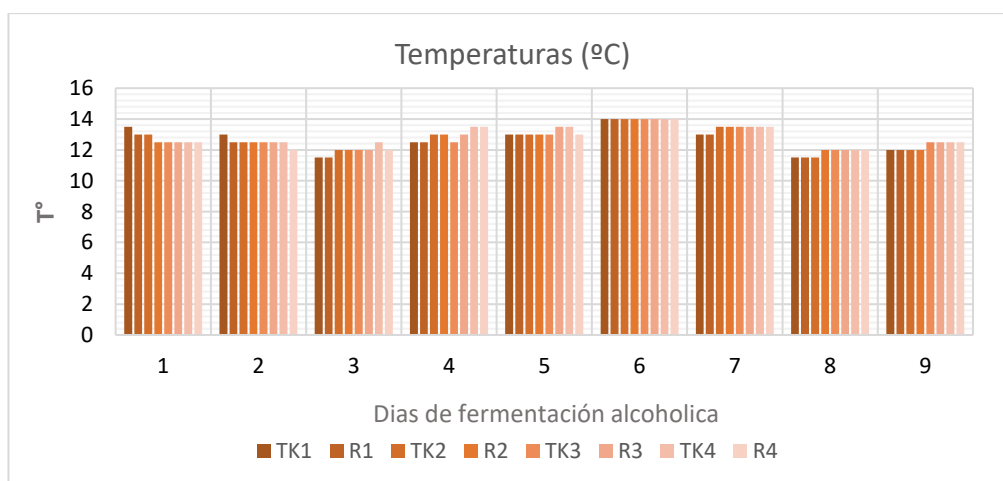


Figura 9 - Temperaturas obtenidas durante el transcurso de la fermentación alcohólica.

Fuente: Elaboración propia

Con respecto al consumo de azúcares según lecturas realizadas expresadas en grados baume (°B), pudo observarse una demanda similar respecto a los tratamientos bajo estudio, excepto para las muestras identificadas bajo las siglas “TK2”, “R2” y “R4” sobre todo al final de fermentación y más precisamente en el día 7, tuvieron un leve adelanto, alcanzando más rápidamente el rastro de azúcar, sin embargo y en términos generales los 4 tratamientos, con sus correspondientes replicas, tuvieron un comportamiento bastante regular.

Dicho salto cinético podría estar ligado a una veloz asimilación de la sustancia nitrogenada básica del tratamiento 2 (FD) recordemos que este, está compuesto en su totalidad por fosfato diamónico, nutriente inorgánico fundamental y preferido por las levaduras, para realizar sus procesos metabólicos.

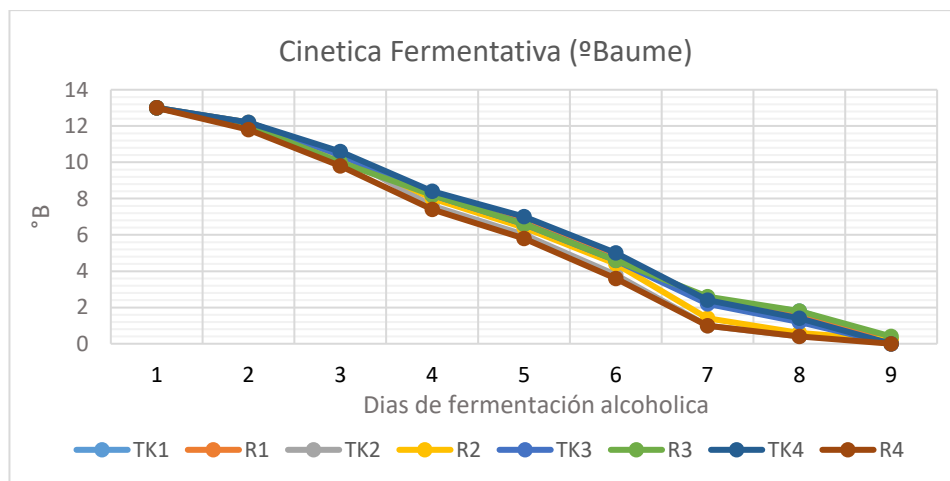


Figura 10 - Cinética fermentativa (consumo de azúcares reductores, expresado en grados baume).

Fuente: Elaboración propia

En el siguiente cuadro (Tabla 5) se detalla a modo de resumen todos los valores obtenidos durante el transcurso de la fermentación alcohólica, hasta su finalización, donde diariamente y al mismo horario, luego de un remontaje tipo passages, se procedía a realizar la toma de lecturas, expresadas en grados Baume (°B) y Celsius (°C). Las franjas resaltadas representan los días en los que se procedió a realizar el agregado nutritivo para cada tratamiento, siendo la dosis total utilizada de 30 gr/hl fraccionada en dos partes iguales de 15 gr/hl.

Tabla 5 - Cinética fermentativa de los tratamientos

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11
<b>TK1</b>	Pie de Cuba	13,5 °C 13 °B	13 °C 12 °B	11,5 °C 10,4 °B	12,5 °C 8,2 °B	13 °C 6,8 °B	14 °C 4,8 °B	13 °C 2,4 °B	11,5 °C 1,8 °B	12 °C 0,2 °B	0° Baume
<b>R1</b>	Pie de Cuba	13 °C 13	12,5 °C 12	11,5 °C 10,4 °B	12,5 °C 8,2 °B	13 °C 6,8 °B	14 °C 4,8 °B	13 °C 2,4 °B	11,5 °C 1,6 °B	12 °C 0,2 °B	0° Baume
<b>TK2</b>	Pie de Cuba	13 °C 13 °B	12,5 °C 12 °B	12 °C 10,4 °B	13 °C 7,6 °B	13 °C 6 °B	14 °C 3,8 °B	13,5 °C 1 °B	11,5 °C 0,4 °B	12 °C 0,2 °B	0° Baume
<b>R2</b>	Pie de Cuba	12,5 °C 13 °B	12,5 °C 12,2 °B	12 °C 10,4 °B	13 °C 8 °B	13 °C 6,4 °B	14 °C 4,4 °B	13,5 °C 1,4 °B	12 °C 0,6 °B	12 °C 0,2 °B	0° Baume
<b>TK3</b>	Pie de Cuba	12,5 °C 13 °B	12,5 °C 12,2 °B	12 °C 10,4 °B	12,5 °C 8,2 °B	13 °C 6,6 °B	14 °C 4,6 °B	13,5 °C 2,2 °B	12 °C 1,2 °B	12,5 °C 0 °B	0° Baume
<b>R3</b>	Pie de Cuba	12,5 °C 13 °B	12,5 °C 12 °B	12 °C 10 °B	13 °C 8,2 °B	13,5 °C 6,6 °B	14 °C 4,6 °B	13,5 °C 2,6 °B	12 °C 1,8 °B	12,5 °C 0,4 °B	0° Baume
<b>TK4</b>	Pie de Cuba	12,5 °C 13 °B	12,5 °C 12,2 °B	12,5 °C 10,6 °B	13,5 °C 8,4 °B	13,5 °C 7 °B	14 °C 5 °B	13,5 °C 2,4 °B	12 °C 1,4 °B	12,5 °C 0 °B	0° Baume
<b>R4</b>	Pie de Cuba	12,5 °C 13 °B	12 °C 11,8 °B	12 °C 9,8 °B	13,5 °C 7,4 °B	13 °C 5,8 °B	14 °C 3,6 °B	13,5 °C 1 °B	12 °C 0,4 °B	12,5 °C 0 °B	0° Baume

Fuente: Elaboración propia



Si se analiza el consumo de azúcares diario, puede observarse que en general, la demanda promedio de todas las microvinificaciones oscilaron 1,4 °B/día.

