

ENOLOGÍA

Enzimas de extracción de color en uvas tintas



Comparación entre tratamientos y efecto final sobre los vinos

Los técnicos especialistas de Fomento Vinícola dependientes del Departamento de Desarrollo Rural del Gobierno de Navarra han estudiado la influencia de diferentes enzimas comerciales de extracción de color añadidas a las uvas tintas en el proceso de vinificación.

El objetivo era analizar los productos de nueva generación que se comercializan en el mercado para determinar sus efectos en el rendimiento y la calidad y poder asesorar a los bodegueros sobre la aplicación de enzimas de extracción de color más adecuadas.

Se trata de una práctica común en las bodegas, autorizada por la Unión Europea, que busca mejorar el rendimiento final de los vinos sin merma de su calidad.

En este artículo se exponen los resultados obtenidos así como la valoración final realizada por un grupo de catadores expertos en una cata a ciegas.

M^º Carmen Jimeno Mendoza*, Carlos Izuriaga Echeverría*, Laura Aguirre Lopez*, Natalia Jáuregui Martínez, Agurtzane Abascal Arbaizagoitia*, Ana Sagües Sarasa**, Julián Suberviola Ripa*

(*Sección de Fomento Vinícola. **Sección de Sanidad vegetal. Dpto. de Desarrollo Rural, Medio Ambiente y Administración Local. Gobierno de Navarra)

Desde comienzos de los años 70 se utilizan enzimas comerciales en enología para complementar la acción de las enzimas naturales propias de la uva con el fin de aumentar el rendimiento y potenciar el color y aromas.

Se han realizado numerosos trabajos de investigación y existen referencias técnicas sobre este tema, pero con resultados dispares. Por ello, los técnicos de la Sección de Fomento Vinícola del Gobierno de Navarra, han llevado a cabo esta experiencia.

El objetivo era estudiar el rendimiento de transformación uva/vino y comprobar la capacidad de extracción

de compuestos fenólicos de diferentes enzimas comerciales de última generación, en vinificaciones en tinto. Se buscaba en definitiva caracterizar analítica y organolépticamente los vinos resultantes, fundamentalmente en los aspectos relacionados con el color.

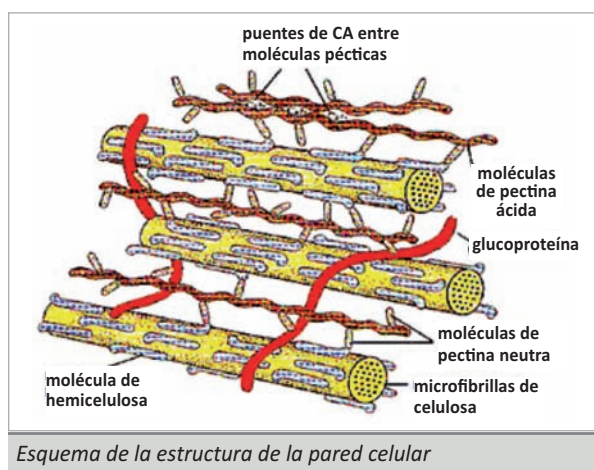
ENZIMAS NATURALES O PROPIAS DE LA UVA

Los compuestos más importantes, desde el punto de vista del color, son los antocianos y taninos. Se encuentran en el interior de las células de los hollejos protegidos por las paredes celulares que son, de hecho, una barrera frente a la difusión de los mismos al exterior.

La maduración de la baya va acompañada de un reblandecimiento y de la aparición de actividades enzimáticas provocadas por enzimas naturales, que son catalizadores biológicos que degradan la pared celular y facilitan la extracción de antocianos y taninos en la fermentación.

Las enzimas suelen tener carácter selectivo sobre el sustrato y su actividad viene definida en función de la acción que ejercen sobre los diferentes constituyentes de la membrana, que son:

- Polisacáridos:
 - Celulosa
 - Polisacáridos no celulósicos: pectinas y hemicelulosas
- Proteínas
- Compuestos fenólicos
- Lignina



Esquema de la estructura de la pared celular

El grupo de enzimas pectolíticas o pectinasas, que degradan las pectinas, son pectinesterasas (actividad PE). Eliminan los grupos metilo de los galacturonanos esterificados (principales componentes de las pectinas) y de las poligalacturonasas (actividad PG) que catalizan la hidrólisis de los enlaces glicosídicos y reblandecen el hollejo.



