

NOVEDADES

❖ El Institute of **Masters of Wine** y **Lallemand** se complacen en anunciar que Cath Oates de Mount Barker, en Australia Occidental, ha ganado la **Beca Lallemand 2014**. Creada en 2010, la beca se ofrece a estudiantes en el programa de estudio del Instituto. Excepcionalmente, este año la beca comprende una participación totalmente financiada en el VIII simposio internacional del Instituto en Italia. «Estoy absolutamente entusiasmada de recibir la beca Lallemand para asistir al simposio de MW en Florencia. Para una Australiana que trabaja en una región relativamente remota, no podría haber una mejor manera de terminar la que ya ha sido una maravillosa cosecha 2014», declaró Cath Oates.

Cath Oakes aseguró la beca con un ensayo de unas 1000 palabras sobre el siguiente tema: *En el contexto de las tendencias actuales del mercado, discutir qué prácticas vitícolas puede emplear un viticultor que influyan en el perfil aromático, y por qué lo quería hacer así?*



WINEMAKING UPDATE

**WINEMAKING UPDATE** (actualización en la elaboración de vinos) es una publicación de Lallemand Inc. Su finalidad es informar a enólogos y al staff responsable de la elaboración de vinos, acerca de las novedades y sugerencias resultantes de las investigaciones. Para solicitar publicaciones anteriores o enviar sus preguntas o comentarios, contáctenos en : Lallferm S.A. Silvana Gimenez Rodriguez Peña 2163 Fracción C Godoy Cruz Mendoza C.P. 5001 Argentina sgimenez@lallemand.com

La información técnica de **WINEMAKING UPDATE** es fiel y precisa; debido a la gran diversidad de situaciones operativas, todos los consejos y advertencias son presentados sin ninguna garantía ni compromiso formal. Los productos Lallemand se encuentran disponibles gracias a una amplia red de distribución. Para encontrar su distribuidor local, contáctenos a la siguiente dirección.

# Bacterias enológicas seleccionadas: Cómo prevenir el contenido de fenoles volátiles y el crecimiento de *Brettanomyces*

**D**urante el proceso de vinificación, ciertos factores pueden influenciar la calidad del vino, desde la viticultura y las condiciones de la cosecha, el proceso de fermentación, el envejecimiento en las barricas, el embotellado, hasta la higiene en bodega. El cambio climático influye en la calidad de las uvas, los niveles de azúcar y el pH, y, en consecuencia, las condiciones de vinificación deben adaptarse. La presencia de microorganismos también se modifica ya que las uvas con mayores niveles de azúcares y pH más alto influyen la levadura y las bacterias presentes. Las interacciones entre estos microorganismos son muy complejas y los enólogos buscan un mayor control de la microbiota para evitar problemas durante la fermentación alcohólica y maloláctica. *Brettanomyces* es una de las levaduras afectadas, ya que prefiere un pH más alto para desarrollarse. Por ser un microorganismo oportunista, es bastante tolerante al sulfuroso (Edwards 2011). Como *Brettanomyces* es un organismo contaminante, debe ser controlado. Esta edición de *Winemaking Update* explorará una vía natural para el control de *Brettanomyces* con bacterias enológicas seleccionadas involucradas en la fermentación maloláctica.

## 1. *Brettanomyces* – un reincidente

Las levaduras *Brettanomyces/Dekkera* son microorganismos contaminantes del vino bien conocidos, pues pueden ser responsables de daños considerables a la calidad del vino, desde su opacidad hasta la formación de compuestos odorantes no deseables como los fenoles volátiles descritos como responsables de aroma a medicamento, tirita, a establo ó a sudor de caballo (Fugelsang et al. 1993 y Heresztyn 1986). El control de

los precursores de los fenoles volátiles y del crecimiento de esta levadura contaminante en la bodega no es tarea fácil, ya que pueden desarrollarse en condiciones difíciles, (altos contenidos de alcohol, de pH y de SO<sub>2</sub>, bajos niveles de nitrógeno, etc.), como también durante la crianza. Las *Brettanomyces* se detectan habitualmente después de la fermentación alcohólica (FA) y antes de que ocurra una fermentación maloláctica (FML) espontánea ó durante el envejecimiento en barrica, aunque ya se han aislado *Brettanomyces* en todas las etapas del proceso de vinificación.

