



**INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE VINIFICACIÓN Y LAS BACTERIAS
LÁCTICAS SOBRE LA FORMACIÓN DE CARBAMATO DE ETILO**
Silvana Verónica Romero Tissera

ISBN: 978-84-693-7663-8
Dipòsit Legal: T-1745-2010

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Silvana Verónica Romero Tissera

**INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE VINIFICACIÓN
Y LAS BACTERIAS LÁCTICAS
SOBRE LA FORMACIÓN DE CARBAMATO DE ETILO**

TESIS DOCTORAL

Dirigida por la Doctora M. Carme Masqué i Tell y
el Doctor Albert Bordons de Porrata-Doria

Departament de Bioquímica i Biotecnologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE VINIFICACIÓN Y LAS BACTERIAS LÁCTICAS SOBRE LA FORMACIÓN
DE CARBAMATO DE ETILO
Silvana Verónica Romero Tissera
ISBN:978-84-693-7663-8/DL:T-1745-2010



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Departament de Bioquímica i Biotecnologia

Facultat d'Enologia
Campus Sescelades, URV
C. Marcel·lí Domingo, s/n, E-43007 Tarragona
Tel. +34 977 55 80 43
Fax +34 977 55 82 32

El Dr. Albert Bordons de Porrata-Doria, professor del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili, i la Dra. M. Carme Masqué Tell, tècnica investigadora de l'Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI)

CERTIFIQUEM

que aquest treball, titulat "**Influencia de las condiciones de vinificación y las bacterias lácticas sobre la formación de carbamato de etilo**", que presenta **Silvana Verónica Romero Tissera** per a l'obtenció del títol de Doctora, ha estat realitzat sota la nostra direcció al Departament de Bioquímica i Biotecnologia d'aquesta universitat.

Tarragona, 24 de maig de 2010

Albert Bordons de Porrata-Doria

M. Carme Masqué Tell

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE VINIFICACIÓN Y LAS BACTERIAS LÁCTICAS SOBRE LA FORMACIÓN
DE CARBAMATO DE ETILO
Silvana Verónica Romero Tissera
ISBN:978-84-693-7663-8/DL:T-1745-2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE VINIFICACIÓN Y LAS BACTERIAS LÁCTICAS SOBRE LA FORMACIÓN
DE CARBAMATO DE ETILO
Silvana Verónica Romero Tissera
ISBN:978-84-693-7663-8/DL:T-1745-2010

La verdadera sabiduría está en reconocer la propia ignorancia.

Sócrates.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE VINIFICACIÓN Y LAS BACTERIAS LÁCTICAS SOBRE LA FORMACIÓN
DE CARBAMATO DE ETILO
Silvana Verónica Romero Tissera
ISBN:978-84-693-7663-8/DL:T-1745-2010

La presente tesis se ha realizado con el apoyo de una beca predoctoral de formación de investigadores (FI) concedida por el Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació (DURSI) de la Generalitat de Catalunya. También se ha contado con la ayuda del proyecto de investigación financiado AGL2000-0827-C02-02 del Plan Nacional de I+D del Ministerio de Ciencia y Tecnología y de la empresa Lallemand BIO, S.L. La obtención de estas ayudas ha hecho posible la consecución de este trabajo.

Quiero agradecer a todas las personas que me han ayudado a lograr hacer realidad esta tesis.

En primer lugar, a mis directores de tesis. A Albert Bordons, la primera cara que conocí en la Universitat Rovira i Virgili, quien me habló de las lácticas y del trabajo de su grupo de investigación con tanta pasión que no me quedó ninguna duda del objeto de mi investigación. Gracias por ayudarme a comenzar esta historia y ponerme en contacto con Carme Masqué y el INCAVI. A M. Carme Masqué, que me enseñó los primeros pasos en el mundo de la investigación, los secretos prácticos de las bacterias lácticas y la microbiología enológica, confió en mí para las tareas diarias de un laboratorio enológico y siempre ha estado pendiente para solucionar cualquier problema. Muchas gracias.

A Jordi Rusell, del Departamento de Química Analítica y Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universitat Rovira i Virgili, que fue muy accesible y atento a la hora de ayudarme a despejar algunas dudas en la comprobación de la trazabilidad de algunos métodos aquí utilizados.

A todos los que me han inculcado los valores y me han dado las herramientas, tanto prácticas como humanas, que me han permitido llevar esta tesis a término. A los que aún siguen a mi lado y a los que, por una u otras razones, ya no forman parte de mi vida. A los que me enseñaron a ser perseverante, a remar más fuerte cuando la marea es más grande y a no desistir ante el cansancio o las dificultades. Entre ellos, principalmente, y con especial cariño, enaltecido quizás por la distancia, a mis padres, a quienes dedico este trabajo. A Efrain, por tu paciencia, sé lo orgulloso y contento que te sientes al ver al fin culminado este proyecto. A mis amigos, que me ayudaron a despejarme, a lidiar con ordenadores o impresoras en su momento, y con comas en otros. A Isabel, gracias por compartir tantos buenos ratos conmigo, esas comidas entre bodega y bodega, por los consejitos para la tesis y, principalmente, por tu

amistad. A Miguel, por ayudarme a pensar cuando el SPSS inutilizaba mis neuronas, por tu inestimable ayuda en las correcciones finales, por esas benditas comas y por estar ahí en aquellos malos momentos. Gracias por estar siempre ahí.

A todos mis compañeros, algunos hoy grandes amigos, en el INCAVI. A la gente de Reus, Carmen, Marta, Sandra, Gemma, Nuria, Albert, Xon, María, Xoan (y más eventuales compañeros que aquí olvido) con quienes compartí trabajo diario, estrés con la OTA, pipetas, turnos de espera para usar el espectrofotómetro y muchas risas y buenos momentos. A la gente de Vilafranca del Penedès, Paola, Anna, Enric, Eva, Alexia, Ainhoa, Fina, Vero, Oscar, Carme, Lluís, Marga, Concepció, Salvador y, especialmente, a Santiago Minguez, Joan García, por permitirme realizar en la Estación Enológica de Vilafranca del Penedés y su laboratorio parte de las analíticas necesarias para completar esta tesis, y Rosó Franquet, quien me enseñó a familiarizarme con el carbamato de etilo y con un gascromatógrafo y con quién compartí muchos buenos momentos.

A la gente de Lallemand que ayudó no sólo económicamente a la consecución de este trabajo. A Antonio Palacios y Sibylle Krieger que me enseñaron más secretos de las lácticas y compartieron abiertamente conmigo sus conocimientos.

En fin, a todos los que ayudaron a que este camino que finalmente llega a su fin haya sido más fácil y placido con su ayuda y al formar parte de mi vida.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE VINIFICACIÓN Y LAS BACTERIAS LÁCTICAS SOBRE LA FORMACIÓN
DE CARBAMATO DE ETILO
Silvana Verónica Romero Tissera
ISBN:978-84-693-7663-8/DL:T-1745-2010

A mis padres

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE VINIFICACIÓN Y LAS BACTERIAS LÁCTICAS SOBRE LA FORMACIÓN
DE CARBAMATO DE ETILO
Silvana Verónica Romero Tissera
ISBN:978-84-693-7663-8/DL:T-1745-2010

ABREVIATURAS

ADI	arginina deiminasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosin 5'trifosfato
<i>B.</i>	<i>Botrytis</i>
BL	bacterias lácticas
CE	carbamato de etilo
cél/mL	células/mililitro
CEP	carbamato de etilo potencial
CK	carbamato quinasa
cm	centímetros
DEDC	dietil dicarbonato
DL	dosis letal
DMSO	dimetilsulfóxido
DO	densidad óptica
<i>et al.</i>	<i>et altri</i>
FA	fermentación alcohólica
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FFA	final de fermentación alcohólica
FFML	final de fermentación maloláctica
FML	fermentación maloláctica
g	gramo
g/kg	gramo/kilogramo
g/L	gramo/litro
GC/EM	cromatografía de gases/espectrometría de masas
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
INCAVI	Institut Català de la Vinya i el Vi
kg	kilogramo
L	litro
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
λ	longitud de onda

<i>Lc.</i>	<i>Leuconostoc</i>
LCBO	Liquor Control Bord of Ontario
µg/Kg	microgramos/kilogramo
µg/L	microgramos/litro
mg/kg	miligramos/kilogramo
mg/L	miligramos/litro
mL	mililitros
mL/L	mililitros/litro
N	Normal
ng/kg	nanogramos/kilogramo
ng/mL	nanogramos/mililitro
nm	nanómetros
NOPA	nitrógeno asimilable por OPA
<i>O.</i>	<i>Oenococcus</i>
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino
OMS	Organización Mundial de la Salud
OTC	ornitina transcarbamilasa
PCR	polymerase chain reaction
ppb	partes por billón
RAPD	random amplified polymorphic DNA
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
TJF	tomato juice factor
ufc/mL	unidades formadoras de colonias por mililitro
(v/v)	volumen/volumen
WHO	World Health Organization

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	1
1.1 Las bacterias lácticas del vino y la fermentación maloláctica	3
1.1.1 Antecedentes históricos	3
1.1.2 Clasificación y características de las bacterias lácticas del vino	4
1.1.3 Aislamiento e identificación	6
1.1.4 Recuento de BL en mosto y vino	8
1.1.5 Ecología	12
1.1.6 Bioquímica de la FML	13
1.1.7 Efectos beneficiosos de la FML	14
a) Disminución de la acidez	14
b) Mejora del perfil organoléptico	14
c) Estabilidad microbiológica	15
1.1.8 Efectos indeseables de la FML	16
1.1.9 Alteraciones durante la FML que pueden afectar a la seguridad alimentaria	16
1.1.10 Control de la FML	19
a) Estimulación de la flora natural	20
b) Inducción de la FML por inoculación con cepas comerciales	20
c) Impedir la FML	25
1.2 El carbamato de etilo	25
1.2.1 Antecedentes	25
1.2.2 Características y usos	26
1.2.3 Toxicidad y carcinogenicidad del CE	28
1.2.4. Origen del CE en los alimentos	30
Pirocarbonato de etilo	30

Ácido cianhídrico	31
Compuestos carbamílicos	32
1.2.5 Influencia de las condiciones de vinificación en la formación del CE	39
1.2.6 Reglamentación	42
2. Objetivos	45
3. Materiales y Métodos	49
3.1 Cepas utilizadas	51
3.2 Cultivo y conservación de cepas	51
3.2.1 Medios de cultivo	51
3.2.2 Soluciones utilizadas	53
3.2.3 Conservación de las cepas	54
3.3 Métodos analíticos	54
3.3.1 Análisis de parámetros enológicos	54
3.3.2 Análisis de CE	56
3.3.3 Análisis del CE potencial	57
3.3.4 Análisis de arginina y de precursores de CE	58
a) Arginina	58
b) Urea	58
c) Citrulina	58
d) Contenido de nitrógeno	59
3.3.5 Control de la población bacteriana	60
a) Recuento de viables/recuento en placa	60
b) Medida de la turbidez	60
c) Recuento de microorganismos por epifluorescencia	60
d) Control de imposición	64
3.4 Procesamiento estadístico de los datos	64

4. Resultados y discusión	65
4.1 Influencia de diferentes condiciones de vinificación sobre la formación de CE	67
4.1.1 Antecedentes	67
4.1.2 Condiciones de vinificación estudiadas	68
4.1.3 Características de las vinificaciones	69
4.1.4 Control de la vinificación	72
4.1.5 Determinación de la población viable	72
4.1.6 Caracterización enológica del vino	76
4.1.7 Evolución de las fermentaciones	77
4.1.8 Dinámica de poblaciones de cepas de BL aisladas	80
4.1.9 Resultados analíticos de los vinos	81
4.1.10 Conclusiones	87
4.2 Efecto de diferentes condiciones vnicas sobre la formación de CE en vino simulado	89
4.2.1 Características de los cultivos	89
4.2.2 Controles analíticos	91
4.2.3 Determinación de la población viable	92
4.2.4 Efectos sobre el crecimiento de las cepas de BL, la degradación de ácido L- málico y el metabolismo de la arginina	93
4.2.5 Formación de CE	101
4.2.6 Consumo de azúcares, producción de ácido acético y cambios de pH	103
4.2.7 Conclusiones	105
4.3 Relación entre características enológicas de mostos y vinos y la formación de CE	107
4.3.1 Antecedentes	107

4.3.2 Controles analíticos	108
4.3.3 Análisis de Correlaciones I	108
4.3.4 Análisis de Conglomerados Jerárquicos de los casos	122
4.3.5 Análisis de Correlaciones II	125
4.3.6 Conclusiones	127
4.4 Influencia del momento de inoculación de las BL en el vino sobre la formación de CE	129
4.4.1 Antecedentes	129
4.4.2 Características de las vinificaciones	130
4.4.3 Caracterización enológica del vino	134
4.4.4 Evolución de la fermentación alcohólica en las vinificaciones	134
4.4.5 Evolución de la FML en las vinificaciones	136
4.4.6 Resultados analíticos de los vinos	151
4.4.7 Formación de CE	155
4.4.8 Análisis estadístico	163
4.4.9 Conclusiones	176
5. Discusión general	179
6. Conclusiones	185
7. Bibliografía	191
8. Anexo A	209
9. Anexo B	219
10. Anexo C	225
11. Anexo D	235
12. Anexo E	245
13. Anexo F	255
14. Anexo G	263
15. Anexo H	267

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI
INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE VINIFICACIÓN Y LAS BACTERIAS LÁCTICAS SOBRE LA FORMACIÓN
DE CARBAMATO DE ETILO
Silvana Verónica Romero Tissera
ISBN:978-84-693-7663-8/DL:T-1745-2010

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LAS BACTERIAS LÁCTICAS DEL VINO Y LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA

1.1.1 Antecedentes históricos

En 1837 en su libro titulado “A Short Education on Suitable Treatments of Vinificated Juices”, F. von Babo describió el fenómeno de una “segunda” fermentación en los vinos jóvenes que comenzaba al final de la primavera. Esta “segunda” fermentación liberaba CO₂ y originaba una turbidez renovada en los vinos nuevos, que von Babo relacionó con la “fusión de la grasa” de la fermentación alcohólica (FA) (Krieger, 2006a)

Berthelot y De Fleurieu (1864) fueron los primeros en observar una disminución fuerte de la acidez total de un vino, en comparación al mosto de procedencia. Durante los estudios sobre las alteraciones del vino que llevó a cabo en 1866, Louis Pasteur aisló las primeras bacterias del vino e inició sus “Études sur le vin”. Fue el primero en describir algunos de los efectos de lo que hoy conocemos como fermentación maloláctica (FML), como la producción de gas y lo que él consideraba una pérdida de sabor, hechos que asociaba a una enfermedad del vino. Unos años más tarde (1873) observó que vinos embotellados perdían acidez a lo largo del tiempo, pero presumió que se debía a la precipitación del ácido tartárico. Ordonneau (1891) advirtió la desaparición casi total del ácido málico en el envejecimiento de los vinos, pero fue Kunz (1901) quien puso en evidencia que la disminución del ácido málico se acompaña de un incremento simultáneo del ácido láctico (Suárez Lepe e Íñigo, 1988; Krieger, 2006a)

Por otro lado, Kulisch (1889) comprobó la naturaleza biológica del proceso. Sugirió que una levadura era la responsable, ya que al inocular lo que él creía un cultivo puro de *Saccharomyces ellipsoideus* observó una disminución de la acidez total. Müller-Thurgau (1891) corrigió el error indicando que no eran levaduras sino bacterias las responsables de los cambios de acidez, pero este hecho no se confirmó experimentalmente hasta que Koch (1900) consiguió inducir la FML inoculando bacterias aisladas del vino (García *et al.*, 1992).

La ecuación química de la reacción maloláctica fue propuesta por primera vez por Möslinger (1901) y Seiffert (1901). Hasta entonces la FML era considerada como

un proceso perjudicial en la vinificación. Uno de los primeros autores en citar los beneficios de la FML fue Ferré (1922) quien señaló que la FML es un proceso esencial para obtener vinos de calidad (García *et al.*, 1992).

Posteriormente, numerosos trabajos de diversos autores describen ampliamente las ventajas de la FML y la necesidad del proceso para obtener vinos de calidad.

