



NITRÓGENO PRONTAMENTE ASIMILABLE EFECTO SOBRE LA VELOCIDAD DE FERMENTACIÓN DEL JUGO DE UVA (*VITIS VINIFERA* L.)

YEAST ASSIMILABLE NITROGEN EFFECT ON THE FERMENTATION RATE OF GRAPE MUST (*VITIS VINIFERA* L.)

Silvia Paladino
María Laura Sánchez
Marcos Maza

Originales
Recepción: 04/11/2003
Aceptación: 25/03/2004

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue evaluar la incidencia de la concentración de nitrógeno prontamente asimilable (NPA) sobre la velocidad y duración de la fermentación alcohólica de los mostos de uva.

El experimento se diseñó con tres tratamientos (A=testigo; B=agregado de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ 50 mg/L; C=agregado de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ 100 mg/L) y cuatro repeticiones. Se realizaron microvinificaciones con jugo de uva pasteurizado var. Chardonnay, inoculado con *Saccharomyces cerevisiae* cepa FCA 32. La fermentación se condujo a 25 °C. La concentración de NPA fue medida por titulación en medio formol. La velocidad de fermentación fue determinada por pérdida de peso.

La velocidad máxima de fermentación se alcanzó al tercer día. Existen diferencias significativas entre la velocidad máxima alcanzada por el testigo y por los tratamientos B y C pero no hay diferencias significativas entre las velocidades máximas alcanzadas por los tratamientos B y C. La velocidad máxima de fermentación alcanzada por el tratamiento B (agregado de 50 mg/L de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$) fue 57 % superior respecto del testigo, mientras que el tratamiento C (agregado de 100 mg/L de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$) fue 53 % superior respecto del mismo testigo. La velocidad máxima de fermentación aumentó con la adición de nitrógeno, pero no se observan diferencias entre las distintas dosis empleadas.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the effect of yeast assimilable nitrogen (YAN) concentration on the time course of fermentation and on the fermentation rate of grape must.

The experiments were carried out with three treatments (A=control; B=50 mg/L $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ added; C= 100 mg/L $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ added). Four replications were run.

The microvinifications were made with pasteurized grape juice from chardonnay and were inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* strain FCA 32. Fermentations were performed at 25 °C.

The YAN concentration was determined by formol titration. The fermentation rate was measured by weight loss.

The maximum fermentation rate was reached at the third day. Differences were found between the maximum fermentation rate reached by the control (A) and the other two treatments (B-C). No differences were found between maximum fermentation rate reached by treatments B and C. The maximum fermentation rate was higher with nitrogen addition, but no differences were found between the different quantities used. The maximum fermentation rate reached by treatment B (addition of 50 mg/L of $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$) was 57 % faster than control, while treatment C (addition of 100 mg/L of $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$) was 53 % faster than the same control.

La duración media de la fermentación resulta significativamente diferente para los tres tratamientos: 9.25 días para el testigo, 7.5 días para el tratamiento B y 6.25 días para el tratamiento C. El agregado de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ disminuye la duración de la fermentación en las condiciones de trabajo. La duración de la fermentación del tratamiento B (agregado de 50 mg/L de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$) fue del 81 % respecto del testigo 100 %, mientras que el tratamiento C (agregado de 100 mg/L de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$) fue del 67 %, respecto del mismo testigo.

The average time to obtain a complete fermentation was different for all treatments (Control=9.25 days; B=7.5 days; C=6.25 days). The $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ addition shortened the average time to reach a complete fermentation, in experimental conditions. The time course of fermentation for treatment B (addition of 50 mg/L of $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$) was 81 % compared with control treatment 100 %, while treatment C (addition of 100 mg/L of $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$) was 67 %.

Palabras clave

nitrógeno prontamente asimilable • jugo de uva • mosto • *Vitis vinifera* L. • velocidad de fermentación • duración de la fermentación

Key words

yeast assimilable nitrogen • grape juice • must • *Vitis vinifera* L. • fermentation rate • time course of fermentation

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno es un macronutriente esencial para el crecimiento y metabolismo de las levaduras. Su disponibilidad en el jugo de uva es fundamental para la creación de componentes estructurales necesarios para las múltiples generaciones de levaduras. Los sistemas de transporte de hexosas, aminoácidos y amoníaco se basan en la presencia de enzimas, las cuales dependen de la concentración de nitrógeno en el mosto (4). El nitrógeno interviene en el crecimiento de la población de levaduras, en la cinética de transporte de azúcares por las levaduras durante el curso de la fermentación (18), en la continuación de la fermentación alcohólica cuando el crecimiento activo ha cesado y en la protección de las levaduras del stress osmótico y de la toxicidad causada por el alcohol etílico en las etapas finales de la fermentación (10).

