

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**EVALUACION DE LA CEPA ES 454 (*Saccharomyces cerevisiae*) Y SU
COMPORTAMIENTO FRENTE A DOS ESTRATEGIAS NUTRICIONALES EN LA
FERMENTACION ALCOHOLICA DE UN VINO CARMÉNÈRE.**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

JUAN PABLO MARDONES ABELLA

TEMUCO – CHILE

2010

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**EVALUACION DE LA CEPA ES 454 (*Saccharomyces cerevisiae*) Y SU
COMPORTAMIENTO FRENTE A DOS ESTRATEGIAS NUTRICIONALES EN LA
FERMENTACION ALCOHOLICA DE UN VINO CARMÉNÈRE.**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

JUAN PABLO MARDONES ABELLA

PROFESOR GUÍA: WALTER FERNANDO LOBOS ALVAREZ

TEMUCO – CHILE

2010

**EVALUACION DE LA CEPA ES 454 (*Saccharomyces cerevisiae*) Y SU
COMPORTAMIENTO FRENTE A DOS ESTRATEGIAS NUTRICIONALES EN LA
FERMENTACION ALCOHOLICA DE UN VINO CARMÉNÈRE.**

PROFESOR GUÍA

: SR. WALTER FERNANDO LOBOS ALVAREZ
Ingeniero Agrónomo
Profesor Fruticultura
Departamento de Producción Agropecuaria
Universidad de La Frontera

PROFESOR CONSEJERO

: SRA. MARIBEL EUGENIA PARADA IBAÑEZ
Doctora en Ciencias por la Universidad de Sevilla
Magíster en Ciencias con Mención en Protección
Vegetal
Departamento de Ciencias Agronómicas y Recursos
Naturales
Universidad de La Frontera

CALIFICACIÓN PROMEDIO TESIS :

Para hacer un gran vino es necesario:

Un loco para cultivar la vid.

Un sabio para reglamentarla.

Un artista lúcido para vinificarlo y

Un aficionado apasionado para beberlo.

Jean Onizet.

AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar, le doy gracias a mis padres (Toñita y Toñito) quienes día a día me entregaron su apoyo y amor incondicional y la motivación necesaria para poder ser alguien en la vida. Gracias por sus retos y lecciones de vida que sin duda me han hecho una mejor persona y así aprender que lo que realmente importa es la familia. A mi hermana y amiga Pepita, gracias por todas esas veces que me has sacado adelante, que sin tu apoyo no hubiese podido terminar este proyecto. Y a mí sobrinito Benjita, quien llegó a alegrar todas nuestras vidas. Los amo.

Agradecer a mi polola Lony, quien ha sido un pilar fundamental en este proceso, probablemente sin tu ayuda y apoyo, esta tesis no la hubiese logrado terminar. A pesar del poco tiempo me has enseñado demasiadas cosas y las suficientes para decidir terminar mis días a tu lado. Gracias por tu amor, cariño, confianza, compañerismo y paciencia. Te amo.

A todas las personas que he conocido durante esta experiencia universitaria, en especial a mi amigo Diego, que siempre ha estado a mi lado dándome una palabra de apoyo o simplemente compartiendo una pena o una alegría. Y por último pero no menos importante a mis amigas Yesy y Vale por su paciencia, amistad, apoyo y disponibilidad de siempre de estar cuando las necesite.

A mi profesor guía Walter Lobos, por permitirme ser su alumno tesista, su ayudante y entregarme las herramientas necesarias para poder desarrollarme como profesional el día de mañana. Por su dedicación, apoyo y disponibilidad, muchas gracias.

A mi profesora consejera Maribel Parada por su constante apoyo, disponibilidad y guía para la revisión de este trabajo.

Le doy las gracias a la Viña Santa Cruz, por permitirme realizar mi trabajo de título, por su confianza y apoyo, en especial a Carolina Blanco, José Miguel Sotomayor, Inés Márquez y Marcial Berrios.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron en el desarrollo de este proyecto.

ÍNDICE DE CONTENIDOS.

Capítulo		Página
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1.	Fermentación alcohólica	4
2.1.1.	Bioquímica de la fermentación alcohólica	6
2.2.	Levaduras vínicas	11
2.2.1.	Ecología de la fermentación alcohólica	15
2.2.2.	Evolución de las levaduras durante la fermentación alcohólica	16
2.3.	Factores que afectan al desarrollo, crecimiento y actividad de las levaduras de fermentación	18
2.3.1.	Temperatura	18
2.3.2.	Etanol	19
2.3.3.	Azúcar	19
2.3.4.	Oxígeno y factores de supervivencia	20
2.3.5.	Nutrientes	21
2.3.6.	Residuos de productos fitosanitarios	24
2.4.	Paradas de fermentación	24
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1.	Fecha y lugar de ensayo	27
3.1.1.	Descripción viñedo	28
3.1.2.	Descripción bodega	28
3.2.	Manejo ensayo	29
3.3.	Materiales	30
3.3.1.	Material vegetal	30
3.3.2.	Material de aplicación	30
3.4.	Métodos	31

3.4.1.	Tratamientos y diseño experimental	31
3.4.1.1.	Ensayo evaluación del poder fermentativo de las levaduras	32
3.4.1.2.	Ensayo del efecto de la estrategia nutricional	33
3.4.2.	Parámetros evaluados	35
3.4.3.	Análisis estadístico	36
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
4.1.	Ensayo evaluación del poder fermentativo de las levaduras	37
4.1.1.	Composición inicial de los mostos	37
4.1.2.	Evolución de la fermentación alcohólica	37
4.1.3.	Evolución del nitrógeno fácilmente asimilable durante la fermentación alcohólica	39
4.1.4.	Composición de los vinos	40
4.2.	Ensayo del efecto de la estrategia nutricional	41
4.2.1.	Composición inicial de los mostos	41
4.2.2.	Evolución de la fermentación alcohólica	41
4.2.3.	Evolución del nitrógeno fácilmente asimilable durante la fermentación alcohólica	43
4.2.4.	Composición de los vinos	44
5.	CONCLUSIONES	45
6.	RESUMEN	46
7.	SUMMARY	47
8.	LITERATURA CITADA	48
9.	ANEXOS	54

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro		Página
1.	Principales alcoholes superiores del vino y aminoácidos de los que proceden	10
2.	Aplicaciones comunes para la vinificación	32
3.	Tratamientos, levaduras y dosis aplicada, para evaluar la actividad Fermentativa	32
4.	Estrategia nutricional habitual	33
5.	Tratamientos, levaduras y dosis aplicada, para evaluar la estrategia Nutricional	33
6.	Estrategias nutricionales habitual y propuesta	34
7.	Composición analítica de los mostos en ensayo de evaluación del poder fermentativo	37
8.	Composición analítica de los vinos en ensayo de evaluación del poder fermentativo	40
9.	Composición analítica de los mostos en ensayo del efecto de la estrategia nutricional.	41
10.	Composición analítica de los vinos en ensayo del efecto de la estrategia nutricional.	44

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura		Página
1.	Ecuación Gay – Lussac.	4
2.	Mecanismo de la fermentación alcohólica	7
3.	Mecanismo de la fermentación gliceropirúvica	8
4.	Mecanismo de la transformación del ácido pirúvico en anaerobiosis	9
5.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
6.	Criterios de selección clonal clásica de levaduras vínicas	14
7.	Curva de crecimiento de las levaduras durante la fermentación	17
8.	Evolución de los azúcares y de las levaduras en el transcurso de una fermentación alcohólica; (a) normal; (b) incompleta.	17
9.	Efectos de la aireación en diferentes momentos de la fermentación sobre la fermentación del azúcar.	21
10.	Activación de la fermentación de un mosto por la adición de 20 g/HL de fosfato amónico	23
11.	Influencia del nitrógeno y del oxígeno sobre las duraciones de la fermentación alcohólica.	23
12.	Valle de Colchagua.	27
13.	Vinificación por gravedad.	29
14.	Cinética fermentativa de la cepa ICV D254 y ES 454.	38
15.	Evolución del nitrógeno fácilmente asimilable.	39
16.	Cinética fermentativa de dos estrategias nutricionales.	42
17.	Evolución del nitrógeno fácilmente asimilable.	43

1. INTRODUCCIÓN.

La fermentación alcohólica es el proceso bioquímico mejor estudiado en la producción de vinos de calidad. Sin embargo, presenta problemas aún sin resolver de orden teórico y práctico. Las dificultades de la fermentación constituyen uno de los mayores problemas de la vinificación, siendo todavía las fermentaciones incompletas un fenómeno muy difundido.

La fermentación alcohólica del mosto es el resultado de la interacción de muchas variables que se pueden agrupar en tres categorías: la composición inicial del mosto; las condiciones tecnológicas que controlan el proceso fermentativo y, las cepas de levaduras presentes, llamada fase química, física y biológica.

En el pasado, la fermentación se llevaba a cabo por las levaduras salvajes presentes en el viñedo y bodega, por ello la transformación de los azúcares en alcohol y la producción de compuestos aromáticos tenían lugar al azar, como resultado de un proceso aleatorio. Desviaciones aromáticas como el picado láctico, o problemas relacionados con el desarrollo de la fermentación, eran frecuentes.

La utilización de levaduras secas activas (LSA) seleccionadas en vinificación, se considera actualmente una práctica indispensable en la producción de vinos de calidad. Desde las primeras levaduras seleccionadas que respondían a necesidades netamente tecnológicas de comienzo rápido de fermentación y cinéticas fermentativas regulares se ha pasado a la sofisticada carta de cepas existentes en la actualidad que permiten modelar el transcurso de la fermentación, potenciando aromas, respetando la carga polifenólica o favoreciendo la posterior fermentación maloláctica.

En cuanto a la composición inicial del mosto, la disponibilidad de nutrientes es variable, dependiendo de factores naturales y tecnológicos.

El nitrógeno es un macronutriente esencial para el crecimiento y metabolismo de las levaduras, y sólo en algunas formas son directamente aprovechadas en condiciones anaeróbicas

de la fermentación alcohólica. Ellas se reducen esencialmente a amonio y aminoácidos libres. La cantidad de estos compuestos se expresa como nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) del mosto y la disponibilidad de éste condiciona la actividad fermentativa, resultando determinante para la reproducción de las levaduras, la velocidad de fermentación y tolerancia de aquellas al etanol, siendo el balance fermentativo muy diverso según las formas de nitrógeno disponible y fácilmente asimilable.

Una correcta estrategia nutricional y adiciones de activadores biológicos son la llave para una buena fermentación, cuya finalidad es aumentar la complejidad nutricional del mosto supliendo las deficiencias de este, facilitando el metabolismo de las levaduras alcoholígenas, con el fin de conseguir fermentaciones completas y evitar los riesgos de fermentaciones lentas, perezosas o paralizadas.

Dada la importancia de las levaduras vínicas y su nutrición en el proceso de fermentación alcohólica, en el presente trabajo de investigación, se busca evaluar y comparar a la vez el poder fermentativo de la levadura ES 454, con la levadura testigo ICV D254 y en segundo lugar, evaluar el efecto de una nueva estrategia nutricional en la fermentación alcohólica comparándola con la estrategia habitual usada.

De acuerdo a lo anterior se plantean dos hipótesis:

- La inoculación con la levadura comercial ES 454 al mosto de uva, genera una velocidad fermentativa más rápida que la cepa ICV D254.
- La dosis y el momento de aplicación de los nutrientes, afectan positivamente a la cinética fermentativa.

Como objetivo general se plantea evaluar la curva fermentativa de la levadura comercial ES 454 y su comportamiento frente a dos estrategias nutricionales.

Para cumplir con lo anterior, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar el efecto de la levadura ES 454 sobre la cinética fermentativa, llevando un control diario de la fermentación, midiendo densidad y temperatura.
- Evaluar el efecto de la levadura ES 454 en la composición del vino, mediante análisis analíticos.
- Evaluar el efecto de la composición inicial del mosto sobre las levaduras fermentativas, mediante mediciones diarias de NFA durante la fermentación alcohólica.
- Determinar la dosis y el momento de aplicación de nutrientes sobre la fermentación alcohólica y su efecto sobre la levadura ES 454.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1 Fermentación alcohólica.

El vino es una bebida que se produce a partir de la fermentación alcohólica del mosto de la uva, en donde ocurre una transformación de azúcares, básicamente encontrados en forma de monosacáridos, ya sea glucosa o fructosa, para formar alcohol etílico (etanol), anhídrido carbónico (CO₂) y energía (Hernández, 2000). El resultado final fue expresado a principios del siglo XIX, por J. L. Gay – Lussac mediante la ecuación $C_{12}H_{24}O_{12} = 4 CO_2 + 4 C_2H_5OH$, que posteriormente en 1828 fue transformada por J. Dumas y P. Boullay en otra que hasta hoy en día se conoce por la ecuación de Gay – Lussac (Jörgenser, 1959) (Figura 1):

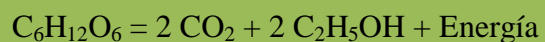


Figura 1. Ecuación Gay – Lussac.

Esta transformación biológica es llevada a cabo a lo largo de una serie de reacciones en cadena catalizadas por las enzimas contenidas en el citoplasma de hongos microscópicos del género *Saccharomyces* (del latín *saccharo* = azúcar y *myces* = hongo) que comúnmente reciben el nombre de levaduras (Epifanio, 2005). Estas son las principales responsables del proceso de fermentación alcohólica, participando en conjunto con otros géneros de levaduras, como *Torulopsis*, *Kloeckera*, *Candida*, *Pichia* entre otras, pero siendo menos participativas; destacando por sobre el resto, la especie *Saccharomyces cerevisiae*, la cual está presente durante la mayor parte del proceso fermentativo.

Las levaduras viven y crecen de forma natural en la naturaleza, sobre todo en el suelo y en la parte exterior de los vegetales, encontrándose en los viñedos repartidas irregularmente sobre los sarmientos, hojas y racimos, pero sobre todo en la superficie de los granos de uva maduros.

Durante la época de maduración de la uva estas se adhieren a la película de cera de color blanquecina que tienen los granos de uvas, denominada pruina, luego de ser transportadas por el aire o los insectos. Así llegan a la bodega y al mezclarse con el mosto dulce se inicia el proceso de desarrollo y multiplicación (Brémond, 1966; Hidalgo, 2002; Martínez, 2005; Aleixandre, 2006; Mijares y Sáez, 2007; Valencia, 2008; García, 2008).

La fermentación alcohólica del mosto de uva es el resultado de la interacción de muchas variables que se pueden agrupar en tres categorías: la composición del mosto inicial, las condiciones tecnológicas que controlan el proceso fermentativo y las cepas de levaduras presentes (Santamaría *et al.*, 1995).

Cada zona vitícola y cada microclima tienen sus propias levaduras autóctonas, que son prácticamente iguales, aunque lógicamente están adaptadas a las condiciones del entorno, transmitiendo a los distintos vinos características peculiares que los hacen diferenciarse unos de los otros (López, 2005; Aleixandre, 2006)

La carga enzimática de las distintas especies de levaduras, presenta diversidad cualitativa y cuantitativa, incluso entre las diferentes cepas, variedades o razas de una misma especie. Por tanto, el curso de la fermentación puede ser diferente en función de las características fisiológicas de la levadura, las características físico-químicas del sustrato y las condiciones ambientales en que se desarrolle, los que influirán en la producción y funcionalidad de las enzimas presentes (Boulton *et al.*, citado por Epifanio, 2005).

Aleixandre y Martínez (1999), indican que como todos los seres vivos, las levaduras tienen necesidades muy precisas. Son muy sensibles a la temperatura, necesitan oxígeno para reproducirse y también necesitan una alimentación apropiada de azúcares, sales minerales, sustancias nitrogenadas y factores de crecimiento.

Si bien el resultado final de la fermentación de los azúcares será la formación de alcohol, se originan además otros subproductos fundamentales para las cualidades organolépticas del vino como son los ésteres, aldehídos y otros componentes aromáticos (Valencia, 2008).