1.1.2 Clasificación y características de las bacterias lácticas del vino

Las bacterias lácticas (BL) aisladas de vino son principalmente de los géneros *Oenococcus* (antes *Leuconostoc oenos*), *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactobacillus* (Wibowo *et al.*, 1985; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000; Liu, 2002)

Además de su morfología como cocos o bacilos, su característica homo o heterofermentativa es un factor decisivo en su clasificación. Este carácter fue establecido por primera vez por Kluver y Donker (1935), y está basado en el catabolismo de los azúcares. Las bacterias homofermentativas producen más del 85% de ácido láctico a partir de la utilización de la glucosa por la vía glicolítica de Embden-Meyerhof, mientras que las heterofermentativas, al carecer de aldolasa y triosafosato-deshidrogenasa, metabolizan la glucosa siguiendo la vía de Warburg-Dickens, originando dióxido de carbono, etanol y ácido acético además de ácido láctico (Suárez Lepe e Íñigo, 1988; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000; Suárez Lepe e Íñigo, 2004).

Entre los cocos, las bacterias del género *Pediococcus* son homofermentativas, y las del género *Leuconostoc* son heterofermentativas. Los lactobacilos pueden presentar los dos comportamientos y se dividen en tres grupos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000):

Grupo I: Homofermentativos estrictos (este grupo nunca se ha identificado en vino).

Grupo II: Heterofermentativos facultativos.

Grupo III: Heterofermentativos estrictos.

En la siguiente tabla se listan las BL más frecuentemente encontradas en vino:

Tabla 1.1. Especies de BL más generalizadas en mosto y vino. (Ribéreau-Gayon *et al.* 2000)

Lactobacilos	Heterofermentativos Facultativos (Grupo II)	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>
	Heterofermentativos Estrictos (Grupo III)	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i>
Cocos	Homofermentativos	<i>Pediococcus damnosus</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>
	Heterofermentativos	<i>Oenococcus oeni</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>subsp. mesenteroides</i>

En la última actualización de clasificación, todas las BL del vino se encuentran dentro del orden *Lactobacillales* (Garrity *et al.*, 2004), lo que se resume en la siguiente tabla:

Tabla 1.2. Clasificación actual de BL vínicas (resumen de Garrity *et al.* 2004)

Dominio <i>Bacteria</i>
Phylum BXIII. "<i>Firmicutes</i>"
Clase III. "<i>Bacilli</i>"
Orden II. "<i>Lactobacillales</i>"
Familia I. "<i>Lactobacillaceae</i>"
Género I. <i>Lactobacillus</i> (126 especies)
Género III. <i>Pediococcus</i> (9 especies)
Familia V. "<i>Leuconostocaceae</i>"
Género I. <i>Leuconostoc</i> (20 especies)
Género II. <i>Oenococcus</i> (1 especie)

A pesar de ser un grupo heterogéneo de bacterias morfológica, bioquímica y metabólicamente, las BL representan un grupo bastante homogéneo desde el punto de vista fisiológico con las siguientes características generales (Zambonelli, 1988; Bordons 1997):

- Gram-positivas,
- catalasa negativas, con excepción de alguna especie del género *Pediococcus*,
- no esporuladas,

- no móviles (no tienen flagelos),
- microaerófilas o anaerobias facultativas,
- presentan un metabolismo exclusivamente fermentativo (ausencia de respiración),
- tienen requerimientos nutritivos complejos: requieren la presencia en el medio de aminoácidos y vitaminas que no son capaces de sintetizar,
- por fermentación de los azúcares producen solamente ácido láctico (homolácticas u homofermentativas) o producen ácido láctico y, además, ácido acético, dióxido de carbono y etanol (heterolácticas o heterofermentativas).

1.1.3 Aislamiento e identificación

Los procedimientos más usuales para el aislamiento de las BL del vino, de acuerdo con Wibowo *et al.* (1985), son:

- Por enriquecimiento de las BL en medio de cultivo líquido previo a la siembra en medio sólido. Esta técnica sólo provee información sobre la presencia o ausencia de BL y no permite su recuento.

- Por siembra directa sobre medio de cultivo sólido. Se obtiene información directa del número de microorganismos en el vino. Es necesario concentrar las bacterias por centrifugación para aumentar el límite de detección si el número de bacterias es menor a 10 cél/mL.

- Por filtración del vino sobre filtros de membrana que luego se incuban sobre placas de cultivo sólido. Esta técnica se usa cuando el número de células bacterianas es muy bajo.

Todos estos procedimientos requieren medios de cultivo apropiados. Los dos medios más comúnmente empleados son el Medio de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) y el agar zumo de tomate. El medio MRS, disponible comercialmente, es un medio muy nutritivo, inicialmente desarrollado para el aislamiento de *Lactobacillus*. El agar zumo de tomate también es un medio muy rico que incorpora zumo de tomate, el cual contiene factores que estimulan el crecimiento de las BL del vino. Se han descrito numerosos medios de cultivo para el crecimiento de las BL que incorporan extracto de levaduras y diferentes modificaciones del medio MRS para incorporar zumo de tomate, cisteína, zumo de uvas y ácido málico además de distintos azúcares. No hay un único

medio recomendado para el crecimiento de todas las especies de un vino. El medio MRS adicionado con zumo de tomate es un medio general para el aislamiento y cultivo de las BL del vino, que se realiza por incubación en atmósfera enriquecida con CO₂ entre 28°C y 37°C (Wibowo *et al.*, 1985). Hace pocos años se desarrolló el medio MLO, ya disponible comercialmente, para favorecer el crecimiento de cepas vínicas incapaces de crecer en otros medios. Este medio es recomendado para el crecimiento y mantenimiento de BL, incluso las más exigentes, como *Oenococcus oeni*, debido a la adición de suero de tomate. Asimismo, puede ser empleado como un medio general para BL que utilicen fructosa (Zuñiga *et al.*, 1993).

Desde los comienzos de la microbiología la identificación bacteriana se ha basado en sus características fenotípicas. El análisis fenotípico incluye observación morfológica y análisis de la asimilación de distintos sustratos y de la naturaleza de los productos metabólicos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). La clasificación de una cepa se determina en función del parecido de esos caracteres con los de las cepas tipo (Lonvaud-Funel, 2006).

La observación microscópica puede ir ligada a la coloración de Gram. La forma celular (coco o bacilo) es fácilmente identificable, así como la disposición celular (parejas, tétradas, cadenas). A continuación se determina su carácter homo o heterofermentativo. Esto permite identificar las bacterias a nivel de género.

La clasificación a nivel de especie requiere el análisis de los perfiles de fermentación de un gran número de azúcares. Para la identificación rápida de las BL aisladas se pueden utilizar las galerías API 50 CHL (Bio-Mérieux), en las cuales se miniaturizan una cuarentena de pruebas en una misma placa (Wibowo *et al.*, 1985; Davis *et al.*, 1988; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000; Lonvaud-Funel, 2006), aunque su uso da resultados discutibles en el caso de *O. oeni* (Pardo *et al.*, 1988). Estas características en su totalidad hacen posible la identificación de una especie sin mucha ambigüedad, por referencia al manual de clasificación Bergey's.

En los últimos años, el progreso de la biología molecular ha hecho posible la identificación aún más precisa y fiable (además de proveer nuevos criterios de clasificación basados en el análisis del genoma) a nivel de género, especie e incluso cepas dentro de una misma especie (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

El principio general consiste en buscar similitudes entre el ADN de la cepa desconocida y el ADN de la cepa de referencia. Existen distintos métodos basados en

diversas propiedades y herramientas. El más seguro consiste en secuenciar una parte del genoma muy característica de la especie, correspondiente a los genes que codifican el ribosoma 16S. Esta región contiene partes muy conservadas en todas las bacterias de una misma especie. El estudio del polimorfismo de restricción se basa en la acción específica de enzimas de restricción. La hibridación se basa en la capacidad de una simple hebra de ADN de reaparearse a una doble hebra. Al combinar y variar estos métodos se amplían considerablemente las posibilidades de análisis. Por otro lado, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite amplificar porciones del genoma delimitado por “primers” o cebadores (oligonucleótidos). Dependiendo de los “primers” escogidos, el perfil electroforético del amplicón obtenido permite distintos niveles de clasificación dentro de un género o especie (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000; Lonvaud-Funel, 2006). Recientemente, Reguant (2001) desarrolló un método de RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA-PCR) para la identificación de cepas de *O. oeni* basado en la amplificación al azar del ADN con dos cebadores (RAPD-PCR múltiple) que ha demostrado mejorar la reproducibilidad y rapidez respecto al método de RAPD-PCR convencional. Este método es una buena herramienta para estudiar la dinámica de poblaciones bacterianas durante la FML y para evaluar la eficiencia de un nuevo cultivo estárter y su imposición sobre la microbiota nativa (Reguant, 2001; Reguant y Bordons, 2003).

1.1.4 Recuento de BL en mosto y vino

El recuento de microorganismos viables se emplea corrientemente en Enología tanto para el seguimiento de las fermentaciones como para el control microbiológico de los vinos, en el embotellado o durante la conservación (Laure y Froudière, 1994).

Hay un amplio número de métodos citados en la literatura que pueden considerarse para estimar la concentración microbiana en Enología. Estos métodos se pueden clasificar como sigue (Delfini y Formica, 2001):

1. Métodos que evalúan la masa microbiana

a) por centrifugación: se puede determinar el volumen de células empacadas, después de separarlas del medio de cultivo, por desecación del “pellet” a 105 °C;

b) por nefelometría: midiendo la turbidez de suspensiones líquidas del cultivo directamente en un nefelómetro;

c) por citometría de flujo: este método, además de la cuantificación, permite la diferenciación de la población en subclases de acuerdo al tamaño celular;

d) por colorimetría: método basado en la absorción de azul de metileno por células muertas, las cuales siguen la ley de Freundlich.

2. Métodos que estiman el número de células viables como Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

a) por recuento de colonias en medio sólido en placas de Petri: con este método se determina el número de UFC;

b) por crecimiento de colonias sobre medios sólidos o líquidos en placas de Petri, luego de colocar un filtro de membrana previamente inoculado sobre el medio;

c) por valoración microscópica de crecimiento de microcolonias sobre un portaobjeto previamente cubierto con una capa delgada de medio sólido;

d) por crecimiento en presencia de sales de tetrazolio y la cuantificación espectrofotométrica subsiguiente de la forma reducida de la sal;

e) por cuantificación de ciertos metabolitos utilizados o formados a partir de un sustrato apropiado bajo condiciones estándar de incubación (CO₂, ácidos, consumo de azúcares, etc.);

f) por el método de bioluminiscencia, utilizando un fotómetro para medir la cantidad de luz emitida en presencia de luciferasa, después de añadir ATP.

3. Métodos que determinan el recuento de células totales en una población consistente en células viables y no viables

a) por recuento microscópico directo de material celular previamente tratado, o no, con colorantes vitales, como azul de metileno, cristal violeta, eritrosina B o diacetato de fluoresceína, en una cámara de recuento.

De todos estos métodos los más útiles en Enología son: el recuento directo con microscopio usando una cámara de conteo, el recuento de colonias crecidas sobre un

filtro de membrana, el recuento de colonias crecidas sobre un medio sólido y el recuento por epifluorescencia de células concentradas sobre un filtro de membrana (Delfini y Formica, 2001).

Por su importancia en el desarrollo de la presente tesis este último método será ampliado en el siguiente apartado.

Recuento de BL del vino por epifluorescencia

La determinación microbiológica de células presentes en vino se basa generalmente en la técnica de cultivo en placa de Petri, en general, con filtración sobre membrana. Es una técnica fácil de realizar, pero tiene algunas desventajas (Berta y Spertino, 1998; Berta *et al.*, 1998):

- a) presenta una tendencia a sobreestimar el número de células presentes;
- b) para levaduras, el tiempo de respuesta y la precisión son aceptables, pero, para bacterias, se requiere un tiempo de incubación más largo que puede ser demasiado largo para prever accidentes de fermentación o de refermentación, y así evitar las paradas de fermentación o modificar las condiciones de embotellado durante el trasiego;
- c) no cuenta bacterias o levaduras presentes en agregados o en microcolonias, las cuenta como si fuera una sola célula y
- d) no tiene en cuenta las células no vitales.

A partir de 1974 se comenzó a utilizar la excitación de fluorescencia con luz reflejada (epifluorescencia) en la industria alimentaria para poner a punto un método rápido y eficiente de recuento de microorganismos (Berta y Spertino, 1998).

Esta técnica se basa en un sistema que transmite luz a corta longitud de onda al preparado, previamente coloreado con un fluorocromo. Éste la absorbe y emite luz a una longitud de onda mayor que la incidente (Figura 1.1). Para evidenciar estas fluorescencias debe delimitarse con un primer filtro coloreado cuál es la banda de excitación, generalmente la ultravioleta o la del azul-violeta, y disponer, tras el objeto, un segundo filtro, "filtro de intercepción", que absorbe el residuo de la luz excitadora para no dejar pasar más que la fluorescencia (Berta y Spertino, 1998).

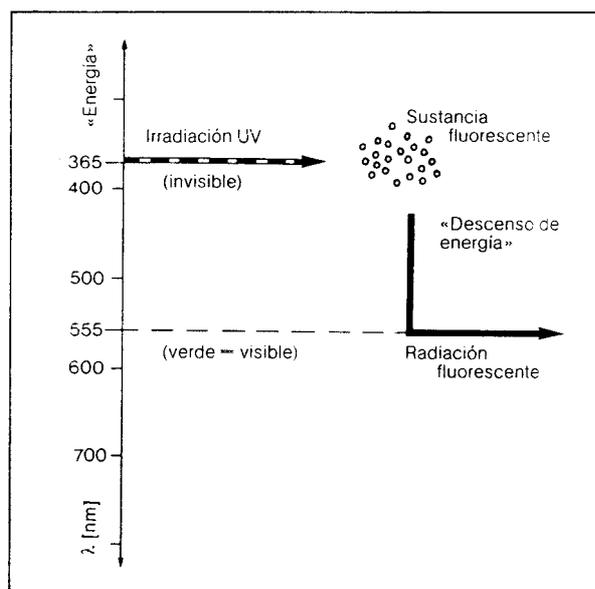


Figura 1.1. Representación esquemática del origen de la radiación fluorescente (Holz, 1990).

1.1.5 Ecología

El origen de las BL del vino se halla en la uva y en el equipamiento de la bodega. Generalmente se encuentran sobre la superficie de las uvas y de las hojas de la vid (Wibowo *et al.*, 1985).

En las uvas se encuentran recuentos reducidos de BL (inferiores a 100 células/g) (Krieger, 2006a). A lo largo de la vinificación la población de BL evoluciona en número (Figura 1.2) y en variedad, hay un crecimiento sucesivo de diferentes especies. El mosto contiene una población bacteriana de 10^3 a 10^4 cél/mL. Las principales especies presentes en esta etapa son *L. plantarum*, *L. hilgardii*, *L. brevis*, *L. casei*, *Leuc. mesenteroides*, *O. oeni*, *P. damnosus* y *P. pentosaceus*. Sobreviene una primera fase de muerte en la FA, ya que el bajo pH y el elevado contenido de etanol hacen del vino un medio adverso para las BL. Hay una disminución del número y la variedad de BL, con lo que al final de esta fase la población desciende a cerca de 10^2 cél/mL. Tras una fase de latencia luego de la FA, cuya duración dependerá de las propiedades del vino, comienza la fase de proliferación que se caracteriza por un crecimiento exponencial de las BL que han sobrevivido. Cuando la población llega al orden de 10^6 cél/mL comienza la FML (Wibowo *et al.*, 1985; García *et al.*, 1992; Lonvaud-Funel, 1994; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). *O. oeni* es la especie que

garantiza la FML en la mayoría de los vinos, en todas las regiones del mundo (Wibowo *et al.*, 1985; Lonvaud-Funel, 1994; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000) y es la especie preferida para conducir la FML debido a su tolerancia al medio ácido y al perfil aromático producido (Liu, 2002). Se ha visto también que vinos con pHs mayores a 3,5 pueden ser contaminados por especies de *Pediococcus* y *Lactobacillus* que pueden crecer hasta niveles de 10^6 a 10^8 cél/mL interaccionando antagónicamente con *O. oeni* (Wibowo *et al.*, 1985). En la fase terminal la población disminuye paulatinamente (García *et al.*, 1992). La supervivencia de las BL después de terminar la FML depende en buena medida de las condiciones del vino y del tratamiento aplicado al mismo (Krieger, 2006a).