Se considera como Nitrógeno Prontamente Asimilable (NPA) para las levaduras a los aminoácidos libres y al ión amonio (21).

La concentración inicial de NPA del mosto afecta la formación de productos secundarios aromáticos y la calidad organoléptica del vino. Cuando un mosto es adicionado con $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$, se produce un aumento del contenido de ésteres y una disminución de los alcoholes superiores, mejorando las características aromáticas del producto (17).

Las concentraciones insuficientes de NPA en los mostos se asocian con fermentaciones lentas o detenidas, mayor duración de la fermentación, bajas velocidades de fermentación y desarrollo de olores desagradables (6, 8, 12, 15, 19, 24).

La velocidad de fermentación es función de la biomasa total viable y de la velocidad de empleo del azúcar por las células individuales (2,14). La inadecuada concentración de NPA limita las fermentaciones reduciendo la multiplicación de las levaduras. En consecuencia, disminuye la velocidad de la glicólisis. Esta menor velocidad de glicólisis se relaciona con una menor velocidad de transporte de azúcares en la célula. Esto ocurre porque las proteínas (enzimas) que intervienen en el transporte de azúcares tienen una vida media de 6 horas, y su síntesis se detiene rápidamente en las células que se desarrollan en sustratos empobrecidos o carentes de NPA (6).

El exceso de NPA en mostos conduce a vinos con cantidades elevadas de nitrógeno residual, lo que implica inestabilidad microbiológica del producto y elevada producción de carbamato de etilo. Este compuesto actúa como un potente carcinógeno cuando es administrado en altas dosis a los animales (5, 6, 13, 16, 21).

El manejo vitícola del cultivo y las operaciones enológicas pueden modificar la concentración de NPA de los mostos. Las restricciones hídricas del cultivo y las cosechas tardías (7), el ataque de *Botrytis cinerea* (20), y los excesivos desbordes del mosto previos a la fermentación (1, 3, 21) tienden a disminuir la concentración de NPA.

Altos niveles de NPA están asociados con una menor duración de la fermentación alcohólica (6, 23). Se necesita una concentración mínima de 130 -140 mg/L de NPA para poder completar una fermentación alcohólica, pero también se recomiendan concentraciones de 400 a 500 mg/L de NPA para evitar fermentaciones detenidas y la generación de aromas desagradables (9, 10, 11).

Las adiciones de NPA estimulan la duración de la etapa de crecimiento activo de las levaduras y también la producción total de células. Cuanto mayor es la cantidad de levaduras en crecimiento activo disponibles, mayor es la velocidad de conversión de los azúcares en alcohol y CO₂, por medio de la fermentación. Las levaduras en crecimiento activo producen alcohol a una velocidad 33 veces superior, que las células que no se encuentran en activo crecimiento. Se han observado reducciones en la duración de la fermentación cuando se agrega alimentación nitrogenada (10).

No existen datos locales sobre contenidos de NPA ni duración de las fermentaciones para dichos contenidos. Tampoco existe información sobre reducción en los tiempos de fermentación, ni sobre aumentos en la velocidad de la misma debido a aportes de NPA a los mostos.

Objetivo

- Evaluar la incidencia de la concentración de NPA sobre la velocidad y duración de la fermentación alcohólica de jugo de uva pasteurizado de *Vitis vinifera* cultivar Chardonnay, originario de Chacras de Coria, Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se diseñó con tres tratamientos (A= testigo; B= agregado de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ 50 mg/L; C=agregado de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ 100 mg/L) y cuatro repeticiones. Se trabajó con mostos pasteurizados de *Vitis vinifera* cultivar Chardonnay, en microvinificaciones inoculadas con *Saccharomyces cerevisiae* cepa FCA 32, en forma de levadura seca activa rehidratada. La fermentación se condujo a 25 °C. Las características del mosto base fueron:

concentración de NPA del mosto base =145.6 mg/L

concentración azucarina = 226 g/L

pH = 3.15

SO_2 total = 40.96 mg/L

SO_2 libre = 7.6 mg/L

Como unidad experimental, se utilizaron erlenmeyers conteniendo 125 mL de mosto, provistos de un tapón con tubo de desprendimiento. La concentración de nitrógeno prontamente asimilable se determinó por medio de la titulación en medio formol o método Sorensen (9, 25). La evolución de la fermentación se registró por medio de la pérdida de peso durante 16 días (22). La duración de la fermentación se definió como el número de días necesarios para llegar a un desprendimiento diario de CO_2 menor de 0.5 gramos, para un volumen de 125 mL de mosto en fermentación. El tratamiento estadístico de los datos fue realizado por medio del análisis de la varianza, empleando el programa Statgraphics plus versión 5.