Es importante recordar en que instancia fueron agregados los compuestos nitrogenados, entre los días 4-5 y 7-8 ya que, si se analiza puntualmente el consumo de azúcares, en cada fracción de 15 gr/hl en esos días, es donde más demanda existió de azúcares reductores, obteniendo picos cercanos a 3°B (Figura 11).

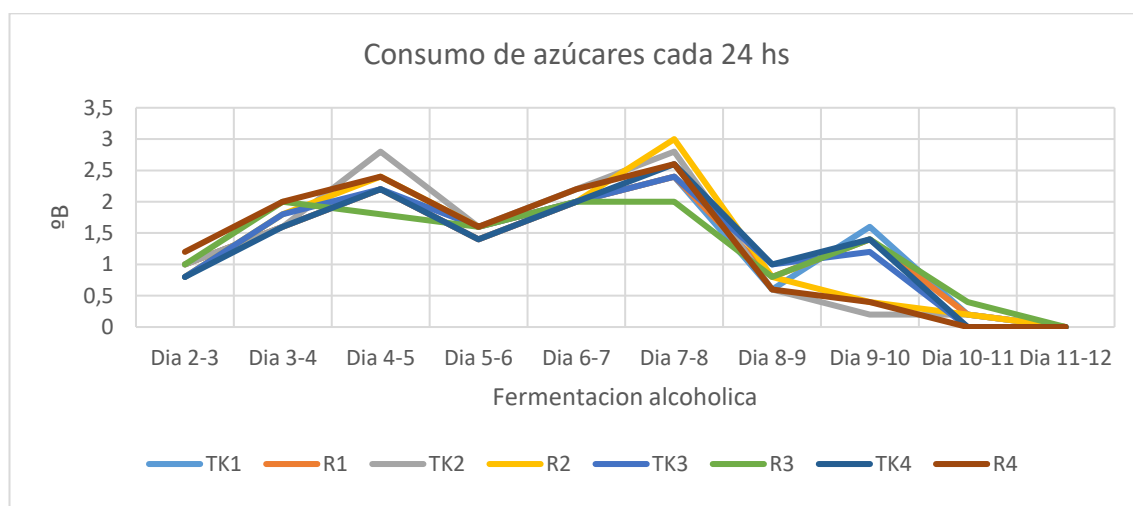


Figura 11 - Consumo de azúcares por día.

Fuente: Elaboración propia

En la (Figura 11) se visualiza claramente, el leve salto cinético citado anteriormente en los ensayos “TK2”, “R2” y “R4”, llegando más rápidamente a rastro de azúcar entre los días 9-10.

Tabla 6 - Consumo de azúcares diarios, expresado en grados baume (B°)

	Día 2-3	Día 3-4	Día 4-5	Día 5-6	Día 6-7	Día 7-8	Día 8-9	Día 9-10	Día 10-11	Día 11-12
<b>TK1</b>	1	1,6	2,2	1,4	2	2,4	0,6	1,6	0,2	0
<b>R1</b>	1	1,6	2,2	1,4	2	2,4	0,8	1,4	0,2	0
<b>TK2</b>	1	1,6	2,8	1,6	2,2	2,8	0,6	0,2	0,2	0
<b>R2</b>	0,8	1,8	2,4	1,6	2	3	0,8	0,4	0,2	0
<b>TK3</b>	0,8	1,8	2,2	1,6	2	2,4	1	1,2	0	0
<b>R3</b>	1	2	1,8	1,6	2	2	0,8	1,4	0,4	0
<b>TK4</b>	0,8	1,6	2,2	1,4	2	2,6	1	1,4	0	0
<b>R4</b>	1,2	2	2,4	1,6	2,2	2,6	0,6	0,4	0	0

Fuente: Elaboración propia

## Análisis químico

Los resultados **analíticos** indicaron que se obtuvieron vinos con una graduación alcohólica cercana a los 14% v/v, con leves variaciones en cuanto a la acidez total, oscilando entre los 6 - 6,7 gr/lit expresado en ácido tartárico, acidez volátil inferior a 0,4 gr/lit en ácido acético y una densidad uniforme en todos los tratamientos (Tabla 7). Los valores obtenidos de pH tuvieron una cierta variación aceptable de 3,5 a 3,7 con azúcares residuales, por debajo de 2,29 gr/lit. Lo que indicaría que todos los tratamientos, finalizaron correctamente la fermentación alcohólica, sin la presencia de paradas fermentativas.

Tabla 7 - Datos analíticos obtenidos en las microvinificaciones.  
(T\*=Testigo; FD\*= Fosfato Diamónico; LI\*= Levaduras Inactivas; MC\*=Mezcla Comercial)

Vasijas	Tratam.	Datos analíticos							
		Alc. %	Ac. Total	Ac. Volátil	pH	Densidad	Az. R.	Glicerol	Extrac.
TK1	T*	13,9	6,19	0,39	3,70	0,995	2,06	8,30	31,78
R1	T*	13,9	6,22	0,36	3,71	0,995	2,13	8,44	31,81
TK2	FD*	13,8	6,35	0,23	3,63	0,995	2,17	8,05	31,28
R2	FD*	13,9	6,24	0,29	3,64	0,995	2,12	8,45	31,36
TK3	LI*	13,9	6,28	0,31	3,68	0,994	2,13	8,23	31,29
R3	LI*	14,0	6,68	0,29	3,61	0,994	2,29	8,35	30,96
TK4	MC*	14,1	6,75	0,20	3,55	0,994	2,03	8,24	30,77
R4	MC*	13,9	5,81	0,34	3,70	0,994	2,01	8,09	30,66

Fuente: Elaboración propia

Analizando la fermentación gliceropirúvica, más conocida por su producto final; glicerol, se obtuvo un promedio de 8,27 gr/lit.  $\pm$  0,2. En general, los valores analíticos arrojados en la investigación, muestran un cierto patrón, con leves diferencias naturalmente aceptables, propias de la fermentación.

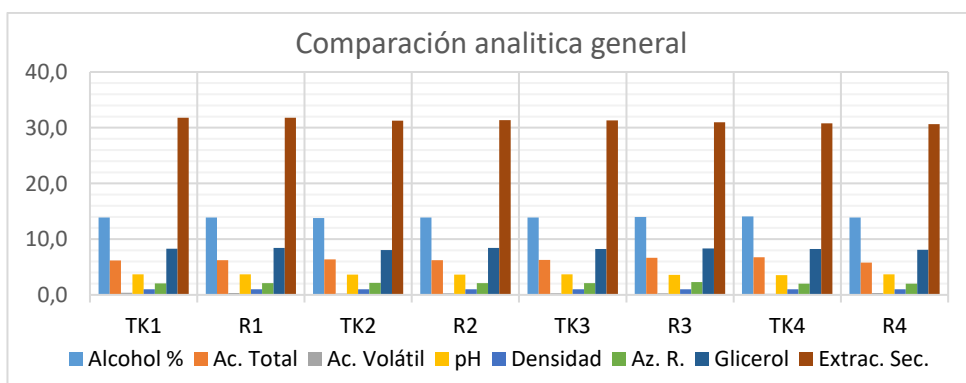


Figura 12 - Comparación de análisis químicos obtenidos por cada microvinificación.