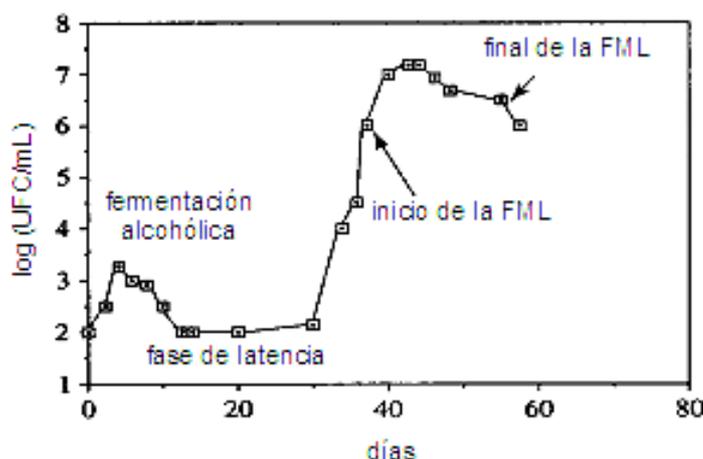


Figura 1.2. Evolución de la población de BL durante la vinificación (adaptado de Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

1.1.6 Bioquímica de la FML

En los últimos años se ha visto que la conversión de ácido málico a ácido láctico no es una verdadera fermentación sino, más bien, una reacción enzimática conducida por las células bacterianas después de su crecimiento. No obstante, el término fermentación maloláctica se ha establecido en la literatura y en la industria enológica (Wibowo *et al.*, 1985).

La ecuación global de la descarboxilación del ácido málico es la siguiente:

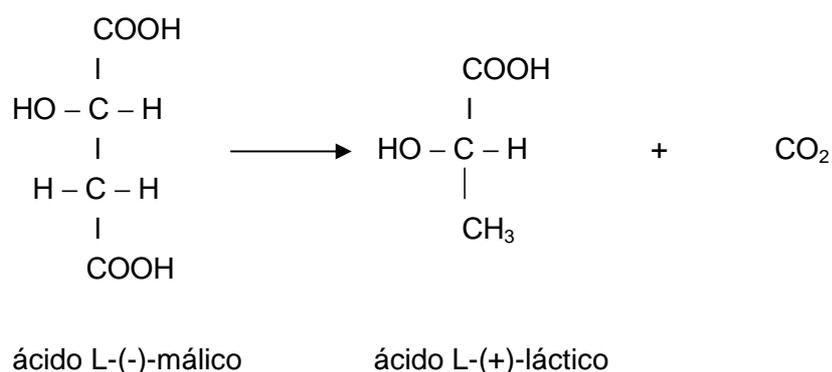


Figura 1.3. Ecuación global de la reacción maloláctica

La reacción así formulada se presenta como una simple descarboxilación, pero el mecanismo de conversión no es tan simple.

La enzima responsable de la FML es la enzima maloláctica, que fue purificada por primera vez en *L. plantarum* en 1973 por Schütz y Radler. Dicha enzima, con un peso aproximado de 235000 y un punto isoeléctrico de 4,35, es constitutiva en el 60% de las BL heterofermentativas e inducible en otras. Se induce en presencia de glucosa, tiene un pH óptimo entre 5,6 – 6,1, su actividad depende de NAD y de Mn^{2+} y puede ser inhibida competitivamente por los ácidos tartárico, succínico y láctico. (Suárez Lepe e Íñigo, 1988; García *et al.*, 1992; Delfini y Formica, 2001; Reguant, 2001; Suárez Lepe e Íñigo 2004). En 1984, Spettoli *et al.* aislaron la enzima maloláctica de *O. oeni*, demostrando que era constitutiva en esta especie a diferencia de *L. plantarum* que era inducido y que, en ambos casos, el transporte de L-malato dentro de las células limitaba la tasa de conversión de la enzima maloláctica (Suárez Lepe e Íñigo, 2004).

El papel que la FML desempeña en el metabolismo celular no está aún completamente esclarecido, ya que no genera energía por sí misma para las células. Kunkee (1967) y Kandler (1973) pensaban que la FML no proveía energía a la célula. Más tarde, Pilone y Kunkee (1976) y García (1992) observaron que la FML parecía proveer algún efecto beneficioso a las BL, ya que su tasa de crecimiento se veía estimulada cuando éstas se desarrollaban en un medio con una fuente de carbono y ácido málico. Para Kandler *et al.* este efecto se debía a que la descomposición de un ácido dicarboxílico en uno monocarboxílico provocaría un aumento del pH externo (García *et al.*, 1992; Reguant, 2001). Más tarde Cox y Henick-Kling (1990)

demonstraron que varias especies de BL podían generar ATP a partir de la degradación del ácido málico. Según estos autores, el mecanismo sería quimiosmótico. El ATP sería formado por una ATPasa de membrana que tomaría la energía del gradiente electroquímico que se genera durante el transporte activo de L-malato al interior celular y el gradiente de protones que se genera cuando el producto final, el L-lactato, es transportado fuera de la célula junto con los protones (Cox y Henick-Kling, 1990). Sobre esta cuestión se continúan proponiendo nuevos aspectos (Cox y Henick-Kling, 1995; Salema *et al.*, 1996a; Salema *et al.*, 1996b).

1.1.7 Efectos beneficiosos de la FML

Las principales ventajas que aporta la FML al vino son (Davis *et al.*, 1985):

a) Disminución de la acidez:

La FML es el principal medio que poseen los vitivinicultores para reducir la acidez de un vino. La disminución de la acidez por la FML varía de 0,1% a 0,3%, y el pH puede subir de 0,1 a 0,3 unidades.

Vinos producidos en regiones de climas fríos se ven beneficiados con una reducción de la acidez porque las bayas presentan naturalmente altas concentraciones de ácidos orgánicos. Vinos de pH alto, como los producidos en regiones vitícolas cálidas, tienen una acidez baja. En estos casos, la FML puede reducir mucho los niveles de acidez, resultando vinos planos e insípidos, donde se pueden desarrollar bacterias perjudiciales.

b) Mejora del perfil organoléptico:

La calidad sensorial del vino es afectada por los componentes que son consumidos y producidos en el vino por el crecimiento bacteriano.

Como las BL convierten ácido málico (característico de la manzana, más agresivo) en ácido láctico (característico de la leche, más suave) el vino resultante es más suave y “mantecoso”.

Las BL son organismos fermentativos que, además de producir ácido láctico como producto principal del catabolismo de los azúcares, son capaces de producir

otros compuestos con incidencia aromática, como acetaldehído, ácido acético, etanol, diacetilo, acetoína y 2,3-butanodiol, en diferentes productos fermentados. Diacetilo, acetoína y 2,3-butanodiol son producto del consumo bacteriano de ácido cítrico y se consideran importantes para el perfil organoléptico del vino. El diacetilo es considerado el más importante por el aroma de manteca o nata que caracteriza a muchos vinos que han realizado la FML con reconocidos aromas lácticos. A bajas concentraciones, estos compuestos aportan complejidad al aroma del vino. A concentraciones superiores a 5 mg/L, el diacetilo puede ser muy intenso, dando al vino sabores de manteca o avellana, lo que se considera indeseable (Davis *et al.*, 1986, Bartowsky y Henschke, 2004)

Otros constituyentes organolépticos que aumentan su concentración en la FML incluyen: ácidos volátiles, dietil succinato, numerosos ésteres volátiles, etil-acetato, n-propanol, 2-butanol, n-hexanol y etil-lactato. También se dan pequeñas disminuciones en 3-metil-n-butil acetato, n-hexil acetato, 2-feniletacetato y 2-etil-n-hexanoato.

Estudios sensoriales demuestran que los componentes aromáticos producidos por las BL confieren cambios reconocibles a las características aromáticas del vino (Laurent *et al.*, 1994). Además, se ha visto que, generalmente, los vinos producidos con BL seleccionadas tienen mejor calidad que los que realizan la FML espontáneamente.

En conclusión, aunque las BL son capaces de alterar la composición del vino durante la FML, principalmente en distintos componentes volátiles, estos cambios no siempre son detectados por panelistas de cata entrenados. Las cepas de BL seleccionadas para inducir la FML tienen una importancia crítica, así como la composición del vino y el diseño de los análisis sensoriales.

c) Estabilidad microbiológica:

Una de las principales ventajas de la FML es que los vinos que han experimentado la FML son, en sentido microbiológico, más estables que los que no la han sobrellevado. No obstante, la estabilidad microbiológica después de la FML no es absoluta. La noción de estabilidad microbiológica después de la FML significa que disminuye el riesgo de que la FML ocurra en la botella, dando lugar a la formación de gas (CO₂) en la misma u otros efectos negativos. Una FML completa proporciona una cierta estabilidad microbiológica al eliminar del vino el ácido málico y algunos

azúcares, y también al producir compuestos antimicrobianos como el mismo ácido láctico y, posiblemente, bacteriocinas, que son proteínas de bajo peso molecular que podrían inhibir el crecimiento bacteriano posterior.

1.1.8 Efectos indeseables de la FML

En cuanto a las desventajas o inconvenientes derivados de la FML, habría que destacar, en primer lugar, la elevación de la acidez volátil que la acompaña y que, además de representar un índice negativo en la apreciación sensorial de cualquier vino, dependerá del carácter homo o heterofermentativo de las diferentes cepas bacterianas y de la temperatura. Además, hay algunas BL que pueden metabolizar el ácido cítrico para obtener energía y, al hidrolizarlo, elevan el diacetilo y la acidez volátil. La degradación del ácido tartárico por bacterias heterofermentativas es muy poco frecuente, dándose sólo en vinos con pHs elevados, próximos o superiores a 4, aumentando también el contenido en ácido acético (Suárez Lepe e Íñigo, 2004).

Otros inconvenientes derivados de la FML conciernen a la pérdida o reducción de aromas varietales y carácter afrutado, a la posible producción de olores anómalos como el geraniol o a la reducción de color que sigue a este fenómeno. El cambio cromático suele deberse a las modificaciones de pH, a los niveles de SO₂ y a la adsorción de antocianos por las paredes celulares bacterianas (Suárez Lepe e Íñigo, 2004).

1.1.9 Alteraciones durante la FML que pueden afectar a la seguridad alimentaria

Las alteraciones más importantes producidas en el vino son aquellas que pueden afectar a la seguridad alimentaria.

Al ser el vino un alimento obtenido por fermentación, es susceptible de presentar concentraciones de determinadas moléculas (productos del metabolismo microbiano), algunas de las cuales pueden afectar a la seguridad alimentaria del consumidor. Como antes se ha señalado, el vino es un medio complejo, aún al final de la FA, por lo que las BL pueden metabolizar distintos compuestos aún presentes en el vino mientras realizan la FML, dejando en el vino los productos finales o parciales de este metabolismo.

En vinos, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), a través de los grupos integrados en la Comisión “Seguridad y Salud” y, particularmente, el Grupo “Seguridad Alimentaria” estudian el estado actual de las alteraciones del vino que pueden incidir en la salud del consumidor para tratar de dilucidar sus orígenes y vías de formación y, en su caso, evitar concentraciones que pueden llegar a ser perjudiciales o nocivas (Suárez Lepe e Íñigo, 2004).

En cuanto a su origen, las sustancias potencialmente tóxicas que pueden encontrarse en el vino se podrían clasificar en (Suárez Lepe e Íñigo, 2004):

- **Contaminantes**, como los pesticidas o el plomo.
- **Aditivos**, como el anhídrido sulfuroso.
- **Moléculas relacionadas con el metabolismo microbiano**. Entre ellas se encuentran el carbamato de etilo y las aminas biógenas, ambos productos del metabolismo de BL, y la ocratoxina A, micotoxina sintetizada por algunas especies de hongos.

Es importante aclarar que en todo el mundo numerosos grupos de investigación aúnan sus fuerzas para establecer la etiología de muchas alteraciones del vino, para poder prevenirlas y asegurar la calidad del vino. Además, si estas moléculas están presentes en el vino, en la mayoría de los casos, lo están en concentraciones muy alejadas de su ingesta diaria admitida.

Antes de ampliar aquellos temas relacionados con la FML, debemos considerar la importancia del estudio de estos compuestos tóxicos en la competitividad de nuestros productos en los mercados nacionales y extranjeros, en los que ya existe legislación sobre límites máximos permitidos en vinos de importación o de elaboración propia.

Formación de aminas biógenas

Las aminas tienen un importante rol metabólico en las células vivas. Las poliaminas son esenciales para el crecimiento; la histamina y la tiramina están involucradas en funciones del sistema nervioso y en el control de la presión sanguínea (Lonvaud-Funel, 2001).

Las aminas biógenas son bases orgánicas de bajo peso molecular, de estructura alifática o cíclica, que provienen de la descarboxilación de aminoácidos (Landete *et al.*, 2001; Suárez Lepe e Íñigo, 2004).

Las aminas biógenas son compuestos indeseables en todos los alimentos y bebidas porque su ingesta en altas concentraciones puede tener efectos nocivos sobre la salud humana. Las aminas biógenas pueden ejercer efectos vasoactivos (tiramina), efectos psicoactivos, o ambos (histamina). Los síntomas típicos de la intoxicación con alimentos contaminados son: náuseas, dolor de cabeza, problemas respiratorios, problemas circulatorios, como hiper o hipotensión y palpitaciones, y distintos desórdenes alérgicos. La sensibilidad varía de un individuo a otro dependiendo de la actividad detoxificante del cuerpo humano que está en manos de las enzimas amino oxidasas. Estas enzimas son inhibidas por algunas drogas, por el etanol e incluso por otras aminas animales, disminuyendo la eficiencia de la detoxificación (Landete *et al.*, 2001; Lonvaud-Funel, 2001).

Estas aminas son producidas por las BL durante los procesos de fermentación de alimentos y bebidas como consecuencia de la descarboxilación de aminoácidos (Landete *et al.*, 2001; Lonvaud-Funel, 2001).

Muchos géneros de bacterias son capaces de descarboxilar aminoácidos para formar las aminas correspondientes y dióxido de carbono. Esta reacción tiene lugar para favorecer el crecimiento y la supervivencia en medio ácido, ya que las aminas generadas tienen carácter básico y por ello tienden a elevar el pH del medio en el que se excretan. Además, el pH bajo favorece la actividad enzimática de las aminodescarboxilasas (Landete *et al.*, 2001; Lonvaud-Funel, 2001; Liu, 2002).

En el vino se encuentran distintos aminoácidos susceptibles de ser descarboxilados, como resultado pueden aparecer histamina, tiramina, putrescina, cadaverina, etilamina y feniletilamina; de éstas, las tres primeras son las más frecuentes en vinos (Lonvaud-Funel, 2001; Liu, 2002; Suárez Lepe e Íñigo, 2004).

Con excepción de la etilamina, que alcanza valores significativos tras la FA, todas las demás son más abundantes en vinos al término de la FML y, aún más, en la etapa de envejecimiento (Suárez Lepe e Íñigo, 2004). Varios meses después de la vinificación es frecuente encontrar altas poblaciones de BL, sobre todo en vinos de pH alto en los que, además, el SO₂ agregado al final de la FML es menos eficiente. Incluso, aunque no se observe crecimiento, esta población sobrevive y es aún

metabólicamente activa. Además, las cepas con actividad aminoácido descarboxilasa pueden sobrevivir más tiempo que aquellas en las que esta actividad no está presente, al obtener energía adicional de la descarboxilación (Lonvaud-Funel, 2001).

En vino, *Lactobacillus* y *Pediococcus* parecen ser los principales productores de aminas, aunque algunos *Oenococcus* también pueden producirlas. Estudios recientes indican que es *Oenococcus* la principal especie responsable de la formación de histamina y que *Lactobacillus* causa la formación de tiramina en vino (Liu, 2002)

Es importante destacar que la actividad descarboxilasa es específica de cepa y no de especie, por ello la ausencia de actividad aminoácido descarboxilasa es un criterio de selección que actualmente se incluye para la preparación industrial de cultivos iniciadores para la FML (Lonvaud-Funel, 2001; Suárez Lepe e Íñigo, 2004).

