



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Estudio de la acidificación de los vinos como estrategia contra los efectos del cambio climático.

Autor/es

MIKEL LANDIN ROSS-MAGAHY

Director/es

MARÍA FERNANDA RUIZ LARREA y MARÍA DEL ROCÍO FERNÁNDEZ PÉREZ

Facultad

Facultad de Ciencia y Tecnología

Titulación

Grado en Enología

Departamento

AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

Curso académico

2020-21



Estudio de la acidificación de los vinos como estrategia contra los efectos del cambio climático., de MIKEL LANDIN ROSS-MAGAHY

(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.

Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor, 2021

© Universidad de La Rioja, 2021

publicaciones.unirioja.es

E-mail: publicaciones@unirioja.es



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

Facultad de Ciencia y Tecnología

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Enología

Estudio de la acidificación de los vinos como estrategia
contra los efectos del cambio climático.

Wine acidification study as a strategy against
the effects of climate change.

Realizado por:

Mikel Traill Landin Ross-Magahy

Tutelado por:

Dra. María Fernanda Ruiz Larrea

Dra. María del Rocío Fernández Pérez

Logroño, julio de 2021

ESTUDIO DE LA ACIDIFICACIÓN DE LOS VINOS COMO ESTRATEGIA CONTRA LOS
EFECTOS DEL CAMBIO CLIMÁTICO.



GRADO EN ENOLOGÍA

CURSO 2020-2021

Mikel Traill Landin Ross-Magahy



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, y como no podría ser de otra manera, agradecer a mis padres por la confianza y el apoyo que me han mostrado siempre. En particular, a mi madre Aisling por haberme animado a hacer la carrera de Enología. Siempre me ha resultado curioso que, siendo mi madre irlandesa, y no teniendo en su país cultura vitivinícola, se le hubiera podido ocurrir algo así para mí. Quizá, precisamente por eso, una persona ajena a nuestra cultura es la que más valora las cosas que no tiene en su tierra natal.

En segundo lugar, quiero agradecer al claustro de profesores de la titulación de Enología de La Universidad de La Rioja por su trato, esfuerzo y cariño dispensados.

Agradecer además a mis tutoras del Trabajo Fin de Grado.

A Fernanda, por su guía y ayuda en la tutorización de las prácticas externas, que terminó convirtiéndose además en el Trabajo Fin de Grado; por cómo se ha implicado, volcando todo su interés y esfuerzo que entiendo que está muy por encima de lo que un tutor hace por su alumno.

A Rocío por dedicarme su tiempo y ayuda. Agradezco enormemente la acogida que me han dispensado en el Instituto de las Ciencias de la Vid y el Vino (ICVV).

Quiero destacar, la suerte que he tenido al toparme con una mujer como Vega Angulo Roig, responsable de laboratorio de Bodegas Roda y mi tutora de empresa en mis prácticas curriculares. Persona que me instruyó y ayudó de una y mil formas.

A Antonio Palacios por su ayuda en la planificación del análisis sensorial y en el tratamiento de los datos obtenidos.

Por otra parte, quiero agradecer a mis compañeros de carrera el trato y ayuda que me han brindado siempre. No sé, si es por la suerte que he tenido con el grupo de compañeros con los que he estudiado o si será el tipo de carrera y por ser tan pocos en la misma, en La Universidad de La Rioja.

Quiero agradecer también a la ciudad de Logroño y sus habitantes por cómo me han acogido y por hacerme sentir parte de ellos desde un principio.

Es una ciudad en la que he disfrutado mucho de sus paseos y sus parques, de sus tiendas y bares y en especial de *la calle Laurel* por los maravillosos pinchos que sirven. Es una ciudad en la que te sientes integrado y seguro desde un comienzo.

ÍNDICE

1. Resumen & Abstract.....	Pág. 5
2. Introducción.....	Pág. 7
2.1. Estrategias vitícolas para mitigar los efectos negativos del cambio climático.....	Pág. 7
2.2. Estrategias enológicas para mitigar en bodega los efectos negativos del cambio climático.....	Pág. 8
2.3. Los vinos de la D.O.Ca. Rioja.....	Pág. 9
3. Objetivos.....	Pág. 10
4. Materiales y métodos.....	Pág. 10
4.1. Seguimiento de la vendimia.....	Pág. 10
4.2. Fermentación alcohólica (FOH).....	Pág. 11
4.3. Fermentación maloláctica (FML).....	Pág. 13
4.4. Crianza.....	Pág. 14
4.5. Cata.....	Pág. 14
4.6. Análisis microbiológicos.....	Pág. 16
4.6.1. Recuentos de levaduras.....	Pág. 16
4.6.2. Recuento de bacterias.....	Pág. 17
4.7. Análisis estadísticos de los datos.....	Pág. 19
5. Resultados y Discusión.....	Pág. 19
5.1. Tratamiento pre-fermentativo.....	Pág. 19
5.2. Seguimiento de la fermentación alcohólica.....	Pág. 21
5.3. Seguimiento de la fermentación maloláctica.....	Pág. 28
5.4. Análisis microbiológicos.....	Pág. 34
5.5. Análisis de los vinos finales elaborados (CATA).....	Pág. 39
6. Conclusiones	Pág. 47
7. Bibliografía y fuentes empleadas.....	Pág. 48
8. Abreviaturas.....	Pág. 49
9. ANEXOS.....	Pág. 50

1. Resumen

La acidificación, es un método que ya lleva empleándose desde los tiempos de Grecia y Roma y que, en la actualidad está ganando protagonismo por causa del cambio climático y el consecuente problema de la sobremaduración de la uva y la falta de acidez en los vinos resultantes.

El objetivo de este estudio es realizar una comparación del proceso fermentativo de uva procedente de una misma parcela y con caracteres fisicoquímicos similares o casi idénticos, teniendo un vino control, un vino acidificado con ácido tartárico y otro con ácido láctico. Dicha adición de ácidos se realizó en el momento del encubado.

Esta experiencia tuvo lugar en Bodegas Roda, ubicada en el Barrio de la estación de Haro (La Rioja). Se empleó uva proveniente de la parcela *la Encina*, con unos parámetros fisicoquímicos iniciales estadísticamente iguales, sin diferencias significativas.

En Bodegas Roda se realizaron las elaboraciones de vino. Una vez que el vino se encubó, se realizaron las correcciones de ácidos pertinentes y se comenzó con la fermentación alcohólica espontánea, que tuvo lugar en depósitos de acero inoxidable de 1.200 kg de capacidad. La FOH duró un total de 14 días. Tras esto, los vinos se trasegaron a barricas bordelesas de 225 L de capacidad y de origen francés, donde se realizó su crianza en madera durante un total de 98 días y durante la cual los vinos realizaron la FML espontánea. Se tomaron muestras a lo largo de todo el proceso de vinificación para su análisis fisicoquímico y microbiológico.

Los análisis fisicoquímicos de las muestras tomadas durante el proceso de elaboración se realizaron en el laboratorio enológico de Bodegas Roda con ayuda de un espectrofotómetro y un analizador infrarrojo de la marca Tecnología Difusión Ibérica (TDI). Los análisis microbiológicos se realizaron en los laboratorios del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV).

Finalmente, se realizaron los análisis sensoriales de los vinos elaborados en una de las sesiones de la asignatura de Ampliación de Análisis Sensorial de La Universidad de la Rioja.

Se pudo observar cómo el vino tipo C presentó la mejor valoración en las fases visual y olfativa con presencia de aromas afrutados lácteos y a pastelería. Los vinos tipo T se caracterizaban por su acidez y presencia de tanino amargo en la fase gustativa. Por último, los vinos L fueron caracterizados por una mayor presencia de roble y de mantequilla en fase olfativa que se corroboraba en la retronasal con descriptores a madera. Además, el vino tipo L fue el mejor valorado en la fase gustativa por su equilibrio y nivel de taninos maduro.

***PALABRAS CLAVES*:** Acidificación de vino tinto, ácido tartárico, ácido láctico, cambio climático.

Abstract

Acidification is a method that has been used since Greek and Roman times and is currently gaining prominence due to climate change and the consequent problem of grape over-ripening and lack of acidity in the resulting wines.

The aim of this study is to compare the fermentation process of grapes coming from the same plot and with similar or almost identical physicochemical characteristics, having a control wine, a wine acidified with tartaric acid and another with lactic acid. These acids were added at the time of vatting.

This experiment took place at Bodegas Roda, located in the Barrio de la Estación in Haro (La Rioja). Grapes from the *La Encina* plot were used, with statistically equal initial physicochemical parameters, with no significant differences.

The wine was made at Bodegas Roda. Once the wine was vatted, the pertinent acid corrections were made and spontaneous alcoholic fermentation began, which took place in stainless steel tanks with a capacity of 1,200 kg. Alcoholic fermentation lasted for a total of 14 days. After this, the wines were racked into 225 L Bordeaux barrels of French origin, where they were aged in wood for a total of 98 days and during which the wines underwent spontaneous MLF. Samples were taken throughout the vinification process for physicochemical and microbiological analysis.

The physicochemical analyses of the samples taken during the winemaking process were carried out in the Bodegas Roda oenological laboratory using a spectrophotometer and an infrared analyser from Tecnología Difusión Ibérica (TDI). The microbiological analyses were carried out in the laboratories of the Institute of Grapevine and Wine Sciences (ICVV).

Finally, the sensory analyses of the wines produced were carried out in one of the sessions of the Sensory Analysis Extension course in University of La Rioja.

It could be observed how wine type C presented the best evaluation in the visual and olfactory phases with the presence of fruity, dairy and pastry aromas. Type T wines were characterised by their acidity and the presence of bitter tannin in the taste phase. Finally, the L wines were characterised by a greater presence of oak and butter in the olfactory phase, which was corroborated in the retronasal phase with woody descriptors. In addition, the L type wine was the best rated in the taste phase for its balance and level of ripe tannins.

***KEY WORDS:** Acidification of red wine, tartaric acid, lactic acid, climate change.

2. Introducción

La Rioja es una tierra con una amplia cultura vitivinícola, sin embargo, por desgracia, cultivos permanentes como la viña, están sufriendo cada vez más los efectos ocasionados por el cambio climático, que se traduce en cambios de temperatura y en la disponibilidad de agua. Los efectos que se producen en el desarrollo de la vid son cambios en las fechas de los distintos estados fenológicos y en la duración de alguno de ellos, repercutiendo así, en la calidad de las bayas (Ramos & Martínez de Toda, 2019 a).

El clima es un factor determinante de la composición de las bayas, ya que es uno de los principales agentes que afecta a su crecimiento y posterior maduración. (Sandra et al., 2007), aunque también es verdad, que hay que tener en cuenta otros factores, como las características del terreno y el manejo del cultivo (Ashenfelter, 2010).

En los últimos años, en La Rioja se ha venido observando una alteración en los estados fenológicos de la vid, siendo éstos cada vez más tempranos y provocando una reducción en el ciclo biológico. Consecuentemente, la vendimia en Rioja, ha venido más adelantada. En ocasiones, debido a temperaturas medias más elevadas en verano, provocando que se alcance la madurez tecnológica (azúcares y acidez), sin alcanzar la óptima fenólica (fenoles y maduración de la pepita). En otras palabras, cada año la uva alcanza una graduación alcohólica mayor, sin haber alcanzado el óptimo de maduración de las pepitas y de los hollejos. (Ramos & Martínez de Toda, 2019 a)

Mayores concentraciones de etanol en los vinos, producen cambios en la percepción de los sabores. Produce una alteración en la percepción del dulce, aumenta el amargor, disminuye la acidez y contribuye a la sensación de calor y al cuerpo del vino. El etanol, también puede disminuir la volatilidad de compuestos aromáticos, al aumentar su solubilidad en el vino, haciendo que compuestos pequeños como los ésteres etílicos y acetatos afrutados sean menos reconocibles por los sentidos humanos (Ivit et al; 2020).

2.1. Estrategias vitícolas para mitigar los efectos negativos del cambio climático.

Evidentemente, existen muchas maneras de lidiar con este problema. Hay estudios que señalan que el uso de levaduras que respiran al inicio de la fermentación alcohólica, pueden ser una buena solución para que se reduzcan los azúcares que finalmente fermentan.

A continuación, se exponen algunas de las estrategias vitícolas (Martinez de Toda, 2019 b), que se pueden emplear para mitigar los efectos del cambio climático, en el ámbito del manejo del viñedo, para posteriormente, si fuera necesario aplicar las enológicas.

- **Cambios en el material vegetal:** empleando vides de ciclo largo, portainjertos que se adapten mejor a esta nueva situación, clones más adaptados... En este contexto, es de gran importancia la conservación de la biodiversidad de clones de *Vitis vinifera* que actualmente existen, para poder seleccionar los más adecuados en cada situación geoclimática que se presente. En el caso de Bodegas Roda, ésta dispone de un campo de germoplasma con más de 250 clones de Tempranillo, plantados desde el año 2.000, con el fin de ver cuáles son los de mayor calidad y mejor adaptados a las nuevas circunstancias.
- **Exposición a la luz solar:** Un factor vitícola de máxima importancia es la exposición a la luz solar de las bayas y de su efecto en la temperatura de éstas. Se considera que,

mantener los racimos en penumbra puede reducir en 0,67°C, aproximadamente la temperatura con respecto a la temperatura ambiente. Por el contrario, exponer los racimos en exceso a la luz solar, produce un aumento de 0,88°C con respecto a la temperatura ambiente.

- **Cambio en la ubicación del viñedo:** trasladando el cultivo de la vid a latitudes mayores, (caso del sur de Inglaterra en los últimos años), o bien trasladando el cultivo a mayor altitud. Dentro de este punto, es importante señalar el tipo de exposición y los posibles cambios de orientación hacia el norte, donde habría menor radiación solar y menores temperaturas.
- **Cambios en las técnicas de cultivo:** Técnicas que promuevan el retraso de la maduración, que bien pueden basarse en **mecanismos de competencia**, (poda tardía, aumento en la carga, despunte temprano, riego tardío, poda mínima...) o en la **disminución de la fotosíntesis**, (disminución en la superficie foliar, empleo de antitranspirantes o empleando la técnica de sombreado a través del uso de redes o umbráculos).

2.2. Estrategias enológicas para mitigar en bodega los efectos negativos del cambio climático

En la actualidad, el cambio climático ha producido que las concentraciones de azúcares en la uva aumenten, de forma que las graduaciones alcohólicas también sean más elevadas. Este es un aspecto negativo, si tenemos en cuenta que el consumidor, cada día está más concienciado con la reducción de la ingesta de alcohol, especialmente visible en los países con tradición vitícola. Dependiendo del país, un mayor grado alcohólico en un vino, también puede acarrear un mayor coste para el consumidor, que quizá no esté dispuesto a asumir.

Por tanto, hemos de lograr una reducción del grado alcohólico del vino, a la par que se consigan vinos con perfiles de sabor a fruta madura, rica y con cuerpo (García *et al*; 2020).

Hay estudios que señalan el uso de levaduras *no-Saccharomyces* o *Saccharomyces no-cervisiae* que respiran al inicio de la FOH, pueden resultar ser una buena solución para que disminuya la cantidad de azúcares presentes en el mosto, que posteriormente se convertirán en alcohol a través de la FOH llevada a cabo por levaduras del género *Saccharomyces* (Ivit *et al*; 2020).

Son muchas las **levaduras** que se pueden emplear **al inicio de la FOH**, para que se realice dicha **respiración** y entre otras, se encuentran (Ivit *et al*; 2020) las siguientes:

- ***Schizosaccharomyces pombe*:** Levadura ampliamente estudiada, debido a su particular capacidad de reducir la acidez del vino mediante la degradación del ácido málico, además de ser capaz de mejorar el color en vinos tintos. Está autorizado como un método alternativo a la desacidificación del vino.
- ***Metschnikowia pulcherrima*:** Levadura capaz de soportar concentraciones de etanol de hasta el 7% (v/v). En los últimos años ha despertado el interés por su uso comercial, debido a su capacidad para reducir el contenido de etanol, además de su capacidad para potenciar compuestos aromáticos varietales.
- ***Lachancea thermotolerans*:** Destaca por su influencia positiva en el perfil sensorial de los vinos y en la acidez total. También es capaz de aumentar las concentraciones de

glicerol de forma significativa (>5 g/L), de manera que puede tener relevancia sensorial.

- ***Candida stellata***: Levadura muy estudiada, debido a las contribuciones positivas que aporta al vino. Puede producir glicerol y llevar a cabo reacciones enzimáticas, que tienen efectos positivos en los atributos sensoriales del vino.
- ***Torulaspota delbrueckii***: Una de las primeras levaduras no-*Saccharomyces* comercializadas. Hay estudios que señalan, cómo el empleo de esta levadura puede producir mejoras en la composición aromática y tener un impacto positivo en las propiedades de la espuma en vinos espumosos. Su uso, en fermentaciones secuenciales con aireación, puede dar muy buenos resultados a la hora de la reducción del grado alcohólico.

Constantemente, se investigan nuevas levaduras para la fermentación de los vinos y su papel en las fermentaciones no inoculadas.

Está además la opción de emplear **Organismos Genéticamente Modificados (OGM)**, sin embargo, ésta no es una práctica aceptada en Europa (Gutiérrez Viguera, 2019).

Por otra parte, también existe la posibilidad de **acidificar los mostos**, que posteriormente fermentarán. En este caso, no se reduciría la graduación alcohólica final, pero sí que se lograría aportar esa acidez, que escasea en la uva sobremadura o con altas concentraciones de azúcar.

Cabe añadir el empleo de **técnicas físicas** (Gutiérrez Viguera, 2019). Éstas parecen ser el futuro de la Enología, ya que evitan el empleo de estabilizantes y aditivos suplementarios, lo cual está en consonancia con la demanda de consumidores que prefieren caldos elaborados con el empleo mínimo de aditivos. Algunas de las **técnicas físicas** que se pueden emplear son:

- Conos rotatorios
- Tecnologías de membrana
 - Osmosis inversa
 - Destilación osmótica
 - Nanofiltración
 - Pervaporación

2.3. Los vinos de la D.O.Ca. Rioja

Una de las características de la D.O.Ca. Rioja, es el hecho que se limita la producción de uva tinta a 6.500 kg/ha y además se restringe el uso de variedades de uva tinta y blanca en el terreno amparado bajo la D.O.Ca. Rioja. Las variedades tintas permitidas en esta denominación son: Tempranillo (87% del cultivo de uva tinta en Rioja), Garnacha Tinta, Graciano, Mazuelo y Maturana tinta.

El Tempranillo se considera una de las variedades de mayor calidad en España, lo cual es una de las razones por las que existe tanta superficie cultivada en Rioja. Originariamente, esta variedad se comenzó a cultivar en La Rioja (unas 30.000 ha) y algo en Ribera del Duero. Es una variedad que en zonas cálidas, suele presentar escasa acidez al absorber mucho potasio, por esta razón en la elaboración tradicional, se hacen coupages con otras variedades, que aportan dicha acidez que al Tempranillo le falta, y también es muy frecuente corregir el Tempranillo con ácido tartárico. (Martínez de Toda, 2019 b).

La Rioja, destaca hoy en día por sus vinos tintos con crianza. Esto no siempre era así, en el pasado, aunque actualmente parezca extraño, los vinos blancos de Rioja, llegaron a tener hasta más caché que los tintos. Posteriormente, los vinos tintos de maceración carbónica (elaboración de vino joven del año), se convirtieron en la elaboración más frecuente entre los tintos. Ha habido una evolución, a lo largo de la cual, los cosecheros se han quedado en un segundo plano y los grandes grupos bodegueros que envejecen el vino, han pasado a tomar liderazgo. (Barco Royo, 2018)

En el 2018, según datos del Consejo Regulador de la D.O.Ca. Rioja, los agentes económicos de Rioja, se distribuían de la siguiente manera:

-  Crianza (48,8%)
-  Cosechero (34,8%)
-  Almacenamiento (11,7%)
-  Cooperativa (4,7%)

3. Objetivos

Ante la problemática del efecto del cambio climático en el desarrollo de la maduración de la uva, que provoca que éstas cada vez presenten menor acidez, se plantean actuaciones a nivel de bodega para mitigar este efecto negativo. El objetivo, es realizar un estudio comparativo del proceso fermentativo y resultado final en cata de vinos elaborados, realizando una acidificación en el momento del encubado con ácido tartárico o ácido láctico.

4. Materiales y métodos

Este estudio se realizó en las instalaciones de Bodegas Roda, localizados en el barrio de la Estación, en el municipio de Haro. Se requirieron de un total de 6 depósitos de acero inoxidable de 1.200L de capacidad cada uno y provistos con camisas refrigerantes.

4.1. Seguimiento de la vendimia:

Para el estudio, se empleó uva tinta de la variedad Tempranillo vendimiada manualmente, procedente de una de las parcelas de Bodegas Roda, denominada *La Encina*.