## 2. Metabolismo de los fenoles volátiles.

Los aromas indeseables son causados por principalmente por 4-etil guaiacol (4-EG) y 4-ethyl fenol (4-EP). Las concentraciones de los precursores de estos compuestos están influenciadas por muchos factores diferentes, como la variedad de uva, manejo del viñedo, clima (cálido, frío), y las condiciones de vinificación. Estos fenoles volátiles se producen durante la biotransformación por *Brettanomyces* de los ácidos hidroxicinámicos como el ácido *p*-cumárico y el ácido ferúlico. Estos precursores están presentes naturalmente en las uvas tanto en forma ligada (esterificados) como en forma libre. Sólo la forma libre de estos ácidos hidroxicinámicos puede ser utilizada por *Brettanomyces* para transformarlos en 4-EG ó 4-EP. En la transformación de estos ácidos hidroxicinámicos (la forma libre) en fenoles volátiles interviene en primer lugar una enzima cinamato descarboxilasa, seguida de una enzima vinil fenol reductasa (figura 2).

Como se ha mencionado anteriormente, y mostrado en un estudio de Schopp et al.(2013), *Brettanomyces bruxellensis* solo



Figura 1. Etapas cruciales de la vinificación en las que se detectan *Brettanomyces* con mayor frecuencia

puede metabolizar la forma libre de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico. Si la forma ligada (ó esterificada) de estos ácidos hidroxicinámicos, como ácido cutárico ó ácido fetárico se convierten en forma libre (ácidos cumárico ó ferúlico), entonces se entiende que hay más precursores presentes en el vino para la producción de 4-EP y 4-EG por *B. bruxellensis*. De esta forma, sería deseable prevenir la conversión de ácidos hidroxicinámicos ligados en sus formas libres para que *Brettanomyces* no tenga sustrato para la producción de vinil

concentración de precursores de fenoles volátiles disponibles para *Brettanomyces*.

### 3. Bacterias enológicas seleccionadas contra *Brettanomyces* : y el ganador es...

El primer paso para controlar las *Brettanomyces* es el seguimiento de unas buenas prácticas enológicas. Como todas son interdependientes, es importante controlar determinados parámetros enológicos tales como: la calidad

seguras, rápidas y completas, combinadas con una estabilización temprana, resultan en un vino más estable en términos de calidad y dejan menos nutrientes residuales con los que las levaduras contaminantes puedan alimentarse y desarrollarse.

### 3.2 Previendo la presencia de precursores de fenoles volátiles.

Idealmente, la no presencia de precursores en el vino no permitiría la producción de los compuestos aromáticos EG y EF. Teniendo esto en mente, un estudio conducido por Osborne et al. (2012) se centró en las bacterias enológicas seleccionadas (*O. oeni* y *L. plantarum*) y su capacidad de degradar ácidos hidroxicinámicos esterificados en vino (la forma ligada de los ácidos hidroxicinámicos), en las formas libres. Los ensayos se llevaron a cabo en un vino de Pinot Noir inoculado con bacterias enológicas seleccionadas. Los niveles ácidos hidroxicinámicos (ligados y libres) fueron analizados después de FML. Los cambios en la concentración de los ácidos hidroxicinámicos indicaban si la bacteria puede o no degradar la forma ligada. Encontraron que algunas bacterias (resultados no mostrados) tenían la capacidad de transformar el ácido cutárico (forma ligada) en ácido *p*-cumárico, y consecuentemente aumentar el nivel de la forma libre, precursor de la producción de fenoles volátiles por *Brettanomyces*. Este estudio trae una nueva luz en el conocimiento de la ruta metabólica de ciertas cepas de *O. oeni* que poseen el enzima cinamil esterasa y pueden degradar ácido cutárico en ácido cumárico.