Tabla 1.3. Aminas biógenas más frecuentes en vinos, tipo de aminas, precursores y enzimas que las producen (Landete *et al.*, 2001)

Amina biógena	Tipo de amina	Precursor	Enzima
Histamina	Amina heterocíclica	Histidina	Histidina descarboxilasa
Tiramina	Amina aromática	Tirosina	Tirosina descarboxilasa
Feniletilamina	Amina aromática	Fenilalanina	Fenilalanina descarboxilasa
Putrescina	Amina alifática	Ornitina	Ornitina descarboxilasa
Cadaverina	Amina alifática	Lisina	Lisina descarboxilasa
Agmatina	Amina alifática	Arginina	Arginina descarboxilasa

Producción de CE

El CE es un compuesto con propiedades carcinogénicas que se forma por reacción del etanol a pH ácido con un compuesto que posea un grupo carbamílico. Por su importancia en el presente trabajo esta cuestión será ampliada en el apartado 1.2.

1.1.10 Control de la FML

Como se ha visto, la FML es un proceso deseado en muchos casos en los que la reducción de la acidez y la modificación del aroma del vino, como fruto de esta segunda fermentación, son favorables a la calidad del vino. El aumento del

reconocimiento de la influencia de la FML sobre la calidad del vino ha llevado a los productores de vino a buscar un mejor control sobre la realización y el resultado de la FML. Este control se hace aun más necesario en caso de FMLs problemáticas, retardadas o paradas y es fundamental para asegurar la ausencia de efectos indeseables.

Los productores de vino disponen de varias opciones para controlar la FML. La primera herramienta disponible sería la estimulación del crecimiento de la flora natural de BL presentes en el vino. También se puede llevar a cabo una inoculación cruzada con vinos que ya están experimentando la FML, usar cepas de levaduras para degradar el ácido málico, o la maceración carbónica para degradar parcialmente el ácido málico previamente a la FML. Pero los métodos más eficaces y recomendables son, o bien la inoculación en el vino de cepas de BL comerciales o preparadas en el laboratorio, o el paso del vino sobre BL activas inmovilizadas (Davis *et al.*, 1985; Krieger, 2006a).

También hay que tener en cuenta que la FML puede ser inhibida para prevenir la desacidificación (Davis *et al.*, 1985; Krieger, 2006a).

a) Estimulación de la flora natural

Si se desea la FML espontánea y la producción bacteriana de compuestos aromáticos, el productor de vino puede propiciar el crecimiento de las BL autóctonas manteniendo condiciones favorables al desarrollo y supervivencia de las mismas, como temperaturas más cálidas, adición mínima o nula de SO₂, largos tiempos de contacto con las pieles, tiempos más largos de contacto con las lías de levaduras y retraso del trasiego (Krieger, 2006a).

Aunque se tomen las medidas necesarias para aumentar el crecimiento de la flora natural y, como consecuencia, completar con éxito la FML, ésta no siempre ocurre y se necesitan otros métodos para fomentar la FML.

b) Inducción de la FML por inoculación con cepas comerciales

La inducción de la FML mediante la inoculación de cepas seleccionadas de BL presenta dos ventajas: permite un mayor control sobre la ocurrencia y velocidad de la

FML y tiene una influencia positiva sobre el aroma y la calidad del vino (Davis *et al.*, 1985; Krieger, 2006b).

La inoculación de cultivos iniciadores seleccionados reduce el potencial de alteración por otras BL y/o bacteriófagos, garantizando el rápido inicio de la FML, un mayor control de la producción de compuestos aromáticos, sabores y olores en el vino. Los cultivos iniciadores se comercializan en forma liofilizada o congelada para la inoculación directa de las BL en el vino. Estas cepas se han seleccionado a partir de la FML espontánea por su buena cinética fermentativa, por tolerar las difíciles condiciones de crecimiento y supervivencia imperantes en el vino, por sus propiedades organolépticas deseables y por su baja capacidad para producir metabolitos peligrosos (Krieger, 2006a).

Distintos estudios demuestran que diferentes cepas de BL tienen diferentes efectos sensoriales en los vinos, pero el mejor momento para la inoculación de las BL sigue siendo objeto de discusión (Krieger, 2005; Krieger, 2006a). Dependiendo del momento en que se realiza la inoculación, las BL encontrarán una diferente composición en el medio, lo que influirá drásticamente en su desarrollo y actividad metabólica (Rosi *et al.*, 2003).

Las BL se pueden inocular en los siguientes estadios de la vinificación (Davis *et al.*, 1985; Krieger, 2006a):

- Simultáneamente a la inoculación de la levadura
- Durante la FA
- Hacia el final de la FA
- Después de la FA

Normalmente, el inicio de la FML sólo se induce después del final de la FA, para evitar el riesgo de picado láctico. No obstante, también puede ser interesante una siembra bacteriana más precoz, al principio o en el transcurso de la FA, con el objetivo de reducir el tiempo de elaboración de los vinos destinados a ser consumidos jóvenes, evitar la proliferación de BL indeseables procedentes de la flora indígena y de otros organismos perjudiciales, como bacterias acéticas o *Brettanomyces*, y aumentar las posibilidades de las BL de crecer y aclimatarse en ausencia de etanol y de acceder a los nutrientes del mosto antes de que sean metabolizados por las levaduras (Davis *et al.*, 1985; Gerbaux, 2006; Krieger, 2006a; Krieger, 2006b).

En ocasiones la inoculación de BL antes de la FA puede provocar un retardo o interrupción de la FA (Huang *et al.*, 1996), aunque Rosi *et al.* demostraron que la población bacteriana no tiene ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento y la FA de las levaduras (Rosi *et al.*, 2003). Por otro lado, Gallander observó que la inoculación de BL antes de la FA no estimula la FML (Gallander, 1979) y King y Beelman sugieren que el crecimiento de *O. oeni* durante la FA en un sistema de mosto modelo se puede retrasar por la producción de compuestos tóxicos derivados de las levaduras distintos del etanol y el dióxido de azufre. Además, concluyen que el crecimiento bacteriano acelera la fase de mortandad del ciclo de crecimiento de la levadura (King y Beelman, 1986). Recientemente, se ha caracterizado un factor de naturaleza proteica, producido por cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae*, que ejerce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las BL y la degradación de ácido málico (Comitini *et al.*, 2005).

Un intenso crecimiento bacteriano puede inhibir el desarrollo de la levadura, lo que induce la producción de niveles excesivos de acidez volátil (Krieger, 2006b). Beelman y Kunkee han demostrado que, en presencia de azúcares fermentables, la FML no provoca necesariamente una producción de cantidades excesivas de ácido acético por las BL, a condición de que la fermentación alcohólica se inicie y concluya rápidamente (Beelman y Kunkee, 1985).

Radler ha reportado un consumo de azúcar de 0,2-2 g/L durante las fases de crecimiento de las BL (Figura 1.4). Durante la fase de crecimiento celular, se pueden producir pequeñas cantidades de ácido acético y ácido D-láctico. Cuando el recuento celular llega a 5×10^6 UFC/mL, en la fase estacionaria I, comienza la degradación del ácido málico, pero no se produce ácido acético durante la degradación del ácido málico. La fase estacionaria II, se caracteriza por la degradación de ácido cítrico y azúcares, acompañada de un incremento del ácido acético. No obstante, las BL sólo empezarán a consumir azúcares cuando haya terminado la degradación de ácidos orgánicos. El ácido málico será el primero en consumirse, seguido del cítrico, el fumárico y otros (Radler, 1963).

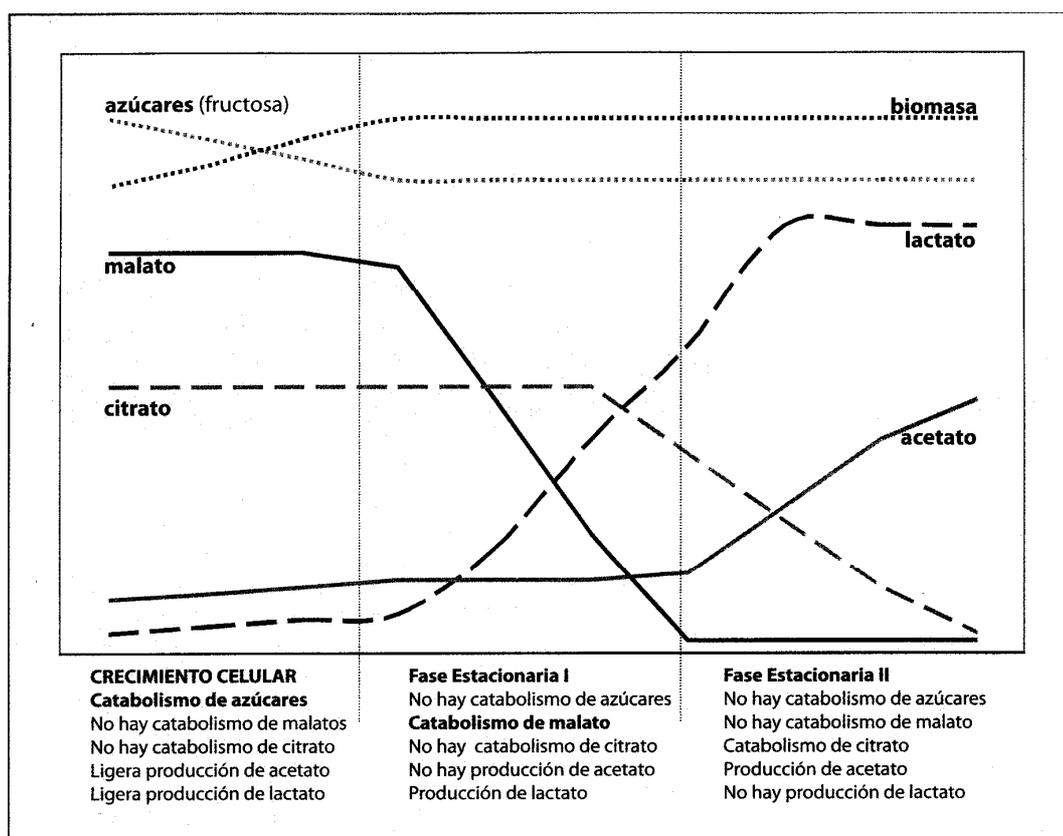


Figura 1.4. Metabolismo de azúcares y ácidos orgánicos durante la FML en el vino (Radler, 1963, adaptado de Krieger 2006b).

Experimentos realizados por Lallemant mediante inoculación simultánea de BL y levadura y su comparación con la inoculación de BL una vez terminada la FA no han mostrado diferencias de concentración final de ácido acético, aunque sí han demostrado una relación directa entre la degradación de ácido cítrico y un incremento de la concentración de ácido acético. Dependiendo de la disponibilidad de oxígeno y del potencial de oxidación-reducción del medio, el ácido cítrico puede ser utilizado como un aceptor de electrones, con el resultado de una producción de ácido acético, o se puede degradar en diacetilo. La subsiguiente reducción de diacetilo en acetoína y 2,3 butanodiol también depende del potencial de oxidación-reducción del vino. La FML en presencia de lías siempre da como resultado bajos niveles de diacetilo, ya que el poder reductor de las levaduras viables lo transforma en componentes menos aromáticos. Por ello, vinos obtenidos por inoculación conjunta de levaduras y BL tienen una menor presencia de sabores lácticos y de mantequilla y una mayor carga frutal (Krieger, 2005; Krieger, 2006b).

La ventaja de inocular las BL durante la FA se puede explicar por el hecho de que en esta etapa la mayor parte del SO₂ libre está ligado por compuestos de carbonilo producidos durante el crecimiento de la levadura y la concentración alcohólica aún no ha alcanzado niveles tóxicos. Sin embargo, es en esta etapa cuando se pueden dar los niveles más altos de antagonismo por metabolitos de la levadura (como el ácido decanoico). Kyne y Gertsen-Briand no recomiendan la inoculación de BL a mitad de la FA porque la FA activa sometería las BL a un estrés excesivo. Lallemand ha confirmado por medio de la investigación la conclusión de que la inoculación de las BL a la mitad de la FA ocasiona siempre una acusada reducción de la viabilidad y actividad bacterianas (Krieger, 2006b; Kyne y Gertsen-Briand, 2006).

La inoculación al final de la FA no plantea el riesgo de descomposición heterofermentativa de los azúcares por las BL, con el resultante incremento de la acidez volátil. También se evita de esta manera la toxicidad de los ácidos carboxílicos producidos, ya que su concentración disminuye después de la FA. La disponibilidad de nutrientes bacterianos originados por la muerte y autólisis de la levadura aseguran el éxito de la inoculación, aunque la exposición a los altos niveles de etanol presentes puede causar un retraso de la FML (Davis *et al.*, 1985; Krieger, 2005; Krieger, 2006b).

En conclusión, no hay un planteamiento universal que pueda ser adoptado para inducir la FML por inoculación. El momento más deseable para la inoculación depende de otros factores de la vinificación, como la composición del vino, la cepa de levadura y las técnicas de vinificación.

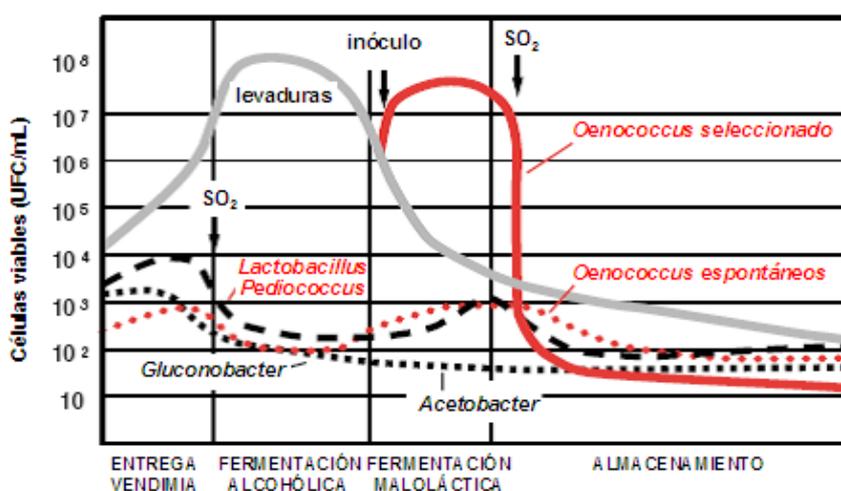


Figura 1.5. Fermentación maloláctica controlada (adaptado de Lallemand Inc., 2000)

c) Impedir la FML

Si no se desea la FML, como en el caso de vinos de baja acidez, hay que impedir el desarrollo de BL en el mosto y en el vino mediante la eliminación o desactivación de las BL presentes en dichos medios, por adición de SO₂ y/o lisozima (Krieger, 2006a).

Para la inhibición de la FML se pueden utilizar todos los factores contrarios a los empleados para favorecer su desarrollo. Por lo tanto los parámetros que permiten inhibir la FML son: una maceración mínima, pH bajo, bajas temperaturas y un trasiego y clarificación precoces (Krieger, 2006a).

1.2 EL CARBAMATO DE ETILO

1.2.1 Antecedentes

A principio de los años 60 se denunció por primera vez la presencia en bebidas alcohólicas de una sustancia cancerígena, el carbamato de etilo (CE), también llamado etil carbamato o uretano. Como su presencia en vino no aporta ninguna ventaja tecnológica, se descartó que fuera agregado fraudulentamente y se comenzó a investigar su origen (Trioli y Colagrande, 1991). En 1962, Thoukis propuso que el CE se formaba en vinos tratados con un inhibidor de levaduras llamado pirocarbonato de etilo o dietil dicarbonato (DEDC) al reaccionar específicamente con el amonio presente (Ough, 1976a; Stevens y Ough, 1993). Este antiséptico suscitó grandes esperanzas en la industria de las bebidas refrescantes, donde ejercía una interesante acción higienizante, y se descomponía en anhídrido carbónico y etanol, productos de por sí inofensivos y no extraños a la propia naturaleza de las bebidas donde se generaban. Inclusive la FAO/WHO (OMS) llegó a señalar un nivel aceptable de tratamiento para bebidas de 0-300 ppm (de la Torre y Buxaderas, 1997). Estudios con diluciones isotópicas encontraron CE en niveles de mg/L en vinos tratados con pirocarbonato de etilo. Por todo esto el uso del pirocarbonato de etilo como aditivo en las bebidas fue prohibido por la Food and Drug Administration (FDA) en 1970 después de 10 años de uso (Ough *et al.*, 1988a; Stevens y Ough, 1993).