Fuente: Elaboración propia

En los gráficos (Figura 12 y 13) se visualiza una comparación genérica de todos los análisis realizados, donde claramente se resalta un cierto patrón analítico.

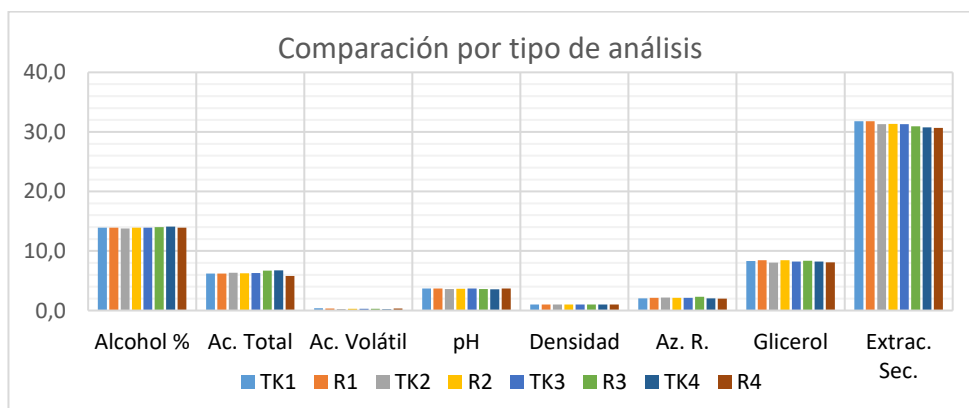


Figura 13 - Comparación discriminada por cada tipo de análisis químico.

Fuente: Elaboración propia

### Análisis sensorial

Los datos sensoriales se analizaron a través del análisis de la varianza (ANOVA), la Prueba de Tukey y el análisis de Diferencia Minina de Medias (Fisher), utilizando un nivel de significancia de  $\alpha = 5\%$ .

De un total de 14 variables sensoriales identificadas en los vinos bajo estudio (Figura 14), se concluye que existe diferencia significativa en 4 de 14 atributos (1 visual, 2 olfativos y 1 gustativo; “bordo”, “mermelada de frutas”, “frutos negros” y “dulzor”. Por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa, la cual expresa que un agregado de compuestos nutricionales durante la fermentación alcohólica, impacta organolépticamente sobre un vino terminado en determinados atributos. En otras palabras, se puede reafirmar varias investigaciones científicas llevadas a cabo desde la década del 90` (Torrea 2011; Rapp 1995; Barbosa 2012; Barbosa 2009) [1,7,12,21]. Estos autores indican que, la suplementación nitrogenada durante la fermentación alcohólica, es fundamental no solo para la cinética de las levaduras, sino también para influir positivamente en el perfil sensorial de un vino a producir.

Es importante destacar que, en cuanto a las repeticiones, no se observaron diferencias significativas, por lo que las condiciones de repetitividad fueron realizadas de forma correcta, sin alteraciones en los resultados entre los tratamientos.

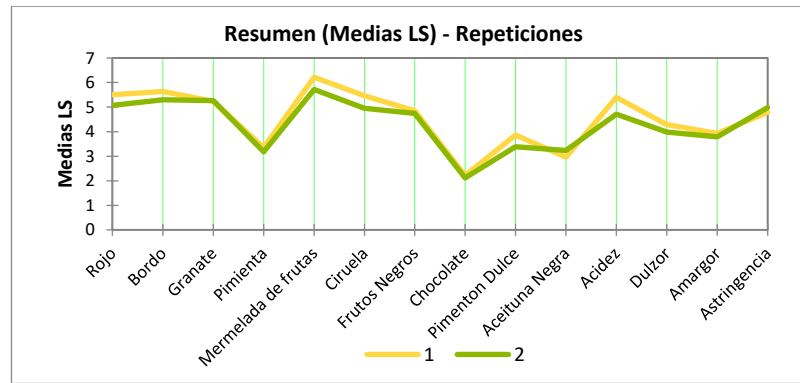


Figura 14 - Variabilidad de las repeticiones, en cuanto a los atributos sensoriales.

Fuente: Elaboración propia

A continuación, se puede observar (Figura 15) un resumen de los valores otorgados por ANOVA, desglosado en cada fase sensorial con su correspondiente atributo, los cuales fueron, previamente identificados por un panel de cata profesional en una rueda de degustación y otorgados a panelistas entrenados en forma virtual, mediante una planilla de degustación, con intervalos de 0 - 10 y un descanso entre repeticiones para evitar la fatiga sensorial. Como puede observarse (Tabla 8 y 9), los tratamientos arrojaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ), únicamente en 3 atributos; “bordó”, “frutos negros” y “dulzor”, a través del ANOVA. Cuando se analizar los datos con la prueba de Tukey y Diferencia Minina de Medias (Fisher) se observa que realmente existen diferencias en cuatro atributos; bordo, mermelada de frutas, frutos negros y dulzor. En cuanto a las 10 variables restantes, también se visualiza una cierta disparidad, pero en menor tenor, el cual no llega a ser estadísticamente significativo.

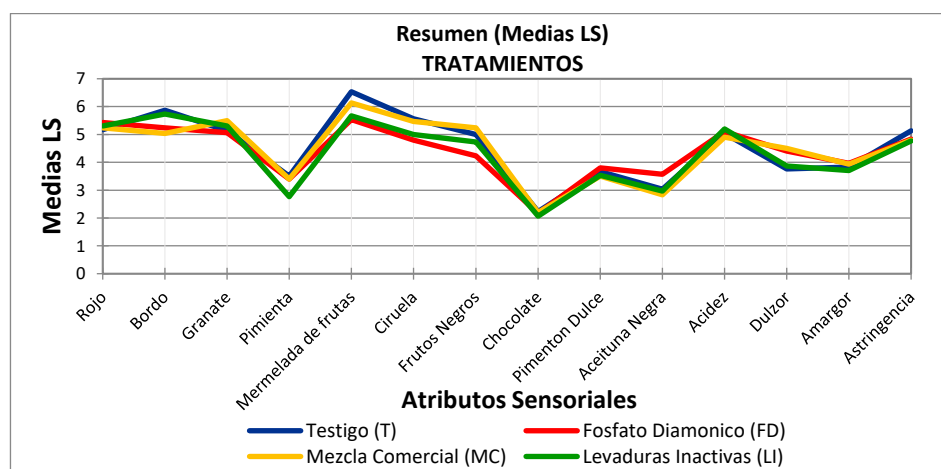


Figura 15 - Diferencias sensoriales obtenidas en los tratamientos (Medias LS).

