The Wine EXPERT

Información práctica sobre elaboración de vino

LALLEMAND

LOS NUMEROSOS ROLES DEL NITRÓGENO EN LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

¿Qué es el nitrógeno?

El nitrógeno es una molécula compuesta de dos átomos (N_2) cuyo nombre científico es dinitrógeno. Esta molécula es el principal compuesto que se encuentra en la atmósfera y constituye el 78% del aire que respiramos. Su presencia es indispensable ya que diluye el oxígeno, cuya concentración sería de lo contrario tan alta que resultaría perjudicial para el ser humano.

El nitrógeno se halla presente en el mosto de uva en diferentes formas: amonio, aminoácidos, péptidos y proteínas. La parte del nitrógeno que la levadura puede utilizar para la fermentación alcohólica se denomina «nitrógeno asimilable». Las células de levadura contienen también nitrógeno en forma de proteínas, péptidos – en particular tripéptidos – y aminoácidos. (vista Figura 1).

EL NFA (es decir, *el nitrógeno fácilmente asimilable*) comprende los alfa-aminoácidos (AA), el amonio y algunos péptidos, y es la parte del nitrógeno que la levadura enológica puede utilizar para llevar a cabo la fermentación de manera eficaz.

NFA = α-aminoácidos libres + NH_4^+ + algunos péptidos pequeños

La prolina es el único α-aminoácido (AA) libre que las levaduras no asimilan, a pesar de que es uno de los más abundantes en los mostos de uva.

- **FAN** = ***F**ree α-**A**mino **N**itrogen*) (α-aminonitrógeno libre), el cual es equivalente a los α-aminoácidos libres
- Principales AA libres presentes (en cantidad) en las uvas: prolina, arginina, glutamina

¿Por qué es importante para la vinificación?

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

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

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

Las concentraciones de NFA en los mostos de uva naturales varían de 60 mg/L a 500 mg/L, dependiendo de la variedad de la uva, de la vendimia y del microclima.

En condiciones en las que hay deficiencia de nitrógeno, el crecimiento de las levaduras y la velocidad de fermentación son muy limitadas. Se ha demostrado que una baja concentración inicial de NFA da como resultado fermentaciones lentas y languidecientes. Por ello, la adición de nitrógeno al mosto se ha convertido en un procedimiento necesario de la elaboración del vino.

Hoy en día, la medida del NFA es un buen método que tienen las bodegas para evaluar el estado general de las uvas en cuanto a la cantidad de nitrógeno se refiere, pero no precisamente en lo que respecta a su calidad, la cual es otro parámetro fundamental, desde el punto de vista de la fermentación y de la calidad sensorial del vino final.

Para manejar correctamente la fermentación, las mejores prácticas recomiendan la adición de nitrógeno en su forma inorgánica (amonio) u orgánica. El nitrógeno orgánico ha demostrado ser el nutriente más eficaz y completo para garantizar la fermentación y explotar todo el potencial aromático de la uva, como se explicará más adelante.

¿En dónde encontramos el nitrógeno?

En el mosto: Una tercera parte del nitrógeno se encuentra en forma de amonio y dos terceras partes, en forma de aminoácidos. A menudo, los mostos presentan deficiencias de NFA (es decir, un nivel inferior a 150 mg/L).

El nitrógeno proveniente de fuentes externas puede adicionarse para ayudar a realizar la fermentación:

- Nitrógeno inorgánico: sales de amonio (DAP, DAS), las cuales se adicionan durante la fermentación alcohólica.
- Nitrógeno orgánico: proteínas, péptidos, tripéptidos y aminoácidos libres provenientes de la levadura (levadura inactiva y autolisado de levadura) (figura 1).