Suárez e Iñigo (2004) establecen un resumen general de las fermentaciones, el cual indica que:

1. Las fermentaciones son reacciones en cadena catalizadas por una serie de enzimas de origen microbiano.
2. Las secreciones enzimáticas de las distintas especies microbianas que tienen una actividad fermentativa común, presentan una notable diversidad cualitativa y cuantitativa, y a menudo incluso en las distintas cepas, variedades o razas de una misma especie.
3. Los agentes físico-químicos influyen notablemente en la producción y funcionalidad de las enzimas microbianas. Por lo tanto, el curso y resultado final de cada fermentación, puede ser diferente según las peculiares características fisiológicas de la levadura y las condiciones ambientales en que se realice.

2.1.1 Bioquímica de la fermentación alcohólica. Las levaduras encuentran la energía que le es necesaria para vivir bajo dos formas de degradación de la materia orgánica: la respiración, que necesita el oxígeno del aire y la fermentación que ocurre en ausencia de oxígeno (Hernández, 2000).

En un medio provisto de oxígeno (aerobio) las levaduras utilizan el oxígeno para su multiplicación (Brémond, 1966; Hernández, 2000). Los azúcares son transformados finalmente en agua y anhídrido carbónico, produciéndose en este caso una energía veinte veces superior a la de la fermentación alcohólica, lo que explica el mayor crecimiento de la población celular en estas condiciones (Hidalgo, 2002); por el contrario, en un ambiente con ausencia de aire (anaerobio), las levaduras descomponen el azúcar en alcohol, gas carbónico y productos secundarios como glicerol, ácido succínico, ácido acético, ácido láctico, alcoholes superiores entre otros. A la vez las actividades vitales de éstas, se reducen al mínimo (Hernández, 2000), es por ello que las levaduras al utilizar esta vía, deben transformar mucho azúcar en alcohol para así cubrir sus necesidad energéticas (Epifanio, 2005).

La principal ruta bioquímica en la degradación de los azúcares es la glicólisis o vía de Endem-Meyerhof, la cual comprende todo un conjunto de reacciones que permiten a las células vivas transformar los azúcares de seis átomos de carbono (glucosa y fructosa) en ácido pirúvico, gracias a un importante contenido enzimático elaborado en el citoplasma. Estas reacciones se dan tanto en anaerobiosis (fermentación alcohólica y láctica) como en aerobiosis (respiración). (Oreglia, 1978; Aleixandre y Martínez, 1999; Hidalgo, 2002; Suárez e Iñigo, 2004)

Por tanto la fermentación alcohólica comprende dos etapas. En la primera etapa las levaduras a través de la vía oxidativa y del ciclo de Endem-Meyerhof degradan moléculas de azúcares (glucosa y fructosa) liberando una gran cantidad de energía en cada transformación hasta llegar al ácido pirúvico (Figura 2), esta liberación de energía permite una rápida multiplicación de las levaduras alcanzando una gran biomasa. Esta fase se mantiene hasta agotar el oxígeno disuelto en el mosto. Una vez consumido el oxígeno existente, se inicia a la segunda etapa donde las levaduras comienzan la vía fermentativa o anaerobiosis, actuando sobre el ácido pirúvico formado en la glicólisis, donde este es descarboxilado, y queda como residuo el etanal (acetaldehído), que finalmente es reducido a alcohol (Oreglia, 1978; Aleixandre y Martínez, 1999; Suárez e Iñigo, 2004).

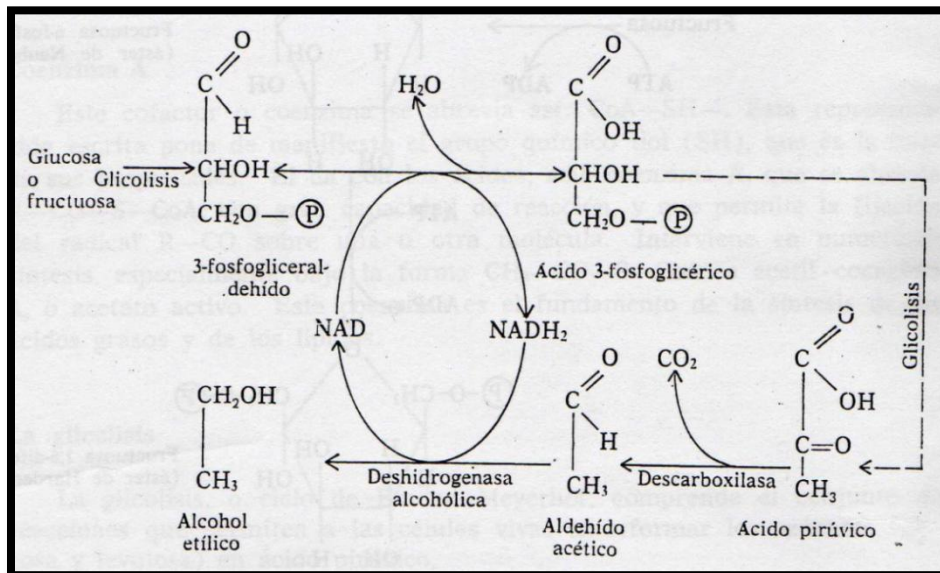


Figura 2. Mecanismo de la fermentación alcohólica.
Fuente: Oreglia, 1978.

Suárez e Iñigo (2004) hacen mención que no todas las moléculas de azúcares presentes en el mosto, van a seguir la ecuación de Gay-Lussac, con obtención de dos moléculas de etanol y otras dos de anhídrido carbónico, sino que dependiendo del propio metabolismo de las levaduras fermentativas, un determinado número de moléculas de azúcar van a ser degradadas mediante fermentación gliceropirúvica (Figura 3), en la que además de glicerina, se forma ácido pirúvico, que será el origen de los numerosos productos secundarios, según los mecanismos comunes a muchos tipos de fermentación (Figura 4).

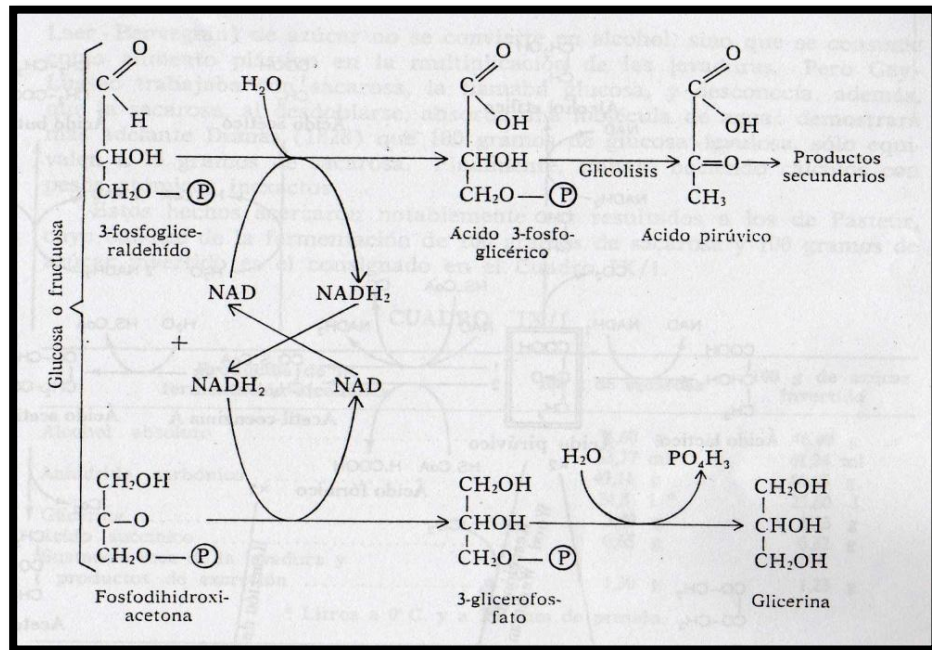


Figura 3. Mecanismo de la fermentación gliceropirúvica.

Fuente: Oreglia, 1978.

El NADH liberado en la reacción glicolítica de formación del piruvato debe ser reoxidado nuevamente gracias a la acción de la cetona, al principio del proceso fermentativo, cuando la cantidad de acetaldehído es escasa. Esto ocurre justamente al comienzo del desarrollo de las levaduras; donde la fosfodihidroxiacetona fosfato que sirve de aceptor de hidrógenos, también permite la acumulación de acetaldehído, que servirá para iniciar la fermentación alcohólica propiamente dicha (Oreglia, 1978). Incluso en la fase tumultuosa se considera que no hay una fermentación alcohólica pura, estando los mecanismos bioquímicos de la fermentación alcohólica y de la fermentación gliceropirúvica estrechamente relacionados (Suárez e Iñigo, 2004).

Por otro lado, el ácido pirúvico formado en esta fermentación, no encuentra NADH disponible para poder reducirse a láctico, ni previa descarboxilación a etanol, pudiendo considerarse esta molécula como el origen de otros productos secundarios del vino (Suárez e Iñigo, 2004).

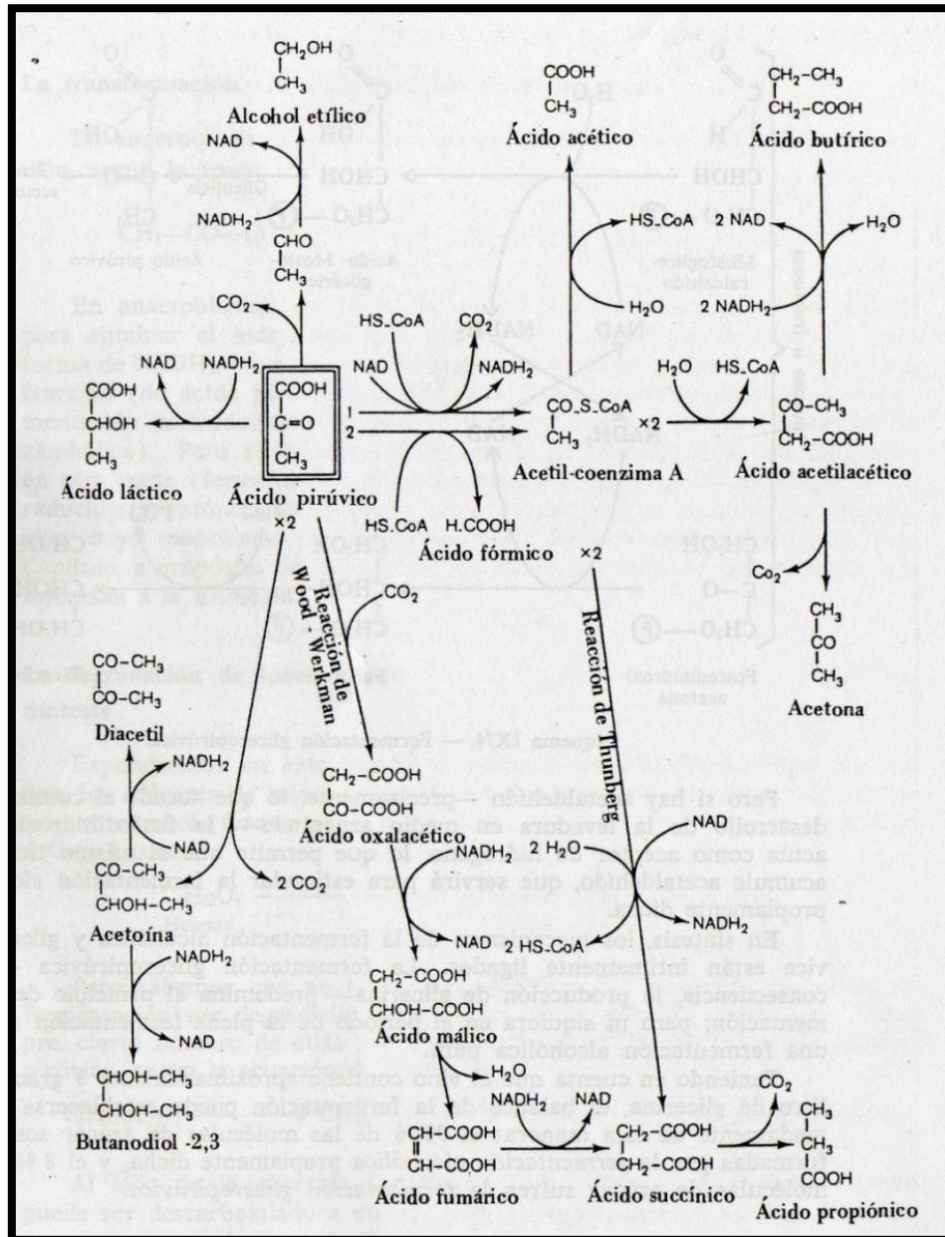


Figura 4. Mecanismo de la transformación del ácido pirúvico en anaerobiosis. Fuente: Oreglia, 1978.

Paralelamente y de forma asociada a esta degradación de los azúcares, se produce la metabolización de materias nitrogenadas y compuestos azufrados, necesarios para el mantenimiento de las estructuras celulares y la multiplicación de la levaduras (Epifanio, 2005).

Entre los productos de degradación metabólica de los aminoácidos, los alcoholes superiores son los más importantes (Aleixandre y Martínez, 1999). Estos aparecen en el vino como subproductos obligados del metabolismo nitrogenado de todas las levaduras, afectando su formación los factores físico-químicos (particularmente la aireación) y las características de las distintas cepas. Los principales productos volátiles de la fermentación del mosto de uva, identificados como alcoholes superiores, son (Cuadro 1): isoamílico, n-butanol, n-propanol, y tirosol; y ellos, o sus ésteres, intervienen de forma muy directa en las características organolépticas del vino (Suárez e Iñigo, 2004).

Cuadro 1. Principales alcoholes superiores del vino y aminoácidos de los que proceden.

ALCOHOLES SUPERIORES	AMINOACIDOS CORRESPONDIENTES	TENOR EN EL VINO (mg/L)
Alcohol isoamílico (metil-3 butanol-1)	Leucina	80 a 300
Alcohol amílico (metil-2 butanol-1)	Isoleucina	30 a 100
Alcohol isobutílico (metil-2 propanol-1)	Valina	50 a 150
Alcohol feniletílico	Fenilalanina	10 a 100
Tirosol	Tirosina	20 a 50
Triptofol	Triptófano	0 a 1
γ -butirolactona	Acido glutámico	0 a 5

Fuente: Aleixandre y Martínez, 1999.

Suárez e Iñigo (2004) señalan que el azufre ha sido empleado con profusión durante mucho tiempo en el control del crecimiento de la microflora de la uva y vinos y para la desinfección de recipientes, conducciones e instalaciones bodegueras.

Los compuestos azufrados se utilizan en los procesos de biosíntesis de aminoácidos, proteínas y vitaminas necesarios para la multiplicación de las levaduras (Epifanio, 2005). Además Flanzy (2003), menciona que el azufre cumple un rol fundamental en el equilibrio organoléptico de los vinos.

Las levaduras pueden incorporar y metabolizar los compuestos azufrados ya presentes en el mosto, pero también pueden producir diferentes clases de compuestos azufrados susceptibles de ser excretados en el medio (Flanzy, 2003). Esta producción está ligada a la necesidad de las levaduras de sintetizar aminoácidos azufrados (Aleixandre y Martínez, 1999).

2.2 Levaduras vínicas.

Las levaduras pertenecen a un amplio grupo de hongos unicelulares (Ascomycetos, Basidiomicetos y Deuteromicetos), incluyendo alrededor de 80 géneros, 600 especies y 4000 nombres. La mayor parte de las cepas fermentativas útiles pertenecen al género *Saccharomyces* y casi siempre a la especie *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 5) (Blouin y Peynaud, 2006). Entre ellas se logran diferenciar por su aspecto, sus propiedades, sus modos de reproducción y por la forma en que transforman los azúcares (Aleixandre y Martínez, 1999).

Cuando una célula de levadura se encuentra en un medio nutritivo favorable, ésta se reproduce multiplicándose de forma considerable y favoreciendo así su actuación. Por lo que en pocos minutos y en forma incesante duplican su número, de forma que su multiplicación es explosiva (Mijares y Sáez, 2007).