Siguiendo esta experiencia, un nuevo estudio fué realizado para caracterizar nuestras bacterias enológicas seleccionadas y ver si poseían la capacidad de transformar ácidos hidroxicinámicos ligados en su forma libre. Los resultados mostrados en la Tabla 1 muestran que no había cambio en la concentración de ácidos hidroxicinámicos (libres y ligados) en los vinos inoculados con las bacterias *O. oeni* seleccionadas PN4, O-MEGA y BETA, así como la cepa de *L. plantarum* V22 comparando con el vino control sin FML.

Con este estudio, hemos mostrado que nuestras bacterias enológicas seleccionadas PN4, BETA, VP41, ALPHA, V22 y O-MEGA (una nueva selección de Lallemand y el Institut Français de la Vigne et du Vin [IFV]) no pueden degradar los ácidos hidroxicinámicos ligados (como el ácido cutárico) para formar precursores de fenoles volátiles (como el ácido *p*-cumárico) que podría ser utilizado por *Brettanomyces* para producir aromas indeseables. Esto lleva a la conclusión que nuestras

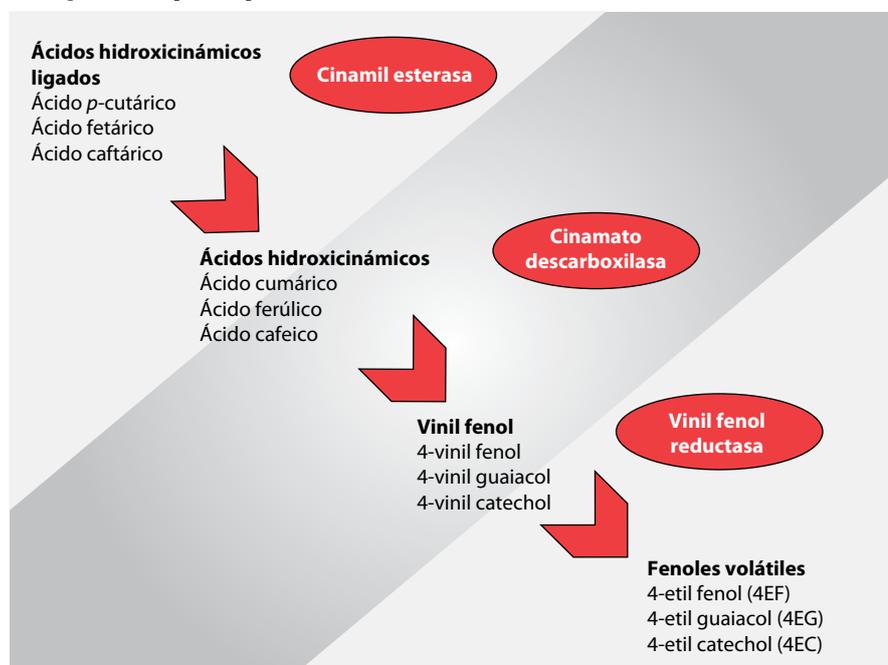


Figura 2. Producción de etil fenoles

fenoles.

Es interesante notar además que *Brettanomyces* no es el único microorganismo que puede producir fenoles volátiles. Algunas bacterias ácido lácticas como *Pediococcus* y *Lactobacillus* (Couto et al. 2006) son también capaces naturalmente de producir fenoles volátiles a partir de los ácidos cinámicos libres (ácidos *p*-cumárico y ferúlico). Resultados similares fueron obtenidos con algunas cepas de *Lactobacillus plantarum*, en el trabajo de Fras et al. (2014). Esto indica que el control de las poblaciones de bacterias indígenas es un factor importante en la calidad del vino para evitar la producción de compuestos indeseables como los fenoles volátiles.

Un estudio reciente de Burn y Osborne (2013) ha mostrado que ciertas bacterias enológicas de la especie *Oenococcus oeni* pueden metabolizar ácido cutárico (forma ligada) en ácido *p*-cumárico, lo que incrementará la

de la uva, el dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), el pH, la temperatura del vino, los nutrientes, el O<sub>2</sub>, el estado de las barricas y las prácticas enológicas. Una buena higiene en bodega, reducir la fase de latencia entre el final de la fermentación alcohólica e inicio de la fermentación maloláctica, una estabilización temprana del vino, junto con una dosis adecuada de SO<sub>2</sub>, minimiza enormemente el riesgo de contaminaciones microbianas.