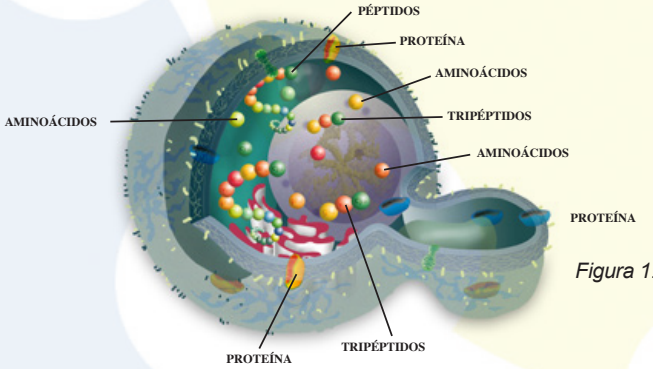


Figura 1. Imagen de una célula de levadura que muestra en dónde se hallan los compuestos que contienen nitrógeno (aminoácidos, péptidos y proteínas)

¿En qué momento la adición de nitrógeno es más eficiente?

Numerosos estudios se han realizado para determinar el mejor momento en el que se debe adicionar el nitrógeno y estos han demostrado que con una adición a 1/3 de fermentación alcohólica, cuando la población de levaduras ha alcanzado su máximo - es decir, después del agotamiento del nitrógenos del mosto (la levadura lo ha consumido en su fase de multiplicación y de producción de biomasa) - se obtienen los mayores beneficios para la tasa de fermen-tación y la la cinética de esta.

Sin embargo, no se recomienda hacer una sola adición de nitrógeno al comienzo de la fermentación, ya que esta ocasionará la presencia de una población de levaduras muy alta, un aumento repentino de la velocidad de fermentación acompañado de una reacción exotérmica (producción de calor) y un alto agotamiento del nitrógeno. Lo anterior dejará a las levaduras sin ningún nitrógeno restante para la conversión del azúcar en etanol. Como se muestra en la figura 2, con una sola adición de DAP (30 g/hl, equivalente a 63 mg/L de NFA) al inicio de la fermentación, puede dar lugar a su ralentización ó parada.

Se utiliza la nutrición orgánica al inicio de la fermentación y a 1/3 de la misma para lograr una mayor eficacia, el uso del nitrógeno es más paulatino y se controla mejor. Como consecuencia de ello, la fermentación es más constante – sin aumentos de calor y con un mejor control de la temperatura – y la FA termina como se ilustra en la figura 3.

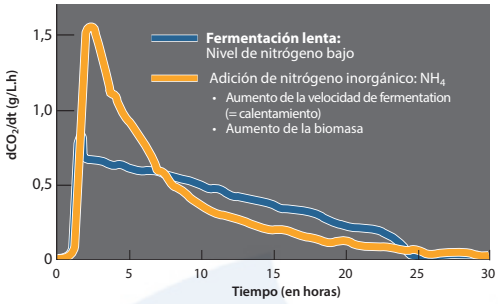


*Figura 2. Impacto de la nutrición **inorgánica** adicionada al comienzo de la fermentación alcohólica*

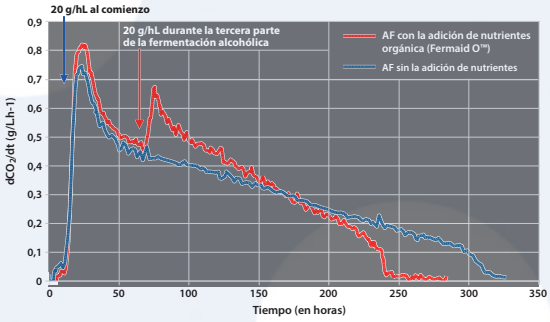


*Figura 3. Impacto de la adición de nutrición **orgánica** en la fermentación alcohólica. 20 g/hl (8 mg/L de NFA) de nitrógeno orgánico adicionado al comienzo de la fermentación y otros 20 g/hl (8 mg/L de NFA) durante la tercera parte de la FA.*

PALABRA DE EXPERTO

Jean-Marie Sablayrolles

Jean-Marie Sablayrolles es director de investigación en el Instituto Nacional para la Investigación Agronómica (*INRA, Institut National de la Recherche Agronomique*) y es responsable de la Unidad Mixta de Investigación en Ciencias de Enología (UMR SPO, *Unité Mixte de Recherches Sciences Pour l'Œnologie*) en Montpellier, Francia, uno de los centros de investigación más importantes del mundo en el campo de la investigación enológica que cuenta con 90 científicos, técnicos y estudiantes. Sus actividades de investigación se enfocan en la fermentación alcohólica, desarrollando así nuevas estrategias para optimizar el manejo de la fermentación basado en el control en línea de la cinética y de las adiciones de nutrientes, sobre todo de nitrógeno asimilable. Es además autor de 76 artículos científicos.