Cabe destacar que la uva vinificada en este ensayo era de excelente calidad, ya que se realizó una selección manual de la uva que entraba en estos depósitos, al igual que se hace con el resto de la uva que entra en esta bodega.

El control de maduración de las distintas muestras se realizó mediante la pesada de 25 bayas, para así obtener el peso de 100 bayas. Posteriormente se pesaban 40 g de uva de cada muestra y esa porción se dejaba apartada para triturlarla durante 30 segundos e introducirla en los tubos de centrifuga, que se centrifugaban durante 15 minutos a 4.000 rpm.

El resto de la muestra de uva se machacaba, se medía el grado probable con un refractómetro, se iban llenando los tubos de centrifuga correspondiente a cada muestra y se centrifugaban a 4.000 rpm durante 10 minutos.

Finalmente, con un analizador infrarrojo de la marca Tecnología Difusión Ibérica (TDI), se medían parámetros como la acidez total, pH, ácido málico, ácido glucónico, ión potasio... entre otros.

Las muestras que habían sido trituradas, se analizaron en un espectrofotómetro y los datos de absorbancia sirven como referencia para el color, procesados como parámetros de índice de color, de IPT y nivel de antocianos.

4.2. Fermentación alcohólica (FOH):

La FOH se realizó en los 6 depósitos de acero inoxidable con una capacidad de 1.200kg cada uno. En dos de esos depósitos de acero inoxidable, se introdujeron las muestras control, en otros dos los del tratamiento con ácido tartárico y en los últimos dos, los de ácido láctico. Se nombraron de la siguiente manera:

- INOX 10 C1 → Control 1
- INOX 11 C2 → Control 2
- INOX 17 T1 → Tartárico 1
- INOX 18 T2 → Tartárico 2
- INOX 19 L1 → Láctico 1
- INOX 20 L2 → Láctico 2

En la **Figura 01** se observan algunos de los depósitos de acero inoxidable donde tuvo lugar la FOH de los vinos de estudio

Figura 01: Depósitos de 1.200 kg de capacidad donde se realizó la FOH de los vinos



No fue necesario añadir nutrientes, debido a los altos valores de nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) que tenía la uva, ni tampoco se inocularon levaduras, sino que se optó por una fermentación alcohólica espontánea.

Durante la fermentación, se midieron la densidad y la temperatura diariamente, tanto por la mañana como por la tarde. Para ello se empleó un densímetro, una probeta de 250 mL y un termómetro. En el caso de que la densidad estuviera por encima de los 1.100 g/L y que no se viera actividad fermentativa, se analizaba el mosto con el **analizador infrarrojo TDI** y se determinaban los siguientes parámetros. NFA, acidez total, concentración de ácido tartárico, sulfuroso libre, ácido málico, pH y grado alcohólico probable; además de emplear un

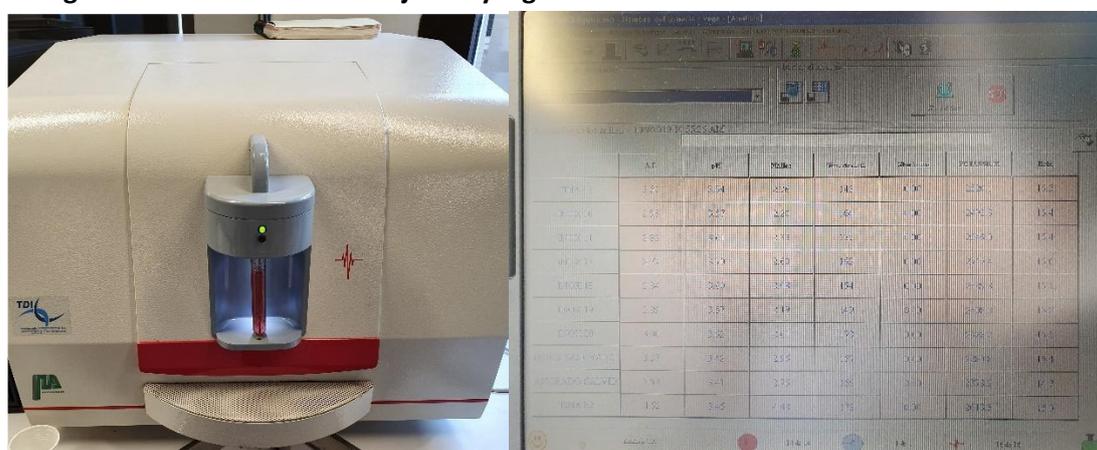
espectrofotómetro, para obtener los valores del IC (Índice de Color), IPT (Índice de Polifenoles Totales) e IA (Índice de Antocianos).

En los casos en que el mosto/vino se encontraba en plena fermentación, sólo se medían la densidad y la temperatura, ya que el carbónico alteraba las lecturas y por tanto los datos de las analíticas no habrían sido fiables.

Cuando ya la densidad estaba por debajo de los 1.000 g/L y no había evidencias de carbónico, ya se empleaba el analizador infrarrojo TDI para la determinación de los parámetros siguientes: acidez total, acidez volátil, azúcares residuales, ácido málico, extracto seco y grado alcohólico. Nuevamente se medían los parámetros de IC, IPT e IA con el espectrofotómetro.

En la **Figura 02** se muestra el analizador infrarrojo TDI y un ejemplo de los resultados que dicho aparato daba en el programa informático asociado al analizado.

Figura 02: Analizador infrarrojo TDI y algunos de los resultados obtenidos del mismo



Los depósitos tenían un control de temperatura, de manera que no se permitía que la temperatura fuera superior a los 28°C.

Una vez que se dieron por concluidas las FOH, se trasegaron los vinos a barricas, rellenando por cada depósito de acero inoxidable 2 barricas, salvo en el caso del tratamiento Láctico 1, del cual se rellenaron 3 barricas. Cabe destacar que los vinos prensa de los diferentes depósitos, se juntaron y se prensaron juntos y posteriormente se emplearon para terminar de rellenar las diferentes barricas.

Las barricas empleadas fueron bordelesas (225 L) de roble francés.

Se dio por concluida la FOH el 21 de octubre cuando la densidad se encontraba entre 994 - 1.000 g/L de vino, mismo día en el que se procedió al descubado de los depósitos.

Se realizó un seguimiento químico-analítico y microbiológico de las 9 barricas (3 con el vino control C; 3 con el vino tratado con ácido tartárico T; 3 con el vino tratado con ácido láctico), que fueron las siguientes:

- C1.1 → Barrica rellena con el vino del depósito INOX 10 C1
- C1.2 → Barrica rellena con el vino del depósito INOX 10 C1
- C2.1 → Barrica rellena con el vino del depósito INOX 11 C2

- T1.1 → Barrica rellena con el vino del depósito INOX 17 T1
- T1.2 → Barrica rellena con el vino del depósito INOX 17 T1
- T2.1 → Barrica rellena con el vino del depósito INOX 18 T2

- L1.1 → Barrica rellena con el vino del depósito INOX 19 L1
- L1.2 → Barrica rellena con el vino del depósito INOX 19 L1
- L2.1 → Barrica rellena con el vino del depósito INOX 20 L2

4.3. Fermentación maloláctica (FML):

La FML se realizó en una sala especialmente preparada, con suelos calefactables y aspersores de agua, de manera que las condiciones propiciaran a la multiplicación de las bacterias lácticas (BAL) que realizaran la FML. Nuevamente se dejó que el proceso fuera espontáneo, no se inocularon en ningún momento BAL.

Debido a que la FML es mucho más lenta que la FOH, sólo se hacían muestreos semanales donde se analizaban los vinos con el analizador infrarrojo TDI, determinando los valores de pH, acidez total, acidez volátil, azúcares reductores, ácido málico (fundamental para el seguimiento de la evolución de la FML), extracto seco y grado alcohólico. Además, se midieron los valores de IC, IPT e IA con el espectrofotómetro.

Se dio por concluida la FML el 28 de noviembre de 2019, cuando el ácido málico se había consumido (0-0,14 g/L de ácido málico), por lo que ambas fermentaciones, desde que comenzaron hasta su fin, duraron un periodo completo de 81 días, contando desde el día en el que se realizó la corrección de la acidez el 9 de septiembre de 2019.

En la **Figura 03** se muestra la sala de barricas termostatazada en la cual tenía lugar la FML de los vinos.

Figura 03: Sala termostatzada donde tenía la FML de los vinos



4.4. Crianza:

El vino permaneció en las mismas barricas, desde que finalizó la FOH y se trasegó el vino a las barricas donde realizó la FML con posterior crianza, hasta febrero de 2020, posteriormente se trasegaron a otras barricas, para proceder a un mayor envejecimiento del vino.

4.5. Cata:

Para la cata de los vinos, se tomaron 3 botellas por tratamiento, es decir 3 botellas de cada uno de los tratamientos estudiados: control, tratamiento con tartárico y tratamiento con láctico. Esto se realizó justo antes que se procediera al trasiego del contenido de las mismas, a finales de enero de 2020.

Para la realización de la cata se empleó el modelo de análisis descriptivo para vinos tintos de la ISO 11035. A continuación, se muestra la ficha de análisis utilizada.

Tabla 01: Ficha de análisis descriptivo método ISO 11035.

ANÁLISIS DESCRIPTIVO MÉTODO ISO11035							
FECHA							
Nombre del catador							
TIPO Vino Tinto con Madera		PUNTUACIÓN Tacha con una X el valor que percibas: 0 equivale a ausencia 5 equivale a intensidad muy alta					
DESCRIPTOR	DEFINICIÓN DE CONSENSO	Ref:					
ASPECTO O FASE VISUAL							
Color	Marrón-teja-granata-rubi-picota-púrpura	0	1	2	3	4	5
Intensidad	Cantidad de color y pigmentación	0	1	2	3	4	5
Limpidez	Transparencia o grado de claridad. Desde turbio a cristalino	0	1	2	3	4	5
Brillo	De mate a brillante	0	1	2	3	4	5
Valoración cualitativa	De malo a excelente	0	1	2	3	4	5
AROMAS O FASE OLFATIVA							
Intensidad aromática	Grado de intensidad aromática en reposo	0	1	2	3	4	5
Herbaceos	Vegetal, esparrago, musgo	0	1	2	3	4	5
Floral	Flores aromáticas	0	1	2	3	4	5
Fruta fresca	Fresa, ciruela, melocotón, frambuesa, casis, cererza	0	1	2	3	4	5
Fruta madura	Fruta negra, mermelada, compota, gominola	0	1	2	3	4	5
Pastelería	Cremoso, crema, natillas, bollería, pastelería, pan horneado	0	1	2	3	4	5
Mantequilla	Margarina	0	1	2	3	4	5
Lácteos	Yogurth de frutas, queso fresco, leche	0	1	2	3	4	5
Vainilla	Canela, coco	0	1	2	3	4	5
Frutos secos	Avellana, almendras, piñón	0	1	2	3	4	5
Especias	Clavo, pimienta negra, cedro, tabaco	0	1	2	3	4	5
Torrefactos	Café, toffe, café molido	0	1	2	3	4	5
Ahumados	Humo, madera tostada	0	1	2	3	4	5
Roble	Madera de roble, ahumados, tostados	0	1	2	3	4	5
Balsámico	Eucalipto, mentolado, incienso	0	1	2	3	4	5
Químicos	Medicamento, caucho, neumático, petróleo	0	1	2	3	4	5
Animales	Aromas de cuero, animal, aromas positivos	0	1	2	3	4	5
Mineral	Pizarra, granito, gema, piedra pomez	0	1	2	3	4	5
Fenolados	Carácter "Brett", cuadra, establo, sudor de caballo	0	1	2	3	4	5
Reducción	Cerrado, aroma relacionado con la presencia de sulfuros	0	1	2	3	4	5
Oxidación	Manzana, acetaldehído, brandy, caramelo	0	1	2	3	4	5
Evolución	De oxidado a joven	0	1	2	3	4	5
Valoración cualitativa	De malo a excelente	0	1	2	3	4	5
GUSTO Y TEXTURA							
Dulcedumbre	De nula a elavada	0	1	2	3	4	5
Untuosidad	Acuoso, suave, sedoso, glicérico, redondo	0	1	2	3	4	5
Acido	Acidez en exceso	0	1	2	3	4	5
Fresco	Acidez positiva en paladar medio	0	1	2	3	4	5
Nivel de taninos	De ligero a muy tánico	0	1	2	3	4	5
T. Maduro		0	1	2	3	4	5
T. Astringente	Sensación táctil de rugosidad y aspereza	0	1	2	3	4	5
T. Amargo	Sensación final amarga de los taninos	0	1	2	3	4	5
Cuerpo	Volumen del vino en boca	0	1	2	3	4	5
Duración	Tiempo con sensaciones gustativas en boca	0	1	2	3	4	5
Equilibrio	Armonía, entre el dulce, ácido, amargo y astringencia	0	1	2	3	4	5
Valoración cualitativa	De malo a excelente	0	1	2	3	4	5
RETRONASAL							
Afrutado	Afrutado de cualquier tipo, frutas	0	1	2	3	4	5
Láctico	Lácteos, leche, yogurth, queso fresco	0	1	2	3	4	5
Madera	Madera de roble, crianza en barrica	0	1	2	3	4	5
Licoroso	Recuerdos de brandy, caramelo, abierto	0	1	2	3	4	5
Reducido	Aromas azufrados en retronasal	0	1	2	3	4	5
Herbáceo/Vegetal	Recuerdos vegetales y herbáceos	0	1	2	3	4	5
Químico	Sensaciones químicas en boca	0	1	2	3	4	5
Complejo	Produce muchas percepciones diferenciables	0	1	2	3	4	5
Evolución	De oxidado a joven	0	1	2	3	4	5
Persistencia	Duración en el tiempo de la percepción retronasal	0	1	2	3	4	5
Valoración cualitativa	De malo a excelente	0	1	2	3	4	5

Test de preferencia de 1-9:

La cata se realizó con la ayuda del profesor D. Antonio Tomás Palacios García, en la asignatura optativa de "Ampliación de análisis sensorial", en la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad de La Rioja.

En total fueron 16 catadores, (estudiantes de último año del grado de Enología, por lo que fueron considerados como catadores con experiencia).

Al comenzar la cata, se consensuó cada uno de los descriptores que aparecen en la ficha de análisis descriptivo, según el método ISO 11035. Además, se les comentó que al finalizar la cata de los vinos debían establecer su orden de preferencia.

El orden de cata fue el siguiente:

- **Primer vino (1): Vino control**
- **Segundo vino (2): Vino acidificado con ácido láctico**
- **Tercer vino (3): Vino acidificado con ácido tartárico**
- **Cuarto vino (4): Vino control (nuevamente)**

El control se cató en dos ocasiones, para así poder establecer si los catadores se habían dado cuenta que realmente se trataba del mismo vino o no.

Una vez concluyó la cata, se trataron los resultados en hojas de cálculo del programa de software Microsoft Excel. Se calcularon los valores de medias aritméticas y las desviaciones estándar de las valoraciones cualitativas, para cada una de las fases (visual, olfativa, gustativa y retronasal). Asimismo, se realizó el ANOVA con ayuda del SPSS, el análisis de componentes principales (ACP) (empleando XLSTAT) y los gráficos de araña (empleando Excel), para facilitar la visualización de los resultados.

4.6. Análisis microbiológicos:

En este estudio se realizaron recuentos de levaduras y bacterias, además de ver los caracteres morfológicos mediante microscopía óptica.

4.6.1. Recuento de levaduras

Para el recuento de levaduras, se emplea el *método de recuento de levaduras totales con la cámara de Neubauer*. Para ello, se necesita el siguiente material:

- Suspensión de levaduras cuyo recuento se pueda realizar
- Cámara de Neubauer Improved
- Microscopio
- Vortex
- Micropipeta

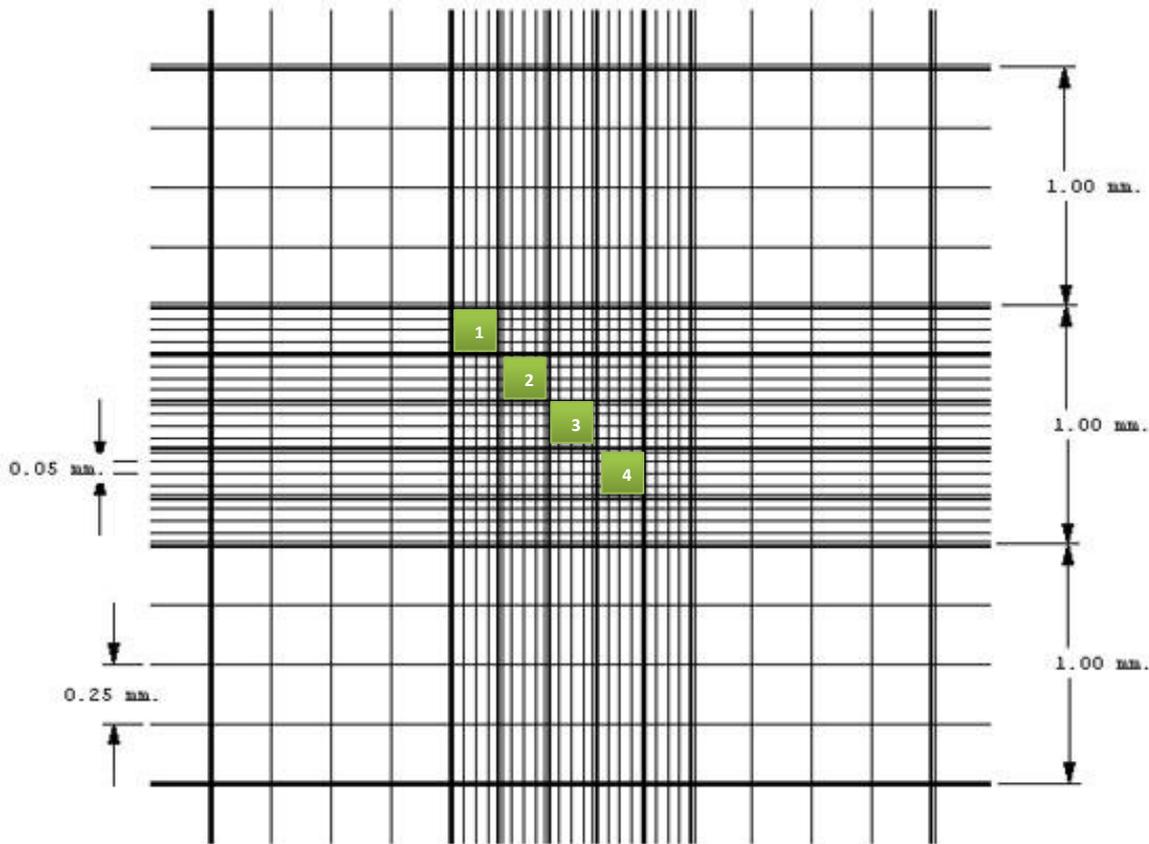
La cámara de Neubauer Improved empleada para el estudio, tenía una superficie de 0,0025 mm² y una profundidad de 0,100 mm, lo cual supone un volumen de 0,00025 mm³.

Para **preparar la muestra en la cámara de Neubauer**, en primer lugar, es importante que la muestra se agite bien con vortex antes de tomar los 250µL necesarios, ya que, si no, las levaduras podrían estar depositadas en el fondo de los viales. Se cogieron 10 µL de la mezcla y se pusieron sobre la cámara de Neubauer, que posteriormente se cubrió con el cubre, para que se extendiera bien por toda la cámara.

El último paso supone el recuento al microscopio, empleando el objetivo x40. Se realiza el recuento de 4 cuadrados de la parte central, (preferiblemente en diagonal), para que sea

estadísticamente significativo (Figura 04). Es decir, por muestra se hacen 4 recuentos de cuadrados pequeños, con los cuales se obtiene la media de células totales.

Figura 04: Esquema para el recuento en Cámara de Neubauer



En este caso, se fijó por convenio que las levaduras que tocaran el perímetro en la parte **izquierda** y de **debajo** del cuadrado que se recontaba, **sí** que se **contabilizaban** y por tanto las de la derecha y arriba no, de manera que no hubiera recuentos dobles. En el caso de que se viera una levadura en gemación, su recuento contaba como el de 2 levaduras independientes.

Cálculo de células por mL:

$$\frac{\text{número de células}}{16 \text{ cuadrados}} \cdot \frac{1.000 \text{ mm}^3}{0,00025 \text{ mm}^3} * \frac{1.000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3} * \text{factor de dilución} = \frac{\text{número de células}}{\text{mL}}$$

Cada uno de los cuadrados señalados en la imagen de arriba (Figura 04), (sección central de la cámara de Neubauer), está subdividido en 16 cuadrados más pequeños, los cuales poseen un volumen de 0,00025m³, de ahí que sea necesario dividir el número de células recontadas entre 16.