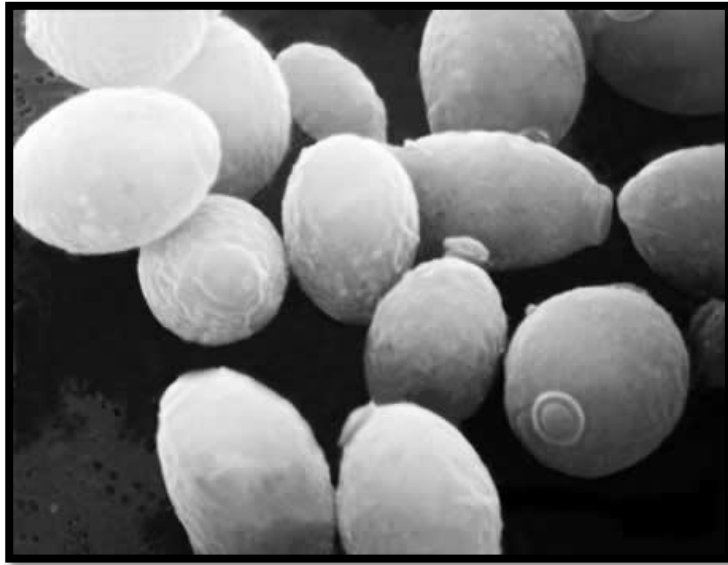


Figura 5. *Saccharomyces cerevisiae*.

Al contrario de cuando se trata de un medio desfavorable, las levaduras se paralizan sin tener ninguna actividad, hasta cuando las condiciones vuelvan a ser las óptimas, germinando sus esporas y dando paso a nuevas células de levaduras (Aleixandre y Martínez, 1999).

Las levaduras se encuentran en la uva madura en el momento de la recolección, y son transportadas con ella a la bodega, pasando por las diferentes labores mecánicas que sufre la uva hasta llegar a los depósitos, y otra parte de ellas proliferan en el mismo depósito. El suelo es su principal hábitat en invierno, encontrándose en la capa superficial de la tierra, y en verano por medio de los insectos y del polvo que levantan los arados, son transportadas a la uva (Aleixandre y Martínez, 1999).

La uva por si sola es muy pobre en levaduras; es decir de 1.000 a 100.000/baya. Se han encontrado sobre todo levaduras poco o nada fermentativa como *Rhodotorulas*, *Kloeckera*, *Candida* y *Pichia*, las cuales no pueden asegurar una fermentación alcohólica normal. La especie *Saccharomyces cerevisiae*, es poco abundante sobre la uva, pero es prácticamente la única especie fermentativa. Por lo mismo esta se vuelve rápidamente dominante en los mostos de fermentación, produciendo una fermentación espontánea, no muy eficaz y a veces molesta por los enólogos; ya que no tiene las características suficientes para la transformación del mosto en vino (Blouin y Peynaud, 2006).

Por lo anterior, la industria enológica cuenta con levaduras aisladas y seleccionadas las que presentan características específicas para cumplir según lo buscado y resaltar las cualidades deseadas en el vino. Estas levaduras llevan por nombre Levaduras Secas Activas (LSA) y tienen la ventaja de estar listas para ser usadas cuando se desee. La siembra de estas levaduras ha revelado una herramienta muy útil, para la obtención de vinos de calidad (De Rosa, 1998; Gaviño *et al.*, 2005).

Las ventajas de la siembra de levaduras al mosto según Brémon (1966) permite:

1. Un arranque de la fermentación mucho más rápido de los primeros mostos entrados, lo que permite evitar la acumulación de la vendimia entrada, facilitando el trabajo.
2. Regularidad y terminación casi siempre de las fermentaciones, a veces incluso con un ligero aumento del grado alcohólico.
3. Buena conservación de los vinos que quedan secos; es decir sin azúcares susceptibles a fermentar y servir de alimentos a las bacterias.

Ough (1992) y Gaviño *et al.* (2005) mencionan que existen en el mercado numerosas cepas de estos microorganismos, los cuales se diferencian en el poder fermentativo, potencialidad de los aromas, rendimiento en alcohol, poder alcohólico, resistencia a temperaturas elevadas, formación de glicerol, producción de ácido acético, entre otros factores buscados por los enólogos.

Para la selección de estas LSA, existen muchos criterios. Por ejemplo Degré (1993) propuso como característica deseable en una cepa vínica, conducir fermentaciones vigorosas con cortas fases de latencia y sin dejar azúcares residuales.

Suárez e Iñigo (2004) por su parte establecieron criterios básicos o fundamentales en la selección de levaduras vínicas señalando lo siguiente (Figura 6):

1. **Poder fermentativo elevado:** Producción y tolerancia a etanol; Ausencia de problemas de acabado.
2. **Acidez volátil baja:** Baja producción de ácido acético y acetato de etilo.

3. **Correcta cinética fermentativa:** Rápido arranque y acabado; Duración de la fermentación; Regularidad fermentativa; Resistencia a estrés fermentativo.
4. **Resistencia al SO₂:** Genética e inducible.
5. **Ausencia de defectos olfativos:** Mínima producción de SH₂ y otros derivados azufrados.
6. **Factor Killer:** Fenotipos K1,K2 y neutro.
7. **Otros según tecnologías específicas:** Blancos y tintos de calidad; Espumosos naturales; Crianza biológica.

La función principal de la adición de levaduras, es la de aportar una cantidad apropiada de biomasa de levadura en buen estado fisiológico. Las misiones son las generales de la gestión de la fermentación alcohólica por medio de la levadura. Éstas se refieren a la gestión de los riesgos de problemas de desarrollo de la fermentación como pueden ser el ritmo y acabado de esta, además de la gestión de los perfiles aromáticos y gustativos de los vinos (Flanzy, 2003).

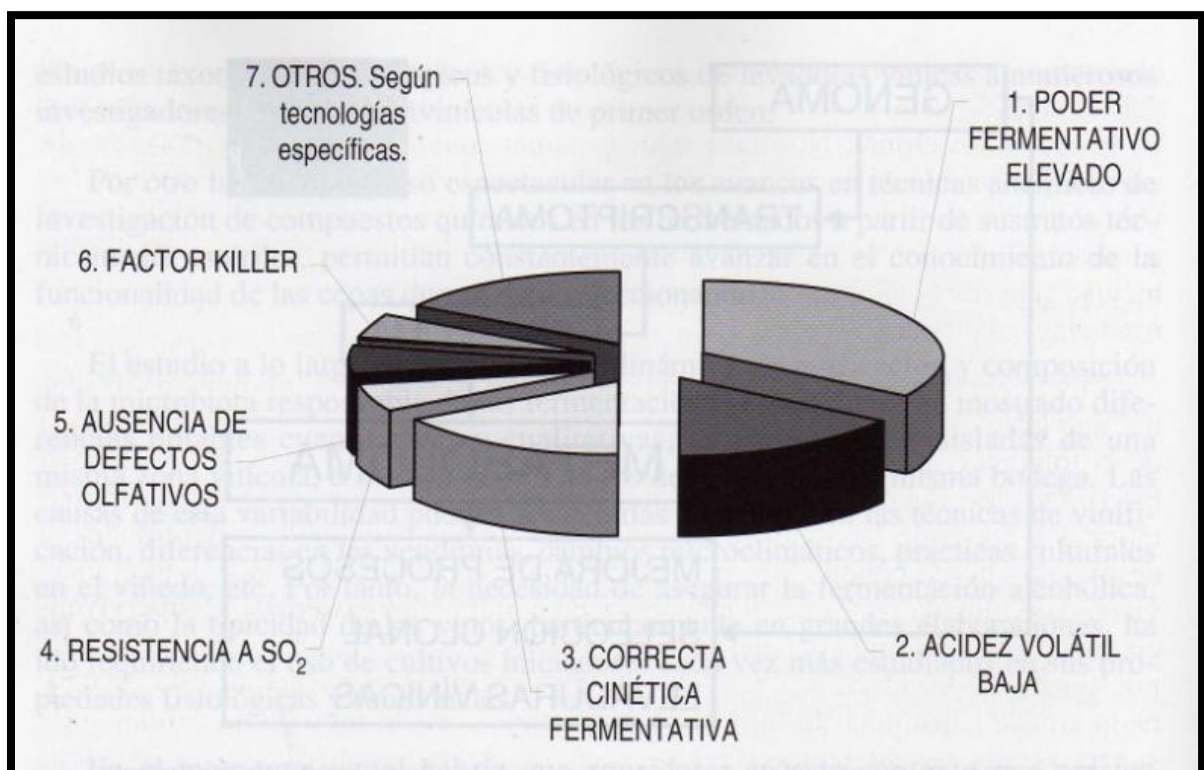


Figura 6. Criterios de selección clonal clásica de levaduras vínicas.
Fuente: Suárez e Iñigo, 2004.

2.2.1 Ecología de la fermentación alcohólica. La fermentación del mosto suele desencadenarse de forma natural y espontánea a partir de las propias levaduras presentes en el mosto, a este tipo de fermentación se le denomina fermentación espontánea. Se caracteriza porque en el transcurso de la misma intervienen varias especies de levaduras, algunas de las cuales coexisten en el tiempo y otras suceden secuencialmente en función de su poder alcohológeno (Mesas y Alegre, 1999).

En la fermentación espontánea, se perfilan tres estadios o fases biológicamente diferenciados, en cada uno de los cuales intervienen levaduras de distinto género y especie con marcadas diferencias fisiológicas (Suárez e Iñigo, 2004).

Durante la primera fase predominan las levaduras apiculadas, comúnmente agrupadas como no-*Saccharomyces*, Epifanio (2005) las define como levaduras poco fermentativas y sensibles al etanol, limitadas a los dos o tres días de fermentación, y por tanto su incidencia es también limitada, son productoras de bajo grado alcohólico, pertenecen a los géneros *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Toruslaspora*, *Pichia*, *Rhodotorula*, entre otras, están presente en los mostos poco sulfitados, dando lugar a la aparición en el vino de una gran cantidad de sustancias volátiles (Barcenilla, 1990; Fleet y Heard, 1993). A ella se deben los 3 ó 4 primeros grados de alcohol (Aleixandre y Martínez, 1999). A medida que la riqueza alcohólica aumenta, la población de estas levaduras decrece y va siendo sustituida como población dominante por el género *Saccharomyces* (García *et al.*, 2002).

En la segunda fase biológica, figuran en forma casi constante especies de gran pureza fermentativa y productoras de grado alcohólico medio (Suárez e Iñigo, 2004), perteneciente a *Saccharomyces ellipsoideus*, invadiendo rápidamente el medio llegando de 4 a 16 grados de alcohol, según las cepas. Su predominio se debe a su fuerte intensidad fermentativa (cantidad de azúcar transformado por unidad de tiempo) (Aleixandre y Martínez, 1999; López, 2005).

Hacia el final de la fermentación y correspondiente a la tercera fase, en los mostos ricos en azúcares, predominan distintas especies del género *Saccharomyces*, típicamente alcoholígenas, que terminan el proceso fermentativo con el agotamiento total de los azúcares. Algunas de estas cepas alcanzan los 17 ó 18 grados de alcohol. Siendo muy útiles para el

acabado de vinos de alta graduación alcohólica (Aleixandre y Martínez, 1999; Suárez e Iñigo, 2004).

2.2.2 Evolución de las levaduras durante la fermentación alcohólica. Durante la fase de crecimiento las levaduras se multiplican durante 6 ó 7 generaciones, generando así una población máxima de alrededor de 120 a 130×10^6 células por ml para una inoculación inicial de alrededor 10^6 células por ml (Flanzy, 2003).

El crecimiento de las levaduras es naturalmente dependiente de ciertas carencias nutricionales de los mostos, especialmente en nitrógeno asimilable (Bely *et al.*, 1990), en vitaminas (Ough *et al.*, 1989) y más particularmente en tiamina (Betaillon *et al.*, 1996). El oxígeno en pequeñas cantidades es necesario para un buen crecimiento celular (Sablayrolles y Barre, 1986).

Vicent (1992) agrega que además requieren condiciones físico-químicas (temperaturas, pH, aireación). Los microorganismos se multiplicarán y desarrollarán hasta que uno de los factores sea limitante. En base a esto se pueden distinguir tres fases principales en el ciclo de crecimiento de levaduras durante la fermentación según Muñoz e Ingledew (1990) (Figura 7):

- Fase de crecimiento con multiplicación activa de las levaduras, que dura de dos a cinco días y alcanza una población de 10^7 a 10^8 células/ml.
- Fase estacionaria en la que el nivel de células viables se mantiene aproximadamente constante sin multiplicación y que dura alrededor de ocho días.
- Fase de declinación, donde comienza la mortalidad celular y avanza paulatinamente alcanzando una población cercana a 10^5 células/ml.

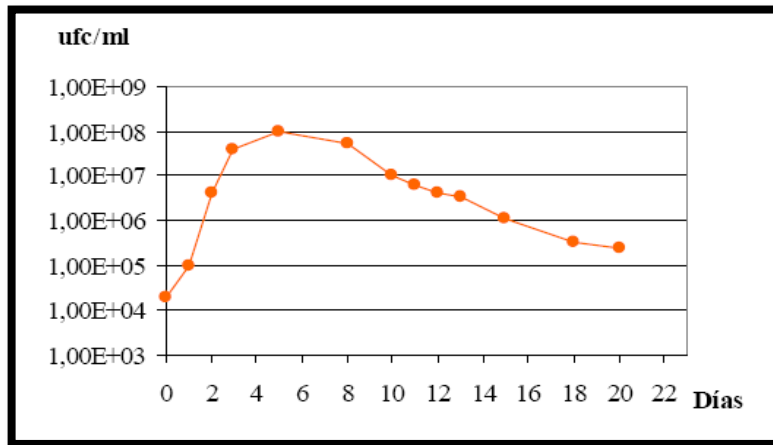


Figura 7. Curva de crecimiento de las levaduras durante la fermentación.
Fuente: Epifanio, 2005.

Esta multiplicación continúa durante la fermentación de los primeros gramos de azúcares: el número de levaduras puede alcanzar de 20 a 150 millones de levaduras/ml (Figura 8) (Blouin y Peynaud, 2006).

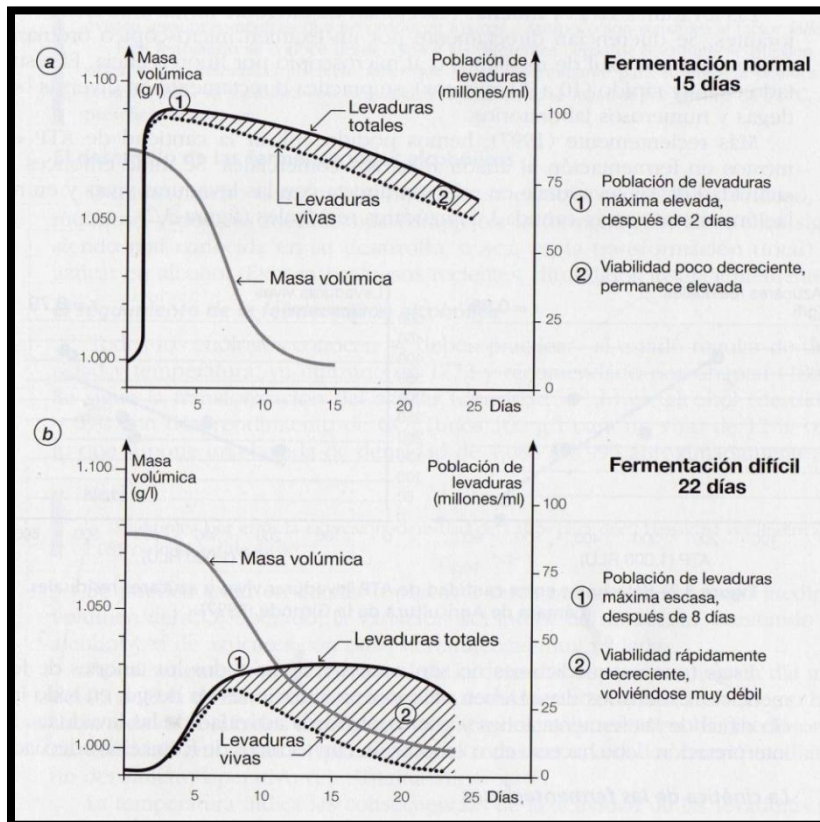


Figura 8. Evolución de los azúcares y de las levaduras en el transcurso de una fermentación alcohólica; (a) normal; (b) incompleta.
Fuente: Blouin y Peynaud, 2006.