El nitrógeno asimilable es esencial para la síntesis proteica en las levaduras; es generalmente el nutriente más limitante y principal causante de fermentaciones lentas: en condiciones más limitante, existe una relación entre la concentración de nitrógeno asimilable presente en el mosto y la velocidad máxima de fermentación. El nitrógeno amoniacal y los aminoácidos libres constituyen las principales fuentes de nitrógeno, aunque algunos péptidos pequeños también pueden ser asimilados.

La concentración de nitrógeno asimilable se considera como limitadora cuando esta es inferior a 150 mg/L; en ese caso, la adición de 50 a 100 mg N/L resulta muy eficaz. Cuando el nitrógeno asimilable se adiciona antes de la inoculación, la población celular y la velocidad de fermentación durante la primera mitad de la fermentación aumentan, pero la viablidad celular puede disminuir al final. Para minimizar el riesgo de que se paralice la fermentación, el mejor método es (i) adicionar el nitrógeno al inicio de la fase estacionaria, es decir una vez que se haya llevado a término entre un 30 y un 40% de la fermentación y (ii) combinar dicha adición con una oxigenación o utilizar un producto complejo que contenga otros nutrientes, tales como lípidos. El nitrógeno amoniacal puede entonces ser remplazado por nitrógeno orgánico, obteniendo así el mismo efecto para la cinética de la fermentación.

Las necesidades de nitrógeno asimilable difieren dependiendo de la levadura enológica seleccionada. Hoy en día, el criterio está bien cuantificado y debe tenerse en cuenta también para optimizar el manejo de la fermentación.

RESULTADOS

Efecto 1: *Efecto del nitrógeno en la cinética de la fermentación*

El contenido de NFA ejerce la mayor influencia sobre la velocidad con la que se realiza la fermentación; además, afecta la biomasa de levaduras al comienzo de la fermentación y la cinética del transporte de los azúcares durante esta misma. Tan pronto como un mosto presenta una deficiencia de nitrógeno al final de la fase de crecimiento, hay una disminución de las actividades de síntesis proteica y de transporte de azúcares. La adición de NFA a un mosto con deficiencias de nitrógeno ocasiona una disminución importante de la duración de la fermentación mediante la reactivación de la síntesis proteica y del aumento de la velocidad del transporte de azúcares, lo cual conlleva a un aumento de la velocidad de fermentación.

Cada vez más estudios describen la diferencia de eficacia, en cuanto a la cinética, entre las adiciones de nitrógeno orgánico e inorgánico. En la figura 4, comparamos la eficacia de ambas fuentes (DAP como inorgánica y Fermaid O™ como orgánica) y aplicamos dos estrategias de nutrición utilizando la misma cantidad de NFA: 16 mg/L, en su forma orgánica comparada con su forma inorgánica. Una tercera fermentación se llevó a cabo sin ninguna nutrición y se utilizó como control.

La figura 4 muestra que para una cantidad equivalente de nitrógeno asimilable adicionado, la adición de nitrógeno orgánico activa de manera eficaz la cinética de la fermentación (línea verde) para lograr así una fermentación completa. Con la adición de una fuente de nitrógeno inorgánico (línea violeta), la fermentación se hace lenta y luego se paraliza, tal como ocurre en el caso de la fermentación control (línea azul) en el que no hay adición de nitrógeno.

