



# Código de buenas prácticas vitivinícolas para evitar o limitar la contaminación por *Brettanomyces*

Mes: Noviembre

Año: 2014

OIV.INT ©

## PREÁMBULO

Entre los procesos que deterioran la calidad del vino, la producción de fenoles volátiles por el género *Brettanomyces* tiene una presencia difundida y es un problema cada vez mayor. Estos compuestos se caracterizan fundamentalmente por producir aromas a tinta o pegamento, a sudor de caballo, a cuero o a establo.

Los fenoles volátiles, principalmente el 4-etilfenol y el 4-etilguayacol, se forman a partir del ácido p-cumárico y del ácido ferúlico respectivamente, tras la descarboxilación enzimática (cinamato descarboxilasa, PAD) y la reducción enzimática (vinilfenol reductasa, VPR). Estos precursores están presentes de modo natural en los mostos de uva. La etapa de descarboxilación, causada por la actividad cinamato-decarboxilasa (PAD), ha sido descrita en muchas especies de bacterias, levaduras y hongos, mientras que la etapa de reducción, causada por la actividad vinilfenol reductasa o VPR, se considera más específica de los géneros *Brettanomyces/Dekkera*.

Dado que las levaduras del género *Brettanomyces* están presentes en la uva y en los equipos de vinificación, el mosto de uva se puede contaminar en estadios tempranos. Sin embargo, estas levaduras generalmente proliferan después de las fermentaciones alcohólicas y/o malolácticas, durante la crianza del vino o después del embalaje.

---

## **ÍNDICE DE CONTENIDOS**

<b>1. INTERVENCIONES EN EL VIÑEDO .....</b>	<b>3</b>
<b>2. INTERVENCIONES DURANTE LA VENDIMIA .....</b>	<b>4</b>
<b>3. INTERVENCIONES EN LA BODEGA .....</b>	<b>5</b>
3.1. Operaciones y tratamientos prefermentativos .....	5
3.2. Operaciones de fermentación .....	5
3.3. Operaciones de crianza y clarificación .....	7
3.4. Crianza en madera .....	8
3.5. Operaciones previas al embalaje .....	10
3.6. Condiciones de conservación .....	10
<b>4. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>11</b>

## **1. INTERVENCIONES EN EL VIÑEDO**

No se aplican (según sabemos, no hay estudios disponibles al respecto). Sin embargo, las levaduras del género *Brettanomyces* se detectan en los hollejos de la uva desde las primeras etapas de desarrollo de la baya. La ecología microbiana de la superficie de la uva mostró una gran diversidad con pequeñas poblaciones para cada especie (Renouf et al. 2007).

Un primer enfoque preventivo podría consistir en la estricta selección de las uvas sanas como una vía importante en la disminución del riesgo de *Brettanomyces*, que están generalmente más presentes en las uvas podridas.

## 2. INTERVENCIONES DURANTE LA VENDIMIA

Manejo de la uva:

Las levaduras del género *Brettanomyces* presentes en la uva no representan la principal especie de levadura (población pequeña). Sin embargo, eliminar uvas podridas podría limitar la alteración por *Brettanomyces*.

La cosecha tardía de uvas es cada vez más frecuente; en dicho caso, se deberían tener en consideración precauciones especiales. Las aportaciones organolépticas son interesantes, pero esto incrementa el riesgo de producción de fenoles volátiles, ya que las uvas sobremaduras contienen más precursores de fenoles volátiles. Trabajar en estas condiciones no incrementa necesariamente la presencia de *Brettanomyces*, pero aumenta el riesgo de actividad (menor acidez total, pH más elevado que impacta directamente en el nivel de SO<sub>2</sub> molecular y por ende en el crecimiento de las levaduras del género *Brettanomyces*).