Cuando el enólogo desea limitar el desarrollo de *Brettanomyces*, siempre deben considerarse tres factores principales: la presencia de precursores para la formación de fenoles volátiles, el desarrollo de *Brettanomyces* y las condiciones del vino. De estos tres factores, las bacterias enológicas seleccionadas pueden controlar positivamente el desarrollo de *Brettanomyces*.

### 3.1 Condiciones de vinificación

Fermentaciones alcohólicas y malolácticas

	Ácido caftárico	Ácido cutárico	Ácido cafeico	Ácido p-cumárico	Ácido ferúlico
<b>PN4</b>	23,2 ± 0,4	6,6 ± 0,1	2,4 ± 0,2	0,9 ± 0,1	3,5 ± 0,2
<b>O-MEGA</b>	24,1 ± 1,3	6,9 ± 0,4	3,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	3,3 ± ,03
<b>Beta</b>	25,0 ± 2,2	7,0 ± 0,6	2,6 ± 0,5	0,8 ± 0,3	4,2 ± ,05
<b>V22</b>	25,8 ± 1,3	7,1 ± 0,3	2,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	3,8 ± ,01
<b>Testigo</b>	25,1 ± 1,1	6,8 ± 0,5	2,2 ± 0,2	0,9 ± 0,2	4,1 ± ,03

Cuadro 1. Concentración de ácido hidroxicinámico en vinos Pinot Noir cuatro semanas después de la inoculación con varias cepas de bacterias enológicas

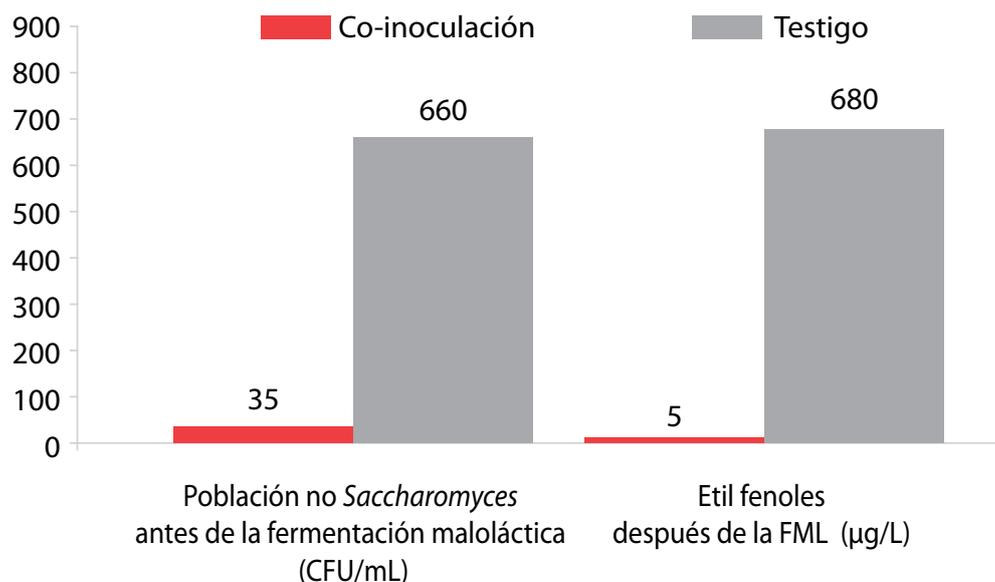


Figura 3. Población microbiana y niveles de etilfenoles en vinos de Cabernet Franc (Francia) durante co-inoculación.