RESULTADOS

La velocidad máxima de fermentación, medida como la máxima pérdida de peso diaria, se alcanzó al 3^{er} día en todos los tratamientos (figura 1).

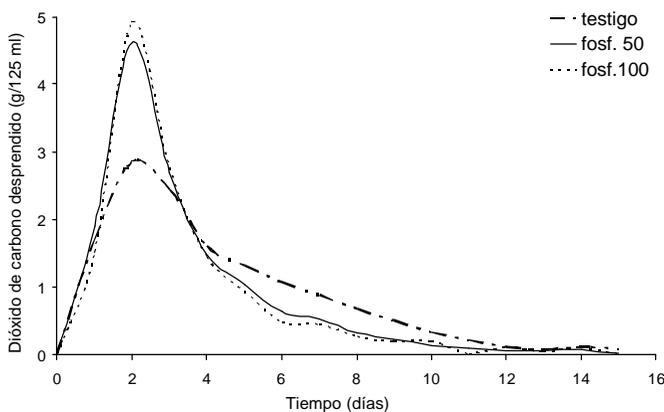


Figura 1. Curvas de fermentación para el tratamiento testigo, agregado de 50 mg/L $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ y agregado de 100 mg/L $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$. Se representa la pérdida de peso en g de CO_2 liberado diariamente. Cada punto representa la media de tres medidas diferentes, las desviaciones típicas fueron siempre menores de 1 %.

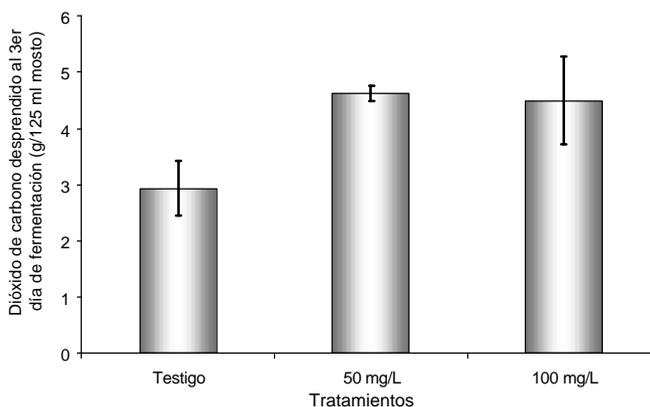
Existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la velocidad máxima alcanzada por el testigo y por los tratamientos B y C. No existen diferencias significativas entre las velocidades máximas alcanzadas por los tratamientos B y C (tabla 1 y figura 2).

Tabla 1 y Figura 2.

Velocidad de la fermentación para los tratamientos testigo, agregado de 50 mg/L $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ y agregado de 100 mg/L $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$. La velocidad se representa como la máxima pérdida de peso en g de CO_2 liberado al 3^{er} día de fermentación. (Valores medios \pm desviación standard. $n = 4$)

Tratamientos	CO_2 liberado al 3 ^{er} día de fermentación (g)
Testigo	2.9325 a
agregado de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ 50 mg/L	4.6225 b
agregado de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ 100 mg/L	4.4950 b

Los valores seguidos por diferentes letras son estadísticamente diferentes.



La barra representa la dispersión de los datos.

La duración media de la fermentación, medida en días, resultó significativamente diferente ($p < 0.05$) para los tres tratamientos: 9.25 días para el testigo, 7.5 días para el tratamiento B y 6.25 días para el tratamiento C (tabla 2 y figura 3).

Tabla 2. Duración de la fermentación para los tratamientos testigo, agregado de 50 mg/L $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ y agregado de 100 mg/L $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$. La duración se ha medido en N° de días necesarios para llegar a un desprendimiento diario de CO_2 menor de 0.5 g para un volumen de 125 ml de mosto en fermentación. (Valores medios \pm desviación standard. $n = 4$)

Tratamientos	Duración de la fermentación
Testigo	9.25 a
agregado de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ 50 mg/L	7.5 b
agregado de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ 100 mg/L	6.25 c