4.6.2. Recuento de bacterias

Los recuentos de las bacterias, se realizaron mediante el método de microscopía de fluorescencia, empleando la cámara de Neubauer Improved y el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BaLight (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Las muestras teñidas con el kit se examinaban al microscopio de fluorescencia Eclipse Ni-e (Nikon Instruments Europe B.V.,

Amsterdam, The Netherlands), equipado con un módulo de fluorescencia Cool LED pE-300 y una cámara fotográfica Nikon DS-Ri2. Las sondas fluorescentes empleadas fueron Syto 9 y yoduro de propidio. Syto 9 tiñe toda la población bacteriana con fluorescencia verde uniéndose a su DNA, tanto de bacterias que tienen intacta la membrana citoplasmática como las que la tienen dañada. Sin embargo el yoduro de propidio penetra sólo en las bacterias que tienen la membrana dañada, desplazando la sonda Syto 9 y la emisión de la fluorescencia de estas células rotas será en el color rojo, mientras que las bacterias con la membrana citoplasmática intacta mantendrán su fluorescencia verde. Las bacterias se examinaron empleando un aumento de x400 y un filtro que selecciona la longitud de onda de emisión de 525 nm para visualizar las células viables teñidas con Syto 9 y que emiten fluorescencia verde, y con un filtro de 620 nm para visualizar las células no viables que emiten el color rojo. Se hicieron los recuentos en 3 zonas tanto en color verde como en rojo, es decir, 6 fotos por muestra por cada muestra analizada. Los datos se procesaron para obtener el número de células viables y no-viables por mL de muestra de vino:

Nº células/mL:

$$\frac{\text{número de células}}{16 \text{ cuadrados}} \cdot \frac{1.000 \text{ mm}^3}{0,00025 \text{ mm}^3} * \frac{1.000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3} * \text{factor de dilución} = \frac{\text{número de células}}{\text{mL}}$$

También se realizaron **tinciones diferenciales de Gram**, para ver si las bacterias son Gram positivas o Gram negativas. Al tratarse de la fermentación maloláctica, éstas en su mayoría deberían ser positivas (bacterias lácticas) y no negativas (bacterias acéticas).

Los materiales necesarios para la tinción Gram son los siguientes:

- Tubo o placa con los microorganismos a estudiar
- Portas y cubreobjetos
- Agua estéril para el frotis
- Asa de siembra
- Aceite de inmersión
- Microscopio
- Pinzas de madera
- Colorantes o tintes:
 - o Solución de cristal violeta (1% en agua)
 - o Solución de I₂/KI (Lugol)
 - o Alcohol-acetona (1:1)
 - o Solución de safranina (2% en etanol: agua; 1:9)

En primer lugar, se prepara y fija el frotis para poder realizar la tinción. Para ello, se pone una gota pequeña de agua sobre el porta. Se coge con el asa, 1-2 colonias del microorganismo que se quiere estudiar, se resuspende en la gota de agua extendiéndola con el asa. Se deja secar al aire y posteriormente se fija a la llama, haciendo pasar varias veces por el mechero, sin que llegue a quemarse. Así, la preparación queda fijada y lista para ser teñida.

La tinción de Gram cuenta con los siguientes pasos:

1. Cubrir con **crystal violeta** y dejar actuar durante **1 min.**
2. Lavar con agua
3. Cubrir con **Lugol** y dejar actuar durante **1 min.**
4. Lavar con agua
5. Decolorar con mezcla **alcohol-acetona** hasta que el efluente salga incoloro (**30 seg.**)
6. Lavar con agua
7. Dejar secar la preparación a T° ambiente
8. Observación al microscopio

En el caso de que las bacterias se observen de color violeta, quiere decir que son Gram positivas, mientras que si se observan de color rosáceo serán Gram negativas.

4.7. Análisis estadístico de los datos:

El método estadístico que se empleó fue el análisis de la varianza (ANOVA) y el análisis de los componentes principales (ACP). Se empleó el software IBM-SPSS Statistics versión 26 para Windows (IBM-SPSS Inc., Chicago, IL, USA) para las ANOVAs y el XLSTAT de Excel versión 2021 para Windows en los ACP. En las figuras las barras de error, indican la desviación estándar de cada valor de la media aritmética de los triplicados.

5. Resultados y Discusión

5.1. Tratamiento pre-fermentativo

Los mostos se encubaron el 7 de septiembre de 2019 y tras realizar las analíticas de los encubados se observó que la acidez era muy baja en todos los depósitos, por lo que se decidió realizar una corrección, incluso en los controles INOX 10C1 e INOX 11C2.

Se indican en la siguiente tabla, las adiciones que se realizaron tras el encubado, el día 9 de septiembre de 2019.

Tabla 02: Correcciones de acidez realizada en los diferentes depósitos inoxidable

DEPÓSITOS INOX	Corrección acidez (09/09/2019)
INOX 10 C1	1g/L de ácido tartárico en grano
INOX 11 C2	1g/L de ácido tartárico en grano
INOX 17 T1	2g/L de ácido tartárico en grano
INOX 18 T2	2g/L de ácido tartárico en grano
INOX 19 L1	1,5 g/L ácido láctico en disolución
INOX 20 L2	1,5 g/L ácido láctico en disolución

La **tabla 02** muestra los resultados obtenidos, tras realizar las pertinentes correcciones de acidez en cada depósito. Tal y como se indica en el apartado anterior, se introdujo 1g/L de ácido tartárico (INOX 10 y 11), 2g/L de ácido tartárico (INOX 17 y 18) y 1,5g/L de ácido láctico (INOX 19 y 20), además de una adición de nutriente para aumentar el NFA y que las levaduras autóctonas pudieran desempeñar la FOH más fácilmente. El encubado fue realizado el 8 de octubre y dicha corrección tuvo lugar a la mañana siguiente (09/10/2019).

Los resultados que se muestran a continuación son los correspondientes a la analítica realizada el 10 de octubre de 2019.

Tabla 03: Parámetros fisicoquímicos de los depósitos tras las correcciones de acidez

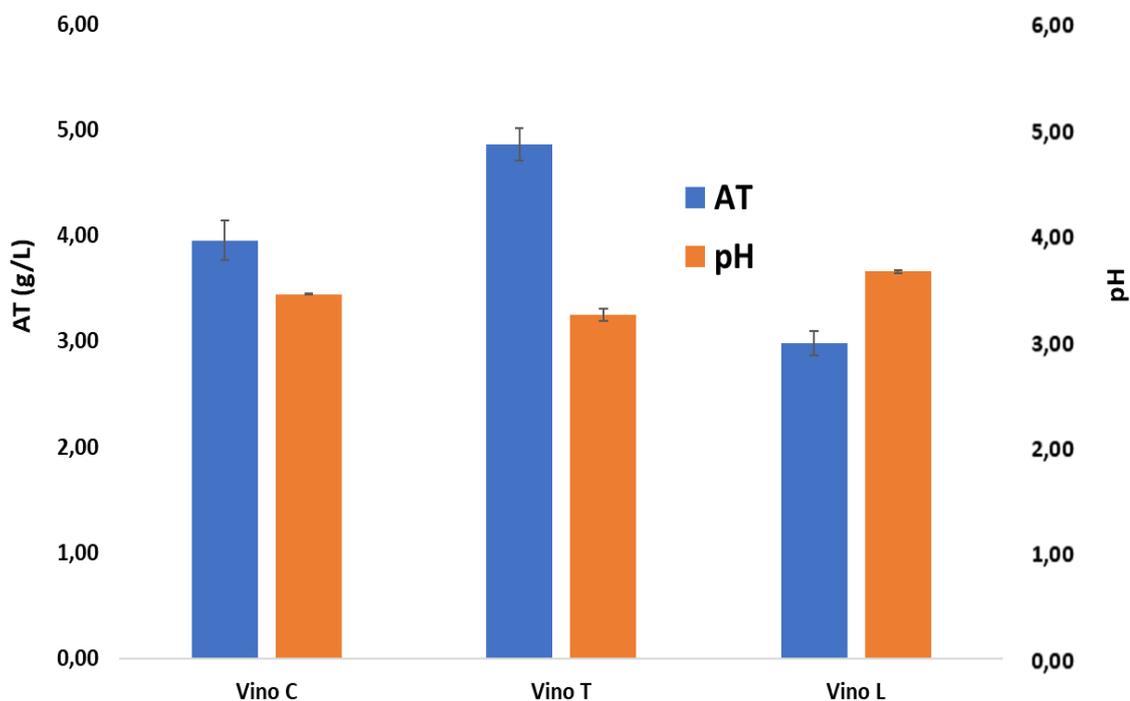
Vinos	AT (g H ₂ SO ₄ /L)	pH	Málico (g/L)	FAN (mg N/L)	Glucónico (mg/L)
Vinos C	3,96 ±0,19 a	3,45 ±0,01 d	2,67 ±0,13 g	144,50 ±6,36 i	0,00 ±0,00 -
Vinos T	4,86 ±0,16 b	3,25 ±0,06 e	2,97 ±0,16 h	163,50 ±7,78 j	0,01 ±0,01 -
Vinos L	2,98 ±0,11 c	3,66 ±0,01 f	2,75 ±0,13 gh	158,50 ±2,12 j	0,00 ±0,00 -
Vinos	Potasio (mg/L)	GAP	IC	IPT	Antocianos (mg/L)
Vinos C	2472,55 ±96,66 k	15,30 ±0,28 -	10,03 ±0,31 n	25,95 ±0,49 -	399,00 ±25,46 o
Vinos T	2410,20 ±45,82 k	15,35 ±0,07 -	10,92 ±1,10 n	25,70 ±1,68 -	352,00 ±100,55 op
Vinos L	2638,95 ±30,48 l	15,20 ±0,14 -	7,35 ±0,53 m	25,27 ±0,46 -	289,10 ±19,09 p

Acidez total (AT), Nitrógeno fácilmente asimilable (FAN), Grado alcohólico probable (GAP %vol), Índice de color (IC), Índice de Polifenoles Totales (IPT). **Vinos C:** Vinos Control, **Vinos T:** Vinos acidificados con ácido tartárico, **Vinos L:** Vinos acidificados con ácido láctico. Se muestran los valores promedio ± desviación estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores ($P \leq 0,05$). (-) Indica la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores.

Se observan diferencias estadísticamente significativas en la **Acidez Total** de los mostos una vez corregidos, siendo el mosto al que se le adicionó ácido láctico el que menor Acidez Total presenta y el mosto al que se le adicionó ácido tartárico el que mayor acidez total presenta. El mosto control presentó un valor intermedio. Como cabía esperar, esto se correlacionó con el **pH**, es decir, que el mosto con adición de ácido tartárico, es el que menor pH presenta y el mosto con adición de ácido láctico es el que mayor pH presenta. Nuevamente el mosto control se halla en medio de estos dos valores.

Dicha comparación de AT y pH se observa mejor en la siguiente **Figura 05**.

Figura 05: Valores de AT y pH tras la acidificación



Vinos C: Vinos Control, **Vinos T:** Vinos acidificados con ácido tartárico, **Vinos L:** Vinos acidificados con ácido láctico. **AT:** Acidez Total expresada en g equivalentes de H_2SO_4/L . Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar.

5.2. Seguimiento de la fermentación alcohólica

A continuación, se muestra la evolución de la FOH en los depósitos de los vinos control (INO10C1 y INOX11C2), vinos acidificados con ácido tartárico (INOX17T1 y INOX18T2) y los vinos acidificados con ácido láctico (INOX19L1 y INOX20L2). Los vinos control y acidificados con ácido tartárico se descubaron el 21 de octubre, mientras que los vinos acidificados con ácido láctico (INOX19L1 y INOX20L2) se descubaron el 22 de octubre de 2019 ya que la densidad era ligeramente superior al resto y se decidió descubrirlo con un día más de margen.

De esta forma, la FOH de los 4 primeros depósitos duró 13 días, mientras que, en los dos últimos depósitos, tuvo una duración de 14 días. La fermentación alcohólica comienza el 8 de octubre y finaliza el 21 de octubre de 2019.

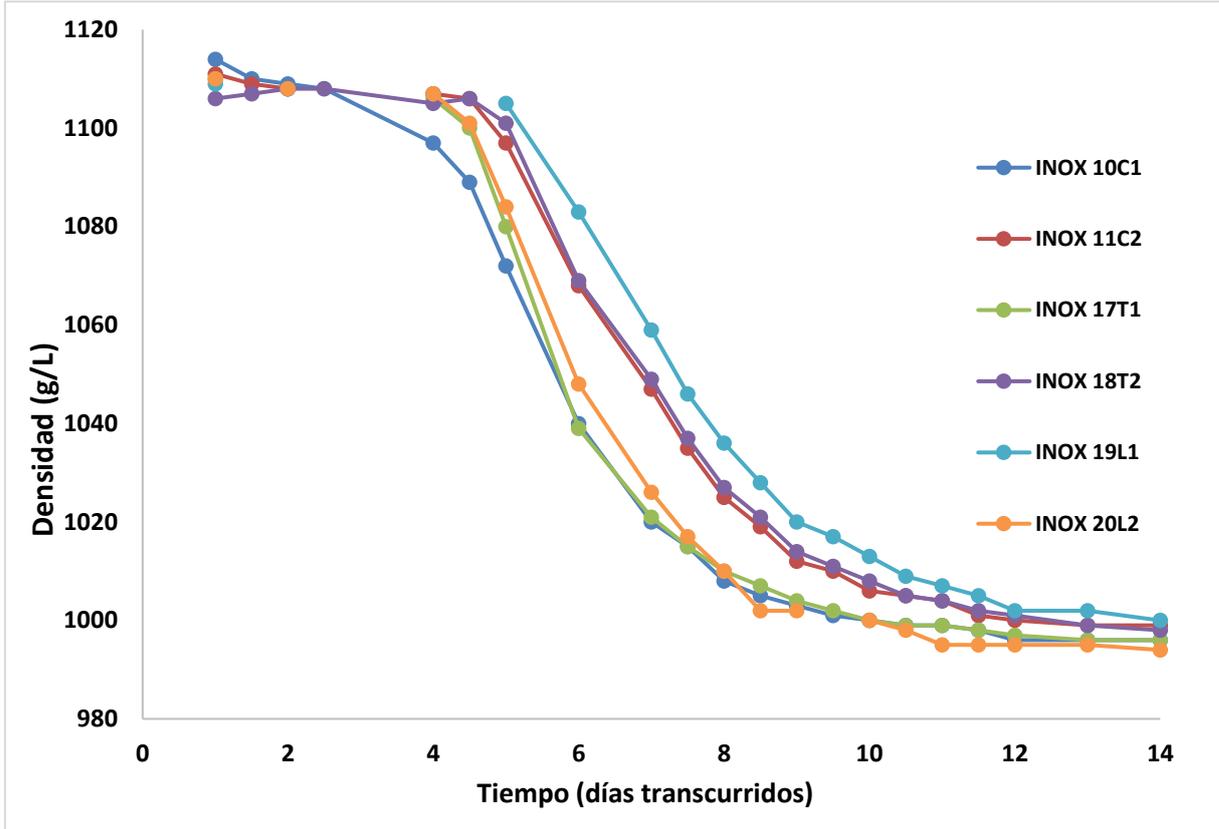
A continuación, se muestra una tabla y gráfica en la cual se puede observar la evolución de las densidades (g/L mosto-vino).

Tabla 04: Evolución de la FOH de los diferentes depósitos.

Fecha	Densidad (g/L)					
	INOX 10 C1	INOX 11 C2	INOX 17 T1	INOX 18 T2	INOX 19 L1	INOX 20 L2
08/10/2019	1114	1111	1110	1106	1109	1110
08/10/2019	1110	1109		1107		
09/10/2019	1109	1108	1108	1108	1108	1108
09/10/2019	1108			1108		
11/10/2019	1097	1107	1106	1105	1107	1107
11/10/2019	1089	1106	1100	1106		1101
12/10/2019	1072	1097	1080	1101	1105	1084
13/10/2019	1040	1068	1039	1069	1083	1048
14/10/2019	1020	1047	1021	1049	1059	1026
14/10/2019	1015	1035	1015	1037	1046	1017
15/10/2019	1008	1025	1010	1027	1036	1010
15/10/2019	1005	1019	1007	1021	1028	1002
16/10/2019	1003	1012	1004	1014	1020	1002
16/10/2019	1001	1010	1002	1011	1017	
17/10/2019	1000	1006	1000	1008	1013	1000
17/10/2019	999	1005	999	1005	1009	998
18/10/2019	999	1004	999	1004	1007	995
18/10/2019	998	1001	998	1002	1005	995
19/10/2019	996	1000	997	1001	1002	995
20/10/2019	996	999	996	999	1002	995
21/10/2019	996	999	996	998	1000	994

Densidades expresadas en g/L mosto-vino

Figura 06: Evolución de la densidad a lo largo de la fermentación alcohólica



En la figura 06 de la evolución de la FOH, se puede observar cómo fueron muy parejas en todos los casos y no se observan diferencias significativas entre los depósitos control, los tratados con tartárico o con láctico.

A continuación, en la **Tabla 05**, se exponen los valores de la Acidez Total (AT), pH y Acidez Volátil (AV) a lo largo de la FOH.

Para los valores de AT y de pH, se tuvieron en cuenta los dos primeros días de la FOH como el inicio de la fermentación y los dos últimos días de la FOH como el fin de la fermentación. En el caso de la AV, se tomaron los datos cuando la densidad se hallaba entre 994-999 g/L, por lo que sólo aparece su valor para el fin de la FOH.

Tabla 05: Valores de AT, pH y AV en distintos momentos de la FOH para cada tratamiento

Momento	AT Vinos C	AT Vinos T	AT Vinos L
Inicio	2,91 ±0,08 a	2,88 ±0,16 a	2,93 ±0,06 a
Fin	4,92 ±0,12 b	5,03 ±0,18 b	5,23 ±0,28 b
Momento	pH Vinos C	pH Vinos T	pH Vinos L
Inicio	3,56 ±0,02 c	3,56 ±0,13 c	3,54 ±0,10 c
Fin	3,76 ±0,04 d	3,66 ±0,05 d	3,76 ±0,07 d
Momento	AV Vinos C	AV Vinos T	AV Vinos L
Fin	0,24 ±0,05 e	0,23 ±0,04 e	0,32 ±0,04 f

Acidez total en gramos de ácido sulfúrico por litro (AT), Acidez volátil expresada como g de ácido acético/L (AV). **Vinos C:** Vinos Control, **Vinos T:** Vinos acidificados con ácido tartárico, **Vinos L:** Vinos acidificados con ácido láctico. Se muestran los valores promedio ± desviación estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores ($P \leq 0,05$).

La Tabla 05, muestra cómo al inicio de la FOH, no había diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes vinos, (control, vinos acidificados con ácido tartárico y vinos acidificado con ácido láctico), para la AT y para el pH. A lo largo de la FOH se puede observar cómo la AT aumentó. Este aumento, pudo ser debido a la mejor homogeneización de los ácidos agregados exógenamente con la pasta sólido-líquida del mosto-vino que se encontraba fermentando.

Sin embargo, con respecto a la AV final, sí que podemos observar que los vinos acidificados con ácido láctico, presentaron un valor de AV más elevado que los otros dos tipos de vinos, (controles y vinos acidificados con ácido tartárico) y estadísticamente significativo, aunque dentro de los valores de AV esperables para un vino de calidad. Este resultado, podría explicarse tal vez, por una mayor población de BAL endógenas que llevan a cabo fermentaciones heterofermentativas en los vinos acidificados con ácido láctico, produciendo además del etanol otros compuestos, entre los que se encuentran el ácido acético provocando ese mayor valor de AV, si bien en el recuento de BAL en los vinos descubados tras la FOH, no se detectaron diferencias significativas entre los valores medios obtenidos de poblaciones totales de BAL (Fig. 16).

Para seguir, se muestran los resultados de los antocianos e IPT a lo largo de la FOH.