### 3. INTERVENCIONES EN LA BODEGA

Como consecuencia de varios factores, como el incremento de la graduación alcohólica, se observa una disminución de la diversidad microbiana en el proceso de fermentación alcohólica. Sin embargo, como *Brettanomyces* tiene una buena resistencia al etanol, su presencia no disminuye, por lo tanto es esencial una higiene perfecta en la elaboración del vino (uvas sanas, equipo de vinificación y de almacenamiento, etc.).

#### 3.1. Operaciones y tratamientos prefermentativos

- Se recomienda garantizar que se apliquen adecuadas prácticas de higiene en la bodega.
- Los factores más importantes son el sulfitado y la temperatura:
  - el sulfitado es la acción preventiva más eficaz en la fase de prefermentación a la hora de limitar el desarrollo de poblaciones de *Brettanomyces*. No obstante, se recomienda evitar el sulfitado excesivo (>8 g/hL), ya que podría conllevar retrasos en la fermentación maloláctica,
  - una maceración prefermentativa a alta temperatura (por encima de los 65 °C) permite la inactivación de las levaduras del género *Brettanomyces* y de otros microorganismos en la vinificación. La maceración en frío, a una temperatura cercana o por debajo de los 10°C, evita su proliferación pero no las mata.
- En cualquier caso, sigue siendo posible una contaminación posterior.

#### 3.2. Operaciones de fermentación

Fermentación alcohólica (FA):

- Durante la FA, la diversidad microbiana disminuye y *Saccharomyces cerevisiae* se convierte en la especie principal. Sin embargo, el género *Brettanomyces*, debido a su resistencia al etanol y a su baja necesidad de nutrientes, puede crecer a medida que la FA ralentiza o termina. Se deberán poner en funcionamiento las prácticas enológicas comúnmente recomendadas para el manejo de la fermentación alcohólica.
- La inoculación de mostos con levaduras seleccionadas contribuye a una FA más fiable.
- El medio se hace más propenso a la multiplicación de *Brettanomyces* en caso de ralentización o parada de la fermentación alcohólica. En tal caso, se recomienda poner en práctica cuanto antes un procedimiento de reinicio de la fermentación alcohólica.
- Los azúcares residuales (principalmente glucosa y fructosa) son sustratos para el crecimiento de *Brettanomyces*. Los vinos son usualmente considerados como secos cuando el nivel de azúcar es inferior a 4 g/L. Para la proliferación de biomasa de *Brettanomyces* basta con una concentración de 0,3 g/L de azúcares residuales. Dicha biomasa puede llegar a producir fenoles volátiles en una concentración que supera los 1 000 µg/L.
- Solo se deberán añadir nutrientes a las levaduras (que también podrían beneficiar a las levaduras del género *Brettanomyces*) en caso de que sea totalmente necesario para evitar que una fermentación se detenga.

Período de latencia antes de la fermentación maloláctica (FML):

- Al completarse la FA, las condiciones favorecerán tanto a las bacterias lácticas como a las *Brettanomyces*, a pesar de que la proliferación de estas continuará siendo lenta.
- Es importante hacer un seguimiento de la población de *Brettanomyces*, ya que el medio es relativamente pobre en microorganismos.
- Los factores favorables al desarrollo de *Brettanomyces* en esta fase son: las maceraciones finales a temperaturas altas (40-45 °C), la microoxigenación y la liberación de azúcares en el caso de uvas no estrujadas.
- La coinoculación de las levaduras seleccionadas y de las bacterias lácticas seleccionadas puede ayudar a disminuir el período de latencia existente entre la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica, y por consiguiente el desarrollo de *Brettanomyces*.