Los valores seguidos por diferentes letras son estadísticamente diferentes

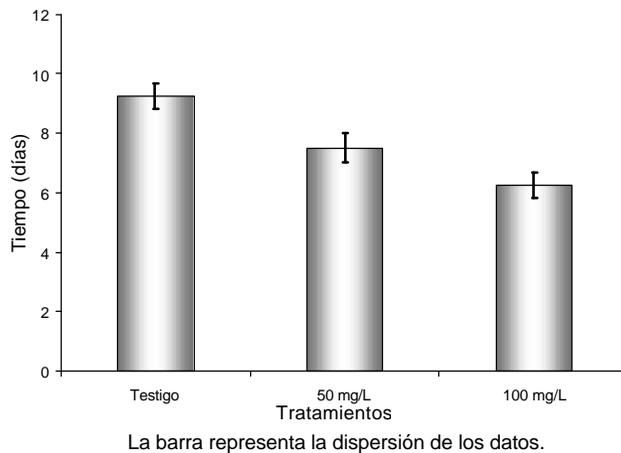


Figura 3. Duración de la fermentación para los tratamientos testigo, agregado de 50 mg/L $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ y agregado de 100 mg/L $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$. La duración se expresa en días. $n = 4$.

DISCUSIÓN

La velocidad máxima de fermentación, medida como la máxima pérdida de peso diaria, se alcanzó al 3^{er} día en todos los tratamientos. Existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la velocidad máxima alcanzada por el testigo y por los tratamientos B y C. No existen diferencias significativas entre las velocidades máximas alcanzadas por los tratamientos B y C.

Resultados análogos obtuvo Henick-Kling (9): La adición de hasta 1 g/L de fosfato diamónico (equivalente a 258 mg/L de amonio) aumentó la velocidad de fermentación; adiciones de 2g/L de fosfato diamónico no resultaron más efectivas que la dosis antes mencionada.

La duración media de la fermentación, medida en días, resultó significativamente diferente ($p < 0.05$) para los tres tratamientos, siendo de 9.25 días para el testigo, 7.5 días para el tratamiento B y 6.25 días para el tratamiento C.

Sablayrolles (18) expresa que la dotación de NPA del mosto influye fuertemente la cinética de las fermentaciones. Sostiene que existe una relación inversa entre la concentración de NPA del mosto y la duración de la fermentación alcohólica. La adición de NPA durante la fermentación se traduce en una sensible reducción de la duración global, dependiendo del momento y de la cantidad del agregado. El agregado de 30 g/HL de nutrientes nitrogenados (300 mg/L) ha permitido una reducción de la duración de la fermentación del 26 % en mosto con 80 mg/l de NPA original, y de un 15 % si el NPA original es 300 mg/L.

Tromp (23) trabajó con mostos de Chenin blanc, de pH 3.08, y temperaturas de fermentación entre 10 y 15 °C. Modificó la concentración original de NPA del mosto (270 mg/L) y la llevó a 520 mg/L. La adición de nitrógeno redujo de 56.3 a 46.4 días la duración de la fermentación alcohólica.

En las condiciones locales, se ha trabajado con mostos de mayor pH, con temperaturas mayores de fermentación y con dosis menores de NPA. Esto permite explicar las diferencias registradas en la duración de la fermentación.

CONCLUSIONES

- ❖ El agregado de nitrógeno prontamente asimilable, bajo la forma de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$, realizado previamente a la inoculación de las levaduras, redujo la duración de la fermentación alcohólica. La duración de la fermentación del tratamiento B (agregado de 50 mg/L de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$) fue del 81 % respecto del testigo 100 %, mientras que el tratamiento C (agregado de 100 mg/L de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$) fue del 67 %, respecto del mismo testigo.
- ❖ La velocidad máxima de dicha fermentación aumentó con la adición de nitrógeno, sin que se observaran diferencias para las distintas dosis agregadas. La velocidad de fermentación alcanzada por el tratamiento B (agregado de 50 mg/L de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$) fue 57 % superior respecto del testigo, mientras que el tratamiento C (agregado de 100 mg/L de $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$) fue 53 % superior respecto del mismo testigo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ayestarán, B.; Ancín, C.; García, A; González, A. and Garrido, J. 1995. Influence of prefermentation clarification on nitrogenous contents of musts and wines. *J. Agric. Food. Chem.* 43. p. 476-482.
2. Bisson, L. 1999. Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 50, N° 1. p. 107-119.
3. Boulton, R.; Singleton, V.; Bisson, L. and Kunkee, R. 1995. Principles and practices of winemaking. Ed. Chapman&Hall. New York. 604 p.
4. Butzke, Christian. 1998. Survey of yeast assimilable nitrogen. Status in musts from California, Oregon and Washington. *Am. J. Enol. Vitic.* 49, N° 2. p. 220-224.
5. Cherubin, S.; Fontana, M. e Zironi, R. 2001. Confronto fra metodi er la determinazione dell'azoto totale nei mosti e nei vini e dei composti azotati assimilabili dal lievito. *Vignevini* N° 1/2. p. 88-93.
6. Dukes, B. and Butzke, C. 1998. Rapid determination of primary amino acids in grape juice using an O-phthaldialde-hyde/N-acetyl-L-cysteine spectrophotometric assay. *Am. J. Enol. Vitic.* 49 N° 2. p. 125-133.
7. Falchek, David. 2000. Nitrogen, the essential element. *Vineyard and Winery management.* May-June. p. 97-101.
8. Giudici, P. and Kunkee, R. E. 1994. The effect of nitrogen deficiency and sulfur containing amino acids on the reduction of sulfate to hydrogen sulfide by wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.* 45 N° 1. p. 107-112.