En todo el mundo se investigó la cantidad normal de CE en diferentes alimentos y bebidas fermentados. Se observó su presencia en cantidades trazas en muchos productos fermentados, con excepción del sake japonés. Se comprobó la ausencia del pirocarbonato de etilo, indicando que no había sido usado, e investigaciones posteriores sobre un número importante de muestras de sake confirmaron la presencia de cantidades significativas de CE (60-600 µg/L) (Ough *et al.*, 1988a).

En 1985 el “Liquor Control Bord of Ontario” (LCBO) encontró cantidades importantes de CE en muchos vinos de importación y otras bebidas alcohólicas, sobre todo destilados y licores de frutas, entre los que sobresalían los destilados de fruta de hueso (ciruela y cereza), donde se encontraron hasta 3200 ppb (µg/L) (Trioli y Colagrande, 1991; de la Torre y Buxaderas, 1997). Luego de estas observaciones, la “Health Protection Branch”, organismo federal canadiense, estableció los límites para regular la cantidad de CE en bebidas alcohólicas (Trioli y Colagrande, 1991; Stevens y Ough, 1993). Las demandas canadienses estimularon nuevos intereses sobre el CE y se sugirió que la fuente del CE en alimentos y bebidas fermentados eran compuestos N-carbámílicos, principalmente urea y citrulina en vino (Ough *et al.*, 1988a; Stevens y Ough, 1993).

El problema del CE es delicado dado su posible poder carcinogénico. Por ello es necesario establecer unos límites de seguridad y disminuir en lo posible su presencia, para lo que es imprescindible conocer su origen.

1.2.2 Características y usos

El CE es el éster etílico del ácido carbámico, de fórmula química:

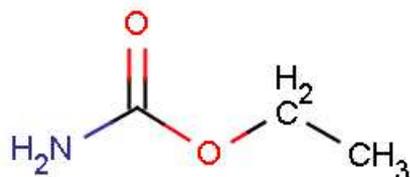


Figura 1.6. Carbamato de etilo

Es una sustancia que se encuentra de forma natural en muchos alimentos obtenidos por fermentación, como el pan, el queso, el yogur, en tenores que pueden variar entre 0 y 5 µg/Kg (Ough, 1976a; Ingargiola, 1992; de la Torre y Buxaderas,

1997) y no se ha detectado en alimentos o bebidas no fermentados (Ough, 1976a; Suárez Lepe e Íñigo, 2004).

Forma cristales prismáticos, incoloros. Su temperatura de fusión es de 48,5 °C y su temperatura de ebullición de 184 °C. Sublima a 171°C. Es soluble en agua, etanol y otros solventes orgánicos (Ingargiola, 1992).

Debido a su ligera lipofilia, penetra en el sistema nervioso central donde ejerce una acción sedante y anestésica. Sobre esta base se ha utilizado en medicina humana y veterinaria como agente hipnótico. Debido a la falta de constancia en los resultados terapéuticos obtenidos y la puesta a punto de derivados con acción más poderosa y controlada, esta utilidad ha caído en desuso. Aparte de esta acción hipnótica y sedante demostrada, no hay unanimidad en el beneficio de su empleo en terapéutica humana. La bibliografía recoge datos tan dispares como los que anuncian que, en el ámbito biológico, posee una actividad anticancerígena o citostática, por lo que se apoyó su empleo en el tratamiento de distintas neoplasias, como la leucemia granulocítica crónica, la leucemia linfocítica crónica y otras. Sin embargo, las dosis eran demasiado elevadas (de 1 a 3 y hasta 6 g al día), pudiendo producir efectos secundarios como náuseas, vómitos, hemorragia gastrointestinal y leucopenia, llegándose incluso a mencionar casos de lesiones hepáticas y renales, así como anemia aplásica. Por todo ello estos intentos han sido abandonados (Ingargiola, 1992; de la Torre y Buxaderas, 1997).

El CE y sus derivados son ampliamente empleados en la industria de los materiales plásticos y en la fabricación de ciertos pesticidas, como herbicidas y fungicidas. También ha sido empleado como conservante en la industria agroalimentaria, especialmente en las bebidas (cerveza, zumos de fruta) (Ingargiola, 1992).

La determinación analítica del contenido de CE en los vinos se realiza actualmente por cromatografía de gases con espectrometría de masas.

Sus propiedades físicas y microbianas son ahora bien conocidas, aunque la falta de tecnologías sencillas para su estimación ha impedido estudiar más a fondo este compuesto (Suárez Lepe e Íñigo, 2004).

1.2.3 Toxicidad y carcinogenicidad del CE

La ruta principal de exposición al CE en la población humana es a través del consumo de alimentos y bebidas fermentados.

El CE es bien absorbido por el tracto gastrointestinal (y la piel), y se distribuye de manera rápida y homogénea por todo el organismo. Su eliminación también es rápida y más del 90% se elimina como dióxido de carbono en seis horas en ratones. Las vías metabólicas de importancia potencial incluyen la hidrólisis a etanol y amoníaco y la oxidación a vinilcarbamato, que se une covalentemente a los ácidos nucleicos y a las proteínas, induciendo mutaciones, como sustituciones de pares de base en el ADN.

En 1943 Nettleship y Henshaw señalaron por primera vez la carcinogenicidad del CE. Ésta fue confirmada en 1968 por los trabajos de Mirvish (Ingargiola, 1992). La mayor parte de los cánceres causados por el CE son provocados por su administración por vía parenteral (subcutánea, intramuscular, intraperitoneal). Existen muy pocos trabajos en los que haya aparecido un cáncer por vía oral (Ingargiola, 1992).

Su carácter cancerígeno ha quedado bien demostrado después de su empleo como anestésico en animales de experimentación (ratones, ratas, hámster, etc.); a dosis altas, durante tiempo prolongado y por diferentes vías de administración, ha producido lesiones en pulmón, hígado y timo (Mínguez, 1988; de la Torre y Buxaderas, 1997). Es sorprendente observar que las dosis administradas son considerables. Varían de 0,2 a 1,0 g por Kg de peso del animal. Por vía intraperitoneal una sola dosis es suficiente, pero por debajo de 0,5 g por Kg no hay aparición de tumores en los animales tratados. Cuando se administra CE en el agua de bebida, en dosis de 1 g por litro de agua, los tumores sólo aparecen luego de varias semanas de la administración (Ingargiola, 1992).

Los problemas fisiológicos que puede desencadenar una sustancia cancerígena como el CE aparecen a largo plazo y su efecto depende de factores como la ingesta, la susceptibilidad del individuo y su toxicidad intrínseca. La toxicidad intrínseca o potencia tóxica de un compuesto depende de la especie biológica en la que se hayan estudiado sus efectos y viene definida por el valor del índice DL_{50} . El CE tiene un índice DL_{50} en el conejo de 2g/kg (Suárez Lepe e Íñigo, 2004).

De los datos obtenidos en animales de laboratorio se ha estimado la dosis diaria “sin efectos” para el hombre en 0,3 mg/kg/día. Las ingestas diarias máximas se calculan a partir de la dosis sin efecto significativo obtenida en los estudios de toxicología experimental sobre animales de laboratorio dividida por un factor de seguridad a fin de extrapolar los resultados del animal al hombre. Los datos sobre experimentación animal que han servido y sirven como base para dicho cálculo no permiten sacar unas conclusiones muy convincentes, ya que se advierte una gran disparidad en los criterios seguidos en la consecución de los resultados (de la Torre y Buxaderas, 1997). Por ejemplo Schmahl *et al.* consideran una ingesta diaria admitida para el hombre en 0,3 mg/kg/día, sustentándose en estudios dosis-respuesta realizados en ratas y ratones y teniendo en cuenta un factor de seguridad de 5000 (Schmahl *et al.*, 1977). En base a estudios experimentales de efectos crónicos sobre ratas y ratones, Schlatter y Lutz estiman una “dosis virtualmente segura” de 20 a 80 ng/kg/día (Schlatter y Lutz, 1990).

La elección del valor del factor de seguridad a emplear para traducir los resultados obtenidos en animales al hombre atiende siempre a la exposición prevista a la sustancia tóxica. En el caso más corriente, por ejemplo, los aditivos alimentarios, de uso tan común, y en alimentos de consumo mucho más habitual y población concernida muchísimo más amplia (incluyendo sectores poblacionales de mayor riesgo, como es el caso de los niños), el factor de seguridad suele ser de 100, por ello extraña la elección por parte de algunos autores del valor 5000, exageradamente alto (de la Torre y Buxaderas, 1997).

Estos resultados obligan a estar muy atentos a las posiciones normativas dirigidas a establecer límites de CE en el vino, si los argumentos que se esgrimen para establecerlos, y que han servido de base a la FDA y al LCBO de Canadá, son los resultados de Schmahl *et al.* de 1977 (de la Torre y Buxaderas, 1997).

En 1987 el Centro Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasificó al CE dentro del grupo 2B, categoría que corresponde a aquellos compuestos de los que se dispone de suficiente información sobre su potencial carcinogénico en los animales de experimentación, pero insuficiente en el hombre. Sin embargo, se conoce bien que los metabolitos activos del CE, el N-hidroxiuretano, el vinilcarbamato y el epoxycarbamato, son capaces de establecer enlaces covalentes con el ADN tanto *in vivo* como *in vitro*, razón por la cual el CE se puede considerar genotóxico (de la Torre y Buxaderas, 1997).

Hay que tener en cuenta, además, que la toxicidad del CE se había ensayado hasta el momento principalmente con soluciones acuosas de CE, no en solución alcohólica, y que determinadas sustancias como la cafeína y el etanol parecen inhibir el poder cancerígeno del CE (Mínguez, 1988; Ingargiola, 1992). Distintos grupos de investigación han postulado que el etanol puede inhibir la carcinogenicidad del CE (Wadell *et al.*, 1987) o que puede modular el metabolismo inicial del CE, previniendo la formación de metabolitos activos (Yamamoto *et al.*, 1988). Resultados preliminares sugieren que el etanol inhibe la activación metabólica del CE resultando en una inhibición parcial de la alquilación del ADN (Kristiansen *et al.*, 1990; Sotomayor y Washington, 1996). Estudios más recientes evidencian efectos contradictorios del etanol sobre la incidencia de ciertos tipos de cáncer (Beland *et al.*, 2005).

1.2.4. Origen del CE en los alimentos

Pirocarbonato de etilo

Este compuesto fue el primero en ser identificado como precursor del CE, un tiempo comercializado por Bayer con el nombre de Baycovin[®]. Ofrece una buena acción fungicida en medios de pH bajo, como el vino y los jugos de fruta. Es un producto muy interesante tecnológicamente porque hidroliza rápidamente dando como subproductos etanol y dióxido de carbono (Trioli y Colagrande, 1991).

Este compuesto da como producto CE cuando reacciona con nitrógeno amoniacal.

Un informe de Lofroth y Gejvall (1971) fue el primero sobre la cantidad de CE producida al agregar DEDC a las bebidas. Ellos encontraron grandes cantidades de CE por determinación de diluciones isotópicas, aunque estudios posteriores con técnicas de ionización de llama y cromatografía de gases combinada con espectrometría de masas no pudieron verificar estos resultados extremadamente altos (Ough, 1976a; Ough, 1976b).

En 1972, el Comité de Expertos sobre Aditivos Alimentarios de la FAO/WHO disminuyó el nivel máximo permitido de DEDC para el tratamiento de bebidas carbonatadas o no de 300 a 250 ppm. Aunque también reconoció que el CE se puede encontrar naturalmente en bebidas fermentadas, prohibió el uso del DEDC en vino

basándose en que las deficiencias en la metodología analítica no permiten una conclusión inequívoca sobre la presencia o ausencia de CE en bebidas tratadas con DEDC y los niveles obtenidos de CE en trabajos previos son inadmisibles (Ough, 1976a; WHO, 1973).

En 1974, ante la evidencia de la formación de CE en bebidas tratadas con DEDC, y teniendo en cuenta que el CE es un conocido carcinógeno, la WHO revoca el uso del DEDC. (WHO, 1974)

La aparición de cantidades significativas de CE en bebidas alcohólicas luego de la prohibición hizo suponer que hay otras causas de formación de CE independientes del DEDC (Trioli y Colagrande, 1991).

Ácido cianhídrico

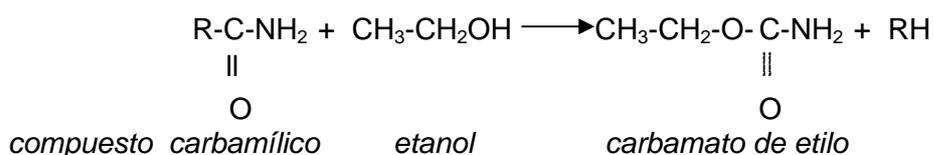
Algunos compuestos aldehídicos y cetónicos propios de los destilados, como metilglioxal, diacetilo o 2,3-pentadiona, pueden formar peróxidos por acción de la luz. Se produce por éstos una reacción de tipo radical que transforma el ácido cianhídrico y el etanol en CE y que puede continuar en ausencia de luz (Trioli y Colagrande, 1991). Estudios de Baumann y Zimmerli (1986) demostraron que se forma CE a temperatura ambiente y en presencia de luz en soluciones que contienen estos compuestos, etanol y cianuro, indicando que las altas cantidades de CE encontradas en brandy de fruta o licores se asocia al hueso de frutas desosadas, el cual contiene compuestos relacionados con el cianuro (Ough, 1991).

Estos compuestos relacionados con el cianuro pueden estar en cantidades importantes en los destilados de fruta, pero están prácticamente ausentes en los vinos, por lo que este mecanismo no explica la presencia de CE en los mismos (Trioli y Colagrande, 1991), salvo que una clarificación azul incorrectamente practicada como tratamiento desferrizante hubiese dado lugar a concentraciones anómalas de dicho ácido (Suárez Lepe e Íñigo, 2004), ya que si se utiliza ferrocianuro potásico en exceso el ión ferrocianuro remanente puede descomponerse con formación de ácido cianhídrico (Molina Úbeda, 2000).

Sin embargo no es imposible que se encuentren en la uva, por lo que sería lógico buscarlos en las semillas (Ough, 1991).

Compuestos carbamílicos

En el vino y en otras bebidas alcohólicas producidas por fermentación, el mecanismo de formación del CE que parece más factible es la reacción del etanol con compuestos que poseen un grupo carbamílico (Ough *et al.*, 1988a; Trioli y Colagrande, 1991). La reacción general se esquematiza a continuación:



Esta reacción se ve acelerada a temperatura elevada y en ambiente ácido, como el del vino (Ough *et al.*, 1988a, Trioli y Colagrande, 1991).

En el vino se encuentran naturalmente numerosos compuestos carbamílicos que potencialmente podrían reaccionar con el etanol presente dando CE. Algunos de estos compuestos son aminoácidos carbamílicos propios de la uva, otros proceden del metabolismo nitrogenado microbiano y de la degradación de los ácidos nucleicos. Entre ellos encontramos urea, citrulina, α -aminoácidos N-carbamílicos, β -aminoácidos N-carbamílicos, alantoína y carbamil fosfato (Ough *et al.*, 1988a; Trioli y Colagrande, 1991). A continuación se presenta la evolución hacia CE de algunos de los precursores más importantes en vino.

Urea

La urea es probablemente el principal precursor del CE en el vino. Es producida por las levaduras en la FA como producto intermedio del catabolismo de la arginina y de las purinas (Monteiro *et al.*, 1989; Trioli y Colagrande, 1991). En la Figura 1.7 se esquematizan las vías metabólicas implicadas en su síntesis en *S. cerevisiae*.