Tabla 06: Evolución del contenido en Antocianos (mg de antocianos/L) e IPT en la FOH

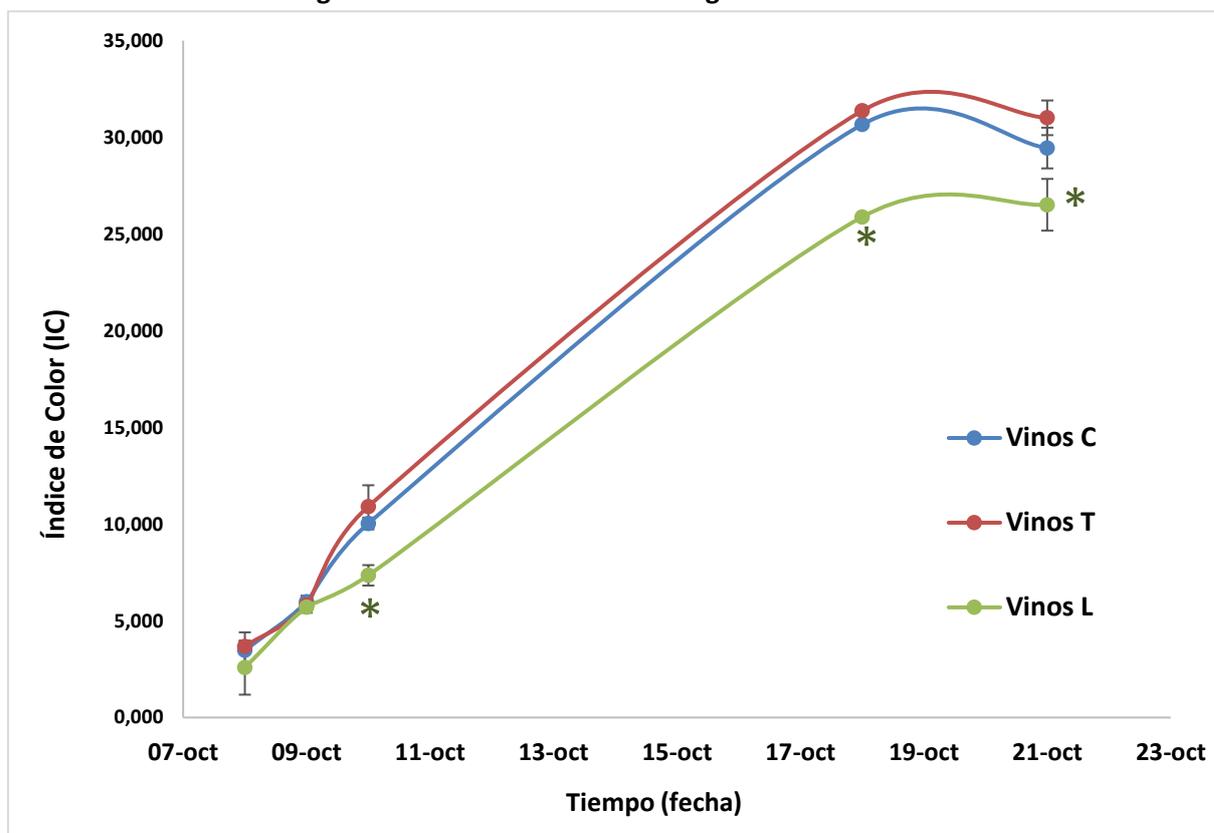
Momentos	Antocianos Vinos C			Antocianos Vinos T			Antocianos Vinos L		
Inicio	261,43	±100,54	a	217,30	±107,65	a	237,85	±57,31	a
Fin	994,05	±72,05	b	1075,50	±4,95	b	957,18	±81,32	b
Momentos	IPT Vinos C			IPT Vinos T			IPT Vinos L		
Inicio	19,05	±5,25	c	18,89	±7,11	c	17,78	±5,08	c
Fin	82,46	±3,22	d	77,76	±1,87	d	78,27	±2,54	d

Contenido en antocianos en mg de antocianos/L. Índice de Polifenoles Totales (IPT). **Vinos C:** Vinos Control, **Vinos T:** Vinos acidificados con ácido tartárico, **Vinos L:** Vinos acidificados con ácido láctico. Se muestran los valores promedio ± desviación estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores ($P \leq 0,05$).

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes vinos (control, vinos acidificados con ácido tartárico y vinos acidificados con ácido láctico) para el contenido en antocianos e IPT. En los tres casos se ve el incremento, tanto en el contenido de antocianos como de IPT en el transcurso de la FOH, debido a la maceración y/o extracción activa de estos compuestos, producida por la presencia de carbónico y etanol, además de los remontados con aireación que se realizaron rompiendo el sombrero y facilitando la mayor extracción de compuestos de los hollejos de la uva.

Seguidamente, se muestra en la **Figura 07** la evolución del Índice de Color (IC) a lo largo de la FOH.

Figura 07: Evolución del IC a lo largo de la FOH



Vinos C: Vinos Control, **Vinos T:** Vinos acidificados con ácido tartárico, **Vinos L:** Vinos acidificados con ácido láctico. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar.

Se puede observar en la Fig. 07, cómo los depósitos control y tartárico van más parejos en la evolución del IC a lo largo de la FOH, acabando con un valor superior final; mientras que los depósitos acidificados con láctico, acaban con un IC ligeramente menor al finalizar la FOH. Cabe señalar, que el grado alcohólico final de los vinos (tabla 7), sigue la misma tendencia que el IC, de tal modo, que los vinos L presentaron un grado alcohólico ligeramente más bajo y los vinos T presentaron el grado alcohólico ligeramente más elevado. Esa menor concentración de etanol, puede reducir la extracción de compuestos colorantes y que por tanto, el IC a lo largo de la FOH sea menor en el vino acidificado con láctico, con respecto al control y al vino acidificado con ácido tartárico.

En la siguiente tabla se muestran otros valores fisicoquímicos (concentración de ácido málico, % vol, concentración de azúcares reductores y extracto seco) en el descubado, justo antes de mover el vino de los depósitos de acero inoxidable (de 1.200 kg cada uno) a barricas bordelesas de roble francés, donde tuvo lugar la FML y una posterior crianza.

Tabla 07: Otros datos fisicoquímicos de los diferentes tratamientos en el momento del descubado.

Vinos	Málico (g/L)			Grado alcohólico %vol		
Vinos C	3,37	±0,24	a	14,52	±0,30	cd
Vinos T	3,41	±0,01	a	14,73	±0,03	d
Vinos L	2,98	±0,01	b	14,35	±0,16	c
Vinos	Azúcares reductores (g/L)			Extracto seco (g/L)		
Vinos C	11,41	±3,66	-	55,10	±4,95	-
Vinos T	10,74	±4,29	-	52,15	±5,87	-
Vinos L	9,14	±10,21	-	51,50	±13,58	-

Vinos C: Vinos Control, **Vinos T:** Vinos acidificados con ácido tartárico, **Vinos L:** Vinos acidificados con ácido láctico. Se muestran los valores promedio ± desviación estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores ($P \leq 0,05$). (-) Indica la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores.

Se observa que hay diferencias significativas en el contenido de ácido málico al final de la FOH, siendo éste más bajo en el vino acidificado con ácido láctico. Los otros dos vinos presentan valores estadísticamente semejantes en ácido málico. El grado alcohólico final, es ligeramente superior en el vino acidificado con ácido tartárico con respecto al acidificado con ácido láctico.

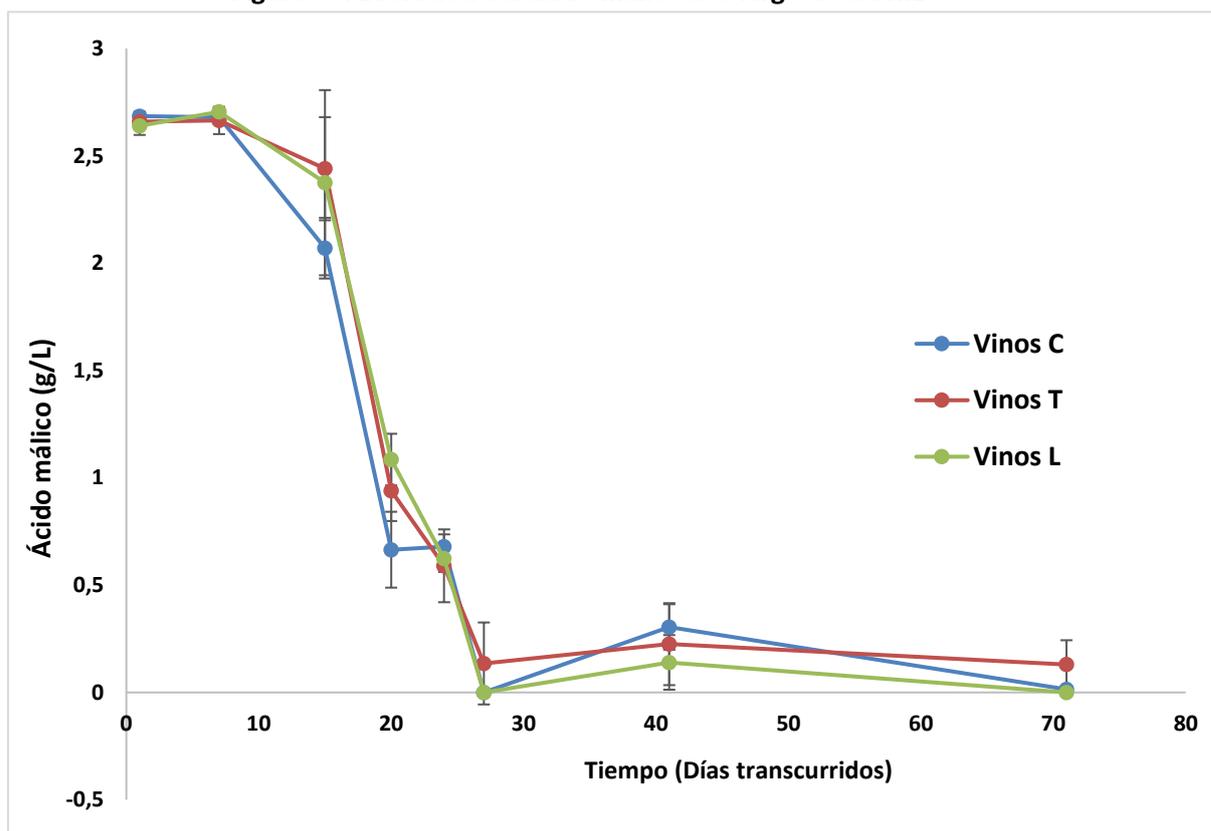
No se observan diferencias significativas, ni para el contenido de azúcares reductores ni extracto seco.

5.3. Seguimiento de la fermentación maloláctica

Se realizó el seguimiento de tres barricas por tratamiento. Es decir, 3 barricas para el control, 3 para el tratamiento con ácido tartárico y otras 3 para el tratamiento con ácido láctico.

A continuación, se muestra la evolución de la FML, que tuvo lugar entre el 30 de octubre de 2019 y el 09 de enero de 2020 (71 días de duración). En la Fig. 8 se muestra cómo el ácido málico va disminuyendo.

Figura 08: Evolución del ácido málico a lo largo de la FML



Vinos C: Vinos control, **Vinos T:** Vinos tratados con ácido tartárico, **Vinos L:** Vinos tratados con ácido láctico. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar.

No presenta diferencias significativas en la evolución de los vinos en cuanto al consumo de ácido málico y el tiempo necesario para ello.

A continuación, se muestra la evolución de la AT, pH y AV durante la FML en la siguiente tabla:

Tabla 08: Evolución de la AT, pH y AV durante la FML

Momento	AT Vinos C			AT Vinos T			AT Vinos L		
Inicio	4,53	±0,08	a	4,74	±0,11	ab	4,81	±0,10	b
Media	3,67	±0,06	c	3,90	±0,12	d	3,95	±0,06	d
Fin	3,50	±0,02	e	3,76	±0,09	f	3,91	±0,08	f
Momento	pH Vinos C			pH Vinos T			pH Vinos L		
Inicio	3,80	±0,01	a	3,72	±0,02	b	3,80	±0,04	a
Media	3,93	±0,03	c	3,84	±0,03	d	3,94	±0,03	c
Fin	3,86	±0,03	ef	3,78	±0,03	e	3,92	±0,07	f
Momento	AV Vinos C			AV Vinos T			AV Vinos L		
Inicio	0,34	±0,01	a	0,35	±0,03	a	0,43	±0,03	b
Media	0,63	±0,04	-	0,59	±0,03	-	0,60	±0,05	-
Fin	0,64	±0,13	-	0,63	±0,09	-	0,71	±0,11	-

Acidez total en gramos de ácido sulfúrico por litro (AT), Acidez volátil expresada como g de ácido acético/L (AV). **Vinos C:** Vinos Control, **Vinos T:** Vinos acidificados con ácido tartárico, **Vinos L:** Vinos acidificados con ácido láctico. Se muestran los valores promedio ± desviación estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores ($P \leq 0,05$). (-) Indica la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores.

En la **Tabla 08**, se puede observar cómo la AT va disminuyendo a lo largo de la FML, mientras que el pH y la AV van aumentando conforme transcurre la FML.

Para establecer cuándo se alcanzaba la mitad de la FML, se tomó como referencia la concentración de ácido málico que debía estar entre 0,5-1 g de ácido málico/L.

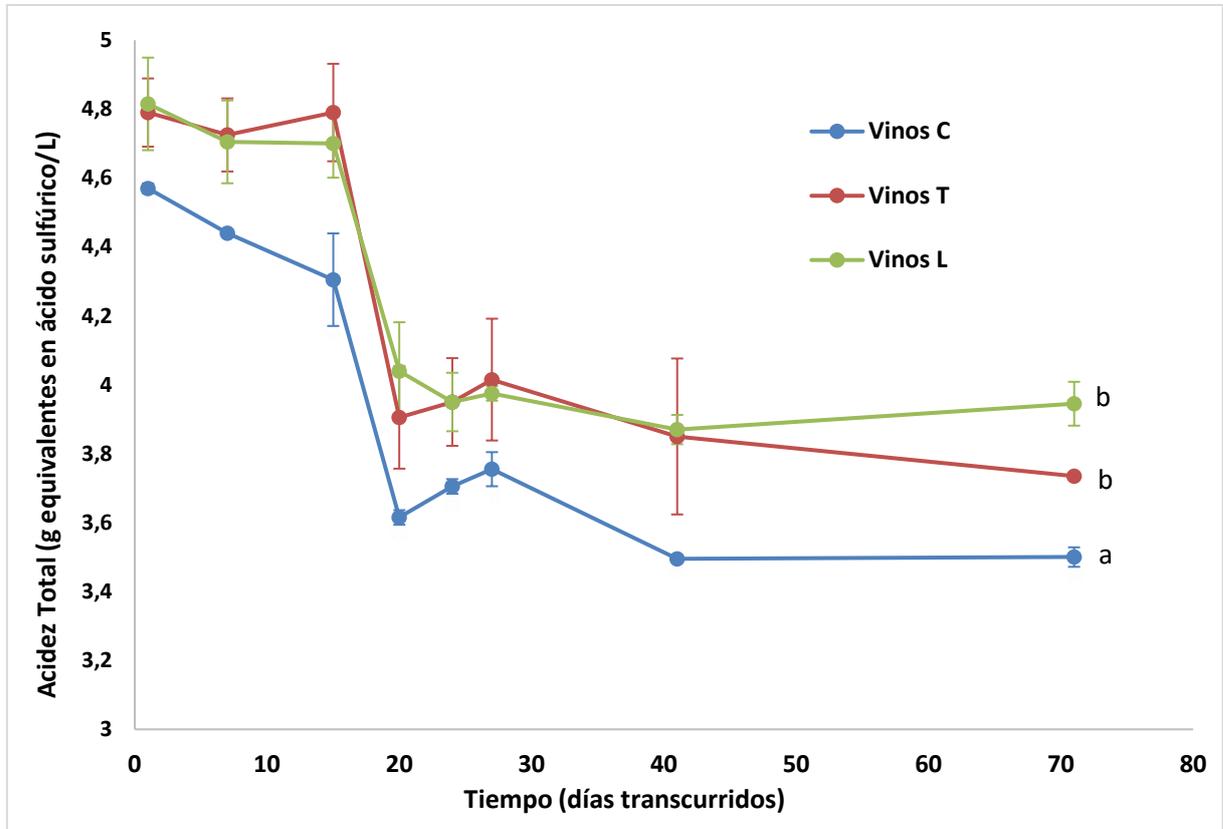
La AT final presentó diferencias estadísticamente significativas, siendo iguales en los vinos acidificados con ácido tartárico y con ácido láctico y diferente para los vinos control.

El pH final es diferente entre el vino acidificado con ácido tartárico y el acidificado con ácido láctico. El control se sitúa entre ambos.

La AV sólo presenta diferencias significativas al inicio de la FML, siendo superior en el vino acidificado con ácido láctico. Al final de la FML, la AV más elevada también se encuentra en el vino acidificado con ácido láctico, pero no es estadísticamente significativo.

A continuación, en la **Figura 09**, se muestra la evolución de la Acidez Total a lo largo de la FML para cada uno de los tratamientos del estudio.

Figura 09: Evolución de la AT de los vinos a lo largo de la FML

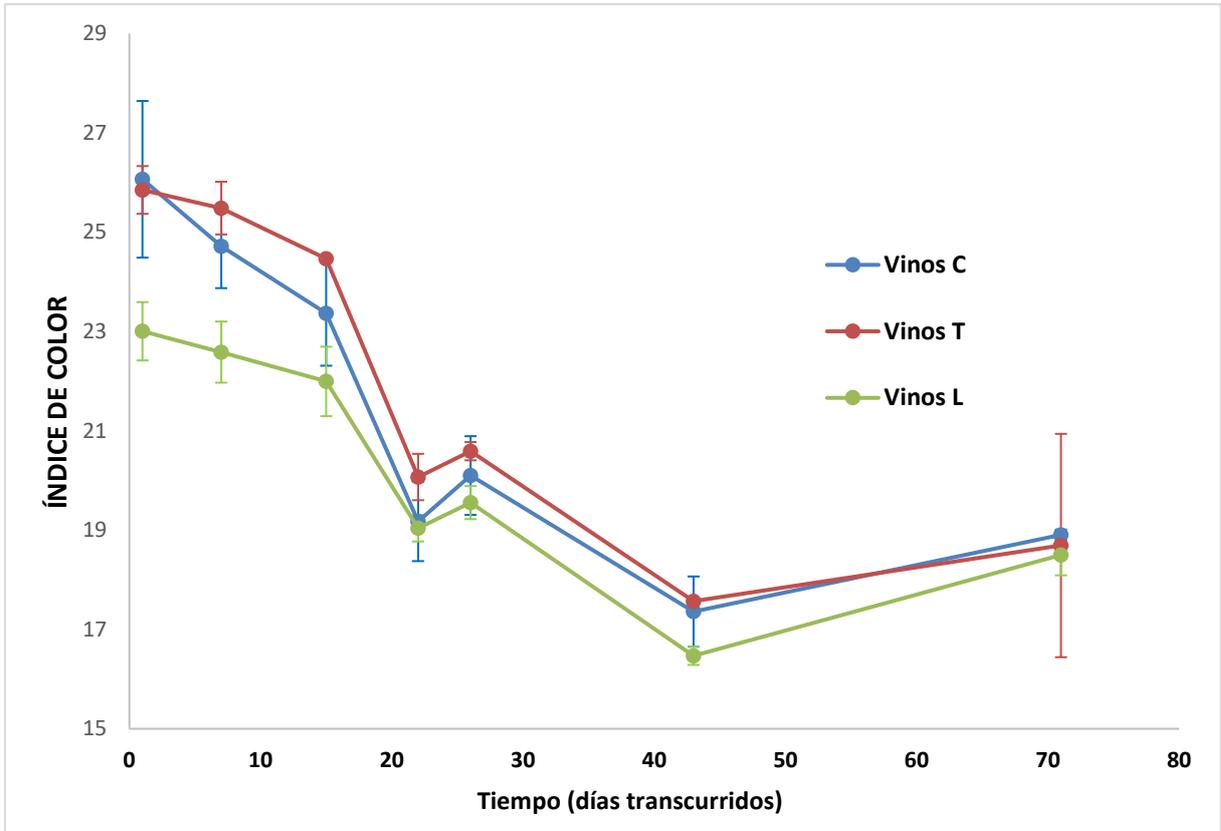


Vinos C: vinos control, **Vinos T:** vinos tratados con ácido tartárico, **Vinos L:** vinos tratados con ácido láctico. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores ($P \leq 0,05$).

Los vinos control tenían una acidez al finalizar la FML de 3,5 g/L de ácido tartárico, los vinos tartárico de 3,76 g/L y los vinos láctico de 3,91 g/L de ácido tartárico. No es de extrañar que el vino control es el que presente una AT final con diferencias significativas con respecto a los otros dos tratamientos al ser el vino que menor acidificación presentó en el momento del encubado (adición de 1g/L de ácido tartárico en grano), con respecto a la adición de 2g/L de ácido tartárico aplicado en los vinos T y el 1,5 g/L de ácido láctico en disolución aplicado en los vinos L.