9. Henick-Kling, T.; Edinger, W. D. and Larson - Kovach, I. 1996. Survey of available nitrogen for yeast growth in New York grape musts. *Die wein wissenschaft (Vitic. Enol. Sci.)* 51(3):169-174.
10. Ingledew, W. M. 1996. Nutrients, yeasts Hulls and proline in the wine fermentation. *Die Wein-Wissenschaft (Vitic. Enol. Sci.)* Vol. 51(3):141-146.
11. Jiranek, V.; Langridge, P. and Henschke, P. A. 1995. Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine. Producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 61. N° 2. p. 461-467.
12. Lorenzini, F. 1996. Teneur en azote et fermentescibilité des moûts de Chasselas. *Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* Vol. 28(3):169-174.
13. Monteiro, F. F.; Trousdale, E. K. and Bisson, L. F. 1989. Ethyl carbamate formation in wine: use of radioactively labeled precursors to demonstrate the involvement of urea. *Am. J. Enol. Vitic.* 40. p. 1-8.
14. Monteiro, F. F. and Bisson, L. 1991. Biological essay of nitrogen content of grape juice and prediction of sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 42. p. 47-57.
15. _____ . 1992. Nitrogen supplementation of grape juice. I- Effect on amino acid utilization during fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.* 43. p. 1-10.
16. Ough, C. S.; Crowell, E. A. and Mooney, L. A. 1988. Formation of ethyl carbamate precursors during grape juice (Chardonnay) fermentation. I- Addition of amino acid, urea and ammonia: effects of fortification on intercellular and extracellular precursors. *Am. J. Enol. Vitic.* 39. p. 243-249.
17. Rapp, A. and Versini, G. 1996. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wines. *Die wein wissenschaft (Vitic. Enol. Sci.)* 51(3):193-203.
18. Sablayrolles, J. M.; J. M. Salmon et P. Barre. 1996. Carences nutritionnelles des moûts. Efficacité des ajouts combinés d'oxygène et d'azote ammoniacal. *Revue Française d'Oenologie*. N° 159. p. 25-32.
19. Salmon, J. M. 1996. Sluggish and stuck fermentations: some actual trends on their physiological basis. *Die Wein-Wissenschaft (Vitic. Enol. Sci.)* Vol. 51(3/4):137-140.
20. Sponholz, W. R. 1991. Nitrogen compounds in grapes must and wine. In: *Proceedings of the International Symposium on nitrogen in grapes and wine*. Seattle, WA. AJEV J. Rantz (Ed). p. 67-77.
21. Torrea-Goñi, D. y C. Ancín Azpilcueta. 1999. Use of nitrogen compounds in spontaneous and inoculated wine fermentations. *J. Agric. Food. Chem.* 47. p. 4018-4024.
22. Trioli, G. 1996. Effect of fermaid addition to white grape juice on the behavior of several commercial yeast strains. *Die Wein-Wissenschaft (Vitic. Enol. Sci.)* Vol. 51(3/4):204-209.
23. Tromp, A. 1985. Influence de la souche de levure, des bourbes, de l'azote et de la température de fermentation sur la vitesse de fermentation et sur la qualité du vin. *Bulletin de L'OIV.* (648-649) p. 247-255.
24. Vos, P. J. and Gray, R. S. 1978. The origin and control of hydrogen sulfide during fermentation of grape must. *Am. J. Enol. Vitic.* 30. p. 187-197.
25. Zoecklein, B.; Fugelsang, K.; Gump, B. and Nury, F. 1994. *Wine analysis and production*. Ed. Chapman & Hall. New York. 621 p.