Fuente: Elaboración propia

Tabla 8 - Análisis de la varianza - ANOVA  $\alpha = 5\%$ , Tukey (HSD) & Fisher (LSD). T\*=Testigo; FD\*= Fosfato Diamónico; LI\*= Levaduras Inactivas; MC\*=Mezcla Comercial, NS\*= No Significativo

	Fase visual			Fase olfativa							Fase gustativa				
	Rojo	Bordo	Granate	Pimienta	Merm. de frutas	Ciruela	Frutos Negros	Chocolate	Pimentón Dulce	Aceituna Negra	Acidez	Dulzor	Amargor	Astringencia	
F	7,204	6,609	8,144	4,564	19,388	7,218	5,393	6,723	11,952	11,175	11,664	21,123	7,654	4,726	
Pr > F	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	
ANOVA Pr >  t	Trat. 1 (T)	NS	<b>0,025*</b>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	<b>0,025*</b>	NS	NS	
	Trat. 2 (FD)	NS	NS	NS	NS	NS	<b>0,020*</b>	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
	Trat. 3 (LI)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
	Trat. 4 (MC)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
Medias LS	Trat. 1 (T)	5,167	5,867	5,133	3,500	6,533	5,567	5,000	2,233	3,667	3,033	5,033	3,767	3,833	5,133
	Trat. 2 (FD)	5,433	5,233	5,067	3,400	5,533	4,800	4,233	2,167	3,800	3,567	5,100	4,400	3,967	4,833
	Trat. 3 (LI)	5,300	5,733	5,300	2,767	5,667	5,000	4,733	2,067	3,533	2,967	5,200	3,867	3,700	4,767
	Trat. 4 (MC)	5,233	5,033	5,500	3,400	6,133	5,467	5,233	2,200	3,500	2,833	4,900	4,500	3,933	4,800
Tukey (HSD) 95% Conf.	A	A	A	A	1 vs 2	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
Fisher (LSD) 95% Conf.	A	<b>1 vs 4</b>	A	A	<b>1 vs 2</b> <b>1 vs 3</b>	A	<b>2 vs 4</b>	A	A	A	A	<b>1 vs 4</b>	A	A	

Fuente: Elaboración propia

Tabla 9 - Tratamientos. / Fisher (LSD) / Diferencias entre las categorías con un intervalo de confianza de 95%. 1=Testigo; 2= Fosfato Diamónico; 3= Levaduras Inactivas; 4=Mezcla Comercial

Análisis	Fase	Atributo	Contraste	Diferencia	Dif. estandarizada	Valor crítico	Pr > Dif	Significativo
Fisher (LSD)	Fase Visual	Bordo	1 vs 4	0,833	2,282	1,984	<b>0,025*</b>	Sí
			1 vs 2	1,000	2,815	1,984	<b>0,006*</b>	Sí
	Fase Olfativa	Mermelada de frutas	1 vs 3	0,867	2,440	1,984	<b>0,016*</b>	Sí
			4 vs 2	1,000	2,369	1,984	<b>0,020*</b>	Sí
	Fase Gustativa	Dulzor	4 vs 1	0,733	2,278	1,984	<b>0,025*</b>	Sí

Fuente: Elaboración propia

## Matiz bordó

En la fase visual, se observó una diferencia significativa entre los vinos, con respecto a los tres colores estudiados; rojo, bordó y granate, con un valor  $Pr > |t|$  (**0,025\***) para el tratamiento testigo (T), con un importante grado de discrepancia ante el tratamiento 4 (MC).

En otras palabras, se puede decir que entre el vino testigo y el vino tratado con una mezcla nutritiva comercial compuesto de sustancias orgánicas e inorgánicas (MC) existe diferencia, utilizando un alfa del 5%.

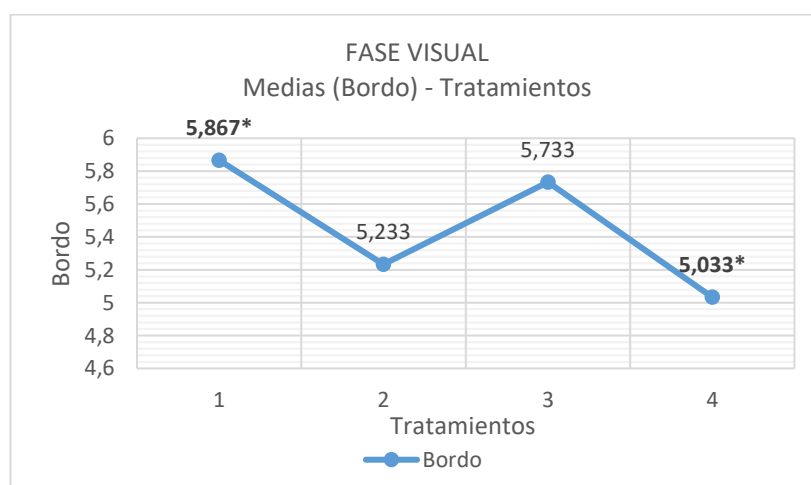


Figura 16 - Medias (LS) de tratamientos obtenidas en la fase visual en cuanto al atributo "bordo"  
(1=Testigo; 2= Fosfato Diamónico; 3= Levaduras Inactivas; 4=Mezcla Comercial).

Fuente: Elaboración propia

Visualizando (Figura 16 y 17) el valor más alto de las medias (LS), lo obtuvo el tratamiento testigo con **5.867\***, en comparación con el 4 (MC) de **5.033\***. El resto de los tratamientos no presentaron diferencias notables en cuanto al atributo "bordo".

Los demás parámetros analizados en la fase visual, es decir, "rojo" y "granate" no arrojaron diferencias significativas en ninguno de los cuatro (4) tratamientos en cuestión.

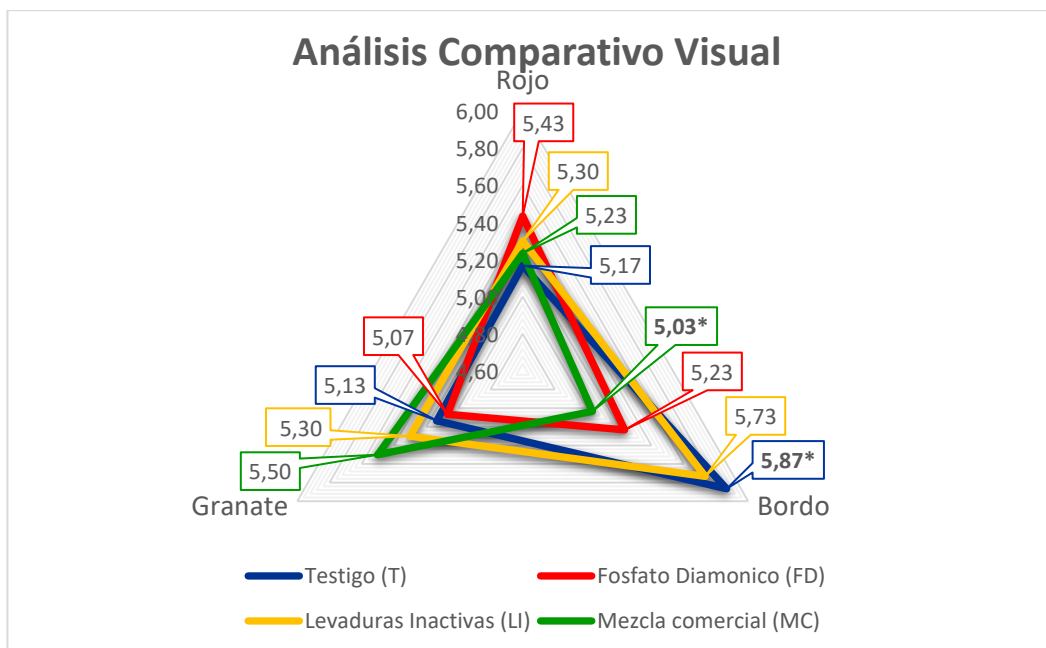


Figura 17 - Análisis comparativo de los atributos analizados en la "fase visual".

Fuente: Elaboración propia

## Mermelada de frutas

Dentro de la fase olfativa se obtuvieron resultados muy interesantes, ya que si bien, el análisis de la varianza dio a conocer una diferencia significativa, Tukey & Fisher revelaron otra variante relevante (Figura 18).