También actúan sobre las pectinas, aunque en menor medida, otros enzimas como pectatoliasas (actividad PAL) y pectinliasa (actividad PL) que, además de degradar las paredes celulares, pueden activar sistemas de defensa de la planta (Romero Cascales I, 2008).

Igualmente se localizan enzimas que actúan sobre otros sustratos como la hemicelulosa (son las hemicelulasas, que requieren la concurrencia de varios de ellos para degradar la hemicelulosa) o sobre la celulosa (son las celulasas como glucanasa y celobiasa). Otras actúan sobre las proteínas; son proteasas como la lisina, que liberan polipéptidos de la membrana, aunque su actividad no es muy conocida.

ENZIMAS COMERCIALES EN ENOLOGÍA

La actividad enzimática natural no es suficiente para provocar la rotura general de la membrana y es preciso añadir enzimas externos que “ayuden” en esta acción.

Los enzimas pectolíticos han sido utilizados en la elaboración de vinos tintos desde comienzos de la década de 1970, buscando sobre todo un aumento de rendimiento de transformación sólido/líquido. A partir de los años 1990, el uso se ha diversificado empleándose además para otros fines como extracción de color, potenciación de aromas en blancos, etc.

Los preparados comerciales se obtienen, muy frecuentemente, por fermentación, por inmersión (Canal Llaúberes, 2002) sobre sustratos como harina de soja o almidón de patata de algunas cepas de hongos no modificados genéticamente como *Aspergillus Niger* y *Trichoderma harzianun*, debido a la facilidad de estas cepas para obtener pectinasas y glucanasas respectivamente.

Después de la fermentación, las actividades enzimáticas deseadas se recuperan y purifican, aunque también hay actividades secundarias como la actividad β -glucosidasa, que decolora pigmentos de color de los hollejos por hidrólisis de

la glucosa de los antocianos, y la actividad cinamil esterasa (o fenolesterasa), que también influye en la pérdida de antocianos por oxidación (*Sarni 1995; Romero Cascales I, 2008*).

La composición enzimática de cada preparación va a depender de la cepa, del medio y de las condiciones de cultivo, que son específicas para cada empresa productora, por lo que pueden variar de unos a otros preparados comerciales.

DISPARIDAD DE CRITERIOS TÉCNICOS

Existen cantidad de referencias sobre investigaciones relacionadas con la utilización de preparados enzimáticos en enología. Los resultados son dispares debido fundamentalmente a la diferente composición y diferente actividad de los mismos, y a la presencia de actividades secundarias en los citados preparados.

Hay resultados positivos, con aumentos de la extracción de color sin efectos negativos en otros aspectos, como los expresados por *Revilla y González, San José 2002; Sacchi et al. 2005; Romero Cascales I, 2008*; o como los expresados por *M. Ortega-Heras, S. Perez Magariño y C. González Huer-tas, 2004*, que encuentran en un vino de tempranillo más estabilidad de color en el tiempo de los vinos macerados con enzimas y más porcentaje de antocianos poliméricos en estos vinos.

Otros estudios aportan resultados dispares, en algunos casos negativos con disminución de antocianos en vinos tratados (*Wigtman et al.1997*).

NORMATIVA LEGAL

El Código Internacional de las Prácticas Enológicas y la normativa de la Unión Europea recogen en varios reglamentos y resoluciones lo relativo a la utilización de enzimas para la clarificación, tanto para mostos, uvas y vinos. Autorizan su uso siempre y cuando no suponga merma de la pureza y calidad de los mismos.

Hay varias Resoluciones de la OIV relativas a las preparaciones enzimáticas: Res OIV/OENO 365/2009, Res OIV/OENO 485/2012, y la última referencia es la Res OIV_OENO 498-2013.

La normativa de la UE está recogida en el Reg (CE) 606/2009 Anexo IA, p10 que autoriza el uso de enzimas pectolíticos para clarificación, y en el Reg (UE) N° 53/2011 de la Comisión, Anexo I, apartado b.