2.3 Factores que afectan al desarrollo, crecimiento y actividad de las levaduras de fermentación.

Conducir la fermentación alcohólica es proporcionar las condiciones necesarias que aseguren un buen trabajo de las levaduras, las que permiten obtener la transformación completa del azúcar en alcohol (Aleixandre y Martínez, 1999). Como se mencionó en el punto 2.1, todos los seres vivos necesitan alimentos para subsistir y desarrollarse, además de tener un medio favorable para el óptimo crecimiento. Las levaduras son muy sensibles a la temperatura, necesitan oxígeno para reproducirse y también necesitan una alimentación apropiada en azúcares, sales minerales, sustancias nitrogenadas, entre otros factores (Aleixandre, 2006).

2.3.1 Temperatura. La temperatura es un factor importante en la actividad de todas las levaduras. Brémond (1966) menciona que como todo ser viviente, las levaduras sólo conservan su vitalidad entre ciertos límites de temperatura.

Más tarde Oreglia (1978) señala que existe una temperatura mínima, máxima y óptima para cada una de las funciones de las células. Mesas y Alegre (1999) indican que por debajo de los 10°C las levaduras o las esporas que se encuentran sobre los granos de uvas, generalmente no se reproducen o lo hacen muy lentamente. Por el contrario, una elevación de temperatura relativamente pequeña tiene efectos muy acusados sobre las levaduras. A partir de los 20-22°C la reproducción aumenta su velocidad (Brémond, 1966), y a medida que la temperatura aumenta la fermentación es más rápida, debido a que hay una mayor transformación de azúcar, por lo que la fase de latencia es mucho más corta, pero a los 35°C la fermentación se detiene a los pocos días, debido a una especie de agotamiento de las levaduras (Aleixandre y Martínez, 1999).

La velocidad de transformación del azúcar aumenta con la temperatura hasta un cierto límite; es decir por cada grado suplementario de temperatura, las levaduras transforman un 10% más de azúcar en el mismo tiempo, a mayor temperatura más rápido es el comienzo de la fermentación, terminando antes. El grado de alcohol alcanzado es menor y puede quedar azúcar residual sin fermentar. Además la población máxima de levaduras es inferior a temperaturas más

elevadas, a mayor temperatura la sensibilidad al alcohol es considerablemente mayor y las levaduras asimilan peor las sustancias nitrogenadas y se reproducen mal (Ribéreau-Gayon, citado por Vicent, 1992).

Aleixandre y Martínez (1999) señalan que la temperatura ideal en la vinificación en tinto se sitúa entre los 25 y 30°C, en función de conseguir una vinificación bastante rápida, una buena maceración, y evitar lógicamente la parada de fermentación.

2.3.2 Etanol: El efecto antiséptico bien conocido del alcohol, se manifiesta también frente a las levaduras cuya actividad ralentiza. Su efecto varía con la temperatura, los azúcares propios de las levaduras, la aireación y pH, entre otros. Es sensible a partir de 12,5-13% vol y es totalmente sensible hacia 15-17% vol (Blouin y Peynaud, 2006). Vale decir, mientras la tasa de crecimiento y viabilidad se ven afectadas con una baja concentración de etanol, la capacidad fermentativa es inhibida a concentraciones más altas de etanol (Reed y Nagodawithana, 1987).

La acción del alcohol depende de la especie y de la vitalidad de la levadura. Las levaduras apiculadas no pueden desarrollarse en un medio que contenga un 5% de alcohol (Brémond, 1966) y ya con un 6%, existe un predominio de *Saccharomyces* (Vicent, 1992).

La acción sobre la energía fermentativa va disminuyendo con el aumento del tenor alcohólico. En cuanto al poder fermentativo, hay levaduras que producen hasta un 19% en volumen de alcohol, por lo que hay un aumento de la concentración de azúcar. Cuando se trata de mostos que ya han fermentado y tienen elevada concentración alcohólica, se debe tener precaución de ir añadiendo de a poco mosto concentrado, sin esperar que se interrumpa la fermentación (Oreglia, 1978).

2.3.3 Azúcar. Brémond (1966) indica que la levadura en plena actividad tiene de 68 a 70% de agua, por tanto, si el mosto tiene menos de un 70% de agua, es decir más de un 30% de azúcar (alrededor de 250-300 g/l), las células de levadura pierden agua en beneficio del mosto, debido a

un intercambio osmótico, y su actividad aunque no se paraliza, resulta muy disminuida provocando un efecto inhibitor limitado según Blouin y Peynaud (2006).

A muy altas concentraciones, vale decir 700-900 g/l, los azúcares impiden la multiplicación de microorganismos, reprimiendo el arranque de la fermentación (Brémond, 1966; Blouin y Peynaud, 2006). Esta inhibición según Bisson (1986) se desconoce, ya que existen especies o cepas tolerantes a altas concentraciones de azúcar y que por lo tanto no sufren plasmólisis.

2.3.4 Oxígeno y factores de supervivencia. Aunque llamada “vida sin aire” por Pasteur, la fermentación no puede prescindir del oxígeno, cuyo papel es indispensable en la multiplicación de las levaduras (Blouin y Peynaud, 2006). Hidalgo (2002) lo define entonces, como una anaerobiosis no estricta o semianaerobiosis.

Para conseguir fermentaciones prolongadas y vinos de más de 10° de alcohol, se requiere la formación de un mayor número de levaduras, y por lo tanto es necesario el oxígeno (Vicent, 1992), permitiendo la síntesis de esteroides y de ácidos insaturados de cadena larga. Además del efecto factor de crecimiento, existe la formación de factores de supervivencia necesarios para los fines de la fermentación, pero que se forman únicamente al inicio de ésta (Blouin y Peynaud, 2006).

La verdadera utilidad del oxígeno para las levaduras es durante las fases de multiplicación, y nunca cuando la fermentación está avanzada; recomendándose al menos una aireación al segundo día de comenzar la fermentación alcohólica, cuando las levaduras están al final de su crecimiento (Hidalgo, 2002), por medio de remontados al mosto (Mesas y Alegre, 1999).

Blouin y Peynaud (2006) señalan que la aireación es la herramienta más poderosa para el buen desarrollo de las fermentaciones, debiendo intervenir de forma eficaz en toda situación (Figura 9).

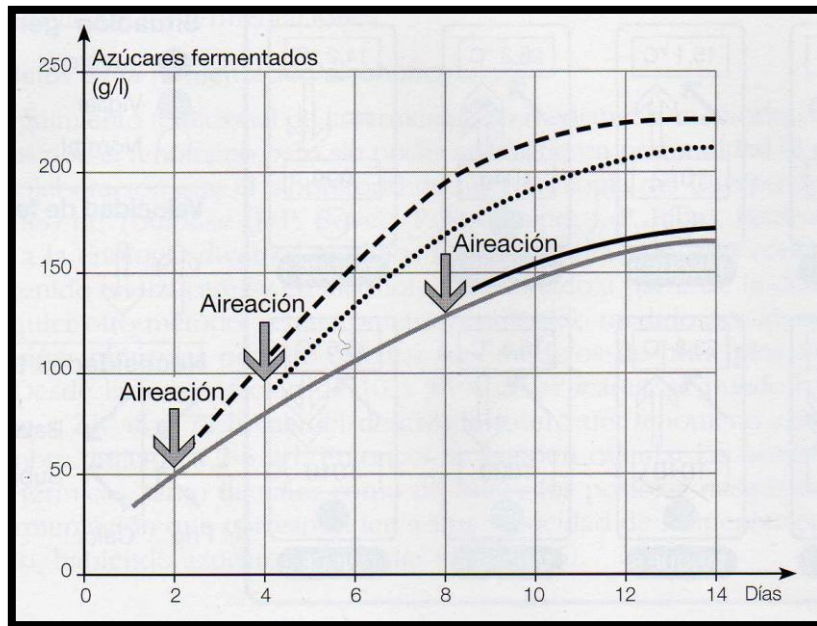


Figura 9. Efectos de la aireación en diferentes momentos de la fermentación sobre la fermentación del azúcar.

Fuente: Fuente: Blouin y Peynaud, 2006.

La falta de oxígeno limita la multiplicación de levaduras y al ser estas menos numerosas no terminan la transformación de azúcar (Ribéreau-Gayon, 1979, citado por Vicent 1992).

Por otra parte, en medios muy bien oxigenados pero con altas concentraciones de azúcares fermentables se reprime la síntesis y actividad de las enzimas respiratorias y se produce etanol (García *et al.*, 2002).

2.3.5 Nutrientes. Si bien las levaduras son capaces de encontrar en el mosto todo lo necesario para su desarrollo, este a veces no cumple con todas las necesidades de estas (Vicent, 1992). Tozzelli y Bovo (2005) señalan que la disponibilidad de nutrientes en el mosto es variable y depende de factores naturales, tales como características del viñedo, condiciones climáticas, entre otros y tecnologías como operaciones pre-fermentativas: clarificación, maceración, etc. Sus

requerimientos de azúcar y sales minerales son fácilmente satisfechos, no así sus necesidades de sustancias nitrogenadas asimilables (Aleixandre y Martínez, 1999).

El modo de empleo de los compuestos nitrogenados por las levaduras depende de su cantidad y de sus características químicas (Bustos, 1985).

Las levaduras están constituidas de un 25 a 60% de materias nitrogenadas, por lo tanto para formar sus células y reproducirse necesitan encontrar en el medio suficiente nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) (Aleixandre y Martínez, 1999) constituido por nitrógeno amoniacal y diversos aminoácidos (Blouin y Peynaud, 2006).

La vendimia puede ser pobre en nitrógeno asimilable por dos motivos principales según Aleixandre y Martínez (1999):

1. Una excesiva maduración de la uva.
2. Uvas atacadas por *Botrytis cinérea*. La podredumbre agota los alimentos nitrogenados necesarios para las levaduras.

La adición nitrógeno amoniacal en forma de sal de amonio es indispensable en algunos casos, útil en otros y nunca contraindicada, pues si las levaduras se benefician, las bacterias no lo utilizan. Debe hacerse preferentemente antes de iniciarse la fermentación, para que el nitrógeno adicionado sea íntegramente utilizado por las levaduras. Después de cuatro días de fermentación las levaduras solo utilizan la mitad y hacia el final apenas un tercio. Dosis de 10 a 20 g/HL de fosfato amónico, previa disolución, son suficientes para aumentar el número de levaduras y acelerar la fermentación (Figura 10) (Aleixandre y Martínez, 1999).

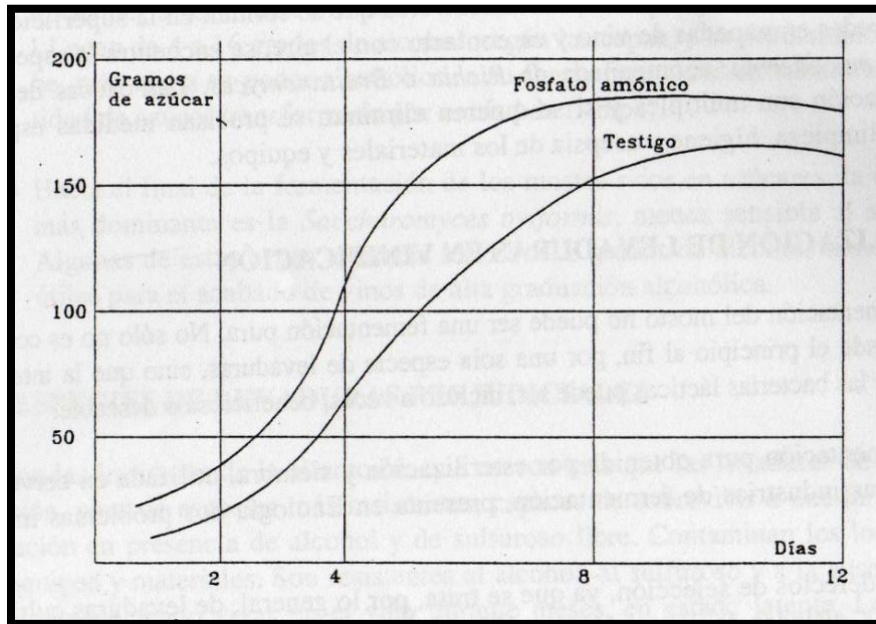


Figura 10. Activación de la fermentación de un mosto por la adición de 20 g/HL de fosfato amónico.

Fuente: Aleixandre y Martínez, 1999.

Blouin y Peynaud (2006), hacen referencia que la aplicación de nitrógeno asimilable en conjunto con la aireación del mosto, afectan positivamente la cinética fermentativa (Figura 11).

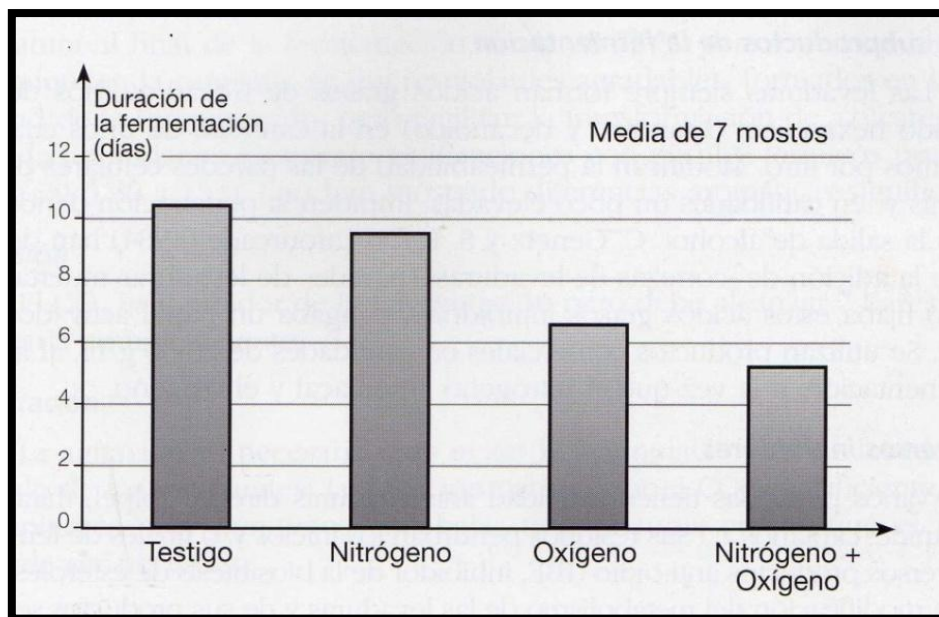


Figura 11. Influencia del nitrógeno y del oxígeno sobre las duraciones de la fermentación alcohólica.

Fuente: Fuente: Blouin y Peynaud, 2006.

La utilización de una correcta estrategia nutricional, es una técnica aplicada en la enología moderna de forma sistemática para mejorar las condiciones de las levaduras de fermentación (Palacios *et al.*, 2002), lo que conlleva a evitar los riesgos de las fermentaciones lentas, perezosas o paralizadas y consecuentemente, mejore los resultados cualitativos (Tozzelli y Bovo, 2005).

2.3.6 Residuos de productos fitosanitarios. Flanzky (2003) señala que los diversos pesticidas utilizados en el tratamiento de la viña, pueden ser detectados en unas dosis no despreciables posteriormente en los mostos.