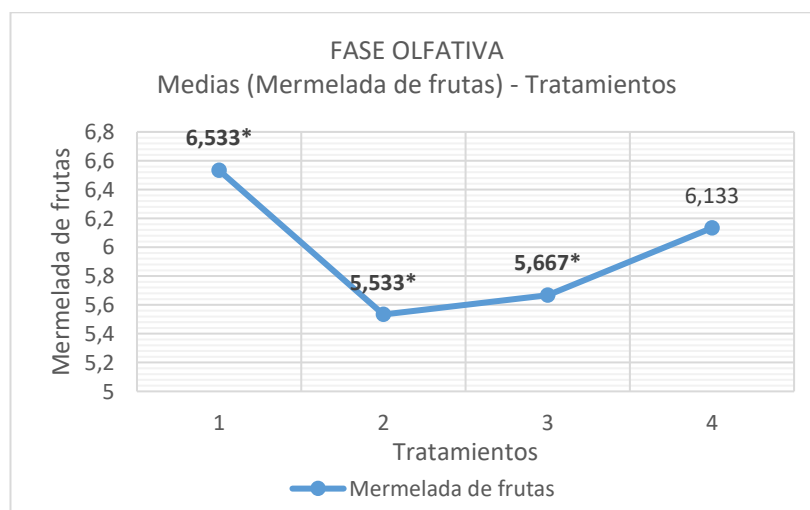


Figura 18 - Medias (LS) de tratamientos obtenidas en la fase olfativa en cuanto al atributo "mermelada de frutas"

(1=Testigo; 2= Fosfato Diamónico; 3= Levaduras Inactivas; 4=Mezcla Comercial).

Fuente: elaboración propia

Fisher arrojó diferencias entre los tratamientos 1(T), 2 (FD) y 3 (LI), con medias que van desde los (5,533\*) hasta (6,533\*) en su punto máximo, otorgando diferencias superiores a 1, en comparación con el testigo.

El análisis otorgó datos con tendencias negativas a la esperada, el tratamiento testigo (T), obtuvo mayor presencia aromática de dicho atributo y por debajo le siguen en importancia; el tratamiento 4 (MC) compuesto por una mezcla comercial de fracción orgánica e inorgánica, el 3 (LI) en su totalidad por una forma netamente orgánica y finalmente el 2 (FD) conformado por 100% fosfato diamónico inorgánico.

El testigo (T) resulto ser el vino con más percepción aromática y aquellos que fueron dosificados con diferentes tipos de nutrientes, fueron los menos aromáticos en comparación con este. Si se tiene en cuenta únicamente los 3 tratamientos con agregados nutritivos exógenos, la intensidad aromática si es diferente y se observa (Figura 19) una tendencia creciente, aunque no es estadísticamente significativa. Iniciando con el tratamiento 2 (FD), seguido del 3 (LI) y 4 (MC)

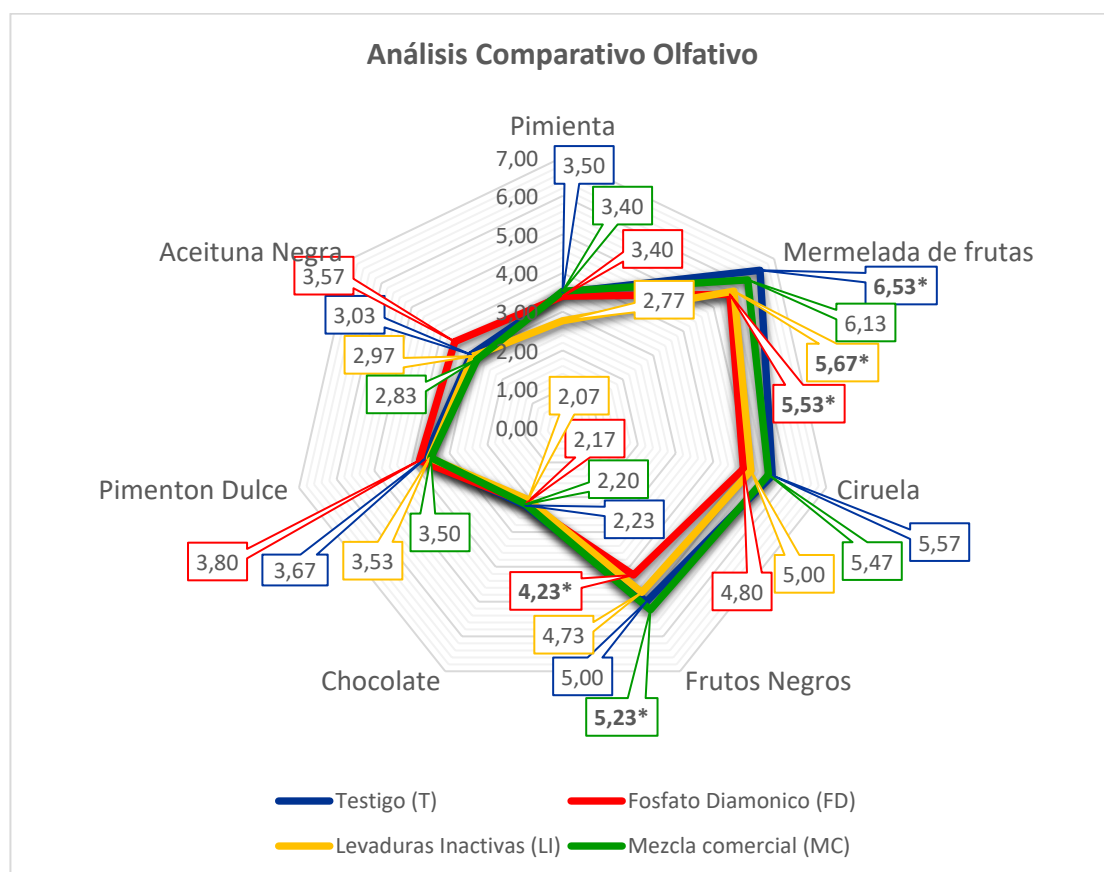


Figura 19 - Análisis comparativo de los atributos analizados en la "fase olfativa".

Fuente: Elaboración propia



## Frutos Negros

Segundo atributo olfativo con un valor  $Pr > Dif$  (**0,020\***) que presenta diferencias significativas entre los tratamientos 2 (FD) y 4 (MC), adquiriendo este último, el valor más alto de percepción media (**5,233\***), manteniendo el resto de los atributos sin diferencia alguna.

Dando certeza que un agregado mixto de sustancias nutritivas (MC), generan una mayor presencia de sustancias volátiles identificadas como “frutos negros”, siguiendo en decrecimiento la muestra testigo (T), continuando con levaduras inactivas orgánicas (LI) y en último lugar con menor presencia, la nutrición inorgánica a base de fosfato diamónico puro (FD).

Como se puede observar, desde un punto de vista aromático, en la “fase olfativa” se obtienen resultados bastante interesantes, siendo en el primer caso la muestra testigo (T) la que obtuvo mayor presencia de aromas a “mermelada de frutas” y la muestra 4 (MC) la que predominó con aromas a “frutos negros”.