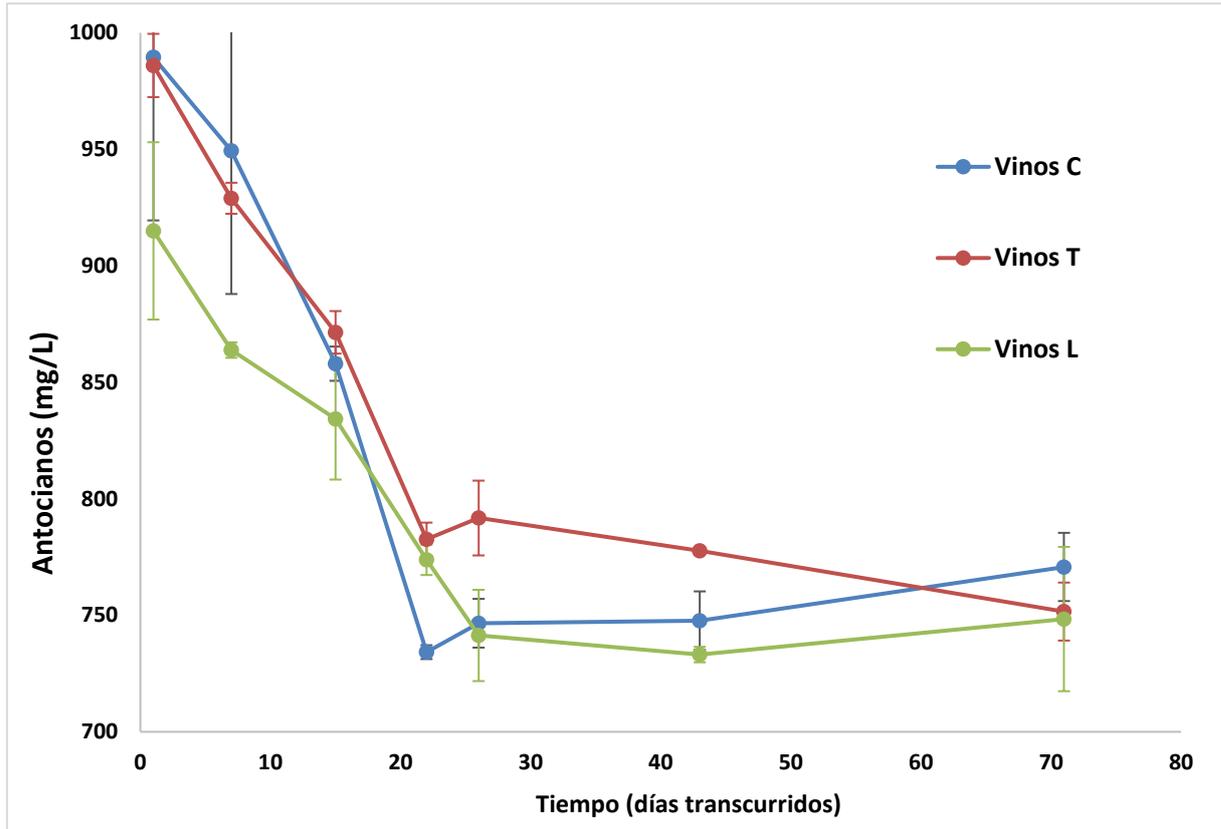
A continuación, se muestra la evolución del IC, antocianos e IPT a lo largo de la FML:

Figura 10: Evolución del IC de los vinos a lo largo de la FML



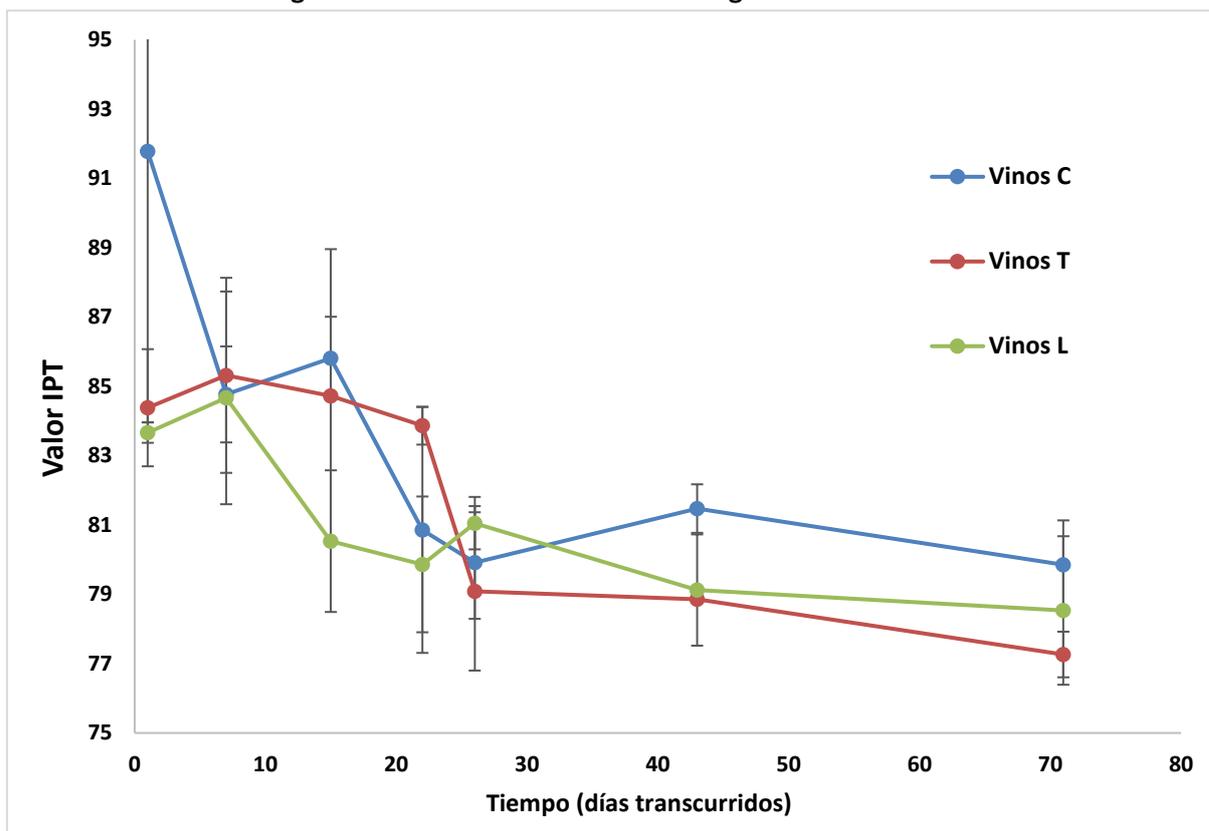
Vinos C: vinos control, **Vinos T:** vinos tratados con ácido tartárico, **Vinos L:** vinos tratados con ácido láctico. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar.

Figura 11: Evolución de los antocianos a lo largo de la FML



Vinos C: vinos control, Vinos T: vinos tratados con ácido tartárico, Vinos L: vinos tratados con ácido láctico. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar.

Figura 12: Evolución de los IPT a lo largo de la FML



Vinos C: vinos control, Vinos T: vinos tratados con ácido tartárico, Vinos L: vinos tratados con ácido láctico. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar.

A continuación, también se muestra una tabla con los valores de Índices de Polimerización de los vinos al final de la FML.

Tabla 09: Valores de Índice de Polimerización para cada uno de los tratamientos

Índice de Polimerización	Vinos C	Vinos T	Vinos L
Fin FML	2,57 \pm 0,06 a	2,51 \pm 0,06 a	2,30 \pm 0,07 b

Vinos C: Vinos control, Vinos T: Vinos acidificados con ácido tartárico, Vinos L: Vinos acidificados con ácido láctico. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores ($P \leq 0,05$).

En vista de las tablas y gráficos anteriores, se puede observar cómo no hay diferencias al final de la FML con respecto al IC, antocianos e IPT.

Sí se observa un descenso a lo largo de la FML tanto del IC, IPT y nivel de antocianos. Esto se debe, entre otras posibles causas, al incremento del pH que sufren los vinos en la FML, (proceso en el que se produce una desacidificación biológica) y al descenso de la AT. En vinos tintos la reducción de color en la FML oscila entre un 20-40% y puede llegar hasta un 60% de la intensidad colorante (Gutiérrez Viguera, 2017).

Con referencia al índice de Polimerización, se observa que es ligeramente superior en los vinos control con respecto a los tratados con tartárico, pero sin haber diferencias estadísticamente

significativas. Los vinos acidificados con ácido láctico, sí que presentaban un valor de Índice de Polimerización estadísticamente más bajo, con diferencia significativa.

A continuación, se muestra los resultados de los análisis fisicoquímicos de los vinos finales elaborados, habiendo estado en contacto el vino con la madera durante 98 días (corresponde a los 71 días de la FML más otros 27 días de crianza).

Tabla 10: Resultados analíticos de los vinos finales elaborados y habiendo estado en contacto con la madera durante 98 días

	AT (g de H ₂ SO ₄ /L)			pH			Málico (g/L)			GAP			AV (g de ácido acético/L)		
Vinos C	3,50	±0,03	a	3,85	±0,02	d	0,02	±0,01	f	15,37	±0,20	h	0,57	±0,01	j
Vinos T	3,80	±0,09	b	3,77	±0,01	e	0,11	±0,08	g	15,22	±0,13	hi	0,58	±0,00	j
Vinos L	3,95	±0,06	c	3,89	±0,05	d	0,00	±0,00	f	15,13	±0,08	i	0,65	±0,01	k
	Azúcares reductores (g/L)			IC			IPT			Antocianos (mg/L)			Índice de Polimerización		
Vinos C	1,83	±0,40	-	18,91	±0,11	l	79,86	±1,28	-	770,75	±14,64	-	2,60	±0,06	n
Vinos T	1,43	±0,07	-	19,87	±0,58	m	77,54	±0,27	-	745,80	±20,65	-	2,55	±0,05	n
Vinos L	1,58	±0,18	-	18,50	±0,41	l	78,54	±2,14	-	748,40	±30,97	-	2,33	±0,07	o

Acidez total (AT), Grado alcohólico probable (GAP %vol), Acidez Volátil (AV), Índice de Color (IC), Índice de Polifenoles Totales (IPT). **Vinos C:** Vinos Control, **Vinos T:** Vinos acidificados con ácido tartárico, **Vinos L:** Vinos acidificados con ácido láctico. Se muestran los valores promedio ± desviación estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores (P ≤ 0,05). (-) Indica la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores.

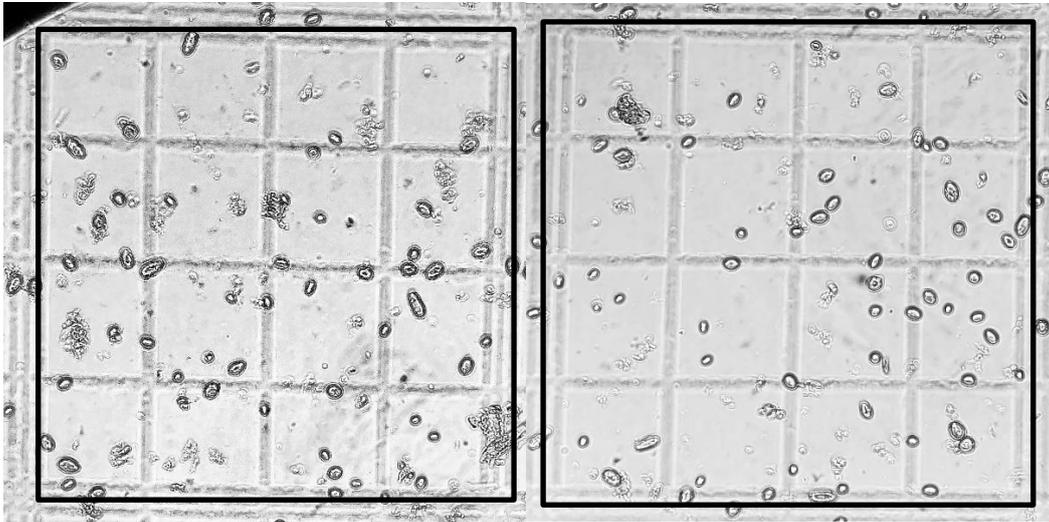
Como era esperable, los vinos acidificados con 2 g/L de ácido tartárico, el ácido más fuerte del vino, son los que mostraron un menor pH.

5.4. Análisis microbiológicos:

Las muestras de vinos elaborados en las instalaciones de Bodegas Roda, se tomaron en viales estériles de 50 mL y se mantuvieron congeladas a -20°C hasta el momento de su análisis microbiológico, en los laboratorios del Instituto de la Ciencia de la Vid y el Vino (ICVV).

Se cogieron muestras en el encubado de FOH, en plena FOH, descubado, inicio FML, mitad FML, fin de FML y tras haber pasado el vino 98 días en contacto con la madera de roble francés de la barrica bordelesa. Posteriormente los vinos fueron trasegados y las barricas fueron rellenadas con otros vinos de la misma cosecha, pero que no estaban incluidos en esta experiencia. Por esta razón, no se tomaron más muestras para análisis posteriores.

A continuación, se muestran dos imágenes de recuentos de levaduras en la cámara de Neubauer con el microscopio óptico en la lente x40.



En la imagen **superior izquierda**, se visualiza uno de los cuadrados grandes de $0,004 \text{ mm}^3$ de la cámara de Neubauer, en la que se realizó un **recuento de levaduras a mitad de la fermentación alcohólica**.

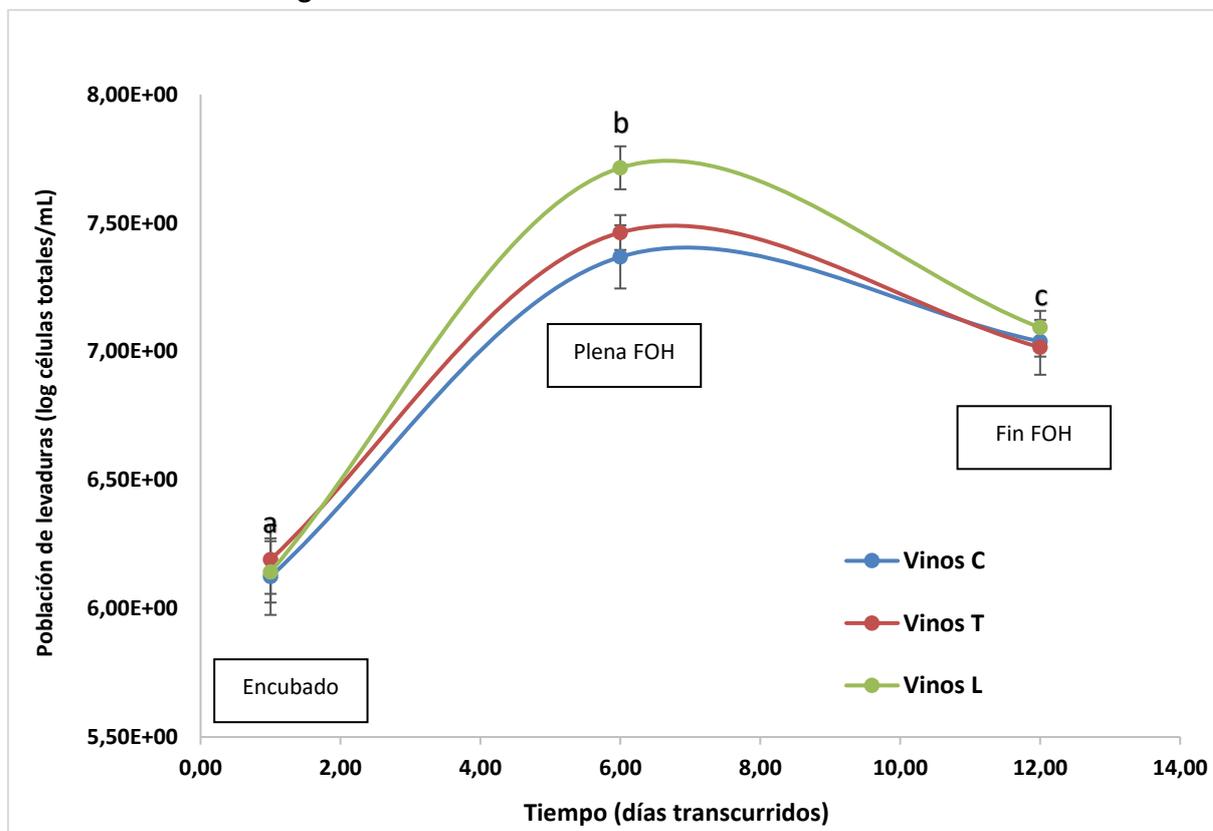
En la imagen **superior derecha**, se visualiza uno de los cuadrados de la cámara de Neubauer en un **recuento de levaduras en el encubado** (mosto).

Como se puede observar, la segunda imagen tiene además de levaduras otros elementos como pudieran ser tartratos, polisacáridos... y se observa una proporción mucho menor.

Es importante destacar además, que la primera muestra fue sometida a una dilución $\frac{1}{2}$, mientras que la segunda no cuenta con dilución.

A continuación, en la **Figura 13**, se muestra el gráfico de la **población de levaduras durante la FOH**.

Figura 13: Población de levaduras durante la FOH



Vinos C: Vinos Control, **Vinos T:** Vinos acidificados con ácido tartárico, **Vinos L:** Vinos acidificados con ácido láctico. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores ($P \leq 0,05$).

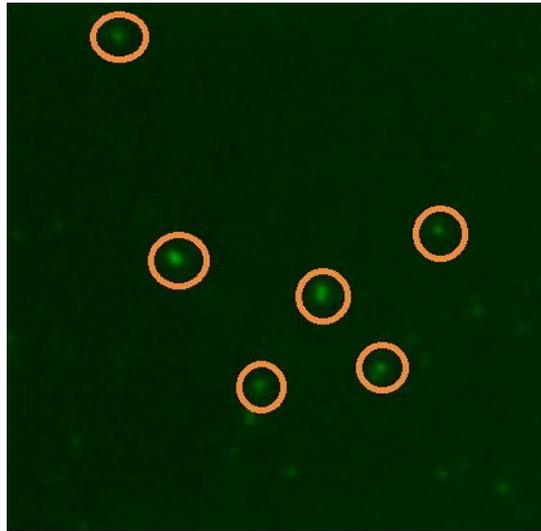
Se observa, cómo los vinos acidificados con láctico alcanzan la mayor población de levaduras en plena FOH. Los niveles de población de levaduras, en los tres tipos de vinos, son estadísticamente idénticos tanto en el encubado como en el descubado.

En el **ANEXO** en la Tabla 18, se incluyen los valores de las medias aritméticas con las desviaciones estándar correspondientes de los niveles poblacionales de levaduras para cada uno de los tipos de vinos estudiados.

He de destacar las diferencias estadísticamente significativas en los niveles poblacionales entre **el inicio de FOH** (rangos de $1,19 \cdot 10^6 - 1,88 \cdot 10^6$), **plena FOH** (rangos de $1,6 \cdot 10^7 - 6,71 \cdot 10^7$) y **fin FOH** (rangos $7,75 \cdot 10^6 - 1,57 \cdot 10^7$), como se puede observar en la Fig. 13. Estos rangos son los obtenidos de las medias de cada uno de los depósitos, los cuales fueron analizados por cuadruplicado.

A continuación, se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de muestras de los vinos en plena FML, en las que las BAL viables se encuentran teñidas con la sonda fluorescente verde Syto-9 y las BAL no viables, en mismas condiciones, se muestran teñidas con la sonda fluorescente rojo Yoduro de propidio.

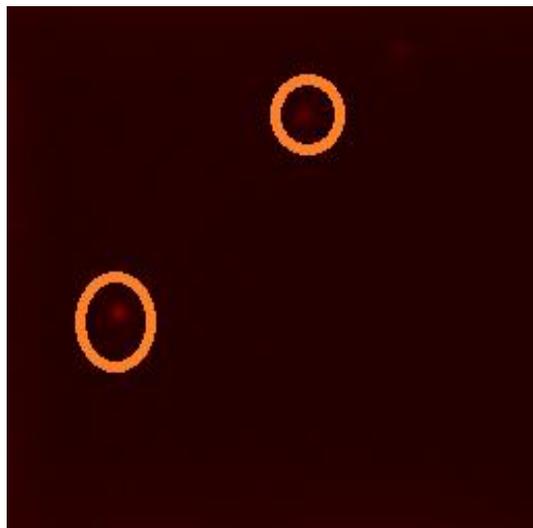
Figura 14: Imagen de microscopía de fluorescencia con la sonda verde Syto-9



Fotografías tomadas a través del microscopio de fluorescencia Eclipse Ni-e, x400 Aumentos. Se visualizan seis bacterias viables en un cuadrado de $0,00025 \text{ mm}^3$

A la hora de realizar el recuento, se tomaron las fotografías de tres zonas para cada muestra y con cada sonda (color rojo y color verde lo cual corresponde a BAL no viables y viables respectivamente), siendo un total de 6 imágenes por muestra. Posteriormente se recontaron las BAL que había en cada una de las imágenes, como se observa en las Figuras 14 y 15.