REFERENCIAS EN VINOS DE NAVARRA

En un estudio realizado en Navarra durante los años 90 se encontró mayor contenido en taninos en vinos de Tempranillo y Garnacha tratados con enzimas artificiales. No obstante, también concluyó que si las maceraciones eran prolongadas, 10-12 días, el efecto de los enzimas se diluye, y ya no se ven diferencias significativas entre vinos tratados y no tratados. A la vista de los resultados obtenidos, se recomendó la utilización de enzimas para maceraciones cortas, bien para vinos sin crianza o en vendimias con problemas sanitarios. (Para más información, ver el artículo "Importancia de la maceración en la vinificación de vinos tintos de Navarra", de J. Suberviola, J. Aznarez y C. Arteaga. Rev: Navarra Agraria 1998)

METODOLOGÍA DEL ENSAYO REALIZADO EN VINOS DE NAVARRA

Dada la disparidad de resultados que se observan en los diferentes trabajos publicados y ante la diversidad de preparados enzimáticos que se ofrecen en el mercado, los especialistas de enología de la antigua EVENA, adscritos a la Sección de Fomento del Departamento de Desarrollo Rural, vieron la necesidad de realizar un nuevo estudio para actualizar las recomendaciones a los bodegueros.

Para ello, han experimentado con productos de nueva generación, caracterizados por las propias empresas suministradoras como de muy baja actividad secundaria, a la búsqueda de perfiles de vinos afrutados y color más estable en el tiempo.



El ensayo se realizó con uva tinta variedad Cabernet Sauvignon de la D.O. Navarra, muestreada homogéneamente.

Proceso de elaboración

La uva se vendimió, se maceró en frío, en cámara a 2°C, durante 24 horas y al día siguiente se procedió al despallado y al reparto equitativo de la pasta en 14 cubos de igual capacidad para el desarrollo del ensayo, que se diseñó de la forma que se explica a continuación.

Se utilizaron 3 enzimas comerciales diferentes, todas ellas con actividad pectinasa y hemicelulosa, sin actividad cinamil esterasa, y no significativa de β-glucosidasa (según referencia comercial): Enzima 1, Enzima 2 y Enzima 3.

Cada enzima se utilizó a 2 dosis diferentes, una de 3 g/100 kg de uva y otra de 4 g/100 kg de uva. Para cada uno de las variantes se realizaron 2 repeticiones, así como para el testigo, que no llevó adición de enzima. De esta manera se obtuvieron 14 tratamientos diferentes: Testigo 1; Testigo 2; Enzima 1 3.1, Enzima 1 3.2; Enzima 1 4.1; Enzima 1 4.2; Enzima 2 3.1; Enzima 2 3.2; Enzima 2 4.1; Enzima 2 4.2, Enzima 3 3.1, Enzima 3 3.2, Enzima 3 4.1, Enzima 3 4.2 (los números consecutivos se corresponden con el número de la enzima, la dosis añadida y el número de repetición).

Una vez repartida la pasta en los 14 cubos se realizó un primer análisis del mosto y se inoculó cada tratamiento con la dosis correspondiente de enzima, así como con la dosis necesaria de levadura, en este caso levadura comercial Mix [mezcla *S. bayanus* EC1118 y *S. cerevisiae* Na33 (EVENA)], a una dosis de 25 g/hl.

En la gráfica 1 se puede observar una comparativa de la dinámica fermentativa de cada uno de los tratamientos.

Una vez finalizada la fermentación alcohólica, se descubrió ca-

da uno de los tratamientos y se introdujo el vino en garrafrones para que realizase la fermentación maloláctica. Para ello se adicionaron 0'63 g/hl de bacterias lácticas en siembra directa a cada uno de los tratamientos.

Al finalizar la fermentación maloláctica, se trasegaron todos los vinos a garrafas de cristal y pasaron a cámara de frío a 4°C.

Finalmente se filtraron con filtro de placas con placas de celulosa con ligera capacidad de abrillantado y se embotellaron 15 botellas de cada tratamiento y repetición.