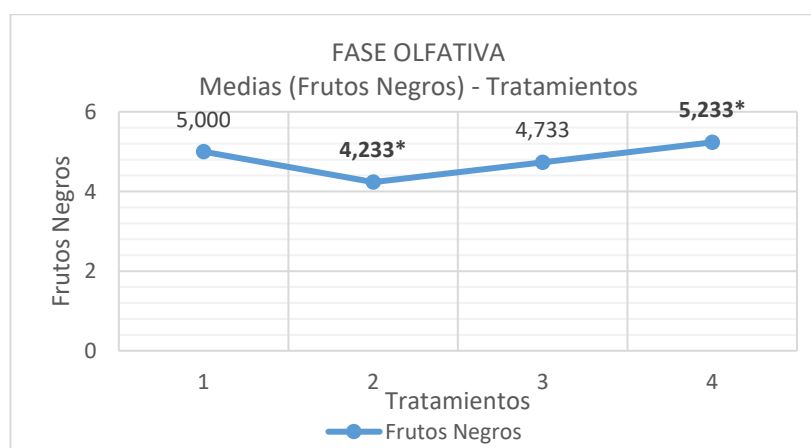


Figura 20 - Medias (LS) de tratamientos obtenidas en la fase olfativa en cuanto al atributo "frutos negros" (1=Testigo; 2= Fosfato Diamónico; 3= Levaduras Inactivas; 4=Mezcla Comercial).

Fuente: Elaboración propia

## Dulzor

Con un valor  $Pr > Dif$  (**0,025\***) fue el atributo con menor diferencia significativa, en comparación con las 13 variables restantes, obteniendo un valor diferencial de 0.733 entre el tratamiento 4 (MC) que más percibió la variable “dulzor”, a diferencia del testigo (T).

Lo cual podría estaría más relacionado al efecto de las manoproteínas liberadas por las cascaras de levaduras que a la parte analítica, ya que todas las

microvinificaciones llegaron a rastro de azúcar e incluso el tratamiento 4, cuenta con uno de los valores más bajos de azúcares reductores. Se observa (Figura 21) que la diferencia existente, inicia con un valor medio de 3.767 hasta llegar a un máximo de 4.500 para el tratamiento 4 (MC).

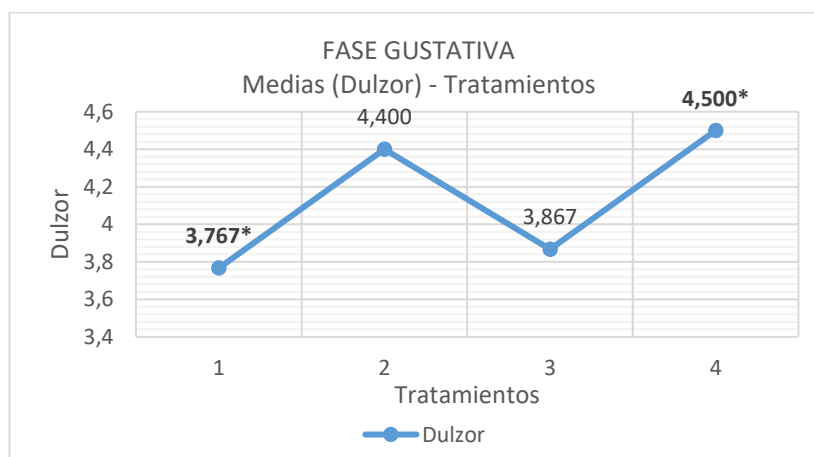


Figura 21 - Medias (LS) de tratamientos obtenidas en la fase gustativa en cuanto al atributo "dulzor" (1=Testigo; 2= Fosfato Diamónico; 3= Levaduras Inactivas; 4=Mezcla Comercial).

Fuente: Elaboración propia

En cuanto al resto de los atributos analizados en esta fase gustativa; acidez, amargor y astringencia, se observa que únicamente se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a la variable "dulzor".

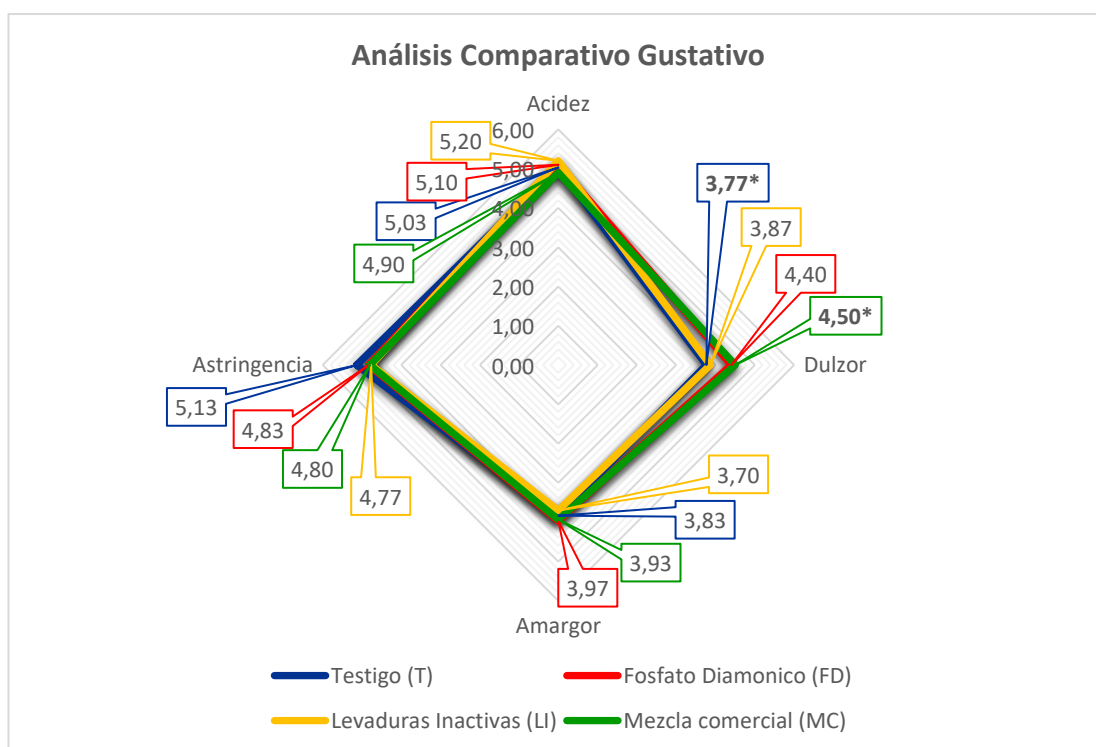


Figura 22 - Análisis comparativo de los atributos analizados en la "fase gustativa".

Fuente: Elaboración propia

## Preferencia de tratamientos

Cada panelista determinó de forma preferencial al finalizar la degustación, cuál de los 4 tratamientos agradó más, indicando el código de la muestra en la plataforma digital. Por lo que esto ayudó estadísticamente a determinar que muestra fue la que más gustó, a gran parte del panel. Un 53,3% eligió el tratamiento 4 (MC), el cual estaba compuesto por una mezcla comercial, a base a compuestos orgánicos e inorgánicos (fosfato diamónico, cortezas de levaduras, tiamina, pantotenato y celulosa).

El panel sensorial, voto por mayoría al tratamiento 4, siguiendo en disputa los tratamientos 2 (FD) y 3 (LI) con una tasa preferencial del 20% cada uno (Figura 23). Es importante recordar que uno está compuesto en su totalidad por un nutriente inorgánico (fosfato diamónico) y el otro por sustancias sumamente orgánicas, como lo son las levaduras inactivas que liberan al medio; aminoácidos, manoproteínas, péptidos, minerales, vitaminas, ácidos grasos y esteroides.