Oreglia (1978) indica que los pesticidas actúan eliminando la microflora de la uva, además de influir sobre el proceso fermentativo, retrasando su inicio, ralentizándola e incluso su cese prematuro, influyendo en las características físico-químicas y sanitarias de los vinos (Otero *et al.*, 1995).

2.4 Paradas de fermentación.

Uno de los mayores problemas que se presenta en la elaboración de los vinos, son las paradas de la fermentación alcohólica, que pueden dejar a los vinos dulces con una cantidad mayor o menor de azúcares sin desdoblarse, y correr además un importante riesgo microbiano, por un posible ataque de las bacterias lácticas sobre los azúcares (Hidalgo, 2002).

Las fermentaciones lentas y paralizaciones causan tiempos largos de fermentación que no sólo resulta en una menor rotación de la capacidad de las cubas durante la temporada, sino que puede tener incluso un efecto adverso en la calidad del producto final, provocando serias pérdidas económicas (Van Vuuren *et al.*, 1987, citado por Vicent, 1992).

Los finales de fermentación son precisamente más lentos cuando la población de levadura viable aparece en pequeña cantidad. La fuerte mortalidad puede ser producida por dos grandes tipos de mecanismo: las carencias nutricionales y la presencia de productos inhibidores (Flanzky, 2003).

El mosto puede tener carencias en diferentes nutrientes susceptibles de causar problemas fermentativos, entre ellos los más citados a menudo son: el nitrógeno asimilable, la tiamina y el oxígeno (Flanzy, 2003).

La concentración de nitrógeno asimilable del mosto influye mucho sobre la cinética durante la mayor parte de la fermentación, así cuando esta concentración es muy débil, la fermentación es más larga, pero esto no implica un gran riesgo de parada de la fermentación (Flanzy, 2003). Por otro lado Ough y Kunkee (1968) señalan que un aumento de los compuestos nitrogenados puede provocar tasas de fermentación incrementadas.

La tiamina o vitamina B₁ puede ser también limitante y provocar fermentaciones muy lentas. En efecto, aunque la levadura es capaz de sintetizar tiamina, no lo puede hacer más que a una velocidad débil que ralentiza considerablemente la fermentación (Flanzy, 2003).

Las levaduras consumen gran cantidad de esta vitamina en la fase de multiplicación celular, y su adición puede aumentar las poblaciones hasta en un 30%, mejorando el rendimiento de la transformación de azúcares (Henzi, 1993), y reduciendo la producción de ácidos cetónicos que se pueden combinar con el sulfuroso haciendo que pierda su eficacia (Hidalgo, 2002, citado por Epifanio, 2005).

El oxígeno como fue explicado en el punto 2.3.4, cumple un rol fundamental para la multiplicación de las levaduras. Además, es utilizado en la biosíntesis de esteroides y ácidos grasos insaturados, necesarios para ajustar la fluidez de la membrana plasmática. Estos compuestos solo pueden ser sintetizados por la levadura en presencia de oxígeno y su efecto principal va a ser prolongar la sobrevivencia de la población (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1979; Traverso-Rueda y Kunkee, 1982; Flanzy, 2003).

El aporte de oxígeno puede modificar muy sensiblemente la cinética fermentativa. Al contrario de lo que ocurre con el nitrógeno, el oxígeno modifica poco el principio de la fermentación pero influye mucho sobre el final (Flanzy, 2003).

Otros factores que pueden causar la paralización de la fermentación son un alto contenido de azúcares y el consecuente elevado grado alcohólico, provocando un efecto inhibitor (Vicent, 1992).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Fecha y lugar de ensayo.

El estudio se realizó durante la temporada 2009 – 2010, en la Viña Santa Cruz, ubicada en la Sexta Región del Libertador General Bernardo O'Higgins, en el Valle Colchagua, a 25 Km. desde Santa Cruz en dirección hacia Lolol por la carretera I-72. Situada a 131m de altitud, siendo sus coordenadas geográficas 34°42'12'' Latitud Sur y 71°33'41'' Longitud Oeste.

La Viña Santa Cruz se emplaza sobre 220 hectáreas de suaves lomajes, en el Fundo el Peral, en la localidad de Lolol. De la superficie total, 160 hectáreas se encuentran en producción de viñedos, con cepas como Cabernet Sauvignon, Malbec, Carménère, Merlot, Petit Verdot y Syrah.



Figura 12. Valle de Colchagua
Fuente: Viña Santa Cruz

3.1.1 Descripción Viñedo. La zona presenta un clima mediterráneo con cambios estacionales muy marcados, con un promedio de precipitaciones anuales de 700 mm, concentradas en los meses de invierno y generalmente no presenta heladas durante los meses de brotación (septiembre). Los veranos son calurosos, cuyo régimen térmico fluctúa entre los 14° y 18° de temperatura. Esta localidad registra anualmente un promedio de 653 horas frío, comprendido entre los meses de Mayo y Agosto, y 1.470 grados días, desde Septiembre a Abril. Presenta vientos en promedio de 16 km/h, llegando hasta los 60 km/h, siendo la dirección predominante Sur – Oeste. Las necesidades de agua son cubiertas a través de tranques abastecidos mediante dos vías: aguas lluvias y embalse Lolol. En relación a los suelos, el fundo presenta dos grandes sectores, los cuales tienen diferencias edafoclimáticas significativas. El primer sector es El Peral, presentando suelos coluviales cercados a los faldeos de la cordillera, con texturas areno arcillosas, y en las zonas más bajas, suelos coluvio aluvial, donde se encuentran las texturas más arcillosas. El segundo sector es el Huaico, el cual presenta exposición Norte en forma predominante, con suelos de origen coluvio aluvial y con texturas arcillo limosas.

Dentro del diseño de plantación, las densidades de plantación varían entre 4.270 a 3.700 plantas/ha., dependiendo de las condiciones texturales y del vigor del suelo.

En cuanto al sistema de conducción utilizado en la Viña Santa Cruz, todas las plantaciones están sobre sistema de espalderas. El manejo agronómico está orientado al uso eficiente y racional de los agroquímicos, de manera de intervenir lo menos posible el medio ambiente natural del viñedo.

3.1.2 Descripción Bodega. La bodega utiliza la gravedad como concepto de vinificación (Figura 13), con el objetivo de fortalecer el concepto de calidad en los vinos como filosofía de productividad. Para ello, durante el proceso productivo se utilizan la menor cantidad de elementos externos, los cuales alteran la calidad final del producto.

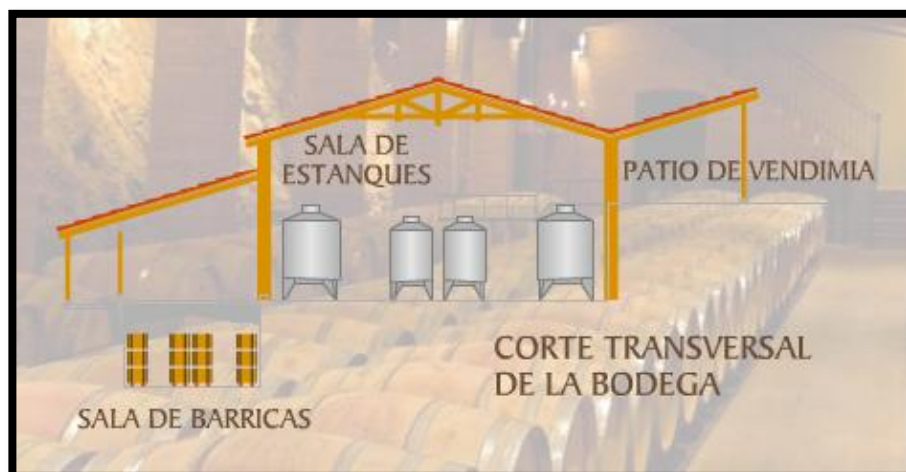


Figura 13. Vinificación por gravedad.

Fuente: Viña Santa Cruz

3.2 Manejo del ensayo.

El manejo vitícola utilizado fue el mismo en todo el huerto, considerando labores de podas, amarras, manejo en verde (eliminación de brotes, chapodas, deshoje, raleo), controles fitosanitarios, y por ultimo cosecha.

Para el ensayo se escogieron cuarteles en sectores que poseen las mismas características edafoclimáticas, las cuales no pasaron a ser influyentes en los resultados de este estudio.

En lo que respecta al manejo enológico aplicado es distinto dependiendo del cultivar cosechado. Teniendo en consideración que todas las vinificaciones tienen el mismo proceso de elaboración, pero esta varía durante sus etapas, aplicándose distintas estrategias enológicas de acuerdo al enólogo a cargo.

Los ensayos fueron realizados con mostos del cv. Carménère, y durante su proceso de vinificación se aplicó, SO_2 , TH_2 , taninos, manoproteínas, enzimas y levaduras comerciales, y por ultimo nutrientes a base nitrógeno (DAP y Nutriferm Energy).

Cabe mencionar que en el caso de la levadura comercial (ES 454) y Nutriferm Energy, proporcionado por la marca comercial enológica Enartis, cumple un rol fundamental en esta investigación, puesto a que se está poniendo a prueba la levadura y una nueva estrategia

nutricional, comparándola con la estrategia y protocolo de vinificación habitual empleado por la Viña.

Al tratarse de ensayos a escala industrial y trabajar con materia prima de alto valor y calidad, la investigación se ajusta a las condiciones de la empresa, lo que limita la realización de repeticiones para cada tratamiento.

3.3 Materiales.

3.3.1 Material vegetal. Se emplearon plantas de *Vitis vinifera* cultivar Carménère, establecidas en dos sectores dentro de la viña, sector Huaico y Peral, con plantas establecidas el año 1998 y 1997 respectivamente, sobre patrón franco y clon masal. El marco de plantación es de 2 x 1,4m.

Esta variedad se caracteriza por ser vigorosa, con entrada en producción lenta, sensible a la corredura, situación que afecta considerablemente a la capacidad productiva (Pszczólkowski, 2004). Los vinos son de gran riqueza, de intenso color y bastante tánicos; a veces con un ligero amargor final si proviene de uvas no bien maduras, pero si se cosecha tarde sus taninos son redondos y suaves. Generalmente su vino es de acidez total baja. Desde el punto de vista aromático sus olores están muy ligados al grado de madurez de la uva y puede variar desde el carácter vegetal con olores a arvejas verdes y habas verdes hasta aromas de frutas maduras rojas y negras, mermeladas y aroma especiados de anís, pimienta negra y laurel. Es un vino que madura rápidamente (Hernández, 2000)

3.3.2 Material de aplicación. Se realizaron análisis pre-fermentativos y fermentativos para obtener información y posteriormente corregirlos con la aplicación de productos. Para estos análisis se utilizó: gamelas con capacidad de 20Kg; balanza digital industrial de sobrepiso de marca Zero modelo PD-F, con capacidad de 300kg x 50gr; vasos precipitados de 250 y 500 ml; pipetas de 10 y 25 ml; cronómetro; bureta de 50 ml; agitador magnético con calefactor de marca

Fisatom modelo 735^a; refractómetro digital HI 96813; medidor de pH digital de mesa marca Hanna, modelo HI221; probeta de 250 ml de vidrio y plástico; mostímetro; termómetro de mercurio y de alcohol; reactivo formaldehído al 40% a pH 8,1; hidróxido de sodio en concentraciones de 1N, 0,1N, 0,01N y 0,25N; agua oxigenada; agua.

Para el proceso de vinificación se aplicó SO₂, TH₂, taninos, manoproteínas, enzimas y levaduras comerciales (ICV D254 y ES 454), y por último nutrientes a base nitrógeno (DAP y Nutriferm Energy).

3.4 Métodos.

Se realizaron dos ensayos, con dos tratamientos cada uno, pero con diferentes propósitos. El primer ensayo consistió en evaluar la acción fermentativa de dos levaduras, poniendo a prueba la usada habitualmente por la viña. En el segundo ensayo se estudió el efecto de una nueva estrategia nutricional en la fermentación alcohólica comparándola con la estrategia habitual usada.

3.4.1 Tratamientos y diseño experimental. Para ambos ensayos, durante el proceso de vinificación se aplicó SO₂ en dosis de 8g/HL en el llenado de las cubas, ácido tártarico (TH₂) en dosis dependiendo de la corrección de acidez de cada cuba, Tan'cor (taninos) en dosis parcializadas de 15gr/HL en el proceso de molienda y posteriormente cuando el mosto alcanza una densidad de 1050g/dm³, Prolie tinto (manoproteínas) en dosis de 10gr/HL utilizado como coadyuvante biológico de fermentación y Zym Couleur (enzimas pectolíticas) en dosis de 3g/100kg (Cuadro 2).

Cuadro 2. Aplicaciones comunes para la vinificación.

Ensayos	Tratamientos	Tratamientos al encubado				
		SO ₂ (g/HL)	TH ₂ (g/L)	Tanino (g/HL)	Manoprot (g/HL)	Enzimas (g/100kg)
Ensayo	T1	8	1,5	15	10	3
Levaduras	T2	8	1,65	15	10	3
Ensayo	T1	8	1,25	15	10	3
Nutrientes	T2	8	1,45	15	10	3

Fuente: Elaboración del autor, 2010.

3.4.1.1 Ensayo evaluación del poder fermentativo. Para el primer ensayo, las elaboraciones se llevaron a cabo en depósitos de acero inoxidable con capacidad de 26.000 lts. (20.000 kg.). El T1, se inoculó con la cepa ICV D254 en dosis de 25 g/HL, perteneciente a la marca comercial Lallemand, la cual es usada habitualmente en el proceso de vinificación de la viña. El T2, se inoculo con la cepa ES 454 en dosis de 25 g/HL, perteneciente a la marca comercial Enartis (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tratamientos, levaduras y dosis aplicada, para evaluar la actividad fermentativa.

Tratamientos	Levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Dosis (g/HL)
T1	ICV D254	25
T2	ES 454	25

Fuente: Elaboración del autor, 2010.

La estrategia nutricional se basó en la habitual usada por la viña, que consistía:

Cuadro 4. Estrategia nutricional habitual.

Tratamientos	DAP		Nutriferm Energy		
	FAN inicial (ppm)	Dosis DAP (g/HL)	Momento de aplicación	Dosis Nutri. E. (g/HL)	Momento de aplicación
T1	175	12,5	50% inoculación, 50% d=1.050	15	11g/HL inoculación, 4g/HL d=1.050
T2	>200	0	50% inoculación, 50% d=1.050	15	11g/HL inoculación, 4g/HL d=1.050

Fuente: Elaboración del autor, 2010.

Para el tratamiento 2, el DAP no se aplicó puesto que el mosto presentaba un NFA de más de 200 mg/l. Cantidad suficiente para que las levaduras realicen todas sus actividades durante todo el proceso de fermentación.

3.4.1.2 Ensayo del efecto de la estrategia nutricional. Para el segundo ensayo, las elaboraciones se llevaron a cabo en depósitos de acero inoxidable con capacidad de 6.500 lts. (5.000 kg.).

Se inoculó en ambos tratamientos la misma cepa de levaduras, ES 454 en dosis de 30 g/HL (Cuadro 5).

Cuadro 5. Tratamientos, levaduras y dosis aplicada, para evaluar la estrategia nutricional.

Tratamientos	Levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Dosis (g/HL)
T1	ES 454	30
T2	ES 454	30

Fuente: Elaboración del autor, 2010.

En T1, se utilizó la estrategia habitual usada por la viña, que consiste en la aplicación de DAP y Nutriferm Energy en dosis parcializadas durante el proceso de elaboración del vino (Cuadro 6).

Para la aplicación del fosfato diamónico DAP, la dosis era en relación a la cantidad de nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) presente en el mosto. En este caso la dosis fue de 12,5 g/HL, y el momento de aplicación fue repartida en 50% en inoculación y el porcentaje restante cuando el mosto alcanzó una densidad de 1050 g/dm³.

Para la adición del activador comercial Nutriferm Energy, la dosis fue de 15 g/HL, aplicando 11g/HL en inoculación y 4g/HL cuando el mosto alcance una densidad de 1050 g/dm³.