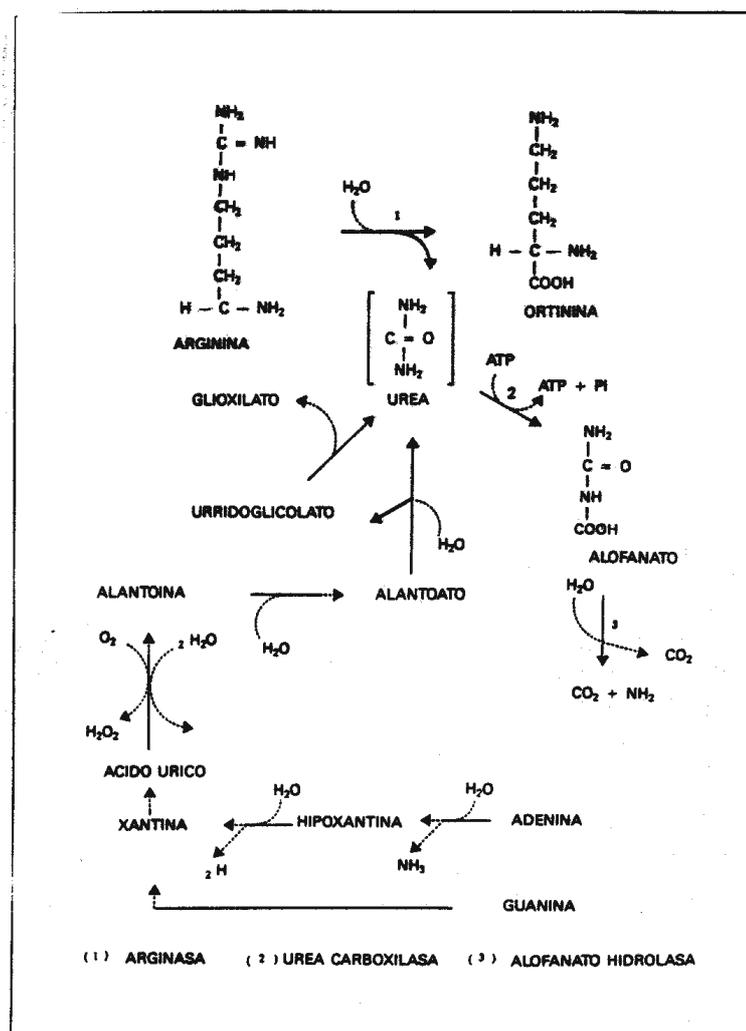


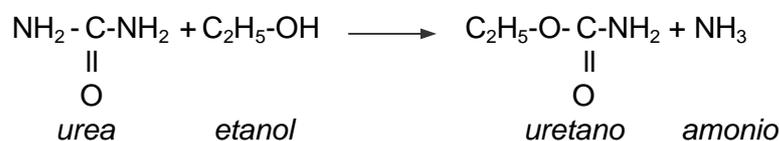
Figura 1.7. Esquema de las principales vías metabólicas de síntesis de la urea en *Saccharomyces cerevisiae* (Trioli y Colagrande, 1991).

La arginina es degradada por la arginasa, resultando en ornitina y urea. En *S. cerevisiae* la urea puede ser carboxilada por la urea carboxilasa dando alofanato que es hidrolizado en amoníaco y dióxido de carbono por la enzima alofanato hidrolasa (Ough *et al.*, 1988b; Trioli y Colagrande, 1991). La vía degradativa de la arginina es regulada en *S. cerevisiae* por la arginina y por el amonio. La arginina estimula la síntesis de la arginasa en la levadura, mientras que el amonio inhibe la actividad de la urea carboxilasa. Si la fermentación tiene lugar en un medio rico en arginina y en iones amonio, una parte importante de la urea no será hidrolizada por las levaduras y se convertirá en un producto final del metabolismo nitrogenado (Ough, 1991).

La arginina es el aminoácido asimilable por las levaduras más abundante presente en el mosto de la mayoría de las variedades de uva (Ough *et al.*, 1988b; Butzke, 1998). Se encuentra en cantidades bastante elevadas en los mostos (hasta 2360 mg/L) y es segunda en términos de contenido después de la prolina. Si es fermentado un mosto con un estatus de nitrógeno importante, es probable encontrar en el vino cantidades importantes de urea (Trioli y Colagrande, 1991).

Los excesivos agotamientos de la vendimia en el prensado y las temperaturas elevadas afectan a los niveles finales de urea, que también están fuertemente relacionados con el contenido de arginina en el mosto (Suárez Lepe e Íñigo, 2004). Además del contenido nitrogenado del mosto, la cepa de levadura que conduce la FA es importante al determinar la cantidad de urea residual en el vino, ya que cada cepa posee un patrimonio enzimático con actividad específica (Trioli y Colagrande, 1991). La crianza del vino sobre lías no parece tener efectos, mientras que la adición de etanol durante la fermentación provoca un considerable aumento de la producción de urea (Suárez Lepe e Íñigo, 2004).

La urea presente en el vino reacciona con el etanol para dar CE.



Esta reacción depende de la concentración de reactantes, la temperatura y el pH. Este último posiblemente es el factor de menor influencia en vino (Ough *et al.*, 1988a; Monteiro *et al.*, 1989).

Se ha demostrado la formación de CE a partir de urea marcada radiactivamente. La arginina marcada radiactivamente puede ser un precursor de urea, lo que la convierte en un precursor potencial para la formación de CE en el vino (Monteiro *et al.*, 1989).

Aminoácidos

Se han estudiado algunos aminoácidos por su papel potencial en la formación de CE. Éstos fueron arginina, ornitina y citrulina. De los tres la citrulina es el único que puede dar directamente cantidades significativas, aunque limitadas, de CE (Trioli y Colagrande, 1991).

Citrulina

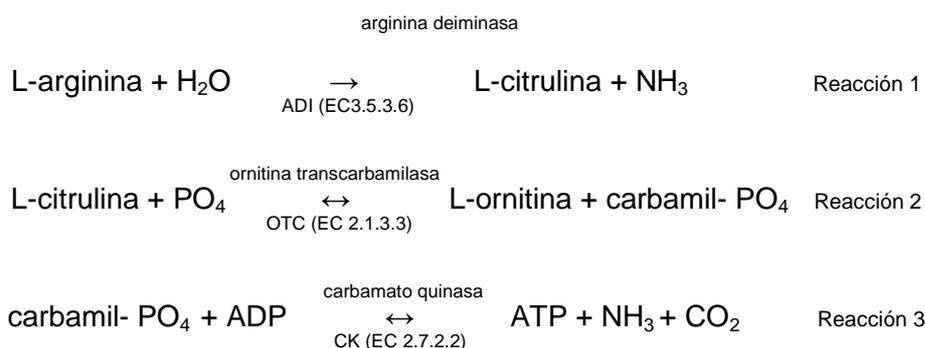
La citrulina no se encuentra normalmente en las proteínas y es un aminoácido presente en pequeñas cantidades en prácticamente todos los mostos (hasta 74 mg/L) (Ough *et al.*, 1988a; Ough, 1991; Trioli y Colagrande, 1991). Una parte de la citrulina puede ser metabolizada por las levaduras durante la FA (Ough, 1991).

La reacción de citrulina con etanol para dar CE es catalizada en medio ácido, al igual que lo que ocurre con la urea. El rango de reacción de urea con etanol comparado con la reacción de citrulina con etanol es de aproximadamente 8:1 (Ough, 1991). Sobre una base molecular, la citrulina tiene un rango de formación de CE de aproximadamente una cuarta parte del de la urea (Stevens y Ough, 1993).

Hay que tener también en cuenta que la citrulina puede ser formada a partir de la degradación de la arginina por diferentes especies de BL.

Arginina

Se ha sugerido que las BL degradan la arginina a través de la vía de la arginina deiminasa (ADI), también conocida como vía de la arginina dihidrolasa (Liu *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1995b), ruta conocida de antemano en otras bacterias y otros microorganismos (Abdelal, 1979). Esta vía implica tres enzimas, arginina deiminasa (ADI), ornitina transcarbamilasa (OTC) y carbamato quinasa (CK) que catalizan las siguientes reacciones:



Dos de los intermediarios de esta vía, citrulina y carbamil-fosfato, pueden reaccionar con etanol para formar CE (Liu *et al.*, 1994).

Además de estas tres enzimas, también está involucrada en la degradación de la arginina una proteína de transporte antiport de membrana que intercambia la entrada celular de arginina con la salida de la ornitina producida (Poolman *et al.*, 1987). Los genes que codifican para las tres enzimas de la ruta ADI (*arcA*, *arcB*, *arcC*) junto con el gen que codifica para la proteína de transporte (*arcD*) forman un operón y han sido secuenciados en *O. oeni* (Divol *et al.*, 2003; Tonon *et al.*, 2001) y otras bacterias.

Aunque algunos autores concluyan con su experiencia que la FML no afecta a la formación de CE (Tegmo-Larsson *et al.*, 1989), otros han demostrado la excreción de citrulina durante la degradación de arginina por diferentes especies de BL y la correspondiente formación de CE en el vino. Esto sugiere que las BL son productores potenciales de un precursor del CE, la citrulina, cuando la arginina es catabolizada (Liu *et al.*, 1994).

En función de la especie y la cepa de BL, existe bastante variabilidad en la capacidad de degradación de arginina. Esta degradación puede ser completa hasta amoníaco y CO₂. En este caso no hay acumulación de citrulina y carbamil-fosfato, pero la formación de amonio implica un aumento de pH, lo cual facilita el crecimiento de otras bacterias no deseadas en vino y tampoco es conveniente organolépticamente para vinos no muy ácidos. En otros casos, la degradación de arginina puede ser incompleta. Hay especies o cepas que pueden tener inhibida la última reacción (carbamato quinasa, CK) por la presencia de otras fuentes de energía o en función de las condiciones (pH, etanol, etc.). En estos casos se pueden acumular los intermediarios citrulina y/o carbamil-fosfato (Bordons *et al.*, 2004).

En un estudio del metabolismo de arginina de diferentes cepas disponibles comercialmente para inducir la FML en el vino con células en reposo metabólico o no proliferantes (*resting cells*), con el objetivo de evaluar su capacidad para excretar y utilizar la citrulina, se vio que todas las cepas examinadas degradan arginina y citrulina en experiencias separadas. Todas las cepas excretaron citrulina a partir de la degradación de arginina, siendo el rango de excreción específico de cepa. Esto tiene relevancia enológica por dos razones: primero, por la posible formación de CE y, segundo, por la posible utilización de la citrulina por BL perjudiciales (como *Lactobacillus* y *Pediococcus*). En este estudio no se consideró útil calcular un rango de conversión de arginina a citrulina, ya que estos rangos se deben calcular a partir de experimentos realizados en vino, teniendo en cuenta que pueden depender de la

variedad de uva, los tratamientos utilizados, la cepa de levadura utilizada para conducir la FA y la reutilización de citrulina por la misma o por otras cepas. *Lactobacillus* y *Oenococcus* ensayados en esta investigación almacenan citrulina intracelularmente durante el crecimiento en un medio rico en arginina y la liberan por lisis celular. Se vio además que algunos *Oenococcus* fueron capaces de reutilizar la citrulina previamente excretada. (Mira de Orduña *et al.*, 2000a).

Hay cepas de *O. oeni*, incapaces de utilizar arginina, que pueden degradar la citrulina hasta ornitina, amoníaco y CO₂. Esto puede ser muy importante por dos motivos: por un lado estas cepas pueden obtener energía suplementaria para el crecimiento del metabolismo de la citrulina (reacción 3) y, por otro lado, la disminución del aminoácido podría evitar la posible formación de CE a partir de la citrulina naturalmente presente en el vino (Arena *et al.*, 1999).

También se ha visto que cepas de *O. oeni* que no degradan arginina ni producen citrulina aumentan, aunque ligeramente, la concentración de CE en el medio. El CE se pudo formar a partir de algún precursor desconocido producido durante el crecimiento de estas cepas en vino (Liu *et al.*, 1994).

En conclusión, BL con la maquinaria enzimática completa para el catabolismo de la arginina pueden ser muy competitivas en crecimiento, ya que pueden conseguir energía extra a partir de la degradación de la arginina (reacción 3). De hecho se ha comprobado que el catabolismo de la arginina puede favorecer el crecimiento en algunas BL (Liu *et al.*, 1994). No obstante, estas bacterias pueden ser indeseables, ya que al degradar la arginina pueden también excretar citrulina y, posiblemente, carbamil fosfato que, al reaccionar con el etanol, podrían formar CE (Ough *et al.*, 1988a; Liu *et al.*, 1994). La etanólisis rápida de la citrulina sólo ocurre a temperaturas elevadas, pero esta reacción puede ocurrir más lentamente a las temperaturas normales a las que se almacena el vino. No todas las BL tienen el sistema enzimático completo para la degradación de la arginina. Las cepas carentes de alguna o todas las enzimas podrían ser una buena elección como cultivos iniciadores. Se debería evitar el uso de las cepas que poseen solamente la ADI (reacción 1), o la ADI y la OTC (reacción 2), ya que, potencialmente, pueden excretar citrulina y/o carbamil fosfato con la consecuente formación de CE (Liu *et al.*, 1994).

De todo ello se deduce que es importante recabar información sobre la capacidad de distintas cepas de BL para degradar la arginina. En el caso de *O. oeni*, el

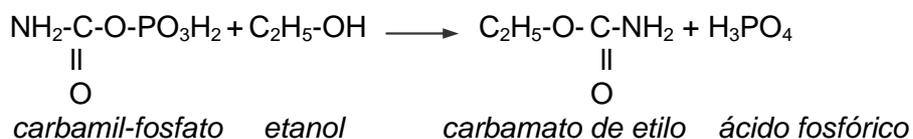
estudio de sus diversas cepas está relacionado con el objetivo de seleccionar cultivos iniciadores que conduzcan la FML con un mínimo riesgo de producción de precursores de CE. En el caso de otras especies diferentes a *O. oeni* es necesario conocer los riesgos de la generación de precursores de CE por las diferentes especies y en qué condiciones de vinificación puede aumentar la posibilidad de producción de éstos. Finalmente, también es necesario conocer cuales son las condiciones de vinificación que minimicen la degradación de arginina, la producción de precursores de CE y la potencialidad de formación de éste a partir de los precursores (Bordons *et al.*, 2004), temas que son objetivos de esta tesis.

Carbamil-fosfato

Como ha sido expuesto anteriormente, el carbamil-fosfato puede ser formado durante el catabolismo de la arginina por diferentes especies de BL vía ADI. Pero también puede ser formado por *S. cerevisiae*.

S. cerevisiae tiene una carbamil fosfato sintetasa capaz de convertir ATP, NH₃ procedente de la glutamina y CO₂ en carbamil fosfato durante el ciclo de producción de arginina, por lo que en los fermentados hay una cierta cantidad de este compuesto que es responsable de la presencia de limitadas cantidades de CE en el vino (0-5 ppb), pero no justifica la aparición de altos niveles a veces observados (Trioli y Colagrande, 1991).

La reacción del carbamil fosfato con el etanol según el siguiente mecanismo ha sido demostrada en el vino (Ough *et al.*, 1988a; Trioli y Colagrande, 1991).



El carbamil fosfato reacciona rápidamente con el etanol incluso a temperatura ambiente, pero, como ya señalamos, se encuentra en muy pequeñas cantidades en los alimentos fermentados, incluyendo el vino (Ough *et al.*, 1988a; Trioli y Colagrande, 1991).

1.2.5 Influencia de las condiciones de vinificación en la formación del CE

Viticultura

Fertilizaciones nitrogenadas en la viña tienen influencia directa sobre el contenido nitrogenado de la uva y del mosto resultante. Fertilizaciones excesivas con urea, amonio y otros fertilizantes nitrogenados empleados en el pasado se consideran parcialmente responsables de los niveles más altos de CE que se encuentran en vinos de países productores tradicionales. En general, la vid tiene un bajo requerimiento nitrogenado. Viñas cultivadas en suelos utilizados previamente para otros cultivos herbáceos, fuertemente fertilizados, pueden dar como resultado mostos con excesivos contenidos nitrogenados y CE en vinos. La concentración de componentes nitrogenados, como arginina en mosto y urea en vino, aumenta proporcionalmente con el aumento de una fertilización nitrogenada en la viña. Si las concentraciones de arginina en mosto exceden los 1000 mg/L, la viña se debe considerar como sobre-fertilizada (Butzke y Bisson, 1997).