Fermentación maloláctica (FML):

- Los parámetros fisicoquímicos (pH, temperatura, SO<sub>2</sub> total) afectan a la progresión de la FML. Si esta se retrasa, el riesgo de producción de fenoles volátiles aumenta ya que las levaduras del género *Brettanomyces* podrán utilizar dicho intervalo de tiempo para multiplicarse.
- El uso de iniciadores malolácticos es una buena manera de limitar el desarrollo de *Brettanomyces*. Algunos estudios indican que la coinoculación o la inoculación secuencial temprana evitan la contaminación por *Brettanomyces* al reducir el período de latencia entre la FA y la FML.
- Después de la fermentación maloláctica, se recomienda eliminar todos los microorganismos, principalmente añadiendo SO<sub>2</sub> puro o en combinación con DMDC para obtener un efecto sinérgico (Renouf *et al.*, 2008). Las cantidades a añadir deberán ajustarse en función del pH del vino.

### 3.3. Operaciones de crianza y clarificación

La primera medida preventiva indispensable es realizar un análisis microbiológico que determine el número exacto de *Brettanomyces*. Este análisis debe repetirse en el período de crianza.

- El manejo del SO<sub>2</sub> es crucial para limitar el desarrollo de *Brettanomyces*. La dosis recomendada es de entre 0,5 y 0,8 mg/L de SO<sub>2</sub> molecular<sup>1</sup>.
- El envejecimiento sobre lías es un factor de riesgo adicional, ya que las levaduras del género *Brettanomyces* tienen una capacidad considerable para sobrevivir y proliferar en las lías (que liberan nutrientes en el vino).
- La clarificación mediante trasiego, aclarado y filtración es crucial a la hora de reducir las poblaciones viables y viables pero no cultivables de *Brettanomyces*, que pueden multiplicarse al metabolizar los azúcares residuales.
- Algunos agentes de clarificación son más efectivos que otros. El tratamiento con proteínas clarificantes puede reducir las poblaciones en un rango comprendido entre 40 y 2 000 veces. La clarificación con caseína o caseinato de potasio podría reducir los niveles de etilfenol, si estos no son demasiado altos.

---

<sup>1</sup> El producto final deberá cumplir con las regulaciones vigentes aplicables con respecto a los límites de SO<sub>2</sub> total.

- La adición de quitosano es una alternativa a la hora de controlar la proliferación de microorganismos indeseables, principalmente las levaduras del género *Brettanomyces*.
- Algunas operaciones de vinificación (trasiego, llenado, filtrado, embotellado, etc.) podrían provocar una disolución del oxígeno en el vino, lo que favorece la proliferación de *Brettanomyces*.
- Si se lleva a cabo un proceso de microoxigenación, se deberá verificar la ausencia de *Brettanomyces* a través de un análisis apropiado.

Nota:

1. Al añadir el SO<sub>2</sub>, la población de *Brettanomyces* puede pasar (total o parcialmente) de un estado viable a un estado viable no cultivable (VNC). Estos cambios implican una reducción del tamaño de las levaduras, por lo que se hace necesario adaptar la filtración.
2. También es importante señalar que el recuento del VNC no puede ser realizado a través de un análisis de rutina como el recuento en placas de Petri, sino por PCR cuantitativa o citometría de flujo con hibridación in situ, que contabiliza de manera indiferente las formas viables y VNC de *Brettanomyces*.

### 3.4. Crianza en madera

La crianza en madera se considera el período más sensible de alteración por *Brettanomyces*.

Durante el muestreo se debe, evitar las contaminaciones cruzadas.

Para evitar la degradación microbiana, el vino que se utilice para el llenado no deberá estar contaminado. La madera favorece el desarrollo de *Brettanomyces*, que pueden utilizar la celobiosa como fuente de carbono. Las barricas son difíciles de limpiar y desinfectar.

Las barricas usadas y mal limpiadas son una fuente conocida de contaminación por *Brettanomyces*. No obstante, las barricas nuevas también favorecen la multiplicación de la levadura y el desarrollo de fenoles volátiles, debido a que estos liberan más nutrientes. Además, las barricas nuevas son más permeables al O<sub>2</sub>, con lo que se favorece una posible oxidación-reducción relativamente alta y se disminuye la

concentración de SO<sub>2</sub> (activo o molecular), dos parámetros favorables al desarrollo de *Brettanomyces*.