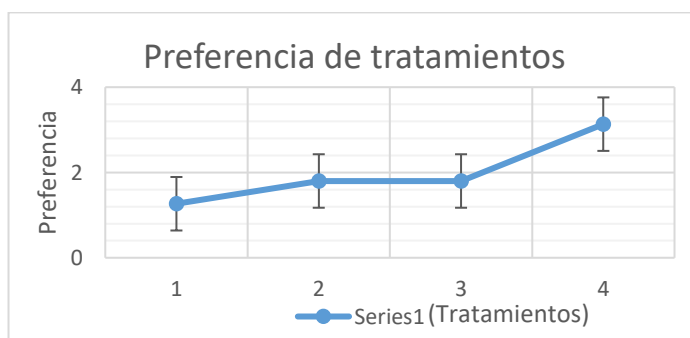


Figura 23 - Tendencia preferencial de los tratamientos investigados.

Fuente: Elaboración propia

En último lugar quedo inesperadamente el tratamiento testigo (T) con el 6,7% de los votos, el cual obtuvo en reiteras variables y fases, medias (LS) con elevados valores de percepción aromática que claramente no se corroboran en un análisis global de preferencia (Figura 24).

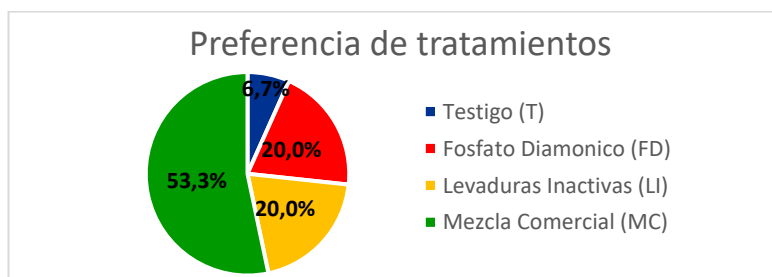


Figura 24 - Preferencia porcentual de los 4 tratamientos realizados.

Fuente: Elaboración propia

## Conclusión

Los resultados de este estudio indicarían que un agregado de nutrientes en la fase fermentativa, impacta positivamente en la cinética y en la concentración de biomasa. Además, influye marcadamente en la composición aromática de un vino con respecto a la presencia de aromas secundarios, propios de la fermentación, reflejando diferencias significativas en los perfiles sensoriales de un vino terminado (Gutiérrez 2015; Rapp 1995; Torrea 2011; Barbosa 2012; Barbosa 2009; Reinal; Granes 2006; Barrajon 2011; Šuklje 2016; Martínez-Moreno 2014; Pei-Tong 2018; Duc 2020) [4,6,7,8,9,13,16,18,19,20,21,22].

Ocasionadas mediante la codificación y expresión genética de la levadura, en cuanto a su necesidad metabólica de asimilar sustancias nitrogenadas (aminoácidos ramificados) mediante la vía Ehrlich y sintetizar respectivos compuestos aromáticos, citando; alcoholes superiores, ácidos de cadena ramificada, ácidos grasos de cadena media, ésteres de acetato, ésteres etílicos y ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena media, que hacen el aroma del vino (Ribereau-Gayon 2003) [5].

Factor limitante en la investigación ya que, no se contó con instrumentos para medir la variable “concentración y tipo de aminoácidos presentes” durante la fase fermentativa. Punto importante a tener en cuenta en investigaciones futuras para evidenciar que resultados se obtendrían aromáticamente, variando de forma exógena, los tipos y/o concentraciones de aminoácidos que hay en el medio.

Desde un punto de **vista fermentativo**, la cinética fue uniforme analíticamente para todos los tratamientos, obteniendo alcoholes de 14% v/v  $\pm$  0,1. Mediante análisis de la varianza con un nivel de significancia del 5% (0.05), se obtuvieron resultados interesantes e incluso con tendencias opuestas a la esperada, ya que existieron disminuciones en algunos compuestos aromáticos. Con respecto a la **fase visual** únicamente el atributo “bordo” varió entre los tratamientos 1 (T) y 4 (MC), lo cual estaría más relacionado a ciertos fenómenos de condensaciones y comportamientos del catión flavilium, que a la nutrición en sí.

La **fase olfativa** revela que si se desea buscar un vino con importante carga aromática no siempre va a estar ligado a insumos enológicos de elevado costo comercial, cuyo caso se observó en el tratamiento testigo (T), el cual presentó

mayores intensidades aromáticas y estaba compuesto únicamente de nitrógeno natural (249 mg/lit de NPA). Este punto es de considerable importancia, ya que en reiteras investigaciones se han comprobado que un agregado nutricional es importante, solamente si hay deficiencia, pero no en sobredosis, ya que ocasionaría una **inhibición retroalimentaria** (Torrea 2011) [7] provocando una menor acumulación de esteres, tal es el caso del tratamiento 2 (FD) a base de fosfato diamónico, que aumentó mayoritariamente los valores de NPA y disminuyó los atributos de “mermelada de frutas”, “ciruela” y “frutos negros”. El tratamiento 3 (LI) compuesto por levaduras inactivas, también revelo una diferencia en cuanto a “mermelada de frutas”, aunque fue en menor tenor.

En cuanto a el atributo “frutos negros”, existió mayor percepción en el tratamiento 4 (MC) compuesto por una mezcla de sustancias orgánicas e inorgánicas, en comparación con la muestra 2 (FD).

La decadencia de algunas sustancias volátiles, estaría relacionada directamente a una leve **inhibición retroalimentaria aminoacídica**, al aumentar los valores de NPA con las diferentes fuentes de nitrógeno utilizadas, afectando los **genes codificadores** de permeasas (GAP 1, BAP 2, BAP 3) y aminotransferasas (BAT1, BAT2) ocasionado que las levaduras no absorban ciertos aminoácidos ramificados, con menor cantidad de sustancias transaminadas y descarboxiladas, provocando una disminución en la producción de **esteres aromáticos**.

El **análisis preferencial** evidenció que la muestra con mayor percepción aromática (Testigo) fue la menos elegida, a diferencia del tratamiento 4 (Mezcla Comercial) que obtuvo más del 50% de aceptación. La cual, podría estar vinculada a un cierto **equilibrio entre las sustancias nitrogenadas aportadas (orgánicas e inorgánicas), los compuestos volátiles sintetizados y las necesidades fisiológicas de las levaduras**. Ya que una mezcla comercial, está exclusivamente diseñada para satisfacer las necesidades fisiológicas de las levaduras, aportando nitrógeno inorgánico (NH<sub>4</sub>) de pronta asimilación y nitrógeno orgánico amínico (aminoácidos), proveniente naturalmente de las levaduras, con presencia de lípidos, péptidos, vitaminas, minerales,

manoproteínas, ácidos grasos insaturados de cadena larga y esteroides que fortalecen la membrana plasmática y el metabolismo de asimilación.

Sería interesante realizar en investigaciones futuras, cual podría ser la mejor combinación de sustancias nitrogenadas no solo para obtener una mejor expresión de genes aromáticos, en base a diferentes escalas de NPA o perfiles sensoriales, sino también para una posible reducción de costos a nivel empresarial, para no realizar dosificaciones genéricas, produciendo carencias o excesos nutricionales, con el valor que esto conlleva, recordando que se está hablando de sustancias nitrogenadas puras de elevado importe comercial.