Análisis físico-químico de los vinos

Todas las muestras de vino empleadas en el ensayo se analizaron en el Laboratorio Enológico de Navarra (Sección de Fomento Vinícola).

Para comprobar la existencia de diferencias significativas entre los vinos se realizó el tratamiento estadístico de los datos obtenidos en los análisis por el método de ANOVA considerando los resultados para un nivel de significación ≥0,05.

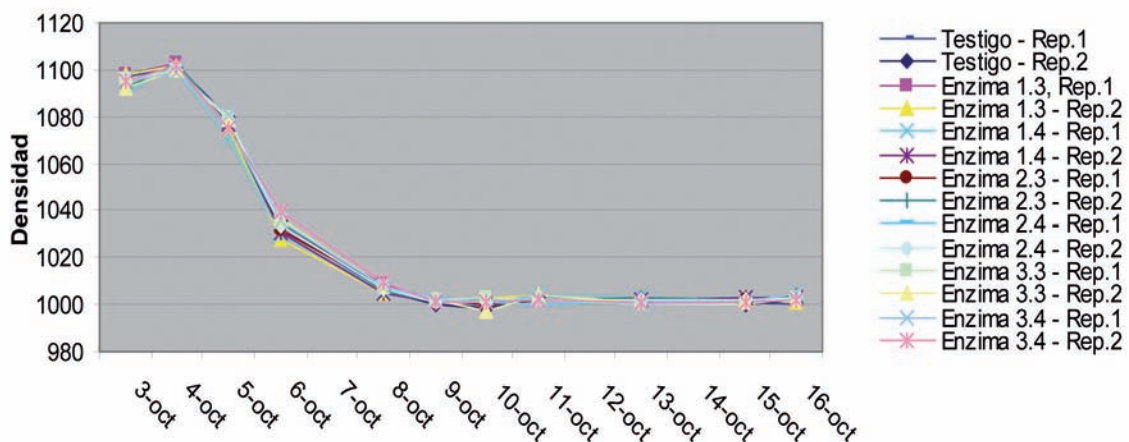
Análisis organoléptico de los vinos

Para el análisis organoléptico del ensayo se realizó una cata descriptiva mediante test binario de preferencia según criterios de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV).

La puntuación para cada vino catado se expresó como la media ponderada de las puntuaciones dadas por todos los catadores y con estas medias se estableció el orden de preferencia de cada serie de vinos, aplicándole el correspondiente tratamiento estadístico.



Gráfico 1. Comparación de las dinámicas fermentativas



RESULTADOS DEL ESTUDIO

Rendimiento de prensado

En la tabla 1 se muestran los rendimientos en el prensado de las variantes tras el final de la fermentación alcohólica. Se observa un rendimiento mayor en las variantes con enzimas respecto al testigo.

Tabla 1. Rendimientos de prensado de la pasta

Enzima *	Tratamiento **	Pasta (Kg)	Vino (litros)	L/kg. Pasta	Media Rep.	Media Enzima
Enzima 2	3.1	10,8	26,5	2,45	2,45	2,44
	3.2	11,4	28	2,46		
	4.1	10,4	26,5	2,55	2,42	
	4.2	11,3	26	2,3		
Enzima 3	3.1	10,6	27,5	2,59	2,65	2,64
	3.2	10,35	28	2,71		
	4.1	9,9	29	2,93	2,63	
	4.2	11,2	26	2,32		
Enzima 1	3.1	10,8	26,5	2,45	2,45	2,45
	3.2	10,6	26	2,45		
	4.1	11	26	2,36	2,45	
	4.2	11	28	2,55		
Testigos	T 1	12	25	2,08	2,07	2,07
	T 2	13,1	27	2,06		

* Denominación de las enzimas empleadas en el ensayo.

** Para cada tratamiento, el primer índice corresponde a la dosis de enzima en g/100 kg de uva y el segundo índice a la repetición del ensayo.

Evolución del color

Los análisis de color se realizaron en diferentes momentos de la evolución de los vinos. El primer análisis de color se realizó al inicio de la fermentación alcohólica; el siguiente tras finalizar dicha fermentación; un tercero, tras finalizar la fermentación maloláctica; los dos últimos análisis se hicieron a los 3 meses tras la finalización de dicha fermentación y tras 7 meses del final de la fermentación.