En T2, se utilizó una nueva estrategia nutricional, que consistía en la no parcialización de ninguno de los dos productos. La aplicación de DAP, al igual que el tratamiento 1, fue en relación a la cantidad de NFA presente en el mosto, por lo que la dosis aplicada fue de 19,5 g/HL cuando el zumo de uva alcanzó una densidad de 1050 g/dm³.

El momento de aplicación del activador biológico Nutriferm Energy, se realizó durante la inoculación de las levaduras a razón de 15 g/HL.

Cuadro 6. Estrategias nutricionales habitual y propuesta.

Tratamientos	DAP			Nutrifer Energy	
	FAN inicial (ppm)	Dosis DAP (g/HL)	Momento de aplicación	Dosis Nutri. E. (g/HL)	Momento de aplicación
T1	168	16	50% inoculación, 50% d=1.050	15	11g/HL inoculación, 4g/HL d=1.050
T2	161	19,5	100% d=1.050	15	15 g/HL en inoculación

Fuente: Elaboración del autor, 2010.

El desarrollo de la fermentación alcohólica en ambos ensayos se siguió cuatro veces al día midiendo densidad y temperatura. Permitiendo elegir el momento de la adición de la materia nitrogenada.

Además se analizó diariamente el contenido de nitrógeno fácilmente asimilable presente en el mosto durante el proceso de fermentación.

Una vez terminada la fermentación, los vinos obtenidos en ambos ensayos fueron analizados para su posterior comparación.

3.4.2 Parámetros evaluados.

a) Evolución de la fermentación alcohólica: El desarrollo de la fermentación alcohólica se controló mediante la determinación diaria de la temperatura y densidad.

- **Temperatura (T°).** Se determinó diariamente con termómetro de mercurio para el caso de análisis prefermentativos y termómetro de alcohol para medir el mosto.
- **Densidad (D°).** La densidad relativa a 20°C o densidad 20°C/20°C es la relación expresada en número decimal, entre la masa de un cierto volumen de mosto o de vino a 20°C y la masa del mismo volumen de agua a la misma temperatura. Se determinó diariamente mediante aerometría a 20°C.

b) Evolución del nitrógeno fácilmente asimilable durante la fermentación alcohólica. Se analizó el contenido de nitrógeno asimilable por el método con formaldehído o método de Söresen, descrito por Sanhueza (1999). El resultado se expresa en mg/l.

c) Composición analítica de los mostos y vinos. Se realizaron análisis físico-químicos según los métodos oficiales de la CEE (Reglamento CEE. N° 2676/90), como pH, acidez total (AT), grados brix (Bx), grado alcohólico probable (GAP), acidez volátil (AV), azúcares residuales (AR), grado alcohólico (GA).

3.4.3 Análisis estadísticos. En ambos ensayos, el diseño experimental fue en base a modelos de regresión lineal simple, con una prueba de comparación de regresiones con dosima de hipótesis de las pendientes entre los tratamientos evaluados. Además se evaluó la asociación entre el nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) y la densidad de los mostos, bajo el coeficiente de correlación de Pearson.

La unidad experimental fue cada depósito con capacidad de 26.000 y 6.500 lt. Respectivamente a cada ensayo.

Se utilizó el software estadístico JMP 8 para el análisis de los datos obtenidos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Ensayo evaluación del poder fermentativo.

4.1.1 Composición inicial de los mostos. Los resultados de los análisis efectuados a los tratamientos de este ensayo se presentan en cuadro 7, pudiéndose observar que no hubo diferencia en cuanto a la composición de los mostos de ambos tratamientos para cada una de las variables en estudio. A excepción del nitrógeno fácilmente asimilable.

Cuadro 7. Composición analítica de los mostos en ensayo de evaluación del poder fermentativo.

Tratamiento	T°	pH	AT	Bx	D°	GAP	NFA
T1	13	3,85	2,1	26,4	1114	15,2	203
T2	12,8	3,83	2,2	26,6	1114	15,2	175

Fuente: Elaboración del autor, 2010.

4.1.2 Evolución de la fermentación alcohólica. Las curvas de fermentación, densidad y temperatura de la cepa ICV D245 y la cepa ES 454 se presenta en la figura 14.

En ambos tratamientos la temperatura inicial de fermentación fue de 13°C, y terminada ésta, fue de 22°C, teniendo una media de 25°C en ambos tratamientos durante el proceso de fermentación. Esta temperatura es idónea según Aleixandre y Martínez (1999), quienes señalan que para la vinificación en vinos tintos la temperatura ideal fluctúa entre los 25 y 30°C.

Las dos cepas de levaduras estudiadas han completado la fermentación, aunque con cinética fermentativa distinta. ICV D254 tardó 11 días en completar la fermentación, mientras que la cepa ES 454 demoró 12 días. En ambos casos la fermentación se dió por finalizada al tener una densidad de 998 g/dm³.

A pesar que ambas cepas presentan una velocidad fermentativa moderada a regular según catálogo, se puede observar en la figura 14, que la cepa ICV D254 presenta un arranque más

rápido de la fermentación que la cepa ES454. Esto se explica porque ICV D254 posee una fase de latencia muy baja en comparación a ES454. Pese a ello, al cuarto día de fermentación ambas igualan su poder fermentativo durante la fase de crecimiento.

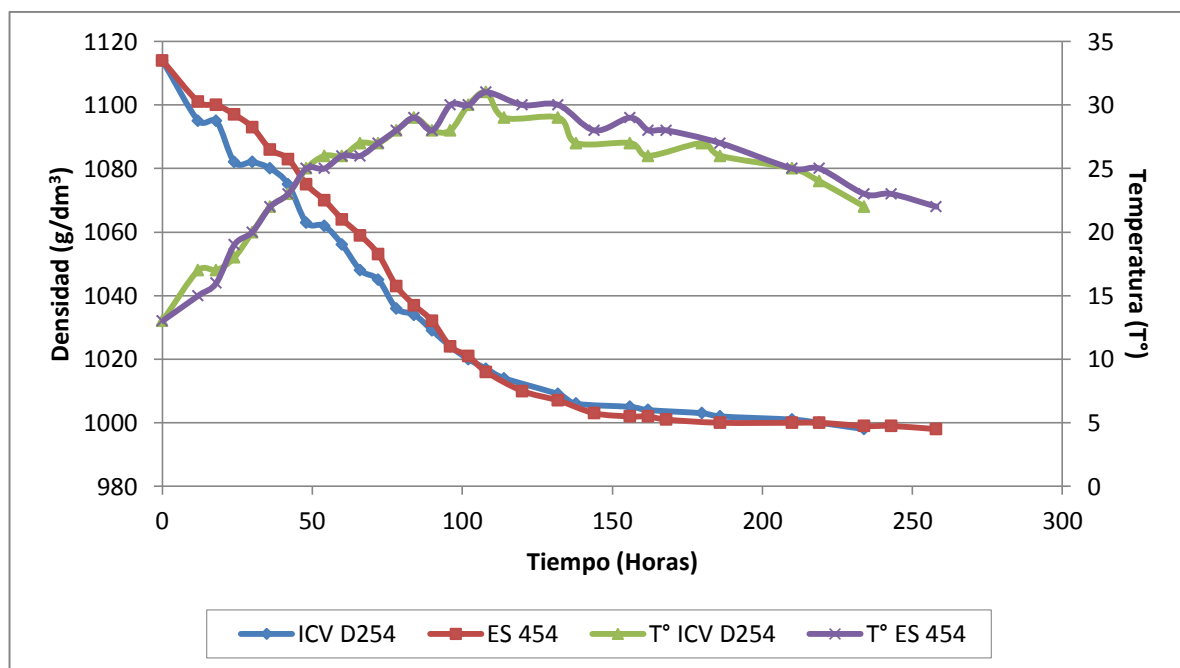


Figura 14. Cinética fermentativa de la cepa ICV D254 y ES 454.

Fuente: Elaboración del autor, 2010.

La adición de nutrientes en inoculación y cuando el mosto alcanza una densidad de 1050 g/dm^3 , afectó positivamente a la cepa ICV D254, aumentando su tasa fermentativa, y por tanto acelerando el acabado del vino. En cambio, para la cepa ES454 la adición de materias nitrogenadas, no afectó su funcionamiento, teniendo una cinética constante a lo largo del tiempo.

El análisis de los resultados obtenidos mediante el método de comparación de pendientes de ambas regresiones, reflejan que no se produjeron diferencias significativas entre los tratamientos.

4.1.3 Evolución del nitrógeno fácilmente asimilable durante la fermentación alcohólica. En la figura 15 se reflejan los resultados de la evolución del nitrógeno fácilmente asimilable para cada uno de los tratamientos evaluados.

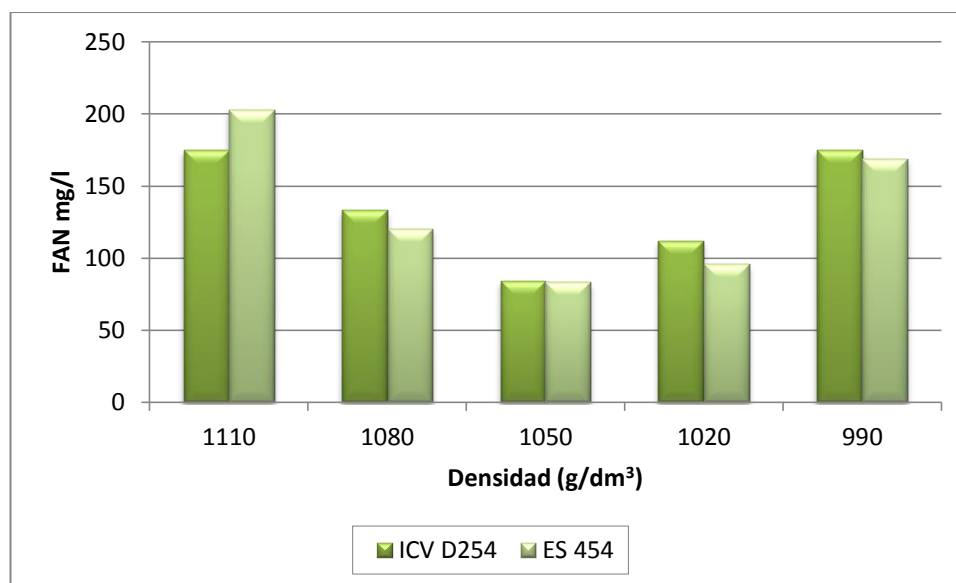


Figura 15. Evolución del nitrógeno fácilmente asimilable .
Fuente: Elaboración del autor, 2010.

Se observa que para el tratamiento con la cepa ES 454, presenta un valor de NFA de 203 mg/l, cuando la densidad del mosto fue 1110 d/dm³ en comparación con el tratamiento de la cepa ICV D254 que presenta 175 mg/l. Según estudios de Lizama (2004) y Paladino *et al.*, (2004) esta diferencia puede atribuirse a diversos factores como: madurez de la uva, fertilización nitrogenada, restricciones hídricas, porta injerto, infección de hongos, añada, tipo de suelo, excesivos desborre del mosto previo a la fermentación, entre otros.

Kunkee (1991) plantea como nivel óptimo de NFA, concentraciones entre 140 mg/l y 200 mg/l. Es por ello que al tratamiento 2, no se le aplicó suplementación nitrogenada, ya que con la concentración existente en el mosto era suficiente para que las levaduras puedan realizar sus actividades metabólicas durante todo el proceso de fermentación. Pese a esta alta concentración de NFA contenida en el mosto, autores como Ough *et al.*, (1991) y Torija *et al.*, (2003a), señalan

que no siempre se asegura una buena cinética de fermentación, lo que coincide plenamente con los resultados obtenidos.

Paladino *et al.*, (2004) señala que los altos niveles de NFA están asociados con una menor duración de la fermentación alcohólica.

En la segunda adición de nutrientes para el tratamiento 1, se ven resultados inmediatamente beneficiosos, aumentando el contenido de NFA, permitiendo un aumento en la población de levaduras favoreciendo la velocidad fermentativa, terminando 1 día antes en comparación con el tratamiento 2.

La cepa ES 454 presenta un mayor consumo de nitrógeno fácilmente asimilable, en comparación con la cepa ICV D254. Jiranek *et al.*, (1995) y Bisson y Butzke (2000) lo atribuyen a la habilidad que cada cepa tiene para utilizar el nitrógeno aprovechable.

Julien *et al.*, (2000), señala que hay que tener en cuenta que los requerimientos de nitrógeno de las distintas cepas de levadura son muy variables, algunas pueden necesitar hasta dos veces más cantidad de nitrógeno para fermentar el mismo mosto.

4.1.4 Composición de los vinos. Los resultados de los análisis de los vinos se encuentran reflejados en cuadro 8, donde no figuran diferencias significativas entre los tratamientos. Cabe mencionar que la cantidad de azúcar residual es considerablemente alta, pasando de ser un vino seco (< de 5g/l) a un vino semiseco (> 5g/l a 55g/l <).

Cuadro 8. Composición analítica de los vinos en ensayo de evaluación del poder fermentativo.

Tratamiento	T°	pH	AT	AV	AR	A°	D°
T1	16,2	3,96	3,62	0,45	8,76	14,7	996
T2	16,2	4,01	3,18	0,41	8,56	14,9	996

Fuente: Elaboración del autor, 2010.

4.2 Ensayo del efecto de la estrategia nutricional.

4.2.1 Composición inicial de los mostos. Los resultados de los análisis se encuentran reflejados en el cuadro 9, pudiéndose observar que no hubo diferencia significativas en cuanto a la composición de los mostos.

Cuadro 9. Composición analítica de los mostos en ensayo del efecto de la estrategia nutricional.

Tratamiento	T°	pH	AT	Bx	D°	GAP	FAN
T1	14,8	3,75	2,4	25,1	1107	14,35	168
T2	15,2	3,77	2,35	24,6	1107	14,2	161

Fuente: Elaboración del autor, 2010.

El mosto presenta una concentración de azúcares suficientes para alcanzar los 14° alcohólicos una vez transformado en vino, su acidez total es baja lo que implica un medio ácido elevado. En cuanto a la concentración de nutrientes, según resultados obtenidos por Bordeu (1998), la cantidad de nitrógeno fácilmente asimilable, está por sobre el límite para asegurar una fermentación completa.

4.2.2 Evolución de la fermentación alcohólica. Las curvas de fermentación, densidad y temperatura de la estrategia nutricional habitual y la nueva estrategia se presentan en la figura 16.

En ambos tratamientos la temperatura inicial de fermentación fue de 15°C, y terminada ésta, fue de 27 y 28°C para cada tratamiento, teniendo una media de 25°C.

La cepa ES 454 utilizada en ambos tratamientos completó la fermentación alcohólica, dejando el vino seco de azúcares fermentables, pero con cinéticas fermentativas distintas. El tratamiento con la estrategia nutricional habitual, demoró 5 días en transformar la totalidad de

azúcares en alcohol. En cambio el tratamiento bajo la nueva estrategia nutricional, la levadura arranca más tempranamente, demorando 4 días en terminar el proceso.

El análisis de los resultados obtenidos mediante el método de comparación de pendientes de ambas regresiones, reflejan que si existen diferencias significativas entre los tratamientos, pudiéndose constatar que la dosis y el momento de aplicación inciden en la cinética fermentativa, con arranques más rápidos y una duración de fermentación más corta. Estos resultados serían similares a los obtenidos por Fernández (1999), quien afirma que aplicaciones de dosis altas de nitrógeno en fase estacionaria llevan a un mejor término de fermentación y a una mayor transformación de azúcar en alcohol.

Sablayrolles *et al.* (1996), determinó que es más eficiente hacer aplicaciones en mitad de fermentación, ya que adiciones hechas durante la siembra llevan a poblaciones máximas acelerando la primera parte de la fermentación pero no tiene efectos importantes sobre la disminución de los riesgos de paralización de la fermentación.