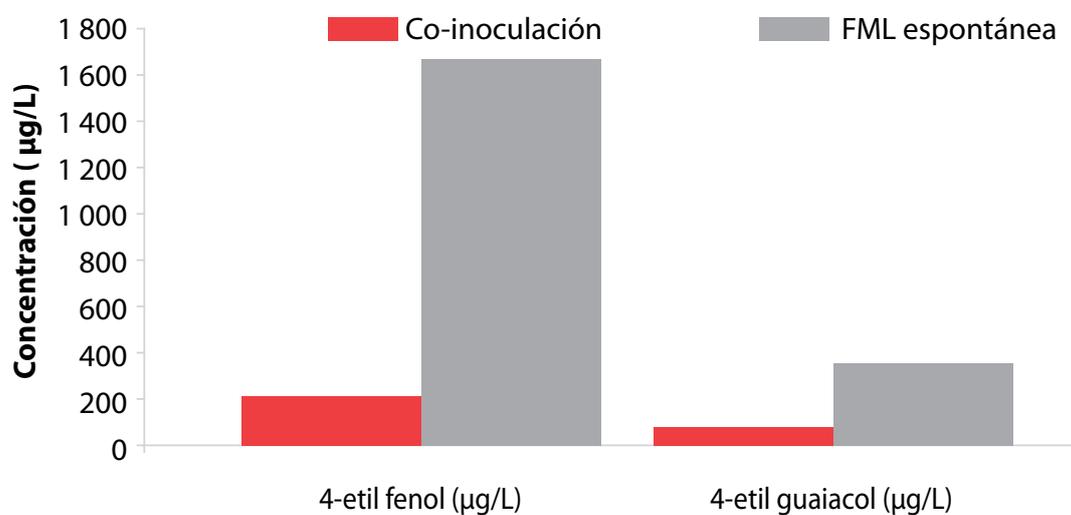


Figura 4. Concentraciones de etil fenol después de la fermentación maloláctica en Cabernet Franc (Francia)

bacterias enológicas seleccionadas no poseen el enzima cinamil esterase, que es capaz de liberar la forma libre de los ácidos hidroxicinámicos (*p*-cumárico, y ferúlico) y son consideradas “fenol negativas”. Varias bacterias enológicas fueron testadas, y Lalvin VP41, PN4, VP41 1-Step, PN4 1-Step, Lalvin 31, Uvaferm Beta, O-Mega resultaron fenol negativas, así como la bacteria enológica *Lactobacillus plantarum* V22.

### 3.3 Evitar el desarrollo de *Brettanomyces* con una fermentación maloláctica segura y rápida

Tanto el inicio rápido de la FA con levadura seleccionada como la nutrición adecuada de la levadura, que aseguran una fermentación sana, son necesarias para prevenir el desarrollo de *Brettanomyces*. Sin embargo, es posible que esto no sea suficiente. El tiempo transcurrido entre la FA y la FML es una etapa idónea para el desarrollo de *Brettanomyces*: el vino no está protegido por el SO<sub>2</sub>, todavía hay algunos nutrientes disponibles y la competencia con otros microorganismos del vino es casi nula, pues la levadura ha terminado la fermentación y esta muriendo, y las bacterias aún no se activan. La inoculación temprana con bacterias enológicas, ya sea justo después de la FA ó en co-inoculación (24 horas después de la inoculación de la levadura), ha mostrado ser una práctica eficaz para la prevención del

desarrollo de *Brettanomyces*. En un estudio realizado por Pillet et al. (2011), se mostró en un Cabernet Franc de Gironde, Francia, que después de la co-inoculación con Uvaferm Beta, la FML transcurrió suavemente, pero lo que es aún más importante, como se muestra en la figura 3, la concentración de levadura no-*Saccharomyces* (identificada luego como *Brettanomyces*) era bastante inferior en el vino co-inoculado. Durante esta prueba, la co-inoculación impidió el desarrollo de *Brettanomyces* y, por lo tanto, la producción de fenoles volátiles.

En una experiencia similar, cuando la co-inoculación fue realizada en Cabernet Franc (esta vez con Languedoc-Roussillon, Francia), resultó otra vez en vinos con menor concentración de etil guayacol y etil fenole que en los vinos con FML espontánea. Se puede observar que la concentración de 4-etil fenol es ocho veces más alta si se la compara con el vino co-inoculado y que su nivel de 4-etil guayacol es cuatro veces mayor.