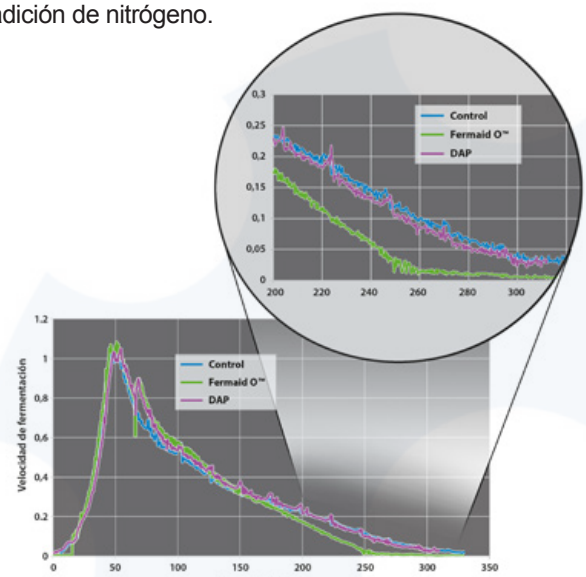


Figura 4. Cinética de fermentación de un Viognier fermentado a 18 °C con una concentración de azúcares de 215 g/L, NFA inicial < 100 mg/L. En dos fases de fermentación se realizaron adiciones de 16 mg/L de NFA en dos formas diferentes, nitrógeno inorgánico (DAP) y nitrógeno orgánico (nutriente orgánico): 8 mg/L de NFA al comienzo de la fermentación alcohólica y 8 mg/L de NFA durante la tercera parte de la FA).

RESULTADOS

Así pues, para una dosis equivalente de NFA, una fuente de nitrógeno orgánica es mucho más eficaz que una fuente de nitrógeno inorgánica.

En un mosto que presente una alta deficiencia de nitrógeno (100 mg/L de NFA), una estrategia adecuada de nutrición orgánica será lo suficientemente eficaz para que la fermentación alcohólica se lleve a término.

Efecto 2 : *Efecto del nitrógeno en el perfil aromático del vino*

El metabolismo del nitrógeno, en particular de los aminoácidos, genera la formación de numerosos compuestos aromáticos involucrados en la matriz aromática del vino: niveles más elevados de acoholes superiores y de sus acetatos. El metabolismo de las levaduras también ejerce una influencia en la revelación y preservación de ciertos precursores aromáticos de naturaleza aminada (precursores cisteinilados o precursores glutationilados de tioles varie-tales). En consecuencia, el nitrógeno que compone al mosto puede modular el perfil aromático del vino. El uso de nutrientes orgánicos ha demostrado también ejercer una influencia en la formación de compuestos aromáticos cuando estos se utilizan durante la fermentación alcohólica.

Efecto de las distintas fuentes de nitrógeno en los perfiles sensoriales

1. **Ésteres**

El metabolismo de los aminoácidos (anabolismo y catabolismo) por parte de la levadura ocasiona la formación de altos niveles de alcohol, de ésteres de acetato y de ésteres etílicos.

Se han realizado estudios sobre la modulación del perfil de ésteres mediante la adición de nitrógeno (proyecto AWRI-Lallemand, 2012). En uvas Chardonnay, se comparó la adición de DAP con la adición de nutrientes orgánicos. A continuación se presentan algunos resultados de la comparación de la síntesis de compuestos de ésteres para una adición de 50 mg/L de NFA en forma de DAP y para una adición de 24 mg/L de NFA en forma de nutriente orgánico (figura 5). Con el nutriente orgánico, se observa un aumento considerable de todos los compuestos aromáticos, lo cual revela la eficacia del nitrógeno orgánico para formar ésteres comparado con el nitrógeno inorgánico.

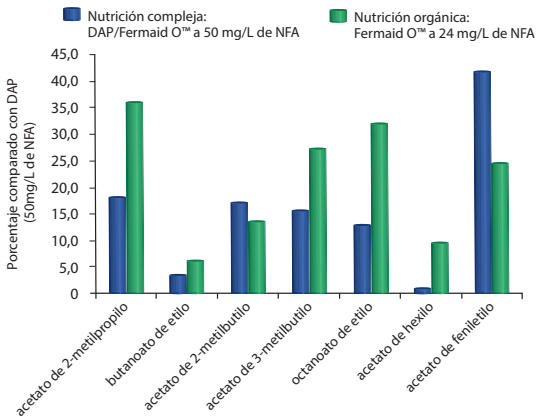


Figura 5. Chardonnay de la bodega Yalumba fermentado con dos fuentes diferentes de nitrógeno (DAP y Fermaid O™)