## Referencias bibliográficas

- [1] Esti, M., Tamborra, P. (2006). Influence of winemaking techniques on aroma precursors. *Analytica Chimica Acta*, 563 (1-2), 173-179.
- [2] Liang, H., Chen, J., Reeves, M., y Han, B. (2013) Aromatic and sensorial profiles of young Cabernet Sauvignon wines fermented by different Chinese autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Research International*, 51 (2), 855-865.
- [3] Regodón Mateos, J. A., Pérez-Nevado, F., y Ramírez Fernández, M. (2006). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. *Tecnología de enzimas y microbios*, 40 (1), 151-157.
- [4] Gutiérrez, A., Chiva, R., y Guillamón, J. M.(2015). Arginine addition in the stationary phase influences the fermentation rate and synthesis of aroma compounds in a synthetic must fermented by three commercial wine strains. *Food Science and Technology*, 60 (2), 1009-1016.
- [5] Rivéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A., (2003), *Microbiología del vino, Tratado de enología*, Buenos Aires, Argentina, Hemisferio Sur.
- [6] Rapp, A. y Versini, G. (1995) Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. *Developments in Food Science*, 37, 1659-1694.
- [7] Torrea, D., Varela, C., Ugliano, C., Ancin-Azpilicueta, C., Leigh Francis, I., Henschke, P. (2011). Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice – Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Food Chemistry*, 127, 1072-1083.
- [8] Barbosa, C., Mendes-Faia, A., y Mendes-Ferreira, A. (2012) The nitrogen source impacts major volatile compounds released by *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 160 (2), 87-93.
- [9] Barbosa, C., Falco, V., Mendes-Faia, A., Mendes-Ferreira, A. (2009) Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by

- Saccharomyces cerevisiae* wine strains. Journal of Bioscience and Bioengineering, 108 (2), 99-104.
- [10] Godoy Danesi, E. D., Melim Miguel, A. S., Rangel-Yagui, C. de O., Monteiro de Carvalho, J. C., y Pessoa Jr, A. (2006). Effect of carbon:nitrogen ratio (C:N) and substrate source on glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Food Engineering, 75 (1), 96-103.
- [11] Kato, S., Ishihara, T., Hemmi, H., Kobayashi, H., y Yoshimura, T. (2011). Alterations in d-amino acid concentrations and microbial community structures during the fermentation of red and white wines. Journal of Bioscience and Bioengineering, 111 (1), 104-108.
- [12] Noti, O., Vaudano, E., Giuffrida, G. M., Lamberti, C., Cavallarin, L., Garcia-Moruno, E., Pessione, E. (2018). Enhanced arginine biosynthesis and lower proteolytic profile as indicators of *Saccharomyces cerevisiae* stress in stationary phase during fermentation of high sugar grape must: A proteomic evidence. Food Research International, 105, 1011-1018.
- [13] Reinal, C., Bonnefond, C., Reginel, F., Suarez, C., Heras, J. M., Granes, D., Dumont, A., Ortiz-Julien, A. Nutricion equilibrada para una fermentacion alcoholica sana. Lallemand, 1-5.
- [14] Valero, E., Millán, C. y Ortega, J. M. (2001) Influence of pre-fermentative treatment on the fatty acid content of *Saccharomyces cerevisiae* (M330-9) during alcoholic fermentation of grape must. Journal of Bioscience and Bioengineering, 91 (2), 117-122.
- [15] Fornairon-Bonnefond, C., Demaretz, V., Rosenfeld, E., Salmon, J-M. (2002). Oxygen Addition and Sterol Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* during Enological Fermentation. Journal Of Bioscience and Bioengineering, 93 (2), 176-182.
- [16] Granes, D., Medina, E., Blateyron, L., Romero, C., Bru, E., Roux, C., Bonnefond, C., Piperno, A., Rouanet, M., Oui, T. (2006). Alimentación nitrogenada de la levadura. Revista Internet de Viticultura y Enología, N3/2, 1-7.
- [17] Bataillon, M., Rico, A., Jean-Marie, S., Jean-Michael, S., y Barre, P. (1996). Early Thiamin Assimilation by Yeasts under Enological Conditions:



- Impact on Alcoholic Fermentation Kinetics. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82 (2), 145-150.
- [18]Barrajón, N., Capece, A., Arévalo-Villena, M., Briones, A., y Romano, P. (2011) Co-inoculation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains and influence on volatile composition of wines. *Food Microbiology*, 28 (5), 1080-1086.
- [19]Šuklje, K., Antalick, G., Buica, A., Coetzee, Z., Brand, J., Schmidtke, L., Vivier, M. (2016). Inactive dry yeast application on grapes modify Sauvignon Blanc wine aroma. *Food Chemistry*, 197, 1073-1084.
- [20]Martinez-Moreno, R., Quiros, M., Morales, P., Gonzalez, R. (2014). New insights into the advantages of ammonium as a winemaking nutrient. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 128-135.
- [21]Pei-Tong, L., Ke-Ji, Y., Yu-Ting, L., Chang-Qing, D., Guo-Liang, Y. (2018). The content of linoleic acid in grape must influences the aromatic effect of branched-chain amino acids addition on red wine. *Food Research International*, 114, 214-222.
- [22]Duc, C., Maçna, F., Sanchez, I., Galeote, V., Delpech, S., Silvano, A., Mouret, J-R. (2020). Large-Scale Screening of Thiol and Fermentative Aroma Production during Wine Alcoholic Fermentation: Exploring the Effects of Assimilable Nitrogen and Peptides. *Fermentation*, 6 (4), 98.
- [23]Landolfo, S., Zara, G., Zara, S., Budroni, M., Ciani, M., Mannazzu, I. (2010). Oleic acid and ergosterol supplementation mitigates oxidative stress in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 229-235.
- [24]Fornairon-Bonnefond, C., Aguera, E., Deytieux, C., Sablayrolles, J-M., Salmon, J-M. (2003). Impact of Oxygen Addition during Enological Fermentation on Sterol Contents in Yeast Lees and Their Reactivity towards Oxygen. *Journal of bioscience and bioengineering*, 95 (5), 496-503.
- [25]Sablayrolles, J., Debois, C., Manginot, C., Roustan, J., y Barre, P. (1996) Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. *Journal of fermentation and bioengineering*, 82 (4), 377-381.

- [26]Perez-Vazquez, V., Uribe, S., Velazquez-Arellano, A. (2005). Effects of biotin on growth and protein biotinylation in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Nutritional Biochemistry, 16, 438-440.
- [27]Vazquez, F. (2018). Metabolismo de azúcares y nitrógeno. Curso de postgrado. Microbiología enológica. Instituto de Biotecnología (IBT) Universidad nacional de Cuyo - Facultad de ciencias agrarias.
- [28]Ishmayanaa, S., Kennedy, U., Learmonth, R. (2015). Preliminary Evidence of Inositol Supplementation Effect on Cell Growth, Viability and Plasma Membrane Fluidity of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Procedia Chemistry, 17, 162-169.
- [29]Combina, M. (2018) Curso de postgrado. Microbiología enológica. Laboratorio de Microbiología Enológica y Biotecnología. Centro de Estudios Enológicos EEA Mendoza, INTA –Argentina.
- [30]Stevens, S., and Hofmeyer, J.H.S. (1993). Effects of ethanol, octanoic and decanoic acid on fermentation and passive influx of protons through the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology. 38, 656–663.