Para ver si existían diferencias significativas entre los vinos se realizó un tratamiento estadístico de los datos obtenidos en los análisis físico-químicos de color por el método de ANOVA.

Al inicio de la fermentación alcohólica ningún parámetro analizado presentaba diferencias entre las distintas variantes.

En cambio, al término de la fermentación alcohólica los parámetros de DO 420, DO 520, DO 620, tonalidad y antocianos ya presentaban diferencias significativas. Para el resto de parámetros analizados no se encontraron diferencias para un nivel de significación $\geq 0,05$.

En el análisis realizado al término de la fermentación maloláctica se encontraron diferencias significativas en los parámetros de DO 420, DO 520, intensidad colorante, tonalidad, antocianos e índice de ionización de antocianos.

Los datos obtenidos en el análisis de los vinos tres meses después de la finalización de la fermentación maloláctica mostraron diferencias significativas para todos los parámetros excepto para las catequinas. (Ver tabla 2)

Tabla 2. Análisis estadístico de los parámetros de color a los 3 meses

3 MESES TRAS FML	Testigo	Enzima 1 3 gramos	Enzima 1 4 gramos	Enzima 2 3 gramos	Enzima 2 4 gramos	Enzima 3 3 gramos	Enzima 3 4 gramos
IPT	65,50 c	66,00 c	62,00 abc	64,50 bc	66,50 c	57,50 a	58,00 ab
DO 420	3,32 a	3,85 abc	3,83 ab	3,90 bc	4,39 c	3,79 ab	3,97 bc
DO 520	3,35 a	4,66 b	4,62 b	4,78 b	5,50 c	4,59 b	4,83 b
DO 620	0,92 a	1,20 b	1,19 b	1,25 b	1,44 b	1,20 b	1,26 b
I. Colorante	7,58 a	9,71 b	9,64 b	9,93 bc	11,33 c	9,57 b	10,05 bc
Tonalidad	0,99 b	0,83 a	0,83 a	0,82 a	0,80 a	0,83 a	0,82 a
Antocianos	779,00 ab	789,50 ab	774,00 ab	870,50 bc	942,00 c	786,50 ab	734,50 a
IIA	4,70 a	7,90 b	7,00 ab	9,40 bcd	11,60 d	8,85 bc	10,80 cd
Catequinas	1.027,00 a	1.345,50 a	1.299,00 a	1.233,50 a	1.365,00 a	1.106,50 a	1.126,50 a



En el análisis realizado siete meses después de la finalización de la fermentación maloláctica únicamente se encontraron diferencias significativas para los parámetros de antocianos e índice de ionización de antocianos. (Ver resultados en la tabla 3)

Los gráficos que se presentan a continuación muestran la dinámica de algunos parámetros en los diferentes momentos de análisis, así como, los momentos en los que se dan diferencias significativas para cada parámetro. Dichos momentos aparecen indicados por un círculo. (Ver gráficos 2, 3, 4 y 5)

Para la elaboración de los gráficos se han tomado las medias de las dos repeticiones para cada tratamiento y momento.

Tabla 3. Análisis estadístico de los parámetros de color a los 7 meses

7 MESES TRAS FML	Testigo	Enzima 1 3 gramos	Enzima 1 4 gramos	Enzima 2 3 gramos	Enzima 2 4 gramos	Enzima 3 3 gramos	Enzima 3 4 gramos
IPT	65,00 a	74,00 a	77,50 a	74,50 a	81,50 a	75,00 a	69,00 a
DO 420	4,29 a	4,61 a	4,44 a	4,43 a	4,83 a	4,43 a	4,51 a
DO 520	5,09 a	5,98 b	5,65 ab	5,64 ab	6,17 b	5,59 ab	5,70 ab
DO 620	1,45 a	1,59 a	1,51 a	1,53 a	1,68 a	1,52 a	1,55 a
I. Colorante	10,83 a	12,17 ab	11,59 ab	11,59 ab	12,67 b	11,54 ab	11,76 ab
Tonalidad	0,84 b	0,77 a	0,79 a	0,79 a	0,78 a	0,79 a	0,79 a
Antocianos	672,00 a	694,00 a	674,50 a	756,50 b	796,50 b	646,50 a	661,00 a
IIA	13,85 a	15,35 b	15,35 b	14,10 a	13,50 a	15,10 b	15,50 b
Catequinas	859,00 a	1.120,00 a	1.083,50 a	1.023,50 a	1.113,50 a	928,50 a	952,50 a