2. **Tioles volátiles.**

Durante la fermentación se ha visto que niveles excesivos de amonio, o la adición de este, al comienzo de la FA limitan la capacidad de la levadura de liberar los tioles propios de la variedad (Subileau *et al*. 2008). Este fenómeno puede explicarse por la represión catabólica ejercida por el amonio sobre la síntesis de los transportadores de aminoácidos en la levadura fermentativa. Esto hace que se limite la entrada de precursores tiólicos de tipo cisteinilado a la célula y, por consiguiente, la conversión intracelular de los mismos en tioles volátiles (figura 6).

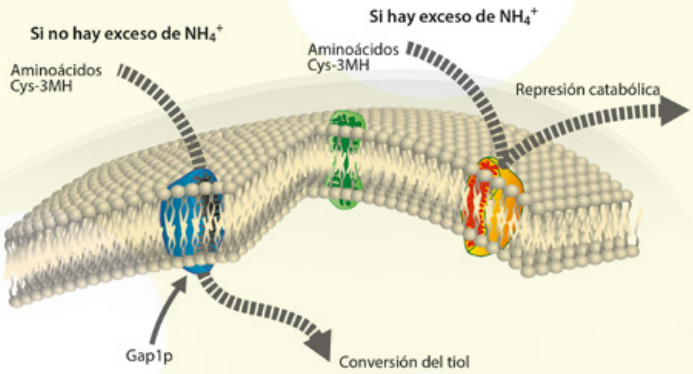


Figura 6. Transporte de los aminoácidos Cys-3MH dentro de la membrana celular de la levadura gracias a la proteína de transporte Gap1p y represión catabólica en presencia de cantidades excesivas de nitrógeno inorgánico en el mosto

En términos de producción de tioles, como se muestra en la figura 7, la cantidad de tioles 3-MH y 3-MHA es menor cuando se utiliza el DAP. Esta observación, hecha en laboratorio y a escala de bodega, ha conducido a la implementación de una estrategia de nutrición con nitrógeno durante la FA, con adición de nutrientes orgánicos únicamente y dividida entre el inicio y a 1/3 de FA.

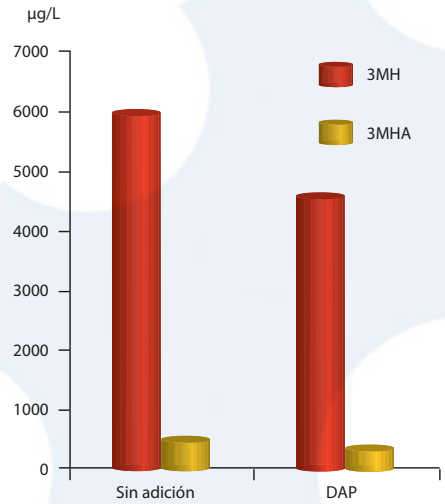
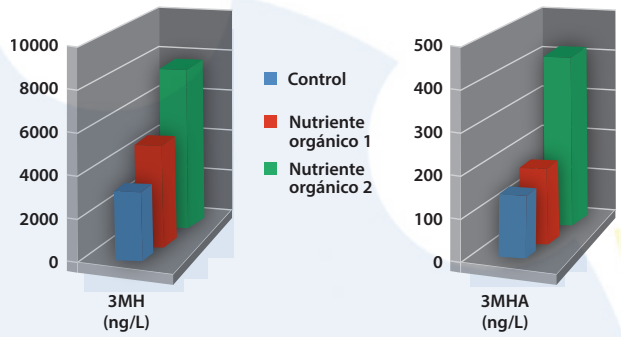


Figura 7. Concentraciones de tioles en un Sauvignon (Gers, Francia 2004) al que se le adicionó DAP (tomado de Schneider et al. *2008)*

RESULTADOS

Dos fórmulas diferentes de nutrientes orgánicos se han ensayado en las uvas Colombard, muy ricas en precursores tiólicos. Al mirar los resultados de la liberación de 3MH y de su acetato de 3MH, pudimos confirmar el impacto positivo de una nutrición orgánica en la conversión y revelación de los tioles. (Figuras 8a y 8b).