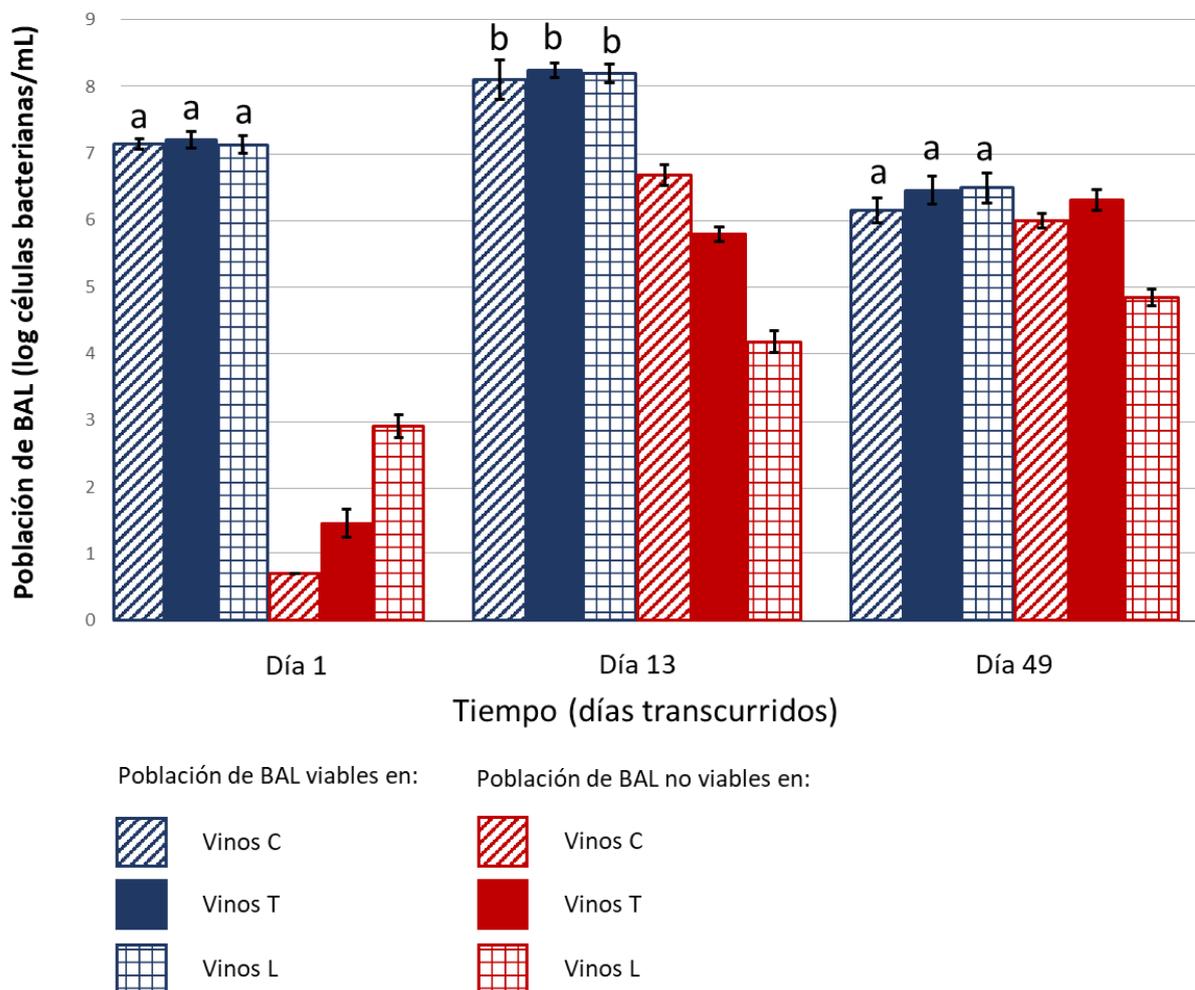
Figura 15: Imágenes de microscopía de fluorescencia con la sonda roja Yoduro de propidio



Fotografías tomadas a través del microscopio de fluorescencia Eclipse Ni-e, x400 Aumentos. Se visualizan dos bacterias no viables en un cuadrado de $0,00025 \text{ mm}^3$

A continuación, en la Figura 16 se muestra el gráfico de la **población de BAL viables y no viables a lo largo de la FML**.

Figura 16: Población de bacterias lácticas viables y no viables a lo largo de la FML



Vinos C: Población de BAL en los vinos control, **Vinos T:** Población de BAL en los vinos acidificados con ácido tartárico, **Vinos L:** Población de BAL en los vinos acidificados con ácido láctico. Se muestran los valores promedio \pm desviación estándar. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores ($P \leq 0,05$).

Se puede observar cómo los niveles poblacionales de BAL viables fueron estadísticamente similares para los tres tratamientos en el inicio de la FML, en plena FML y para el final de la FML. Estos resultados concuerdan con el tiempo que duró la FML en los 9 vinos, independientemente de tratamiento aplicado, fue en todos los casos 71 días.

Los niveles poblacionales de bacterias lácticas viables entre 10^6 y 10^8 células viables/mL son las poblaciones que cabe esperar en un vino que está realizando la FML.

Con referencia a los niveles poblacionales de BAL no viables, se puede observar cómo comienzan siendo mucho más bajos con referencia a las viables al inicio de la FML y según avanza el proceso, los niveles de no viables se van equiparando más a las viables, lo cual cabría esperar puesto que al agotarse el ácido málico las bacterias van perdiendo su actividad metabólica y el número de células no viables va aumentando progresivamente.

5.5. Análisis de los vinos finales elaborados (CATA)

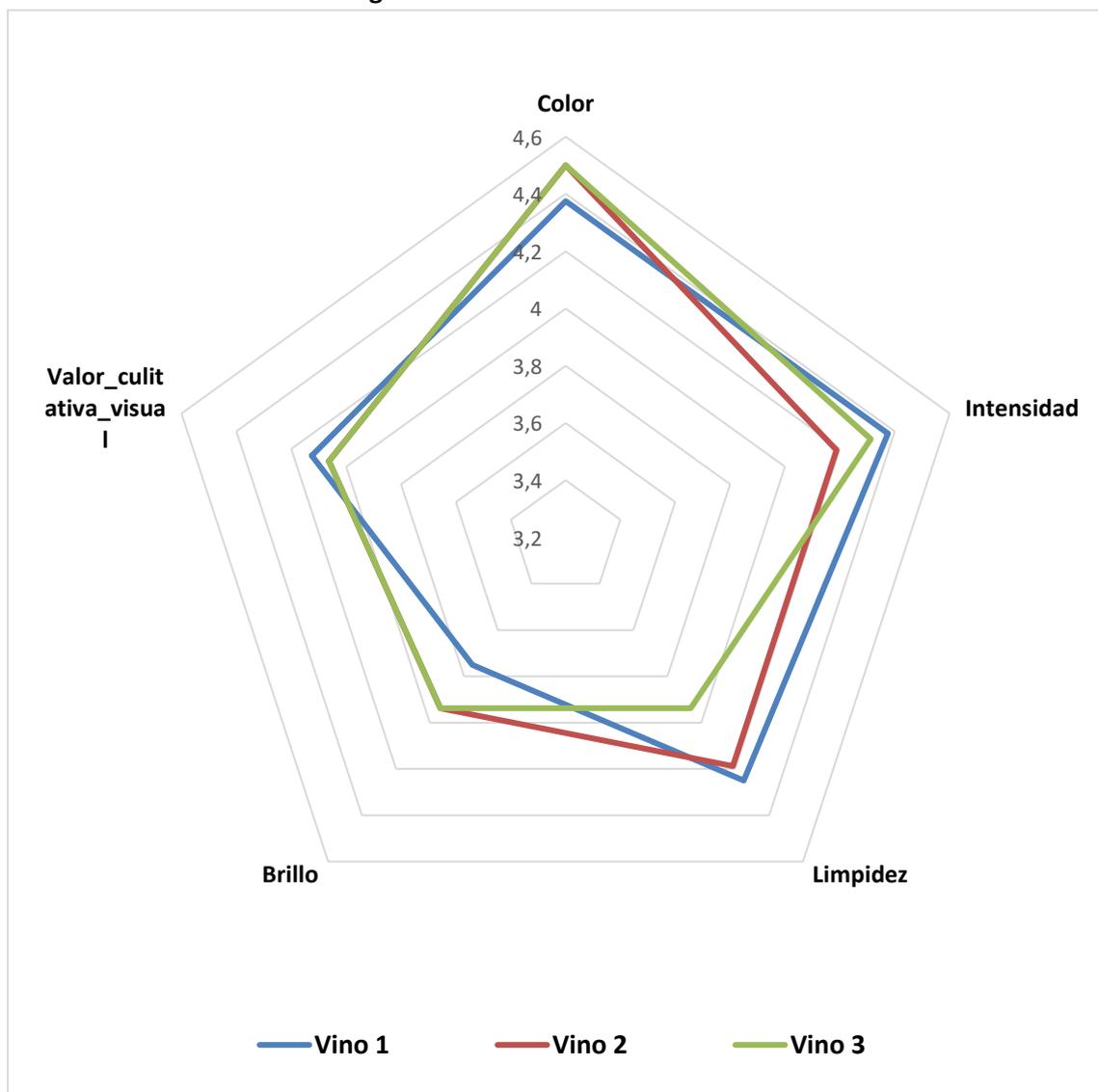
En la tabla 10 se pueden observar los parámetros fisicoquímicos finales de los vinos elaborados, habiendo estado el vino en contacto con la madera durante 98 días.

La cata de los vinos se realizó en la asignatura optativa de cuarto curso de Enología de “Ampliación de análisis sensorial”. Se contó con un total de 16 catadores.

No se procesaron los datos de la cata del vino 4 (repetición del vino 1), porque se produjo una saturación sensorial de los catadores con los vinos con la crianza en madera que no les permitió reconocer que el vino 4 se trataba del mismo que el vino 1.

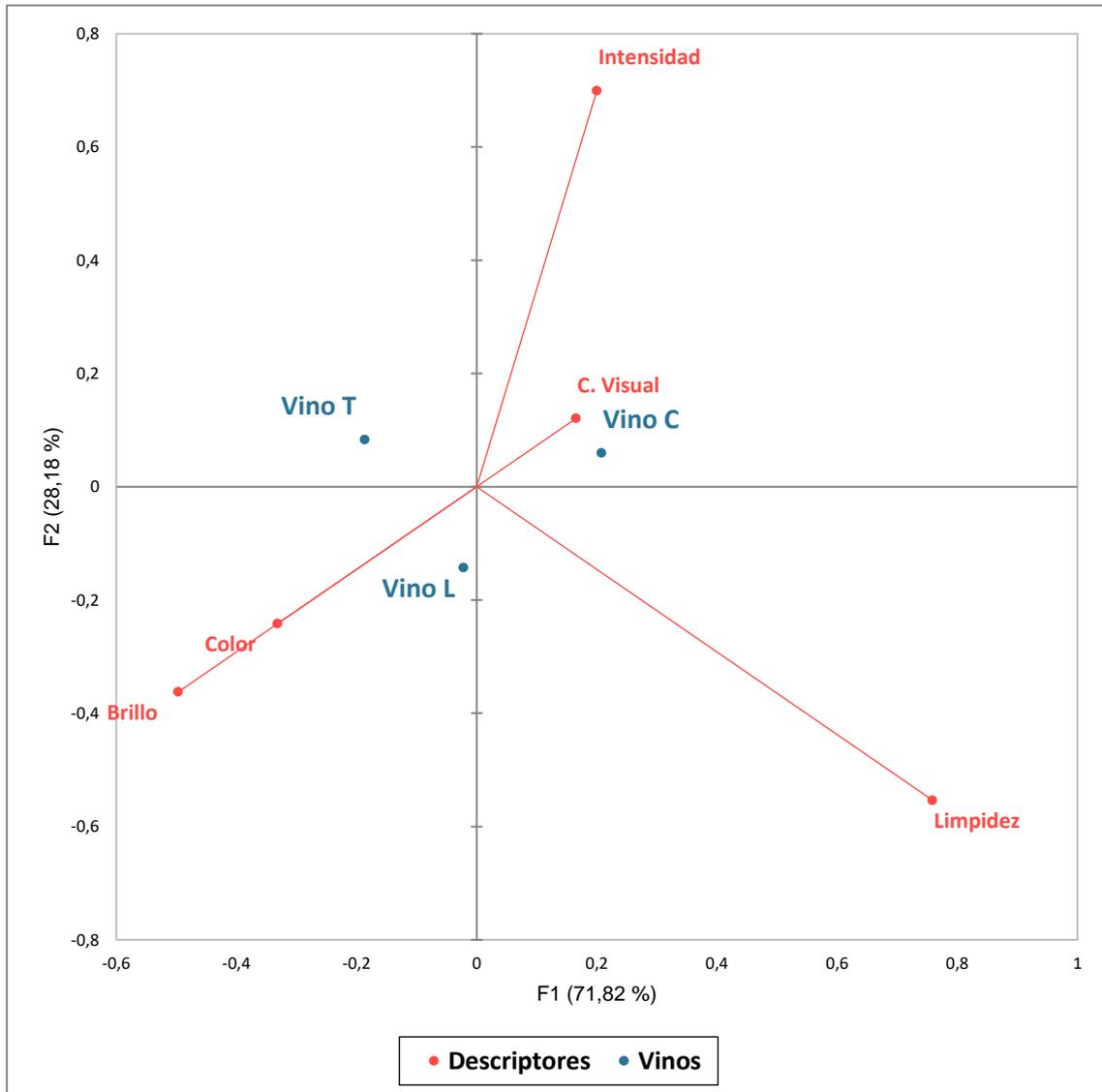
A continuación, se muestran los **gráficos de araña para la fase visual, olfativa, gustativa y retronasal (Vino 1: Vino control, Vino 2: Vino acidificado con ácido láctico y Vino 3: Vino acidificado con ácido tartárico)**, además de **los ACP para cada una de esas fases**.

Figura 17: Gráfico araña Fase visual



(Vino 1: Vino control, Vino 2: Vino acidificado con ácido láctico, Vino 3: Vino acidificado con ácido tartárico).

Figura 18: ACP Fase visual



(Vino C: Vino control, Vino L: Vino acidificado con ácido láctico, Vino T: Vino acidificado con ácido tartárico).

En lo que refiere a la fase visual, se observa que:

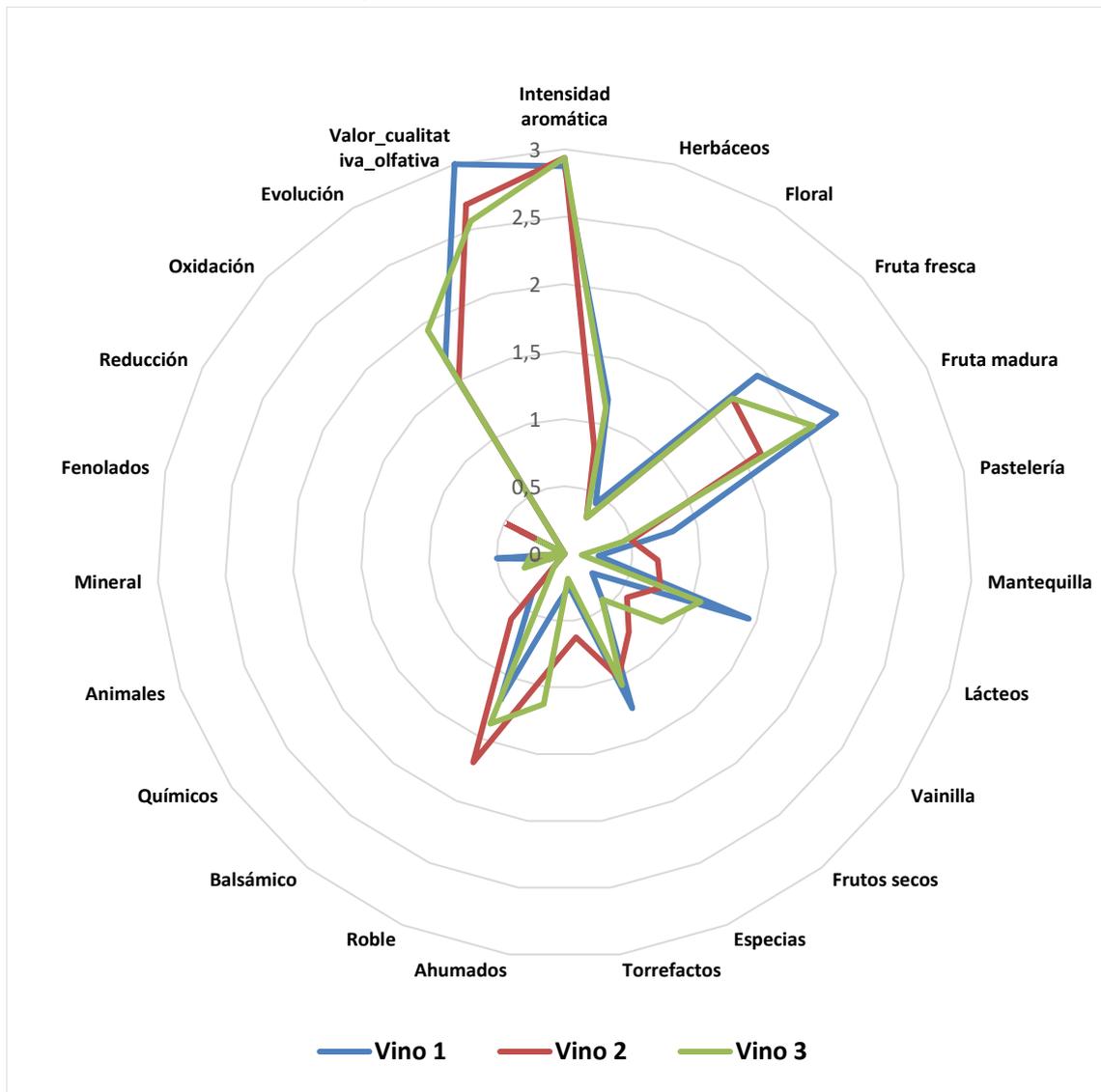
- El vino C, fue el que mejor valoración cualitativa visual (*C. Visual*) e intensidad obtuvo.
- El vino L, fue el que menor intensidad mostraba
- El vino T, presenta una limpidez ligeramente menor con respecto a los otros tratamientos.

Se puede observar cómo el eje F1 puede explicar el 71,82% de la varianza, siendo el eje que mejor explica la varianza de los datos. Esto quiere decir, que los vinos C y T son los vinos que más se diferencian entre sí, por encontrarse a mayor distancia medida con referencia al eje horizontal (F1).

Comparando estos resultados con los resultados analíticos de los vinos (tabla 10), vemos que estos dos vinos C y T se diferencian en que el vino T era el más ácido (pH menor) y el que presentaba un IC más elevado. Tal vez la valoración de los catadores de que este vino presentaba una menor limpidez hizo que los catadores otorgaran una puntuación más elevada

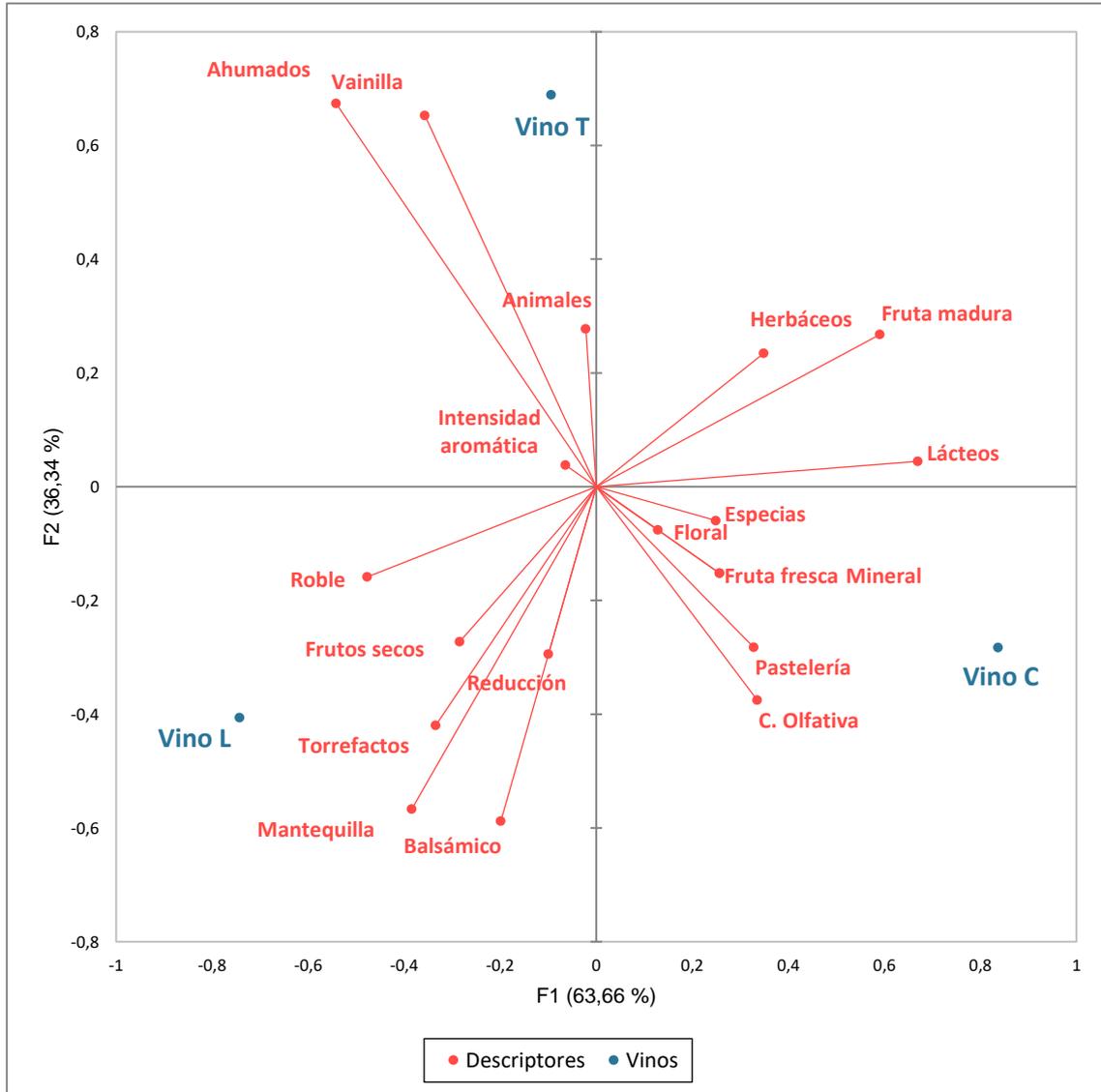
en cuanto a la intensidad del color y valoración cualitativa visual al vino C, en segunda posición respecto a su IC (tabla 10).