Estatus nitrogenado del mosto / adiciones

Para evitar paradas de fermentación, o en caso de paradas de la misma, está permitido agregar fosfato de diamonio a un mosto deficiente en nitrógeno. No obstante, niveles excesivos de nitrógeno pueden favorecer la formación y excreción de urea por parte de las levaduras. Aunque se requiere cierta concentración de nutrientes para realizar la FML, altos niveles al final de la FA pueden contribuir a una inestabilidad microbiana en el vino (Butzke y Bisson, 1997).

La adición de activadores de fermentación, esencialmente sales amoniacaes, se realiza al mosto para asegurar que las levaduras tienen suficiente nitrógeno para sintetizar proteínas y crecer. Esta adición debería efectuarse sólo después de asegurarse de que una carencia de compuestos nitrogenados representa un factor limitante para el desarrollo de las levaduras y teniendo en cuenta los límites legales (200 mg/L de nitrógeno en Estados Unidos). El uso de urea como fuente de nitrógeno para las levaduras está prohibido (Trioli y Colagrande, 1991; Butzke y Bisson, 1997; Lallemand Inc., 1998).

Cepas de levaduras

Las cepas de levaduras difieren en su capacidad para catabolizar la urea durante la FA. A igualdad de condiciones nutricionales, algunas levaduras producen mayores cantidades de urea que otras. Se han descrito algunas cepas comerciales que producen niveles relativamente bajos de urea (Trioli y Colagrande, 1991; Butzke y Bisson, 1997).

En el caso de FAs espontáneas con cepas de levaduras desconocidas es necesario controlar los niveles de arginina y urea en la fermentación, ya que no se conoce la capacidad para metabolizar estos compuestos en estas cepas (Butzke y Bisson, 1997).

Bacterias lácticas

Como se ha expuesto antes, algunas cepas de BLs son capaces de formar pequeñas cantidades de citrulina a partir de arginina y excretar este precursor en el vino, y hay cepas que, aunque no son capaces de degradar la arginina, pueden producir pequeñas cantidades de CE, sugiriendo que pueden estar involucrados otros precursores nitrogenados que no derivan de la arginina. Por ello la necesidad de seleccionar cultivos iniciadores para conducir la FML que no generen una gran cantidad de precursores. Por la misma razón debería evitarse la FML espontánea (Butzke y Bisson, 1997).

Como recomendación, si los productores de vino desean la FML deberían usar una cepa comercial que no produzca altos niveles de citrulina o controlar el contenido de citrulina del mosto en la post-fermentación (Butzke y Bisson, 1997).

Aplicación de ureasa

Ya que la urea es el principal precursor del CE en el vino, la hidrólisis enzimática de la urea a amonio y CO₂ parece un medio adecuado para eliminarla del vino. Esta enzima se obtuvo de *Lactobacillus fermentum* y se conoce como "ureasa ácida". No obstante, su actividad es limitada bajo condiciones normales del vino, principalmente el bajo pH y el etanol. Es inhibida por altas concentraciones de ácido málico y residuos de fluoruro (Trioli y Colagrande, 1991; Butzke y Bisson, 1997).

Envejecimiento sobre lías

Es una práctica común envejecer el vino sobre las lías de levadura para influir en las propiedades organolépticas del vino. Esto libera aminoácidos y proteínas al mismo debido a la autólisis de las células muertas (Butzke y Bisson, 1997).

No obstante, se ha evidenciado que después de aumentar el tiempo de contacto con las lías no aumenta la concentración de CE y no se liberan precursores en el vino a partir de las levaduras por lo que esta práctica parece segura. Hay que tener en cuenta que estos estudios se realizaron con uvas que poseen un bajo contenido de aminoácidos, por lo que estos resultados podrían no ser aplicables a uvas con altas concentraciones de nitrógeno asimilable (Tegmo-Larsson y Henick-Kling, 1990b).

Destilación / Fortificación

Como la urea no es volátil y el CE es escasamente volátil, se puede encontrar CE en destilados de vino. Puede formarse post-destilación por reacción de etanol y un precursor volátil, el isocianato, a temperatura ambiente o temperaturas más elevadas. Los productores de destilados de frutas deben tener cuidado de otro precursor del CE en forma de cianuro. Las frutas con hueso, especialmente cerezas, albaricoques o ciruelas, contienen cianuros unidos a azúcares en sus semillas que pueden ser liberados durante la fermentación. Para evitar altas concentraciones de precursores volátiles de CE es necesario eliminar los huesos antes de la fermentación y una destilación secundaria (Butzke y Bisson, 1997).

Teniendo en cuenta que la fortificación puede agravar el problema de la excreción de urea por las levaduras, se recomienda fortificar en el momento oportuno durante la fermentación, cuando los niveles de urea sean mínimos (Butzke y Bisson, 1997).

Transporte y almacenamiento

La reacción química entre urea o citrulina y etanol aumenta exponencialmente con la temperatura. Un vino con elevados niveles de estos precursores no debe ser expuesto a elevadas temperaturas durante el almacenamiento o el transporte (Butzke

y Bisson, 1997). Estas reacciones pueden ocurrir, aunque más lentamente, a temperaturas normales de almacenamiento (Liu *et al.*, 1994).

Recomendaciones generales para disminuir la formación de CE en el vino (Butzke y Bisson, 1997; Butzke 1998)

- Evitar abonados nitrogenados excesivos del viñedo.
- Controlar el estatus nitrogenado del suelo.
- Controlar el estatus nitrogenado del mosto y del vino.
- Tener en cuenta que el nitrógeno varía mucho con el cultivo.
- No agregar suplementos nitrogenados en exceso.
- No agregar suplementos nitrogenados habitualmente.
- No agregar urea como suplemento nitrogenado.
- Evitar en el mosto concentraciones de arginina mayores a 1000 mg/L.
- Cuando se escojan las cepas de levadura, evitar las que presenten una alta capacidad de excreción de urea, sobre todo si el mosto tiene un alto contenido de arginina.
- Usar BL con características conocidas.
- Recordar que el uso de ureasa no elimina completamente la formación de CE.
- Evitar la exposición del vino a temperaturas elevadas en el almacenamiento y el transporte.
- Ser consciente de que la fortificación del mosto puede agravar el problema de la excreción de urea por las levaduras.
- Controlar los niveles de CE de bebidas espirituosas.

1.2.6 Reglamentación

En Enero de 1988, la FDA limitó el máximo para CE en vinos de mesa en 15 ppb (vinos que contengan 14% vol de etanol o menos) y en 60 ppb para vinos de postre, que contienen más de 14% de etanol (Segal, 1988).

La "Health Protection Branch", organismo federal canadiense, estableció los límites para regular la cantidad de CE en bebidas alcohólicas en 30 ppb para los vinos de mesa, 100 ppb para vinos fortificados, licores y vermouths, 150 ppb en los

destilados (excluido el whisky) y 400 ppb para los aguardientes, oportos y licores de frutas (Segal, 1988; Trioli y Colagrande, 1991).

2. OBJETIVOS

El principal objetivo de la presente tesis era comprender más extensamente los distintos factores que influyen en la formación del carbamato de etilo (CE) durante la fermentación maloláctica (FML) con el fin último y primordial de encontrar pautas que nos permitan prevenir la formación de CE y de sus precursores. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Poner a punto los métodos analíticos para la medición de los precursores del CE y la determinación de CE, así como poner a punto una técnica microscópica rápida para el seguimiento de la FML.

2. Determinar la influencia sobre la producción de CE y sus precursores de distintas condiciones de vinificación (tiempo de maceración con los hollejos durante la FA, FML inducida o espontánea, FML sobre lías, conservación).

3. Determinar el efecto de diferentes condiciones (pH, concentración de etanol, temperatura y concentración de ácido L-málico) sobre la producción de CE y de sus precursores en vino simulado durante la FML por parte de diferentes especies y cepas de BL.

4. Buscar algún parámetro enológico habitual que sirva como predictor de los niveles finales de CE en vinos, mediante el estudio de correlaciones estadísticas entre los parámetros enológicos y el CE, o el CE potencial (CEP).

5. Determinar la posible influencia sobre el metabolismo de la arginina de la infección de la uva por *Botrytis cinerea*, dada la disminución en los niveles de nitrógeno asimilable y, más concretamente, de arginina en uvas afectadas por *B. cinerea*.

6. Evaluar la influencia del momento de inoculación de las BL sobre el desarrollo y evolución de la FML y sobre la formación de CE y sus precursores.

7. Estudiar el comportamiento como cultivo iniciador de una cepa de *L. plantarum* para conducir la FML, en relación con una menor formación de CE y de sus precursores en mostos y vinos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CEPAS UTILIZADAS

Las cepas y especies utilizadas en la presente tesis se exponen a continuación:

- *Oenococcus oeni* A (cepa aislada en la presente tesis durante las experiencias realizadas en la vendimia de 2002),
- *Oenococcus oeni* CECT 217^T (ATCC 23279T),
- *Lactobacillus plantarum* CECT 5671 (Masqué, 1992 – referencia: C11),
- *Lactobacillus brevis* CECT 4121T,
- *Leuconostoc mesenteroides* CECT 219T,
- *Oenococcus oeni* MBR[®] Lalvin ELIOS 1 (Lallemand),
- *Oenococcus oeni* MBR[®] Lalvin 31 (Lallemand).

3.2 CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS

3.2.1 Medios de cultivo

Se han empleado distintos medios de cultivo líquidos y sólidos para recuento, aislamiento, cultivo y conservación de cepas. Todos ellos se han esterilizado antes de ser utilizados. La esterilización se ha realizado en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

- **Medio de Man, Rogosa y Sharpe (MRS):** Medio desarrollado por De Man, Rogosa y Sharpe (1960) para el enriquecimiento, cultivo y aislamiento de lactobacilos en general. Es el medio base para elaborar los demás medios de cultivo que se han utilizado en la presente tesis. La fórmula del medio provisto por Scharlau es la siguiente:

Proteosa peptona	10,00	g/L
Extracto de carne	8,00	g/L
Extracto de levadura	4,00	g/L
Dextrosa	20,00	g/L
Acetato de sodio	5,00	g/L
Citrato de triamonio	2,00	g/L
Sulfato de magnesio	0,10	g/L
Sulfato de manganeso	0,05	g/L
Fosfato ácido de potasio	2,00	g/L
Polisorbato 80	1,00	g/L
pH final: 6,2 ($\pm 0,2$)		

Como este medio presenta un grado muy bajo de selectividad, en él pueden crecer *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y otras especies de bacterias.

- Medio **MRS modificado (MRSm)**: medio utilizado para el crecimiento y mantenimiento de las bacterias. Su composición es la siguiente:

MRS	52	g/L
Fructosa	10	g/L
Ácido DL-málico	4	g/L
pH: 4,5		

- Medio **MRSmT**: medio con la misma composición que el MRSm que, además, contiene un 3% de zumo de tomate. Este medio también es utilizado para el crecimiento y mantenimiento de las bacterias.
- Medio **MRSmTC**: medio de igual composición que el MRSmT pero que, además, contiene 50 mg/L de cicloheximida. Este medio se ha utilizado para realizar aislamientos a partir de vino.
- Medio **MRSmTN**: medio de igual composición que el MRSmT pero que, además, contiene 50 mg/L de nistatina. Este medio se ha utilizado para realizar aislamientos a partir de vino.

Los medios MRSmT, MRSmTC y MRSmTN también se han utilizado como medios sólidos. Su composición es la ya expuesta pero, además, contienen 22,5 g/L

de agar-agar y el pH se ajusta a 4,8-5,0 con NaOH 10 N para que el medio quede lo suficientemente sólido para poder sembrar en su superficie.

- **Vino Simulado:** Se prepara a partir del medio base (Masqué, 1992) cuya composición básica es la siguiente:

Mosto concentrado (65,2 °Brix)	5	mL/L
Extracto de levadura	5	g/L

Este medio contiene mosto concentrado que provee las vitaminas, minerales y otros metabolitos como glicerol, ácidos orgánicos y azúcares necesarios para el crecimiento y metabolismo de las BL. El medio base fue modificado con ácido L-málico, etanol o NaOH 10 N para obtener las distintas variables a ser estudiadas y se le añadieron 200 mg/L de arginina en todos los casos. Se agregó ácido DL-málico antes de esterilizar para corregir la concentración de ácido L-málico y obtener la deseada en cada ensayo (3 g/L ó 6 g/L de ácido L-málico). El NaOH también se agregó antes de esterilizar para alcanzar el pH establecido (3,3; 3,6 y 3,9). Luego de esterilizar el medio en autoclave a 120 °C durante 20 minutos se agregó el etanol, previamente esterilizado por filtración, hasta una concentración final de 10% ó 15% (v/v).

3.2.2 Soluciones utilizadas

- **Zumo de Tomate:** se agrega a los medios de cultivo para favorecer el crecimiento de las bacterias lácticas (BL). En 1969 Amachi y Yoshizumi descubrieron un nuevo factor de crecimiento para las BL en el zumo de tomate. Este factor de crecimiento se conoce como Factor del Zumo de Tomate (TJF, por sus iniciales en inglés). En 1971 Amachi *et al.* identificaron este compuesto como un derivado glicosilado del ácido pantoténico: el ácido 4'-O-(β-D-glucopiranosil)-D(R)-pantoténico. Este factor se agrega al medio de cultivo ya que las BL son incapaces de sintetizar vitaminas del grupo B y son esenciales para la mayoría de ellas (García *et al.*1992, Ribéreau-Gayon *et al.* 2000).

Para su preparación se toma 1 litro de zumo de tomate comercial que no contenga conservantes y se centrifuga para eliminar la materia sólida, el sobrenadante se diluye con agua destilada hasta 1 litro y se esteriliza a 120 °C por 20 minutos.

También se pueden utilizar tomates naturales pelados y triturados. Se puede conservar a 4 °C.

- **Solución de cicloheximida:** la cicloheximida es un inhibidor de la peptidiltransferasa eucariota (inhibe la síntesis proteica). Se agrega a los medios de cultivo para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras.

Se prepara una solución madre concentrada de 8 g/L con agua destilada y se esteriliza por filtración. Se congela en pequeñas dosis para añadir al medio de cultivo una vez esterilizado a razón de 50 mg/L.

- **Solución de nistatina:** la nistatina es un fármaco del grupo de los macrólidos poliénicos. Altera la permeabilidad de la membrana del hongo al formar canales en la misma, impidiendo su crecimiento. Presenta un amplio espectro antifúngico. Se agrega a los medios de cultivo para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras.

Se agrega al medio ya estéril a razón de 50 mg/L, ya que pierde actividad a la temperatura de esterilización. No es muy soluble en agua, por lo que se hace una suspensión que se hierve durante 10 minutos para conseguir su máxima actividad (Masqué, 1992).

3.2.3 Conservación de las cepas

Para períodos de hasta dos meses, las cepas se conservaron en placas de medio MRSmT a 4°C. Para conservar las cepas a largo término se han utilizado Cryo-Billes (AES Laboratoire, Combourg, Francia) que se conservaron a -20°C.

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.3.1 Análisis de parámetros enológicos

- **Masa volúmica a 20°C y densidad relativa a 20°C:** La determinación se realiza por areometría directa del vino utilizando areómetros graduados en unidades de masa volúmica a 20 °C (densímetro). La masa volúmica aparente se ha de corregir por un factor de corrección en función de la temperatura. La

densidad relativa a 20 °C se obtiene multiplicando la masa volúmica por el factor 1,0018 (OIV, 2009).