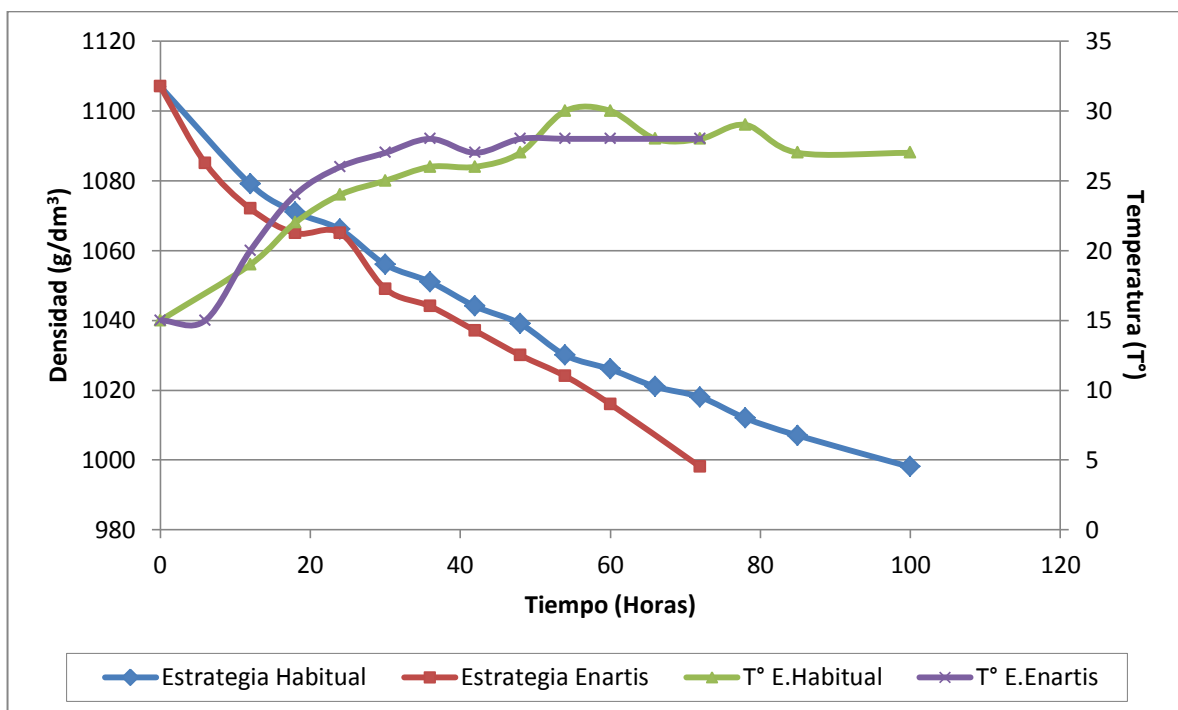


Figura 16. Cinética fermentativa de dos estrategias nutricionales.

Fuente: Elaboración del autor, 2010.

Por otra parte, Hidalgo (2002), hace mención que la aplicación de suplementos nitrogenados se debe dividir en más de una vez, al igual que Bisson y Butzke (2000), quienes señalan que la aplicación debe idealmente realizarse en dos etapas, la primera antes de la inoculación y la otra a mediados, en la tasa máxima de la fermentación.

4.2.3 Evolución del nitrógeno fácilmente asimilable durante la fermentación alcohólica. En la figura 17 se reflejan los resultados de la evolución del nitrógeno fácilmente asimilable para cada uno de los tratamientos evaluados.

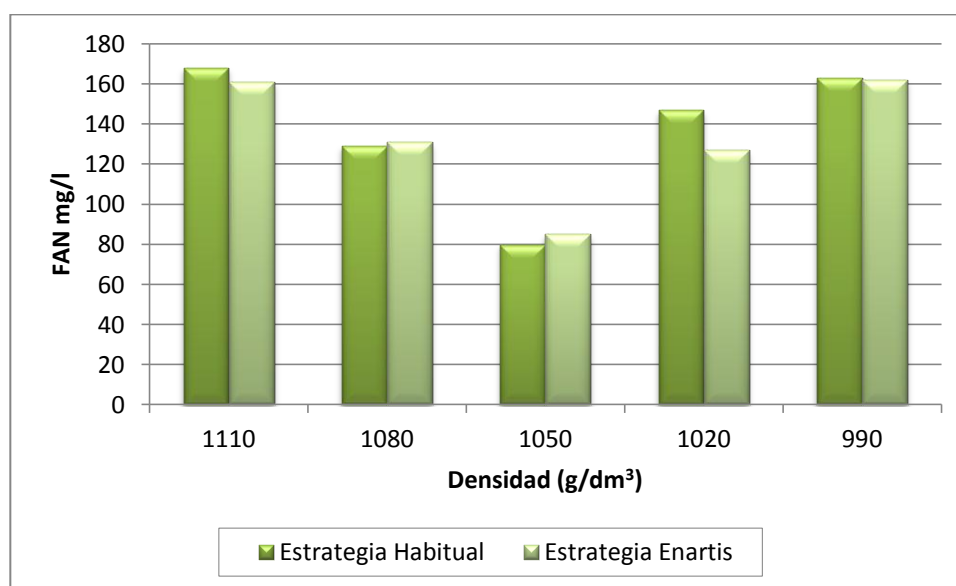


Figura 17. Evolución del nitrógeno fácilmente asimilable.
Fuente: Elaboración del autor, 2010.

Se logra observar que al inicio de ambos tratamientos presentaron una concentración similar de nitrógeno fácilmente asimilable, con 168 mg/l y 161 mg/l respectivamente. Resultados que según Bordeu (1998) están por sobre la concentración mínima para una fermentación exitosa.

Al disminuir la densidad del mosto, las concentraciones fueron similares entre los tratamientos, deduciendo por tanto que las levaduras sometidas a diferentes medios nutritivos, presentan un bajo consumo de nitrógeno fácilmente asimilable. Lo anterior confirma las características enológicas descritas en el catálogo de venta de la cepa ES 454, que señala que la levadura presenta una necesidad media-baja de nitrógeno.

4.2.4 Composición de los vinos.

Los resultados de los análisis de los vinos se encuentran reflejados en cuadro 10, donde las variables evaluadas no muestran diferencias significativas entre los tratamientos. A excepción del azúcar residual.

Cuadro 10. Composición analítica de los vinos en ensayo del efecto de la estrategia nutricional.

Tratamiento	T°	pH	AT	AV	AR	A°	D°
T1	16,8	3,91	3,72	0,33	2,83	14,4	994
T2	16,8	3,86	4,01	0,3	3,54	14,5	995

Fuente: Elaboración del autor, 2010.

5. CONCLUSIONES.

En función de los resultados obtenidos en este ensayo, se puede establecer que se cumple la hipótesis planteada y permite concluir que:

- La cepa ES 454 no presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto a la cepa ICV D254, en su capacidad de terminar la fermentación y en la composición final de los vinos.
- La composición inicial de los mostos no influyó en la actividad fermentativa de las levaduras.
- Se obtuvo diferencias estadísticamente significativas en la dosis y el momento de aplicación de nitrógeno amoniacal, ya sea en forma de fosfato diamónico (DAP) o corteza de levadura rica en aminoácidos complementados con tiamina como es el caso del activador biológico (Nutriferm Energy), incidiendo en la cinética fermentativa, con arranques de fermentación más rápidas y duraciones de fermentación más cortas.
- El uso de la levadura ES 454 bajo la gestión nutricional de DAP añadido 100% cuando el mosto alcanzó una densidad de 1050 d/dm^3 junto con el activador biológico aplicado 100% en inoculación, permite una fermentación completa y en menos tiempo.

6. RESUMEN.

La fermentación alcohólica es el proceso bioquímico mejor estudiado en la producción de vinos de calidad. Pese a ello, éste aún presenta problemas sin resolver de tipo teórico y práctico, que principalmente tienen que ver con la obtención de conseguir fermentaciones completas. La utilización de levaduras y su correcta nutrición aplicada en la enología moderna, ha logrado modificar estas complicaciones, permitiendo de una u otra manera evitar los riesgos de fermentaciones lentas, perezosas o simplemente paralizadas.

Sobre la base de lo anterior, en el presente trabajo de investigación, realizado durante la temporada 2009 – 2010, en la Viña Santa Cruz, ubicada en la Sexta Región del Libertador General Bernardo O'Higgins, en el Valle Colchagua, tuvo por objetivo mediante dos ensayos con dos tratamientos cada uno evaluar la acción fermentativa de la levaduras comercial ES 454 y su comportamiento frente a dos estrategias nutricionales, durante la fermentación alcohólica.

El diseño experimental fue a base de modelos de regresión lineal simple, con una prueba de comparación de regresiones con dosima de hipótesis de las pendientes entre los tratamientos evaluados.

En el primer ensayo se buscó evaluar y comparar el poder fermentativo de la levadura ES 454, con la levadura testigo, donde los resultados obtenidos no presentaron diferencias estadísticamente significativas en el término de la fermentación y en la composición final de los vinos.

En el segundo ensayo se evaluó el efecto de la estrategia nutricional sobre la levadura comercial ES 454, obteniendo resultados estadísticamente significativos en la dosis y el momento de aplicación de nitrógeno amoniacal, incidiendo en la cinética fermentativa, con arranques de fermentación más rápida y duraciones de fermentación más cortas.

7. SUMMARY.

Alcoholic fermentation is the best biochemical process studied in the production of quality wines. Nevertheless, still has unresolved theoretical and practical problems, mostly has to do with obtaining complete fermentation. The use of yeast and proper nutrition applied in modern enology, has succeeded in changing these complications, allowing in one or another way to avoid the risks of slow fermentation, lazy or just paralyzed.

Based on the foregoing, the present investigation, carried out during 2009 - 2010 season, in the Santa Cruz vineyard, located in the Sixth Region of Libertador General Bernardo O'Higgins, Colchagua Valley, aims to assess the trade effects of yeast fermentation ES 454 and its behavior during two nutritional strategies during alcoholic fermentation in two trials with two treatments each.

The experimental design was based on simple lineal regression models, with a comparison test of hypotheses dosimetry regressions of slopes between treatments.

The first assay was aimed to evaluate and compare both fermentations of yeast ES 454, with the yeast control, where results showed no statistically significant difference in the end of the fermentation and the final composition of wines.

In the second assay, was evaluated the effect of the nutrition strategy on commercial yeast ES 454, obtaining statistically significant results in the dose and timing of nitrogen application, affecting the fermentation kinetics, with faster fermentation starts and shorter durations fermentation.

8. LITERATURA CITADA.

1. **Aleixandre, J.** 2006. La Cultura del Vino. Cata y Degustación. Segunda Edición. Editorial Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 345 p.
2. **Aleixandre, J. y Martínez, F.** 1999. Manual de Enología. Primera Edición. Editorial Servicio de Publicaciones, Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 431p.
3. **Barcenilla, J.** 1990. Influencia de las Levaduras sobre Polifenoles, Polialcoholes y Azucares en los Procesos de Fermentación y Conservación de Vinos Blancos. Tesis Doctor en Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. 371 p.
4. **Bely, M., Sablayrolles, J. y Barre, P.** 1990. Automatic Detection of Assimilable Nitrogen Deficiencies During Alcoholic Fermentation in Enological Condition. J. Ferm. Bioeng. 70: 246-252.
5. **Betailon, M., Rico, A., Sablayrolles J., Salmon, J. y Barre, P.** 1996. Early Thiamin Assimilation by Yeasts Under Enological Conditions: Impacto n Alcoholic Fermentation Kinetics. J. Ferm. Bioeng. 82: 101-106.
6. **Bisson, L.** 1986. Strategies for the Improvement of Industrial Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. The Word Biotech Report Food Processing. Vol. 2(1):103-116.
7. **Bisson, L. y Butzke, C.** 2000. Diagnosis and rectification of stuck and sluggish fermentations. American Journal of Enology and Viticulture. 51 (4): 325-329.
8. **Blouin, J. y Peynaud, É.** 2006. Enología Práctica. Conocimiento y Elaboración del Vino. Cuarta Edición. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 357 p.
9. **Bordeu, E.** 1998. Niveles de amonio y nitrógeno fácilmente aprovechable para las levaduras. Algunas Experiencias en Chile. In: Tópicos de actualización en viticultura y enología. Colección de Extensión. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 173-184 p.
10. **Boulton, R., Singleton, V., Bisson, L. y Kunkee, R.** 2002. Teoría y Práctica de la Elaboración del Vino. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 650 p.

11. **Brémond, E.** 1966. Técnicas Modernas de Vinificación y de Conservación de los Vinos. Primera Edición Española. Editor José Montesó. Barcelona, España. 290 p.
12. **Bustos, O.** 1985. El Vino Chileno. Primera Edición. Editorial Universitaria. Santiago, Chile. 111p.
13. **Degré, R.** 1993. Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. Wine and Biotechnology. Graham H. Fleet (ed). Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. 421-447 p.
14. **De Rosa, T.** 1998. Tecnología de los Vinos Blancos. Primera Edición. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 527 p.
15. **Epifanio, S.** 2005. Influencia de la Tecnología de Vinificación en la Microbiología y el Desarrollo de la Fermentación Alcohólica. Tesis Doctoral Enología. Universidad de La Rioja. La Rioja, España. 237 p.
16. **Fernández, R.** 1999. Efecto de dosis y momento de aplicación de fosfato diamónico sobre fermentación alcohólica y la calidad del vino. Proyecto de Título. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 46 p.
17. **Flanzy, C.** 2003. Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos. Segunda Edición. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 797 p.
18. **Fleet, G y Heard, G.** 1993. Yeast. Growth during fermentation. Wine Microbiology and Biotechnology. Graham H. Fleet (ed). Harwood Academic Publisher. Switzerland., 27-54
19. **García, J.** 2008. Maridaje, Enología y Cata de Vinos. Primera Edición. Editorial Innovación y Cualificación. Málaga, España. 410 p.
20. **García, M., Quintero, R. y López-Munguía, A.** 2002. Biotecnología Alimentaria. Editorial Limusa. D.F, México. 636p.
21. **Gaviño, S., Martín, R., Calderón, R., Fernández, F., Suárez, J., García, A. y López-Cordón, E.** 2005. Implantación de Levaduras Seleccionadas Durante la Fermentación. Revista La Semana Vitícola. España. N°3054, 566-569.

22. **Henzi, M.** 1993. Efecto de factores nutricionales y de adsorbentes de ácidos grasos, corteza de levadura y celulosa, sobre fermentaciones difíciles. Tesis Ingeniero Agrónomo. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 45p.
23. **Hernández, A.** 2000. Introducción al Vino de Chile. Segunda Edición. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 101 p.
24. **Hidalgo, J.** 2002. Tratado de Enología. Tomo I. Primera Edición. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 755 p.
25. **Hidalgo, J.** 2002. Tratado de Enología. Tomo II. Primera Edición. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 662 p.
26. **Jiraneck, V., Langridge, P. y Henschke, A.** 1995. Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast from a chemically defined médium. American Journal of Enology and Viticulture. 46 (1): 75-83.
27. **Jørgensen, A.** 1959. Microbiología de las Fermentaciones Industriales. Séptima Edición. Editorial Acirbia. Zaragoza, España. 591 p.
28. **Julien, A., Roustan, J. Dulau, L. y Sablayrolles, J.** 2000. Comparison of nitrogen and oxigen demands of enological yeast: technological consequences. American Journal of Enology and Viticulture. 51 (3): 215-222.
29. **Kunkee, R.** 1991. Relationshipio between nitrogen content of must and sluggish fermentation. Proceedings of the international symposium on nitrogen in grapes and wine. Seattle, Washington, USA 18-19 june. 148-155 p.
30. **Lafon-Lafourcade, S., Laure, F. y Ribereau-Gayon, P.** 1979. Evidence for the Existence of Survival Factors as an Explanation for some Peculiarities of Yesast Growth, Especially in Grape Must of high Segar Concentration. Applied and Environmental Microbiology. 47:1246-9.
31. **Lizama, C.** 2004. Efectos de Distintos Niveles de un Complejo Nutritivo y Fosfato Diamónico sobre la Cinética de la Fermentación. Tesis Ingeniero Agrónomo. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 26 p.
32. **López, M.** 2005. Viticultura, Enología y Cata, para aficionados. Cuarta Edición. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 217 p.