Figura 19: Gráfico araña Fase olfativa



(Vino 1: Vino control, Vino 2: Vino acidificado con ácido láctico, Vino 3: Vino acidificado con ácido tartárico).

Figura 20: ACP Fase olfativa



(Vino C: Vino control, Vino L: Vino acidificado con ácido láctico, Vino T: Vino acidificado con ácido tartárico).

Con referencia a la fase olfativa, se observa que:

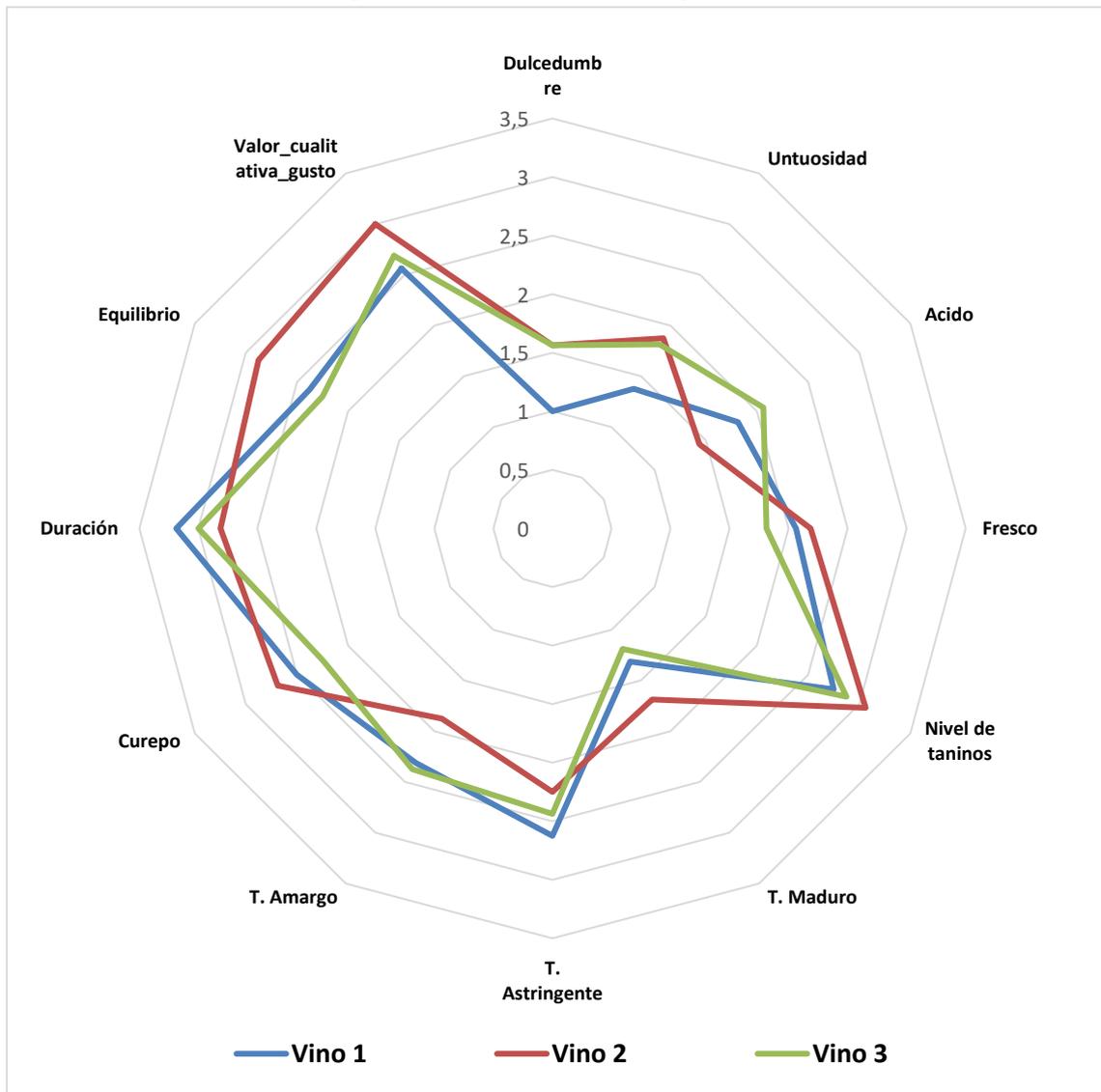
- **El vino C**, fue el que mejor valoración cualitativa olfativa (*C. Olfativa*) tuvo, además de presentar un mayor carácter a fruta madura y fresca, a lácteo y a pastelería.
- **El vino L**, destaca por descriptores como puedan ser el roble, el torrefacto y la mantequilla.
- **El vino T**, presenta un carácter ahumado y con mayor presencia de vainilla.

El eje F1 explica el 63,66% de la varianza, siendo el eje que mejor explica la varianza de los resultados de esta fase olfativa. Los vinos que más se diferencian entre sí, con respecto a la fase olfativa, son el vino C y el vino L.

El vino L fue percibido con un carácter a mantequilla y esto se podría correlacionar con el hecho de que era en vino con pH 3,89 y cuya AV presentaba valores por encima de los valores de los otros vinos. Esa AV es un indicador del crecimiento de BAL, el cual se ve favorecido a pHs más elevados. El metabolismo de las BAL genera como ruta secundaria el diacetilo y la

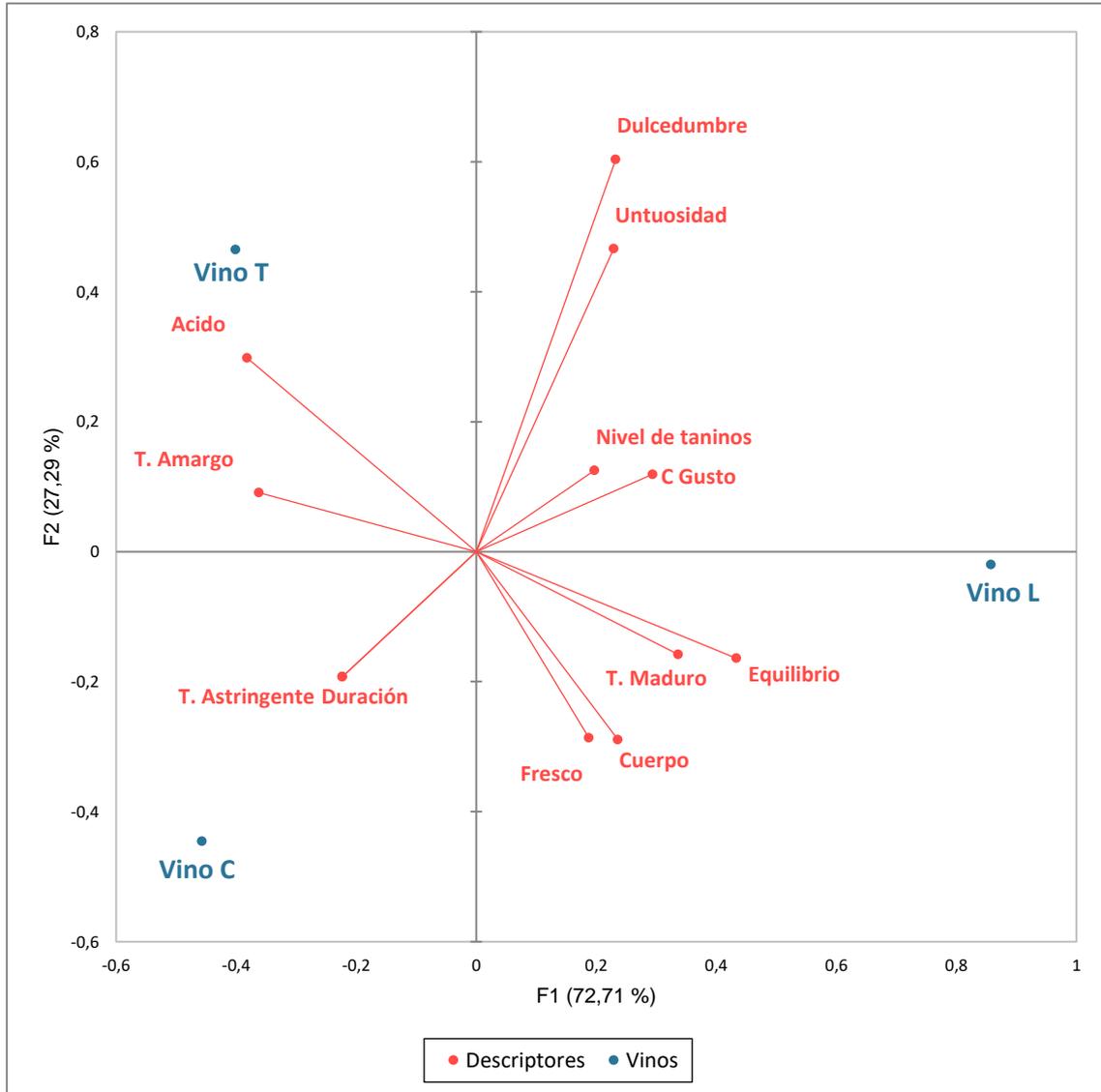
acetoína, ambos compuestos volátiles y que proporcionan ese carácter de aroma a mantequilla.

Figura 21: Gráfico araña Fase gustativa



(Vino 1: Vino control, Vino 2: Vino acidificado con ácido láctico, Vino 3: Vino acidificado con ácido tartárico).

Figura 22: ACP Fase gustativa



(Vino C: Vino control, Vino L: Vino acidificado con ácido láctico, Vino T: Vino acidificado con ácido tartárico).

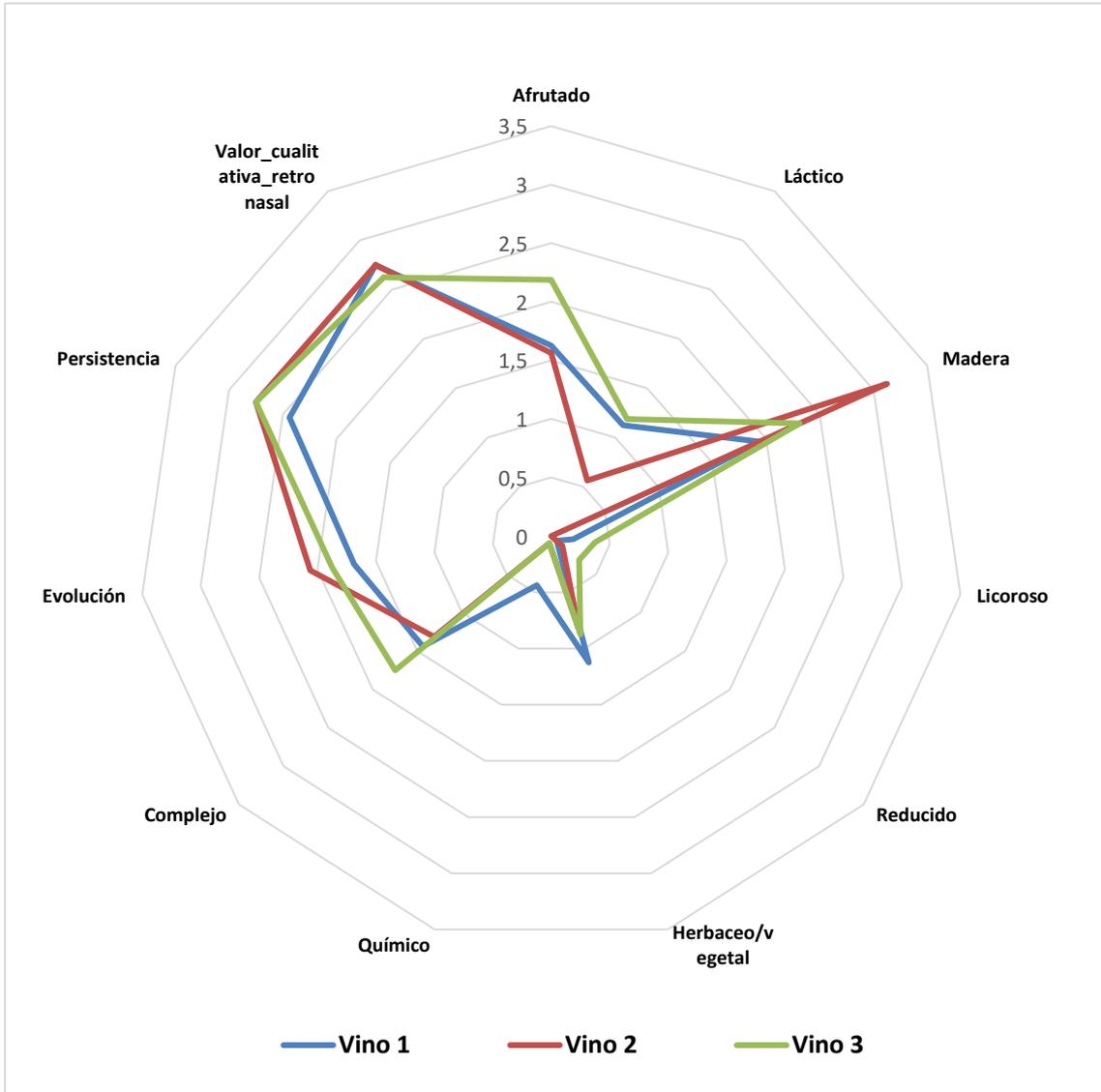
A propósito de la fase gustativa, se puede advertir que:

- El vino C, es el que mayor tanino astringente y duración presenta.
- El vino L, posee la valoración cualitativa gustativa (*C. Gusto*) más elevada. Hay que destacar también, su mayor equilibrio y su mayor nivel de taninos siendo estos maduros.
- El vino T, este vino fue percibido como el que mayor acidez y tanino amargo.

El eje F1 explica el 72,71% de la varianza. El vino L es el que más se diferencia con respecto a los otros dos vinos en la fase gustativa y fue el que mejor valoración cualitativa gustativa recibió de los catadores.

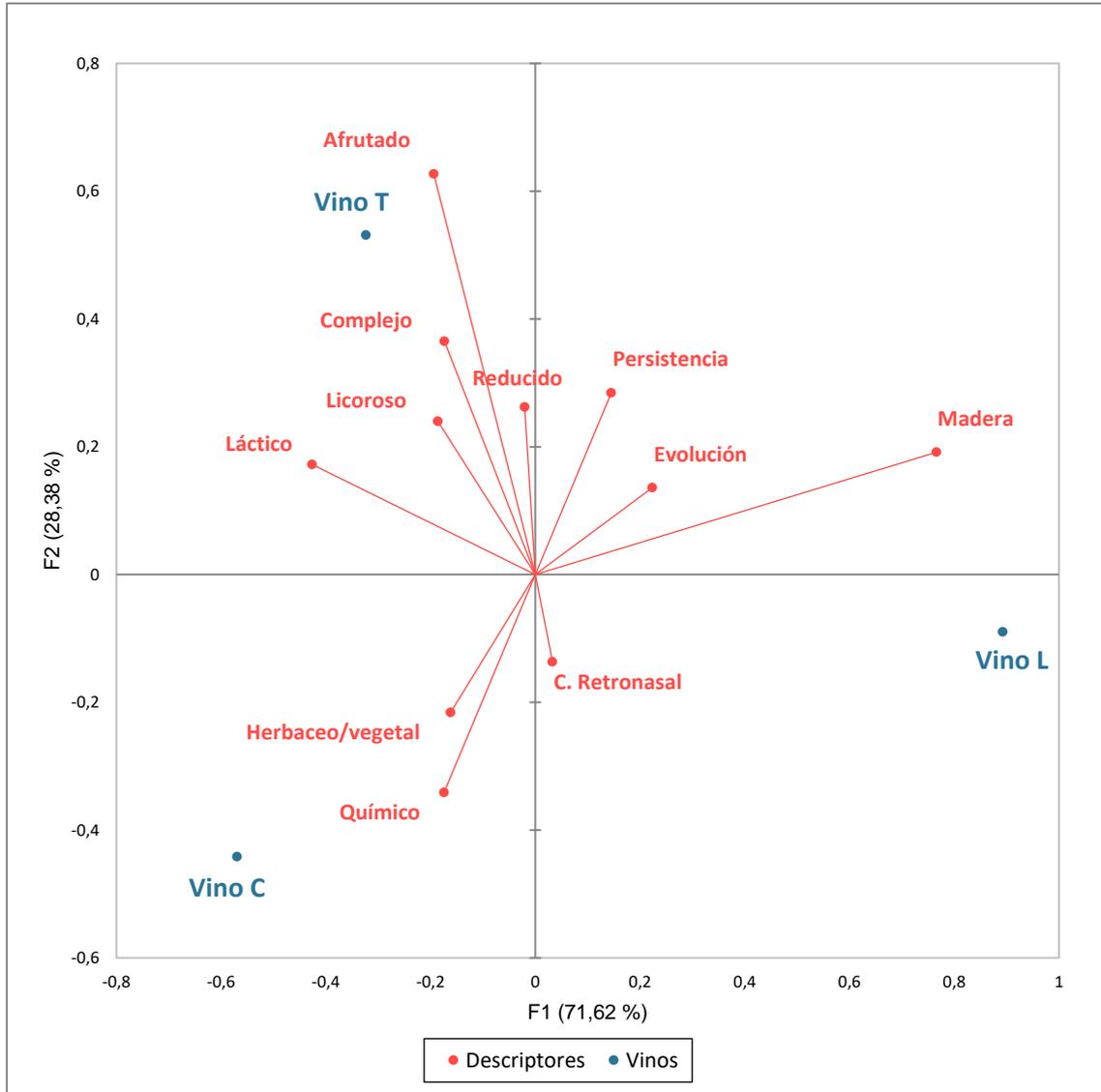
En el caso del vino T, fue percibido como el vino más ácido y amargo, y esto se podría correlacionar con que era el vino acidificado con 2 g /L de tartárico, el ácido más fuerte del vino, y sobre todo en estos vinos cuyo contenido en málico estaba por debajo del umbral de detección después de haber realizado la FML.

Figura 23: Gráfico araña fase retronasal



(Vino 1: Vino control, Vino 2: Vino acidificado con ácido láctico, Vino 3: Vino acidificado con ácido tartárico).

Figura 24: ACP Fase retronasal



(Vino C: Vino control, Vino L: Vino acidificado con ácido láctico, Vino T: Vino acidificado con ácido tartárico).

Finalmente, en relación con la fase retronasal, se manifiesta que:

- El vino C, es el que mayor carácter químico y herbáceo tiene.
- El vino L, destaca por su mayor concentración de madera y muestras a evolución.
- El vino T, se muestra como el vino más complejo y afrutado.

El eje F1 explica el 71,62% de la varianza. Los vinos que más se diferencian entre sí, con respecto a la fase retronasal, son el vino C y el vino L.

6. Conclusiones

1) Se han elaborado tres tipos de vino tinto de la variedad Tempranillo de la D.O.Ca. Rioja:

- Vinos C elaborados a partir de mosto con una AT 3,96 g/L.
- Vinos T elaborados a partir de mosto al que se adicionó ácido tartárico hasta una AT de 4,89 g/L.
- Vinos L elaborados a partir del mosto con la adición de ácido láctico hasta una AT de 2,98 g/L.

2) Con respecto al análisis sensorial,

- El vino tipo C recibió la mejor valoración en las fases visual y olfativa, presentando unas características de intensidad de color y aromas afrutados, lácteos y a pastelería. En la fase gustativa fue caracterizado por su duración y presencia de taninos astringentes.
- El vino tipo T se caracterizó en la fase gustativa por su acidez y tanino amargo.
- El vino tipo L fue caracterizado en la fase olfativa por una mayor presencia de roble y mantequilla, lo cual fue corroborado en la retronasal por el carácter a madera. Este vino fue el mejor valorado en la fase gustativa por su equilibrio y nivel de tanino maduro.