Figuras 8a y 8b. Concentraciones de tioles (3MH y 4MMP) en las uvas Colombard (Francia, 2014) con nutrientes orgánicos diferentes comparadas con una fermentación control (sin estrategia de nutrición)..

3. Efecto de la fuente de nitrógeno en el perfil sensorial del vino

En todos los ensayos, pudimos destacar la influencia positiva del nutriente orgánico en el perfil sensorial del vino, principalmente cuando se comparó con un nutriente inorgánico como el DAP. Como ejemplo, en la figura 9 que se presenta a continuación, las diferencias son considerables: un panel de cata profesional prefirió de forma clara la nutrición orgánica, representada en un vino más complejo e intenso con mayor longitud en aromas.

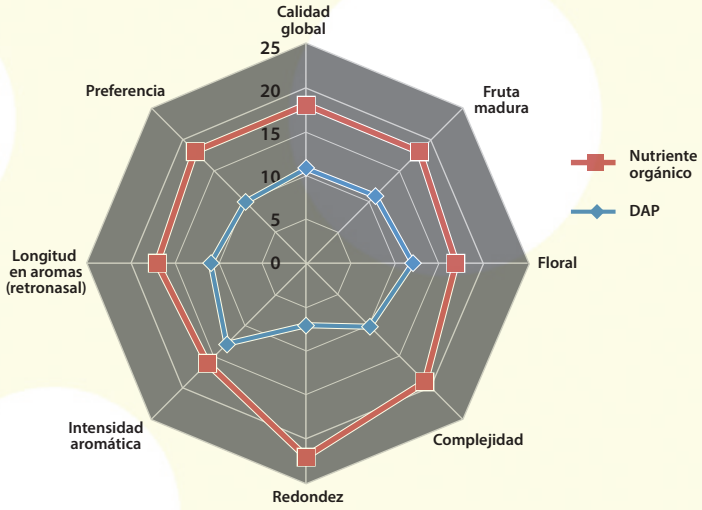


Figura 9. Comparación del perfil sensorial de un Viognier 2012 de Côtes du Rhone (Francia) con una nutrición orgánica y una nutrición inorgánica

PALABRA DE EXPERTO

José Manuel Guillamón

José Manuel Guillamón trabajó como profesor adjunto de la Facultad de Enología en Tarragona (de 1994 al 2007), España, y, actualmente, es profesor de investigación en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) del CSIC en Valencia, España. Sus actividades en investigación se han enfocado en el metabolismo de las levaduras enológicas durante la fermentación alcohólica, haciendo especial énfasis en dos temas: el metabolismo del nitrógeno y las fermentaciones a bajas temperaturas. Dichas actividades han proporcionado importante información acerca del efecto de cada fuente de nitrógeno puro sobre el crecimiento de las levaduras, la actividad fermentativa y la producción de aromas. Es además autor de 90 artículos científicos, conferenciante invitado a 30 congresos nacionales e internacionales, supervisor de 10 tesis de doctorado, 3 patentes (dos de las cuales han sido transferidas a la industria) y ha publicado más de 25 artículos en revistas técnicas de enología.