Gráfico 2. Evolución del IPT en el tiempo (Un Abs/cm)

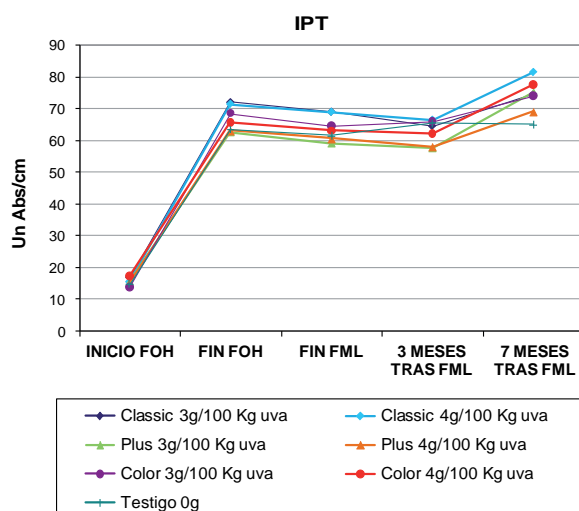
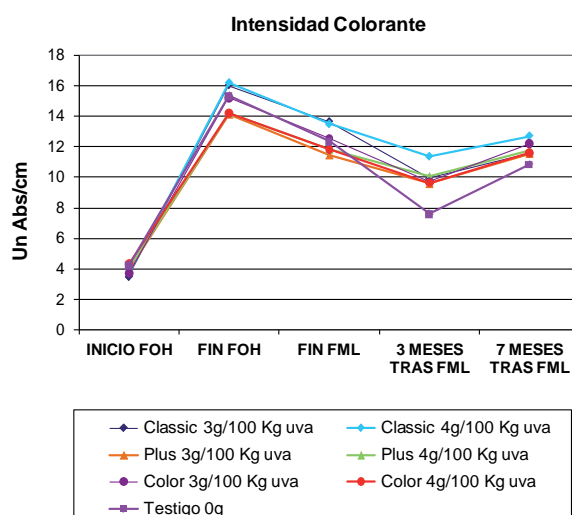


Gráfico 3. Evolución de la intensidad colorante en el tiempo (Un Abs/cm)





Bodega experimental donde se han realizado los trabajos de este estudio.

Gráfico 4. Evolución de los antocianos en el tiempo (mg/L)

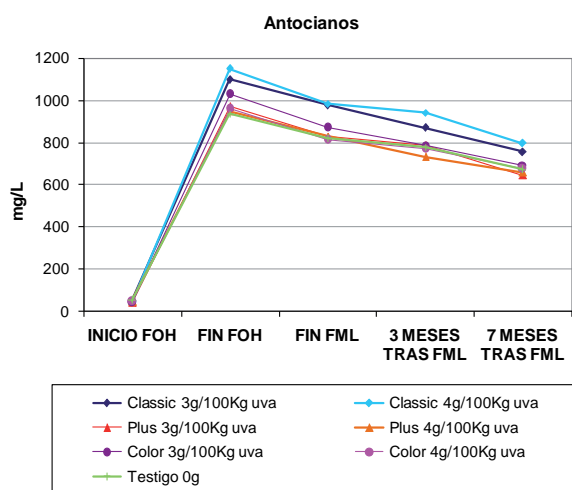
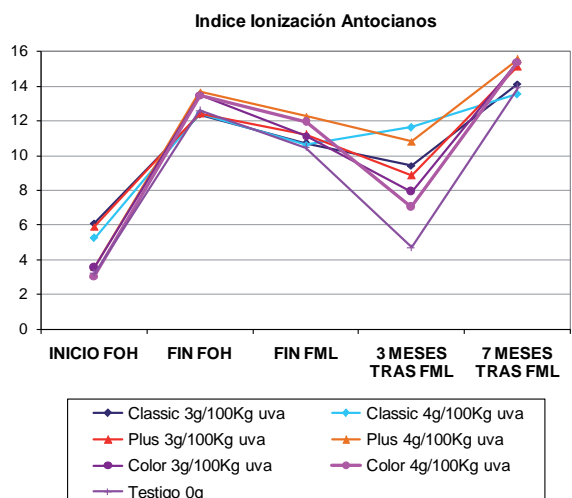