3) La corrección de la acidez de mostos que presentan una AT baja es una operación que se está convirtiendo en una práctica habitual para la elaboración de vinos de calidad que se destinan al proceso de crianza en barrica. En este TFG, mediante las correcciones de la acidez se han elaborado unos vinos con crianza en madera que fueron evaluados muy positivamente por los catadores.

7. Bibliografía y Fuentes usadas

Ashenfelter, O. 2010. Predicting the Quality and Prices of Bordeaux Wine. *Journal of Wine Economics* 5(1): 40-52. doi:10.1017/S193143610000136X

Barco, E. 2018. Análisis de un sector (Rioja 4.0). *Cuaderno de campo* 61: 4-13

Fernández-Pérez, R.; Tenorio Rodríguez, C.; Ruiz-Larrea, F. 2019. Fluorescence microscopy to monitor wine malolactic fermentation. *Food Chemistry*. 274:228-233.

García, M.; Esteve-Zarzoso, B.; Cabellos, J.M.; Arroyo, T. 2020. Sequential Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* Fermentations to Reduce the Alcohol Content in Wine. *Fermentation* 6: 60. <https://doi.org/10.3390/fermentation6020060>

Gutiérrez Viguera, A.R. 2017. Apuntes de “Enología I” de La Universidad de La Rioja.

Gutiérrez Viguera, A.R. 2019. Apuntes de “Destilados y derivados del vino” de La Universidad de La Rioja.

Ivit, N.N.; Longo, R.; Kemp, B. 2020. The Effect of Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces Non-cerevisiae* Yeasts on Ethanol and Glycerol Levels in Wine. *Fermentation*. 6, 77. <https://doi.org/10.3390/fermentation6030077>

Ramos, M.C.; Martínez de Toda F. 2019 (a). Variability of Tempranillo grape composition in the Rioja D.O.Ca. (Spain) related to soil and climatic characteristics. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture*. 99(3):1153-1165. doi: 10.1002/jsfa.9283. Epub 2018 Sep 14. PMID: 30054923.

Martínez de Toda, F. 2019 (b). Apuntes de “Viticultura general y Técnicas vitícolas” de La Universidad de La Rioja.

8. Abreviaturas

- **D.O.Ca.:** Denominación de Origen Calificada
- **°C:** grados Celsius
- **Tª:** Temperatura
- **rpm:** revoluciones por minuto
- **TDI:** Tecnología Difusión Ibérica
- **IC:** Índice de Color
- **IPT:** Índice de Polifenoles Totales
- **IA:** Índice de Antocianos
- **BAL:** Bacterias lácticas
- **FOH:** Fermentación alcohólica
- **FML:** Fermentación maloláctica
- **NFA:** Nitrógeno fácilmente asimilable
- **UFC/mL:** Unidad Formadora de Colonia por cada mililitro
- **ACP:** Análisis de componentes principales
- **ANOVA:** Análisis de varianza
- **GAP (% vol):** Grado alcohólico probable
- **AT:** Acidez Total
- **AV:** Acidez Volátil
- **AR:** Azúcares reductores
- **ES:** Extracto Seco
- **Vino C:** Vino Control
- **Vino T:** Vino acidificado con ácido tartárico
- **Vino L:** Vino acidificado con ácido láctico
- **ACP:** Análisis de Componentes Principales
- **Coupages:** del fr. Mezcla de diferentes vinos (Blend en ingl.)
- **DNA:** del ingl. Ácido desoxirribonucleico (material genético)

9. Anexos

La tabla 11 muestra las analíticas iniciales de los mostos en los distintos depósitos en el momento del encubado (08/10/2019) antes de que se hiciera cualquier tipo de correcciones.

Tabla 11: Resultados analíticos de los diferentes depósitos en el momento del encubado

INOX	Densidad (g/mL)	Tª (°C)	A.T. (g/L H ₂ SO ₄)	pH	Málico (g/L)	Nitrógeno asimilable (mg/L)	Glucónico (mg/L)	Potasio (mg/L)	GAP (% vol)	IC	IPT	Antociano (mg/L)
INOX 10 C1	1114	19	2,96	3,56	2,61	127	0	2490,4	15,8	2,813	14,82	193,1
INOX 11 C2	1111	18	2,82	3,54	2,01	107	0	2512,5	15,3	4,133	14,21	158,9
INOX 17 T1	1110	18	2,8	3,52	2,29	113	0,02	2428,2	15,4	3,489	12,7	139,7
INOX 18 T2	1106	18	3,1	3,45	1,86	93	0	2368,7	14,8	3,873	12,78	172
INOX 19 L1	1109	18	3	3,48	2,16	108	0	2400,7	15,1	1,592	12,31	182,8
INOX 20 L2	1110	18	2,9	3,48	2,28	126	0	2364,2	15,5	3,567	14,76	195,5

Acidez total en gramos de ácido sulfúrico por litro (A.T), Grado alcohólico probable (GAP % vol), índice de color (IC), Índice de Polifenoles Totales (IPT).

La Tabla 12, muestra las analíticas del 10/10/2019, una vez que se habían acidificado los diferentes depósitos.

Tabla 12: Resultados analíticos tras las correcciones realizadas el 09 de septiembre de 2019

DEPÓSITO INOX	A.T. (g/L H ₂ SO ₄)	pH	Málico (g/L)	Nitrógeno asimilable (mg N/L)	Glucónico (mg/L)	Potasio (mg/L)	GAP (% vol)	IC	IPT	Antocianos (mg/L)
INOX 10 C1	3,82	3,45	2,57	140	0	2404,2	15,5	9,817	26,3	381
INOX 11 C2	4,09	3,44	2,76	149	0	2540,9	15,1	10,250	25,6	417
INOX 17 T1	4,75	3,29	3,08	169	0	2442,6	15,4	11,69	26,88	423,1
INOX 18 T2	4,97	3,21	2,86	158	0,01	2377,8	15,3	10,14	24,51	280,9
INOX 19 L1	2,9	3,65	2,65	157	0	2617,4	15,3	7,727	25,59	275,6
INOX 20 L2	3,06	3,67	2,84	160	0	2660,5	15,1	6,98	24,94	302,6

Acidez total en gramos de ácido sulfúrico por litro (A.T), Grado alcohólico probable (GAP % vol), índice de color (IC), Índice de Polifenoles Totales (IPT).

Tabla 13: Valores de AT (g de H₂SO₄/L) y pH a lo largo de la FOH para cada tratamiento

Fecha	AT Vino Control	pH Vino Control	AT Vino tartárico	pH Vino tartárico	AT Vino Láctico	pH Vino Láctico
08/10/2019	2,89 ± 0,10	3,55 ± 0,01	2,94 ± 0,18	3,485 ± 0,05	2,95 ± 0,08	3,48 ± 0,00
09/10/2019	2,89 ± 0,10	3,59 ± 0,09	2,77 ± 0,00	3,7 ± 0,00	2,95 ± 0,07	3,635 ± 0,02
10/10/2019	3,955 ± 0,19	3,445 ± 0,19	4,86 ± 0,16	3,25 ± 0,06	3,87 ± 1,14	3,485 ± 0,26
18/10/2019	5,07 ± 0,00	3,74 ± 0,00	5,26 ± 0,00	3,66 ± 0,00	5,16 ± 0,00	3,8 ± 0,00
19/10/2019	5,065 ± 0,22	3,75 ± 0,22	5,38 ± 0,31	3,655 ± 0,04	5,36 ± 0,40	3,7 ± 0,10
20/10/2019	4,935 ± 0,16	3,78 ± 0,16	5,24 ± 0,31	3,675	5,27 ± 0,47	3,765 ± 0,06
21/10/2019	4,805 ± 0,11	3,74 ± 0,11	5,04 ± 0,25	3,635 ± 0,05	5,1 ± 0,45	3,735 ± 0,05
22/10/2019	-	-	-	-	5,13 ± 0,33	3,785 ± 0,06

Acidez Total en g de H₂SO₄/L (AT)

Figura 14: Datos fisicoquímicos de los diferentes INOX en el momento del descubado.

DEPÓSITO INOX	Densidad (g/mL)	Tª (°C)	A.T. (g/L H ₂ SO ₄)	pH	Málico (g/L)	GAP (% vol)	AV (g/L ácido acético)	Azúcares Reductores (g/L)	Extracto seco (g/L)	IC	IPT	Antociano (mg/L)
INOX 10 C1	996	21	4,73	3,73	3,54	14,73	0,29	8,82	51,6	28,9	82,3	1045
INOX 11 C2	999	22	4,88	3,75	3,2	14,3	0,25	14	58,6	28,78	79,32	943,1
INOX 17 T1	996	22	4,86	3,65	3,4	14,75	0,27	7,7	48	31,67	76,61	1072
INOX 18 T2	998	22	5,22	3,62	3,41	14,71	0,25	13,77	56,3	29,99	76,75	1079
INOX 19 L1	1000	22	5,36	3,74	2,97	14,24	0,3	16,36	61,1	25,6	78,75	959,1
INOX 20 L2	994	22	4,9	3,83	2,99	14,46	0,36	1,92	41,9	23,8	76,7	991,4

Acidez total en gramos de ácido sulfúrico por litro (A.T), Grado alcohólico probable (GAP % vol), Índice de color (IC), Índice de Polifenoles Totales (IPT).

Tabla 15: Evolución de la Acidez Volatil a lo largo de la FML

Fecha	BARRICAS CONTROL	BARRICAS TARTÁRICO	BARRICAS LÁCTICO
30/10/2019	0,34 ± 0	0,34 ± 0,007	0,42 ± 0,007
06/11/2019	0,35 ± 0,007	0,40 ± 0,014	0,45 ± 0,035
14/11/2019	0,48 ± 0,007	0,48 ± 0,007	0,56 ± 0,007
21/11/2019	0,62 ± 0,063	0,54 ± 0,028	0,56 ± 0,028
25/11/2019	0,61 ± 0,028	0,61 ± 0,0141	0,63 ± 0
28/11/2019	0,66 ± 0,007	0,59 ± 0,007	0,67 ± 0,014
12/12/2019	0,78 ± 0,021	0,71 ± 0,035	0,84 ± 0
09/01/2020	0,57 ± 0,014	0,58 ± 0	0,65 ± 0,014

Acidez Volatil expresada en g de ácido acético/L (AV)

Tabla 16: Valores de AT (expresados como g de H₂SO₄/L) y de pH a lo largo de la FML

Fecha	AT CONTROL	pH CONTROL	AT TARTÁRICO	pH TARTÁRICO	AT LÁCTICO	pH LÁCTICO
30/10/2019	4,57 ± 0,01	3,8 ± 0,00	4,79 ± 0,09	3,72 ± 0,02	4,82 ± 0,13	3,82 ± 0,03
06/11/2019	4,44 ± 0,00	3,81 ± 0,02	4,73 ± 0,15	3,71 ± 0,01	4,71 ± 0,12	3,81 ± 0,05
14/11/2019	4,31 ± 0,13	3,83 ± 0,04	4,79 ± 0,34	3,71 ± 0,01	4,70 ± 0,10	3,8 ± 0,00
21/11/2019	3,62 ± 0,02	3,94 ± 0,04	3,91 ± 0,14	3,84 ± 0,01	4,04 ± 0,14	3,91 ± 0,06
25/11/2019	3,71 ± 0,02	3,92 ± 0,02	3,95 ± 0,12	3,835 ± 0,04	3,95 ± 0,08	3,93 ± 0,04
28/11/2019	3,76 ± 0,05	3,94 ± 0,04	4,02 ± 0,12	3,83 ± 0,00	3,98 ± 0,02	3,93 ± 0,00
12/12/2019	3,50 ± 0,01	3,9 ± 0,03	3,85 ± 0,13	3,835 ± 0,04	3,87 ± 0,04	3,96 ± 0,04
09/01/2020	3,50 ± 0,03	3,85 ± 0,02	3,80 ± 0,18	3,765 ± 0,01	3,95 ± 0,06	3,89 ± 0,05

Acidez Total en gramos de ácido sulfúrico /L (AT)

Tabla 17: Resultados analíticos a fecha 09/01/2020 tras la FML y crianza de los vinos en barricas

BARRICAS	A.T. (g de H ₂ SO ₄ /L)	pH	Málico (g/L)	GAP (% vol)	AV (g/L ácido acético)	Azúcares Reductores (g/L)	Extracto seco (g/L)	IC	IPT	Antociano (mg/L)	Índice de polimerización
CONTROL	3,5 ± 0,028	3,845 ± 0,021	0,015 ± 0,007	15,37 ± 0,198	0,57 ± 0,014	1,83 ± 0,396	32,6 ± 0,0	18,905 ± 0,106	79,855 ± 1,279	770,75 ± 14,637	2,5975 ± 0,060
TARTÁRICO	3,795 ± 0,091	3,765 ± 0,007	0,105 ± 0,078	15,22 ± 0,127	0,58 ± 0,0	1,43 ± 0,071	32,2 ± 0,283	19,87 ± 0,580	77,54 ± 0,269	745,8 ± 20,648	2,550 ± 0,046
LÁCTICO	3,945 ± 0,064	3,885 ± 0,049	0,0 ± 0,0	15,13 ± 0,085	0,65 ± 0,014	1,575 ± 0,177	31,7 ± 0,0	18,5 ± 0,410	78,535 ± 2,143	748,4 ± 30,971	2,3255 ± 0,066

Acidez Total en gramos de ácido sulfúrico /L (AT), Grado alcohólico probable (GAP %vol), Acidez Volátil en gramos de ácido acético por litro (AV), Índice de Color (IC), Índice de Polifenoles Totales (IPT)

A continuación, se muestran los resultados de **recuentos de levaduras totales**, habiendo empleado la **cámara Neubauer** con recuentos directos. Se trata de la media de recuentos realizados por cuadruplicado.

Tabla 18: Recuentos de levaduras totales durante la FOH

Depósito INOX	Nivel poblacional de levaduras totales (células/mL)	Desviación estándar
INOX 10 C1 inicio FOH	1,19E+06	± 4,27E+05
INOX 11 C2 inicio FOH	1,63E+06	± 4,79E+05
INOX 17 T1 inicio FOH	1,88E+06	± 6,61E+05
INOX 18 T2 inicio FOH	1,38E+06	± 2,50E+05
INOX 19 L1 inicio FOH	1,50E+06	± 2,04E+05
INOX20 L2 inicio FOH	1,38E+06	± 5,20E+05
INOX 10 C1 plena FOH	3,63E+07	± 1,12E+07
INOX 11 C2 plena FOH	1,60E+07	± 4,30E+06
INOX 17 T1 plena FOH	3,60E+07	± 5,21E+06
INOX 18 T2 plena FOH	2,39E+07	± 3,90E+06
INOX 19 L1 plena FOH	4,13E+07	± 9,44E+06
INOX20 L2 plena FOH	6,71E+07	± 1,10E+07
INOX 10 C1 FIN FOH	7,75E+06	± 9,79E+05
INOX 11 C2 FIN FOH	1,57E+07	± 2,27E+06
INOX 17 T1 FIN FOH	1,04E+07	± 2,38E+06
INOX 18 T2 FIN FOH	1,08E+07	± 2,82E+06
INOX 19 L1 FIN FOH	1,24E+07	± 1,96E+06
INOX20 L2 FIN FOH	1,26E+07	± 1,76E+06

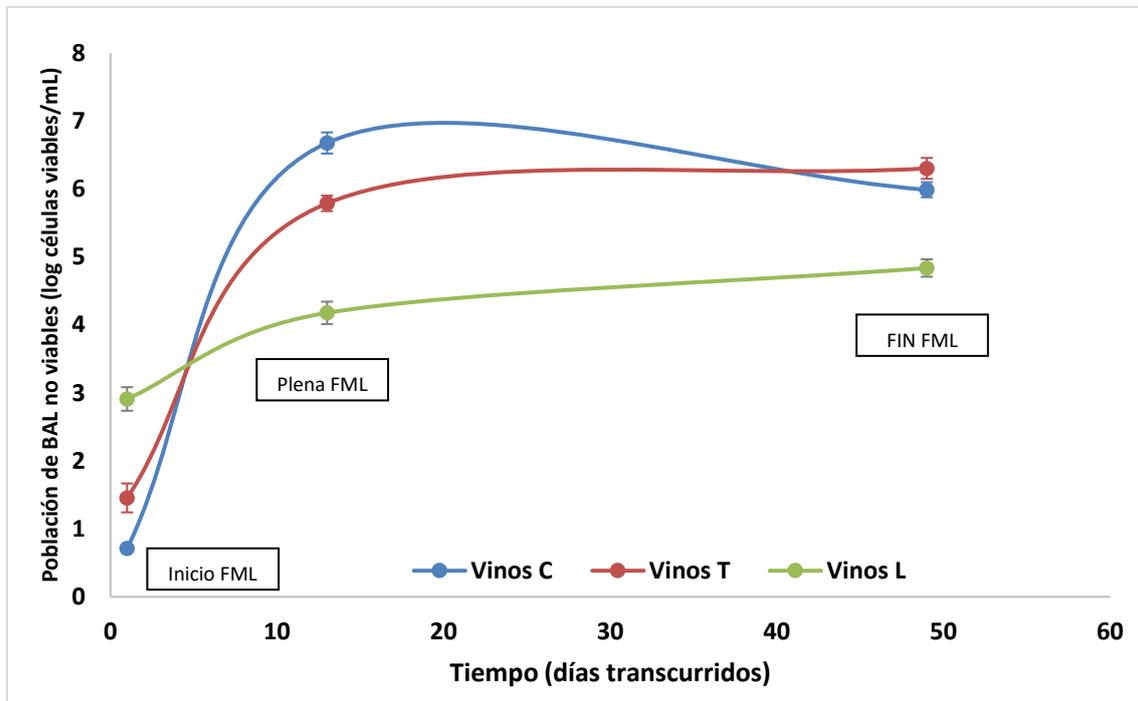
Para seguir, se muestran los resultados de recuentos de bacterias lácticas totales, habiendo empleado la cámara de Neubauer y el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BacLight.

Tabla 19: Recuento de Bacterias Lácticas totales durante la FML

Nombre de la muestra	Media totales BAL (células/mL)	Desviación estándar
7 Comienzo FML C1.1	1,42E+07	±1,44E+06
8 Comienzo FML C1.2	1,58E+07	±1,44E+06
9 Comienzo FML C2.1	1,25E+07	±2,50E+06
10 Comienzo FML T1.1	1,75E+07	±2,50E+06
11 Comienzo FML T1.2	2,17E+07	±2,89E+06
12 Comienzo FML T2.1	1,25E+07	±2,50E+06
13 Comienzo FML L1.1	1,67E+07	±1,44E+06
14 Comienzo FML L1.2	1,83E+07	±5,20E+06
15 Comienzo FML L2.1	1,17E+07	±5,20E+06
16 Plena FML C1.1	1,67E+08	±6,29E+07
17 Plena FML C1.2	1,33E+08	±6,29E+07
18 Plena FML C2.1	2,33E+08	±6,29E+07
19 Plena FML T1.1	1,92E+08	±2,89E+07
20 Plena FML T1.2	2,33E+08	±1,44E+07
21 Plena FML T2.1	2,25E+08	±2,50E+07
22 Plena FML L1.1	1,67E+08	±5,77E+07
23 Plena FML L1.2	2,17E+08	±3,82E+07
24 Plena FML L2.1	1,58E+08	±1,44E+07
43 CRIANZA C1.1	3,00E+06	±7,50E+05
44 CRIANZA C1.2	2,92E+06	±5,20E+05
45 CRIANZA C2.1	1,67E+06	±1,44E+05
46 CRIANZA T1.1	3,67E+06	±2,89E+05
47 CRIANZA T1.2	4,67E+06	±2,89E+05
48 CRIANZA T2.1	7,17E+06	±2,89E+05
49 CRIANZA L1.1	4,83E+06	±1,15E+06
50 CRIANZA L1.2	5,17E+06	±1,61E+06
51 CRIANZA L2.1	4,17E+06	±1,04E+06

A continuación, en la **Figura 20** se muestra el gráfico de la **población logarítmica de BAL no viables a lo largo de la FML**.

Figura 25: Población logarítmica de bacterias lácticas no viables a lo largo de la FML



Barricas control: Barricas con vino control, **Barricas Tartárico:** Barricas con vino tratado con ácido tartárico, **Barricas Láctico:** Barricas con vino tratado con ácido láctico

Se observa una mayor variabilidad en el número de células muertas con respecto a las vivas para cada uno de los tratamientos, pero en conjunto, se observa cómo pasa de tener niveles de células no viables muy inferiores a las viables al inicio de la FML, para acabar con unos niveles significativamente idénticos en el final de la FML, salvo para el caso del vino acidificado con ácido láctico.