La disponibilidad de nitrógeno es indispensable para la vinificación por las siguientes razones: este regula la formación de biomasa de levaduras, y a su vez, el ritmo y duración de la fermentación. Además, el tipo y la cantidad de nitrógeno presente en los mostos de uva afecta también la síntesis del aroma fermentativo y la producción del aroma varietal (por ejemplo, la liberación de tioles). La industria vitivinícola maneja las fermentaciones con deficiencias de nitrógeno adicionando diferentes preparaciones a base de dicho elemento. Sin embargo, es necesario conocer el impacto que ejercen tanto la concentración como la fuente del nitrógeno que se añade sobre la actividad fermentativa y la producción de aromas, al igual que la manera adecuada de realizar dichas adiciones. Aunque la disponibilidad del nitrógeno en la fase estacionaria no tiene ningún impacto en el crecimiento de las levaduras, las adiciones en esta fase de fermentación estimulan el ritmo de la misma y afectan de manera considerable la síntesis de los aromas. Además, en esta etapa de la fermentación, la adición de nitrógeno orgánico da como resultado mayores concentraciones de acetato y de ésteres etílicos, los cuales constituyen los principales compuestos responsables de las notas frutales y florales de los vinos. De este modo, la combinación de diferentes cepas de levaduras enológicas con concentraciones y fuentes de nitrógeno pueden emplearse para obtener perfiles aromáticos nuevos y originales.

Para la producción del vino espumoso, una óptima nutrición rica en nitrógeno del pie de cuba (*pied-de-cuve*) es, por lo general, suficiente para satisfacer las necesidades durante la segunda fermentación, que se lleva a cabo en la botella, y para garantizar un buen desarrollo de dicho proceso. De nuevo se recuerda que el uso de nitrógeno orgánico en el pie de cuba mejora la producción aromática durante la segunda fermentación.

EN RESUMEN

La levadura enológica necesita ciertos elementos esenciales para transformar el mosto en vino: azúcares, vitaminas y minerales, algo de oxígeno y, de gran importancia también, una concentración suficiente de nitrógeno fácilmente asimilable. Este tipo de nitrógeno (NFA) se compone de aminoácidos, de algunos péptidos pequeños y de amonio, elementos que las células de levadura pueden utilizar para, no solamente llevar a término la fermentación, sino también para desarrollar plenamente el perfil sensorial del vino. Muchos mostos presentan deficiencias de nitrógeno y, por lo tanto, el tipo de nutriente que se utilice así como el momento en el cual este se adicione son cruciales para el desarrollo de la FA.

Se ha demostrado que los nutrientes orgánicos, ricos en aminoácidos que contienen nitrógeno, péptidos y proteínas provenientes de las células de levaduras autolisadas que se hallan en Fermaid O™, por ejemplo, y que se adicionan al comienzo de la fermentación y durante la tercera parte de la FA, constituyen la mejor estrategia para lograr una FA constante y completa, y para maximizar el potencial sensorial del vino.

CONTACTE CON NOSOTROS

Lallemand Francia/Suiza/China
Lallemand SAS
fb.france@lallemand.com
Tel: +33.5.62.74.55.55

Lallemand Italia
fb.italia@lallemand.com
Tel: +39 (0) 45 51 25 55

Lallemand Península Ibérica
wine@lallemand.com
Tel: (+34) 914126747

Lallemand Alemania, Austria, Grecia, Hungría, Israel, Chipre, Malta, Polonia
fb.eurocenter@lallemand.com
kburger@lallemand.com
Tel/Fax: (+43) 27 35 80 147

Ferment Croacia, Eslovenia, Macedonia, Rumania, Rusia, Serbia, Moldavia, Ucrania
nmaslek@lallemand.com
Tel : (+385) 98 30 24 62

Lallemand Escandinavia y Reino Unido
sigrid@lallemand.com
Tel: +45 5357 2280

Lallemand Norteamérica, México, Japón, Taiwán
gspecht@lallemand.com

Lallferm S.A. Chile, Argentina, Uruguay, Brasil, Ecuador, Colombia
pcarriles@lallemand.com
Tel: +54 (261) 425 67 89

Lallemand Australia, Nueva Zelanda
australiaoffice@lallemand.com
Tel: 61 (8) 276 1200

Lallemand Sudáfrica
ploubser@lallemand.com
Tel: +27 21 913 7555

Lallemand, una de las empresas líderes en la producción de levaduras, de bacterias y de nutrientes y distribuidor de enzimas para la enología, es una sociedad privada canadiense presente en la mayoría de los países y continentes productores de vinos. La división Enología, situada en Toulouse (Francia), dedica una parte importante de sus actividades a la investigación y al desarrollo, tanto dentro de la propia empresa como en colaboración con prestigiosos institutos de investigación.