No sólo la co-inoculación ayuda a prevenir el desarrollo de *Brettanomyces*, la inoculación temprana o secuencial con bacterias enológicas justo después de la FA previene también la formación de este microorganismo contaminante. En un estudio realizado por Gerbeaux et al (2009), con un Pinot Noir de Borgoña, se demostró en pruebas de laboratorio y en

bodega que la inoculación temprana con bacteria enológica, inmediatamente después de la FA, era útil para controlar la proliferación de *Brettanomyces*. Puesto que los parámetros enológicos del vino como el pH y la temperatura pueden incidir en el arranque y el proceso de FML, el riesgo de producción de fenoles volátiles puede aumentar. La inoculación con bacterias enológicas seleccionadas es deseable porque estos parámetros pueden ser nocivos para la FML espontánea y exponer al vino, innecesariamente, a *Brettanomyces* durante este periodo. Los resultados que aparecen en la tabla 2 muestran que los vinos inoculados con dos bacterias distintas arrancan la FML mucho más temprano, con un periodo más corto y concentraciones de fenoles volátiles más bajas. Las pruebas se efectuaron en dos temperaturas diferentes en bodega y fueron comparadas con la FML espontánea. Con toda certeza, cuanto más grande es el riesgo de desarrollo de *Brettanomyces*, más temprano el vino debería ser inoculado con bacterias enológicas.

	BODEGA REGULADA A 18 -19 °C			BODEGA REGULADA A 14 -15 °C		
	Testigo*	Bacteria 1	Bacteria 2	Testigo*	Bacteria 1	Bacteria 2
Tiempo necesario para FML (días)	58	16	13	124	31	27
Concentraciones de fenoles volátiles (µg/L)						
4-etilguayacol	404	8	7	551	20	15
4-etilfenol	870	17	9	1119	46	32
Las puntuaciones medias de análisis sensorial (en una escala del 1 al 10)						
Calidad visual	5,6	6,0	6,0	6,0	5,1	5,1
Calidad aromática	3,8	5,1	4,7	3,4	4,8	5,0
Calidad del sabor	3,8	4,9	4,3	3,5	4,9	4,5
Calidad general	3,4	4,7	4,3	3,5	4,9	4,5
Intensidad del gusto de establo ó a sudor de caballo	3,8	0,7	0,9	4,4	0,4	1,0

\* No inoculado con bacteria enológica

Cuadro 2. Producción de fenoles volátiles en vinos Pinot Noir (Borgoña, Francia) inoculados con bacterias enológicas comparando con fermentación espontánea.

## EN RESUMEN...

Los enólogos disponen ahora de más información sobre la mejor manera de prevenir –e incluso evitar– *Brettanomyces* en vinos. La inoculación con bacterias enológicas seleccionadas y una fermentación maloláctica rápida resultan ser un medio eficaz de controlar la contaminación. Se sabe que la inoculación del vino con bacterias enológicas seleccionadas a >10<sup>6</sup> células/mL detendrá el crecimiento de esta levadura contaminante. El manejo de las condiciones de vinificación por medio de la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica es un buen punto de partida para evitar el desarrollo de levaduras y bacterias contaminantes. Además, la elección adecuada de la bacteria seleccionada es muy importante para evitar la producción del ácido *p*-cumárico, un ácido hidroxicinámico, precursor de la producción de etilfenoles volátiles por parte de *Brettanomyces*. Las bacterias enológicas de Lallemand, incluso O-MEGA, PN4, Beta, Alpha, VP41, V22 y L31, no producirán este precursor. Son fenol negativas. Estrategias de inoculación adecuadas, tales como la co-inoculación, la inoculación temprana ó secuencial inmediatamente después de la FA, resultan ser herramientas eficaces para prevenir el desarrollo de *Brettanomyces*. Y ahora la opción de inocular con bacterias enológicas fenol negativas es una decisión muy estratégica para proteger los vinos contra los fenoles volátiles.

Para más información sobre este tema, comuníquese con su representante de Lallemand.

Referencias disponibles previa solicitud.