Se han estudiado varios enfoques para la higienización de las barricas, pero ninguno de ellos permitió la eliminación por completo de *Brettanomyces* en la superficie interior de las duelas o en la boca de la barrica. De hecho, la microporosidad natural de la madera complica su desinfección total, ya que los microorganismos permanecen vivos en las cavidades de las capas inferiores de la madera. El tratamiento es esencial y debe actuar en profundidad en aras de una eficacia persistente y un resultado en el tiempo.

Sin embargo, algunas técnicas de desinfección de las barricas reducen de manera significativa las poblaciones de *Brettanomyces* y podrían utilizarse en caso de que las legislaciones del país en cuestión lo permitieran, como por ejemplo:

- tratamiento con vapor: la desinfección total requiere un período de tratamiento, que sea lo suficientemente largo (enjuague con agua fría, enjuague con agua caliente a 70 °C y vapor de baja presión durante 10 minutos),
- esterilización con ozono: ozono gaseoso combinado con un tratamiento de agua caliente a 82 °C durante 20 minutos o con agua ozonizada. Al reaccionar los materiales con una carga orgánica elevada, el ozono no penetra en la madera en profundidad,
- esterilización con SO<sub>2</sub>: se debe utilizar un mínimo de 5 g de SO<sub>2</sub> por barrica para desinfectar las barricas vacías y secas. El SO<sub>2</sub> es muy eficaz en la superficie y también en profundidad, ya que penetra en los primeros milímetros de madera,
- cepillado/fresado y tostado de barricas: este tratamiento no desinfecta la madera pero elimina la fracción más contaminada. El cepillado/fresado y tostado conllevan una disminución del 80 % de fenoles volátiles en comparación con una barrica no tratada,
- ultrasonido: esta técnica elimina más del 90% de las levaduras del género *Brettanomyces* viables (hasta 2-4 mm bajo la superficie interior de la duela).

### 3.5. Operaciones previas al embalaje

El riesgo de producción de fenoles volátiles debe ser evaluado antes de las operaciones de embalaje mediante controles analíticos (tanto químicos como microbiológicos). Cuando el riesgo ha sido evaluado, se deben diseñar operaciones adecuadas para prevenir el desarrollo de *Brettanomyces* después del embalaje:

- esterilización por filtración por membrana (0,45 a 1  $\mu\text{m}$ ) o filtración tangencial, para una eliminación eficaz de levaduras del género *Brettanomyces* seguido de un embalaje estéril,
- uso de DMDC para ofrecer una protección no persistente,
- uso de productos químicos antimicrobianos de protección persistente (ácido sórbico, solo si se han eliminado por completo las bacterias lácticas, manejo del  $\text{SO}_2$  tomando en consideración el pH, etc.),
- tratamiento térmico

### 3.6. Condiciones de conservación

Para evitar la proliferación de *Brettanomyces* en las botellas durante la conservación (y en consecuencia, la producción de fenoles volátiles), se recomienda mantener las botellas a una temperatura inferior a 12 °C, especialmente para los vinos con poco nivel de filtración o vinos que contienen un bajo nivel de  $\text{SO}_2$ .

#### **4. CONCLUSIÓN**

- Se recomienda realizar análisis frecuentes para detectar con antelación cualquier contaminación por *Brettanomyces*. En el proceso de muestreo, se deberá ser extremadamente cauteloso para evitar las contaminaciones cruzadas.
- Se recomienda especialmente la mejor higiene posible en la bodega.
- El manejo del sulfitado.
- El manejo de las temperaturas.
- Es preferible aplicar acciones preventivas antes que procesos correctivos.
- Estas recomendaciones se basan en el conocimiento actual y están sujetas a actualizaciones de acuerdo con las investigaciones en curso.