Gráfico 5. Evolución del índice de ionización de antocianos en el tiempo



ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO DE LOS VINOS

El análisis organoléptico se llevó a cabo mediante cata a ciegas, en base a la ficha de cata de la OIV, por un panel formado por técnicos del sector y de la Sección de Fomento Vinícola del Departamento de Desarrollo Rural, Medio Ambiente y Administración Local del Gobierno de Navarra.

La puntuación de los vinos se hizo por bloques (Fase Visual, Fase Olfativa, Fase en Boca, Impresión General) aplicándoles el tratamiento estadístico correspondiente.

La puntuación total de los vinos se analizó mediante un test de comparación de medianas.

Los vinos sólo presentaron diferencias significativas en la fase olfativa, destacando el vino tratado con la Enzima 1 a dosis 4 g/100 kg de uva como el mejor valorado por los catadores, en esta fase. Para los demás bloques no se encontraron diferencias significativas.

En la imagen, detalle de la cata a ciegas. La mayor diferencia apreciada por los catadores fue el aroma.



CONCLUSIONES FINALES

La adición de enzimas de color al mosto no influye en la dinámica fermentativa del mismo.

El **rendimiento de transformación**, medido como relación entre los litros de vino por kg de pasta después de prensado, es **considerablemente superior con el uso de cualquier enzima de color frente al testigo**. Aproximadamente resulta un 20% mayor que la variante testigo e incluso llegando a ser de casi un 30% mayor con la variante Enzima 3.

Con respecto a los **parámetros básicos del vino**, en todas las variantes **no hay diferencias significativas ni destacables entre ellas**. Lo más reseñable es que la Enzima 2 es más potasófila que las otras enzimas de color.

Con carácter general se observa que los **parámetros de color** van evolucionando de forma diferente entre variantes y muestran diferencias significativas prácticamente en todos los momentos de análisis y para casi todos los parámetros de color.

Se puede destacar lo siguiente:

- IPT, DO420, DO520, DO620, intensidad colorante y tonalidad: muestran diferencias significativas entre tratamientos básicamente hasta los 3 meses finalizada la FML pero no 7 meses después de FML.
- Antocianos e IIA: muestra diferencias significativas entre tratamientos hasta los 7 meses finalizada la FML. El contenido en antocianos es superior en Enzima 1, en ambas dosis, y el IIA es más alto en Enzima 3 y Enzima 1 frente a Enzima 2 y testigo.
- En catequinas, no hay diferencias significativas en ningún momento del análisis para las diferentes dosis de tratamiento.
- En **cata**, no hay diferencias significativas entre las variantes en ninguna de las fases organolépticas excepto en la fase olfativa en la que se muestran dos grupos de significación definidos siendo el vino mejor valorado por los cataadores el correspondiente a la variante Enzima 1.

En la **valoración final** no hay diferencias significativas entre variantes.

- El **testigo** es considerado menos aromático, más plano, ligero en boca y menos tánico.
- En los **vinos con la Enzima 3** (dosis 3 y 4 g/l), se diferencia amargor y astringencia secante en boca. En los **vinos con la Enzima 2** (dosis 3 y 4 g/l), se destaca mayor carnosidad, persistencia y tanino redondo en boca. Los **vinos con la Enzima 1** (dosis 3 y 4 g/l) son menos aromáticos que en el caso de las otras enzimas, pero son más redondos, carnosos y largos, con mayor potencia que con la Enzima 2.



“Resultados positivos de tratamiento enzimático con productos de nueva generación, que mejoran el rendimiento sin influir en la dinámica fermentativa del mosto. Se obtienen vinos aromáticos y con más color.”