33. **Martínez, M.** 2005. El Vino de la A a la Z. Primera Edición. Editorial Planeta Vinos. Santiago, Chile. 310 p.
34. **Mesas, J. y Alegre, M.** 1999. El Papel de los Microorganismos en la Elaboración del Vino. Cienc. Tecnol. Aliment. España. Vol. 2, N° 4. 174-183.
35. **Mijares, M. y Sáez, J.** 2007. El Vino. De la Cepa a la Copa. Cuarta Edición. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 205 p.
36. **Muñoz, E. y Inglede, W.** 1990. Yeast Hulls in Wine Fermentation. A Review. Journal of Wine Research. 1(3): 197-209.
37. **Oreglia, F.** 1978. Enología Teórico – Práctico. Segunda Edición. Ediciones Instituto Salesiano de Artes Gráficas. Buenos Aires, Argentina. 731 p.
38. **Otero, D., Dominguez, J. y Manas, J.** 1995. Effect of Antibotrytical Pesticida Residues on the Yeast-like Poppulations and their Incidente on Wine Quality. Reunión del Grupo de Trabajo de Experimentación de Viticultura y Enología (Gienol). Publisher: MAPA., 113-167.
39. **Ough, C.** 1992. Winemaking Basic. First Edition. Editorial Haworth Press Inc.. EEUU. 327p.
40. **Ough, C., Davenport, M. y Joseph, K.** 1989. Effects of Certain Vitamins on Growth and Fermentation Rate of Several Comercial Active Dry Wine Yeasts. Journal of Enology and Viticulture. 40: 208-213.
41. **Ough, C., Huang, Z., An, D. y Stevens, D.** 1991. Amino acid uptake by four commercial yeast at two different temperatures of growth and fermentation effect on urea excretion and reabsorption. American Journal of Enology and Viticulture. 42 (1): 26-40.
42. **Ough, C. y Kunkee, R.** 1968. Fermentation Rates of Grape Juice. Biotin Content of Juice and its Effect on Alcoholic Fermentation Rate. Applied Microbiology 16(4): 572-6
43. **Palacios, A., Santiago, L., Macías, C., Rasines, G., Navascués, E. y Rodríguez, P.** 2002. Influencia de los micronutrientes en la fermentación alcohólica de levaduras tipo *Saccharomyces cerevisiae* CEG. Revista La Semana Vitícola. 57(2912):1830-1835.

44. **Paladino, S., Sánchez, M. y Maza, M.** 2004. Nitrógeno prontamente asimilable. Efecto sobre la velocidad de fermentación del jugo de uva (*Vitis vinífera* L.). Revista FCA UNCuyo. Tomo XXXVI. N°1. 79-86 p.
45. **Pszczólkowski, P.** 2004. La invención del cv. Carménère (*Vitis vinifera* L) en Chile, desde la mirada de uno de sus actores. Revista Universum N° 19 Vol.2:150 – 165.
46. **Reed, G y Nagodawithana, T.** 1987. Technology of Yeast Usage in Winimaking. American Journal of Enology and Viticulture. 39(1): 83-90
47. **Sablayrolles, J. y Barre, P.** 1986. Evaluation du Besoin en Oxygene de Fermentations Alcooliques en Conditions Cenologiques Simulées. Sci. Alim. 6: 373-383.
48. **Sablayrolles, J., Salmon, J. y Baree, P.** 1996. Carences nutritionnelles des mouts. Efficacite des ajouts combines d'xygene et d'azote amoniacal. R. F. OE. 159: 25-32.
49. **Sanhueza, A.** 1999. Métodos para la determinación de nitrógeno fácilmente asimilable para las levaduras del mosto. Tesis Ingeniero Agrónomo. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 51 p.
50. **Santamaría, P., López, R., Gutiérrez, A. y García-Escudero, E.** 1995. Influencia de la Temperatura en la Fermentación Alcohólica. Zubía Monográfico. Logroño, España. 7:137-149.
51. **Suarez, J. y Iñigo, B.** 2004. Microbiología Enológica. Fundamentos de Vinificación. Tercera Edición. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 714 p.
52. **Torija, M., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Rozés, N., Guillamón, J. y Mas, A.** 2003^a. Effect of nitrogen source on the fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiology. 20: 255-258.
53. **Tozzelli, P. y Bovo, E.** 2005. La Correcta Gestión Nutricional es la Llave para una Buena Fermentación. Revista Enología. Argentina. Año II, N°6, Dic. 2005-Enero 2006.
54. **Traverso-Rueda, S. y Kunkee, R.** 1982. The Role of Esterol son Growth and Fermentation of Wine Yeasts Under Vinification Conditions. Developments in Industrial Microbiology. 23:131-143.

55. **Valencia, F.** 2008. Enología: Vinos, Aguardientes y Licores. Primera Edición. Editorial Vértice. Málaga, España. 200 p.

56. **Vicent, M.** 1992. Evaluación de la Cepa K1 Marcada (*Saccharomyces cerevisiae*) en Condiciones Desfavorables de Fermentación. Tesis Ingeniero Agrónomo. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 59 p.

9. ANEXOS.

Anexo 1. Prueba de comparación de pendientes e intercepto entre dos regresiones, para evaluar el poder fermentativo de la levadura ES 454 y ICV D254.

Regresión (I)		Regresión (II)	
n	19	n	19
Prom(y)	1056,4	Prom(y)	1062
Prom(x)	59,7	Prom(x)	60
Desv.Tip(y)	29,98	Desv.Tip(y)	32,51
Desv.Tip(x)	34,32	Desv.Tip(x)	34,87
bo	1108,23	bo	1117,072
b1	-0,869	b1	-0,928
SSerror	170,88	SSerror	161,959
G.de L.error	17	G.de L.error	17
SSx	21201,5232	SSx	21886,5042
SSxy	-18424,12366	SSxy	-20310,6759
SSy	16178,4072	SSy	19024,2018


Comp. Pend.	0,058611922 (P>0,05)	No hay dif.
Comp.Interc.	0,00000372566 (P<0,05)	Hay dif.

Anexo 2. Prueba de comparación de pendientes e intercepto entre dos regresiones, para el efecto de la estrategia nutricional.

Regresión (I)		Regresión (II)	
n	14	n	11
Prom(y)	1037	Prom(y)	1044
Prom(x)	51,79	Prom(x)	36,55
Desv.Tip(y)	25,12	Desv.Tip(y)	26,3
Desv.Tip(x)	26,5	Desv.Tip(x)	20,86
bo	1085,71	bo	1089,9
b1	-0,94	b1	-1,255
SSerror	128,13	SSerror	66,59
G.de L.error	12	G.de L.error	9
SSx	9129,25	SSx	4351,396
SSxy	-8581,495	SSxy	-5461,00198
SSy	8203,1872	SSy	6916,9

Comp. Pend.	1,42334E-05 (P<0,05)	Pend.Dif.
Comp.Interc.	0,00021237304 (P<0,05)	Hay dif.


Anexo 3. Catalogo Levadura ES 454.



Codigo ficha: EnartisFerm454/es
Revision: n°0 Julio 2009
Pag 1/2

Saccharomyces cerevisiae

ES 454



VINOS TINTOS DE CRIANZA
ES 454 es una levadura óptima para la elaboración de vinos tintos de crianza elegantes, con carácter varietal y del viñedo. Valoriza la complejidad y fineza aromática

CARACTERÍSTICAS SENSORIALES

ES 454 es la levadura óptima para la elaboración de los vinos finos de crianza a partir de uva bien madura. Tiene una muy buena implantación, perfecta cinética fermentativa y no desprende mucho calor durante la fermentación, se adapta a las fermentaciones y maceraciones largas.

Los vinos de la **ES 454** tienen un color intenso y estable, buena estructura, en cata redondos y muy varietales.

ES 454 posee una intensa actividad enzimática que podemos aprovechar para la liberación de los precursores aromáticos de la uva. Produce aromas que evolucionan muy bien en la crianza, e incrementa las notas a fruta madura y confitura. Es respetuosa con las características varietales y las cualidades aportadas por la zona. Revela el perfil organoléptico propio del viñedo.

Cuando **ES 454** es utilizada en la elaboración de vinos potentes de media crianza revela unos intensos aromas a ciruelas, picotas y uvas maduras sobre un fondo especiado (pimienta negra y nuez moscada) y balsámico.

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Rango óptimo de temperaturas	de 18 a 30 °C.
Fase de latencia.	media
Velocidad fermentativa.	moderada y regular. Permite efectuar largas maceraciones
Rendimiento azúcar/alcohol	17 g de azúcar por 1% de alcohol
Potencial fermentativo	≤ 16% v/v
Factor killer	sensible

CARATERÍSTICAS ENOLÓGICAS

Necesidad media de nitrógeno	media-baja
Necesidad de oxígeno	media
Producción de acidez volátil	media
Producción de H ₂ S	baja
Producción de SO ₂	baja.
Producción de Glicerina	buena.

Compatibilidad con la fermentación maloláctica: elevada, favorece el desarrollo del la FML.

APLICACIONES

Vinos tintos que revelan las características varietales y del viñedo
Vinos de media-larga crianza a partir de uva bien madura
Vinificaciones de uvas de zonas cálidas, con alto grado alcohólico
Syrah, Cabernet Sauvignon, Merlot, Aglianico, Barbera, Pinot Nero, Montepulciano, Garnacha.

ESSECO srl
San Martino Trecate (NO) Italy
Tel +39-0321-790.300 - Fax +39-0321-790.347

Las indicaciones detalladas en esta ficha representan al estado actual de nuestros conocimientos y experiencia. El usuario se compromete a cumplir con las normas de seguridad y protección, así como no utilizar el producto de forma impropia.



Saccharomyces cerevisiae

ES 454



enartis FERM

IDEAS DE OPTIMIZACIÓN

Los vinos de la **ES 454** se caracterizan por su respeto de las características varietales de la uva y el "terroir". Si queremos maximizar estas cualidades debemos optimizar el buen desarrollo de la fermentación y evitar la formación de compuestos que bajen la calidad organoléptica del vino.

La nutrición con **Nutriferm Energy** asegura la implantación de la levadura y su viabilidad. Al mismo tiempo previene la formación de ácido acético y H₂S. El tratamiento con **Nutriferm Advance** a 1/3 de la fermentación favorece el buen final de la fermentación y previene la síntesis de compuestos azufrados.

La aplicación de **Prolie Tinto** el primer día de la fermentación realiza una acción sinérgica con la **ES 454** en la estabilización del color y los aromas, así como, en la mejora del volumen al tiempo que lo refuerza para la crianza.

ES 454 tiene una potente acción reveladora de los aromas procedentes del **Tanenol Red Fruit**, los norisoprenoides, en el caso que busquemos vinos estructurados, de color estable y unos intensos aromas a frutas rojas frescas y violetas.

DOSIS

20 - 40g/100L.

Las dosis mayores se aplican en el caso de las uvas alteradas, elevadas concentraciones de azúcar y mostos en condiciones microbiológicas no perfectas.

MODO DE EMPLEO

- Preparar un recipiente limpio con 10 veces su peso en agua a una temperatura de 35-38°C. Evitar la utilización de aguas con alto contenido de Cloro.
- Dispersar la levadura sobre el agua poco a poco.
- Esperar 20 minutos su rehidratación.
- Homogeneizar suavemente.
- Agregar la suspensión al mosto o al prensado lo más rápidamente posible, al inicio del llenado del depósito. Evitar saltos térmicos de más de 10°C.

El respeto del protocolo de hidratación y aclimatación garantiza la máxima viabilidad del cultivo.

CONFECCIÓN Y CONSERVACIÓN

Embalaje: paquetes de 0,5 kg al vacío.

Envase cerrado: conservar en un lugar fresco (15° a 5°C) y seco.

Envase abierto: cerrar con cuidado y conservar el producto según lo arriba indicado. Consumir inmediatamente.

Producto para el uso enológico. Conforme al CODEX OENOLOGIQUE INTERNACIONAL

Anexo 4. Catalogo Acelerador biológico Nutriferm Energy.



Fermentación

Código Ficha: NutrifermEnergy/es

Revisión: n° 4 Diciembre 2008

Pag. 1/1

NUTRIFERM ENERGY

ACELERADOR BIOLÓGICO DE FERMENTACIÓN

COMPOSICIÓN

Paredes celulares de levadura seleccionadas ricas en aminoácidos, tiamina

CARACTERÍSTICAS GENERALES

NUTRIFERM ENERGY ha sido desarrollado por la I&D Enartis estudiando el metabolismo de la levadura, en particular la alimentación aminoacídica, muy importante durante las primeras fases del desarrollo celular. Durante el inicio de la actividad metabólica, la levadura tiene unas necesidades y prioridades que, si no son satisfechas, se corre el riesgo de comprometer todas las fases sucesivas.

NUTRIFERM ENERGY aporta α -aminoácidos, oligoelementos y sales minerales presentes naturalmente en la célula de levadura y en forma inmediatamente asimilable por la levadura.

La aportación de micronutrientes, vitaminas y nitrógeno orgánico es estratégica en las fases iniciales de multiplicación, cuando la presencia de alcohol y la falta de oxígeno no han intervenido todavía modificando el metabolismo de la levadura y la capacidad de seleccionar los elementos nutritivos

Gracias a esta aportación nutritiva y energética la célula aumenta la velocidad de la fase exponencial, iniciando antes la fase fermentativa.

Técnicamente significa:

- Mayor probabilidad de dominancia de la levadura seleccionada;
- Menor producción de compuestos indeseados (ácido acético, acetaldehído, H_2S ,);
- Mejor metabolismo, por lo tanto mayor producción de glicerol, polisacáridos, aromas;
- Menor riesgo de paradas de fermentación;
- Mejor control y gestión de las fermentaciones.

APLICACIONES

- Estimulación del metabolismo de la levadura en las fases iniciales de multiplicación
- Prevención de anomalías fermentativas en las situaciones de riesgo: mostos con contenido de azúcar elevado, uvas atacadas por *Botrytis*, uvas con una alta contaminación microbiológica, refermentaciones de vinos con grados alcohólicos altos.
- Preparación del pie de cuba

DOSIS

- Estimulación del metabolismo de la levadura
Mosto con NFA > 150 mg/l: 5 ÷ 10 g/100L adicionado a la inoculación de la levadura
Mosto con NFA < 150 mg/l: 10 ÷ 15 g/100L adicionado a la inoculación de la levadura
Mostos en situación de riesgo: 10 ÷ 15 g/100L adicionado a la inoculación de la levadura
 - Paradas de fermentación: 10 ÷ 15 g/100L adicionado en el vino parado
 - Preparación del pie de cuba: 5 ÷ 10 g/100L
- Dosis máxima legal en UE: 40 g/100L

MODO DE EMPLEO

Diluir NUTRIFERM ENERGY en poca agua y adicionarlo al pie de cuba o al mosto a fermentar al mismo tiempo de la inoculación de la levadura. NUTRIFERM ENERGY aporta nitrógeno aminoacídico. Por eso su empleo es recomendado durante la preparación del pie de cuba y/o durante las primeras fases fermentativas y separadamente del uso de nitrógeno inorgánico. En las fases sucesivas de la fermentación seguir las recomendaciones del Plan Nutricional Enartis, en función de las características del mosto o estrujado. En caso de paradas, seguir el protocolo publicado en el sitio web www.enartis.com, en la sección "consejos enológicos".

ENVASES Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN

Bote de 1 kg - Tambor de 10 kg

Envase cerrado: consérvese el producto en lugar seco, fresco y ventilado.

Envase abierto: ciérrase con cuidado y consérvese como arriba indicado.

Producto de uso enológico, con arreglo a lo marcado por: Reglamento CE 479/2008

Anexo 5. Mapa Viña Santa Cruz.