- **Grado alcohólico probable en mosto:** se ha determinado por refractometría. El grado alcohólico probable se calcula a partir del resultado de la lectura del Brix y conversión a % v/v mediante tablas (OIV, 2009).
- **Grado alcohólico volumétrico adquirido:** se ha determinado por el método de destilación y areometría. Para ello se destila el vino alcalinado y se determina el grado alcohólico en el destilado por areometría con un alcoholímetro (OIV, 2009).
- **Acidez total:** se ha determinado por valoración potenciométrica (OIV, 2009) con un titrador automático Crison Compact Titrator.
- **Acidez volátil:** la acidez volátil (AV) es el conjunto de ácidos grasos de la serie acética que se hallan en el vino libres o combinados formando sales. El más importante es el ácido acético. Por esta razón en la presente tesis la AV se ha evaluado mediante la determinación enzimática del ácido acético.
- **pH:** se ha determinado por método potenciométrico con pH-metro (OIV, 2009). Se han utilizado dos equipos en la presente tesis, un pH-metro de laboratorio GLP 22 y un titrador automático Crison Compact Titrator, ambos de la marca Crison que se han calibrado con buffers de pH 7,0 y 4,0.
- **Dióxido de azufre:** el dióxido de azufre (SO₂), tanto libre como total, se ha determinado por iodometría (OIV, 2009) y valoración potenciométrica con un titrador automático Crison Compact Titrator.
- **Ácidos orgánicos:** Para la determinación de **ácido acético**, **ácido L-málico** (OIV, 2009), **ácido L-láctico** (OIV, 2009), **ácido cítrico** (OIV, 2009) y **ácido glucónico** se han empleado métodos enzimáticos que se basan en la determinación espectrofotométrica de la formación o desaparición de NADH o NADHP a partir de reacciones en las que el sustrato es el compuesto que se quiere cuantificar. Los análisis se han realizado con un autoanizador automático, **LISA 200**, multiparamétrico, selectivo, para análisis químicos de tipo enzimático y colorimétrico para vinos y mostos. Se emplearon kits enzimáticos de Boehringer-Mannheim (Roche) (Darmstadt, Germany) para las determinaciones de los ácidos L-láctico, cítrico y glucónico, de TDI (Gavà,

España) para la determinación del ácido L-málico y de Chema Italia (provisto por TDI, Gavà, España) para la determinación del ácido acético.

- **Glucosa y fructosa:** la medición de los azúcares se ha realizado por determinación enzimática de **glucosa y fructosa** conjuntamente (OIV, 2009) con kit enzimático de TDI (Gavà, España) en analizador automático LISA 200.
- **Otros compuestos orgánicos:** El **ácido tartárico** se ha determinado por colorimetría en autoanalizador (LISA 200). El **Glicerol** se ha determinado por método enzimático (OIV, 2009) con kit enzimático de Boehringer-Mannheim (Roche) (Darmstadt, Germany) en autoanalizador automático LISA 200.
- **Índice de polifenoles totales:** Se ha valorado por determinación de la absorbancia de las muestras a 280nm (A280) en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25.

3.3.2 Análisis de CE

El CE se determinó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM) en un cromatógrafo de gases HP5890 SERIES II con detector selectivo de masas HP 5971 SERIES e inyector automático HP 7673. La columna cromatográfica utilizada fue una TRB-WAX, capilar de 60 metros de largo, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor del film.

El procedimiento para su determinación se viene utilizando en la Estación Enológica de Vilafranca del Penedés (INCAVI) desde hace varios años con excelentes resultados de fiabilidad y reproducibilidad, y es una adaptación del método aprobado por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2009) y publicado en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 1999). Comprende primeramente una extracción en fase sólida de 10 mL de muestra en columnas Extrelut[®] NT 20 (Merck), rellenas con 8 g de material de relleno Extrelut[®] NT (Merck), una tierra silíceo natural de poro ancho con elevado volumen de poro, químicamente inerte, que actúa como fase estacionaria, y 3 g de NaCl, para favorecer la absorción de agua. Se deja actuar durante 10 minutos para favorecer la absorción y se procede a eluir los analitos lipófilos con disolventes orgánicos. La fase acuosa permanece sobre el soporte. Con esta operación se elimina

la matriz hidroalcohólica y otras sustancias interferentes, como polifenoles y azúcares residuales.

Transcurrido el tiempo de extracción se procede a eluir la muestra con 3 fracciones de 30 mL cada una de diclorometano cada 30 minutos, recogiendo el CE y otros compuestos de polaridad semejante, solubles en diclorometano, en matraces en forma de corazón graduados.

El eluato obtenido se concentra hasta 1 mL bajo corriente de N₂ y se transfiere a un vial para determinación por GC/EM.

Condiciones cromatográficas:

Temperatura del inyector: 250° C

Gas portador: helio a 1mL/minuto.

Modo de inyección: split-splitless.

Programa de temperaturas en columna:

60° C durante 1 minuto

Rampa de 5° C/minuto hasta 200° C

200° C durante 15 minutos

El tiempo de retención del CE en estas condiciones es de 19,8 ± 1,3 min.

Condiciones de detección y cuantificación:

Modo de adquisición SIM de los iones de m/z 62, 74 y 89. La cuantificación se realizó en base al ión de m/z 62 partiendo de curvas de calibración realizadas con soluciones hidroalcohólicas de CE cubriendo concentraciones de 1 µg/L a 300 µg/L.

Con cada lote de muestras se realizaron curvas de calibración obteniendo coeficientes de correlación mayores a 0,99 y recuperaciones entre 87 y 120 %.

3.3.3 Análisis del CE potencial

El CE potencial (CEP) es la cantidad de CE formada cuando el vino se calienta a 80 °C por 48 horas (Azevedo *et al.*, 2002; Arena y Manca de Nadra, 2005). El tratamiento con calor es un procedimiento estándar en el análisis de bebidas

alcohólicas para convertir rápidamente precursores que etanolizan lentamente a CE (Ough *et al.* 1988a, Tegmo-Larsson y Henick-Kling 1990b, Liu *et al.* 1994). Se ha demostrado que esta etanólisis ocurre también durante el almacenamiento prolongado del vino a temperaturas bajas y normales de almacenamiento (Tegmo-Larsson y Spittler 1990, Stevens y Ough 1993). Para obtenerlo, las muestras se calentaron en estufa a $80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas (Azevedo *et al.* 2002, Arena y Manca de Nadra 2005).

3.3.4 Análisis de arginina y de precursores de CE

Para estudiar el metabolismo de la arginina y determinar la influencia de distintas condiciones sobre la formación de CE se han puesto a punto las técnicas para la determinación de algunos de sus precursores más importantes:

a) Arginina:

Se ha determinado siguiendo la reacción de Sakaguchi modificada por Gilboe (Gilboe y Williams, 1956).

Para disminuir la interferencia de los polifenoles presentes en los vinos se probaron distintas diluciones de vinos blancos, rosados y tintos y se verificó la trazabilidad del método con ensayos de recuperación.

b) Urea:

Se ha determinado enzimáticamente a 340 nm. Método adaptado a autoanalizador (LISA 200). Para ello se confeccionó una recta de calibración con urea en medio hidroalcohólico con el fin de adaptar un kit enzimático indicado para uso clínico (QCA, Amposta, España).

c) Citrulina:

Se ha cuantificado por el método colorimétrico de Archibald (Archibald 1944, Spano *et al.* 2004).

En este caso, además de realizar diluciones adecuadas de los mostos y vinos, fue necesario realizar blancos de muestra en mostos y vinos tintos para disminuir la interferencia de los polifenoles y azúcares presentes. También se verificó la trazabilidad del método con ensayos de recuperación.

d) Contenido de nitrógeno:

Para analizar el contenido de nitrógeno total de mosto y vino se determinan separadamente nitrógeno asimilable por OPA (NOPA) y NH_4^+ (Butzke 1998):

NOPA:

El nitrógeno asimilable se ha determinado por el procedimiento espectrofotométrico de OPA/N-acetil-L-cisteína (Dukes y Butzke, 1998). En este ensayo los α -aminoácidos reaccionan colorimétricamente con el reactivo OPA/N-acetil-L-cisteína, con formación de un compuesto iso-indol estable a temperatura ambiente que se determina espectrofotométricamente a 340 nm. Método adaptado a autoanalizador (LISA 200).

En este método se realiza paralelamente para vinos tintos un blanco de muestra en ausencia del reactivo de color cuya absorbancia se resta luego a la absorbancia de la muestra para disminuir la interferencia del color del vino.

NH_4^+ :

Se ha cuantificado enzimáticamente a 340 nm empleando un kit enzimático de Boehringer-Mannheim (Roche) (Darmstadt, Germany). Adaptado a autoanalizador (LISA 200).

Para disminuir la interferencia de los polifenoles en la determinación enzimática de NH_4^+ , se realizaron dos rectas de calibración, una para mostos y vinos blancos, y otra para vinos tintos con PVP (polivinil pirrolidona), clarificante que disminuye el color de los polifenoles.

3.3.5 Control de la población bacteriana

a) Recuento de viables/recuento en placa

Se basa en sembrar en superficie con un asa de Digralsky un volumen conocido de suspensión bacteriana en placas con un medio rico con agar que se incuba hasta crecimiento de las colonias. El resultado se expresa en UFC/mL (unidades formadoras de colonias por mililitro). En general, es necesario realizar previamente un banco de diluciones decimales seriadas con solución Ringer estéril para obtener entre 30 y 300 colonias por placa. Para realizar los recuentos de BL viables en la presente tesis se han utilizado los medios MRSmT, en el caso de partir de un cultivo puro del microorganismo, o medios con antibiótico, MRSmTC y MRSmTN, en caso de realizar recuentos a partir de mosto o vino. Las placas se incubaron 10-12 días en incubador de CO₂ (5%) a 30 °C y se contaron las colonias desarrolladas.

b) Medida de la turbidez

Para organismos unicelulares las unidades de absorbancia son proporcionales a la masa celular y al número de células. Por tanto, la medida de la turbidez se puede utilizar como un sustituto rápido y simple de otros métodos de recuento. Se basa en realizar lecturas espectrofotométricas periódicas a una λ determinada del medio líquido en el que se está desarrollando la bacteria. En la presente tesis se han hecho determinaciones de la densidad óptica a 600nm (DO 600nm) en cubetas de 1 cm de paso de luz en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 25 (Liu *et al.* 1994, Liu *et al.* 1996, Tonon y Lonvaud Funel 2000, Tonon y Lonvaud Funel 2002).

c) Recuento de microorganismos por epifluorescencia

El método consiste en filtrar un determinado volumen de vino sobre una membrana con el objeto de retener los microorganismos presentes. La membrana filtrante debe presentar una porosidad adecuada para recoger la totalidad de las células presentes en el vino, y su naturaleza debe ser tal que no se colorea con el colorante fluorescente utilizado (Berta y Spertino, 1998).

Los fluorocromos utilizados en el sector enológico son de dos tipos. Los de “primera generación” (naranja de acridina, eucrisina) colorean todas las células, sean vitales o no, con diferente coloración dependiendo de la vitalidad. La molécula de colorante se liga al ADN o al ARN de la célula. En el caso del naranja de acridina, el colorante induce una fluorescencia verde cuando se liga a la doble hélice del ADN mientras que la fluorescencia es roja-naranja cuando se liga al ARN o al monofilamento del ADN. Numerosas investigaciones han demostrado su carácter mutágeno y carcinógeno. El de “segunda generación” es un compuesto orgánico que por sí no es fluorescente, pero desarrolla la fluorescencia interaccionando con la actividad enzimática intracelular del microorganismo (esterasa citoplasmática). Luego de la interacción se forma una molécula que cuando es excitada por la luz ultravioleta ($\lambda = 490 \text{ nm}$) emite fluorescencia verde. La calidad e intensidad de la fluorescencia depende de la actividad metabólica celular del microorganismo y de la integridad de la membrana celular y da una medida directa de la vitalidad del microorganismo. Sólo evidencia células viables con la ventaja de que no es peligroso para la salud. (Berta y Spertino 1998, Berta *et al.*, 1998).

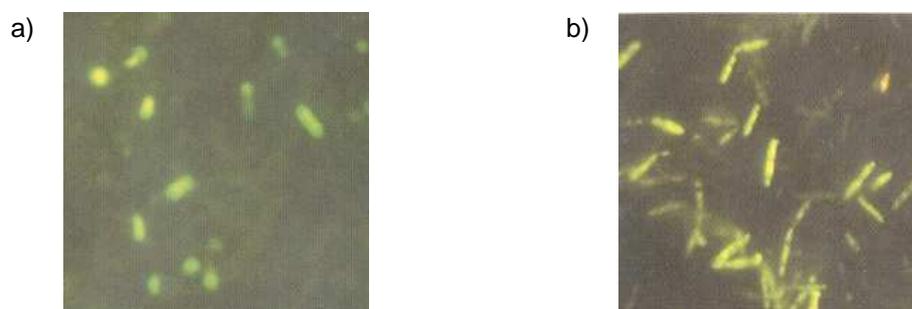


Figura 3.1. Microfotografías de a) *Lactobacillus plantarum* y b) *Oenococcus oeni*, obtenidas con la técnica de microscopía de epifluorescencia (Berta *et al.*, 1998).

Desde hace unos años se encuentra disponible un ensayo que permite determinar la viabilidad de distintos géneros bacterianos.

LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits utiliza mezclas de los colorantes de ácidos nucleicos SYTO® 9, que tiñe los ácidos nucleicos de fluorescencia verde, y yoduro de propidio, que da a los ácidos nucleicos fluorescencia roja. Ambos colorantes difieren en sus características espectrales (figura 3.2) y en su capacidad para penetrar en las células bacterianas (Molecular Probes Inc, 2004).

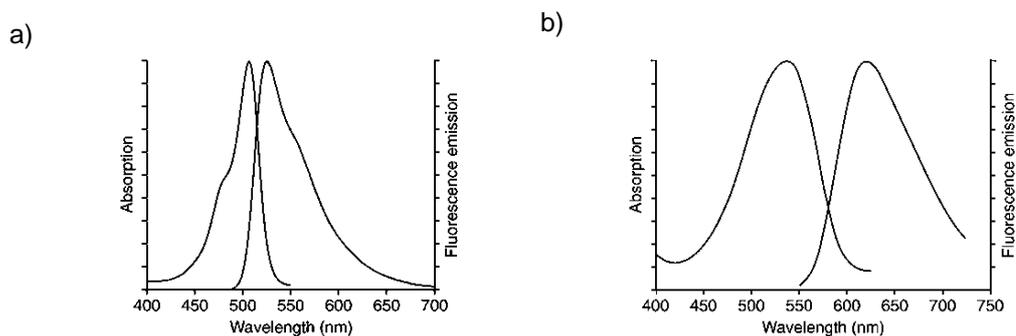


Figura 3.2. a) Espectro SYTO 9/DNA b) Espectro Ioduro de propidio/DNA (www.probes.com)

Cuando se usa solo, el SYTO[®] 9 colorea todas las bacterias de una población (las que tienen las membranas intactas y las que las tienen dañadas). El ioduro de propidio sólo penetra en las bacterias que tienen las membranas dañadas disminuyendo la fluorescencia del SYTO[®] 9. Con una mezcla apropiada de ambos colorantes, las bacterias con las membranas celulares intactas (vivas o viables) presentan fluorescencia verde, mientras que las bacterias con las membranas dañadas (muertas o no viables) exhiben fluorescencia roja. El fondo permanece no fluorescente (Molecular Probes Inc, 2004).

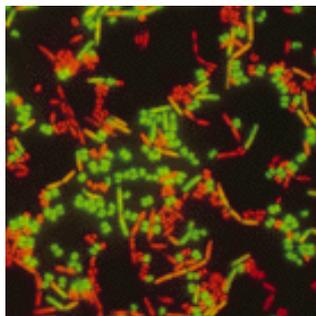


Figura 3.3. *Micrococcus luteus* y *Bacillus cereus* teñidos con LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit. (Fotografía tomada de www.probes.com)

Para el recuento de los microorganismos por la técnica de la epifluorescencia se experimentó con dos tipos de colorantes: un colorante de primera generación (naranja de acridina) y con el kit LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kits. A continuación se comentan los procedimientos que se han seguido para ambos.

Epifluorescencia con colorantes de primera generación: naranja de acridina.

Procedimiento:

1. Se concentran los microorganismos del vino sobre una membrana por filtración bajo vacío de un cierto volumen de vino (25-250 mL)
2. Sin parar la aspiración, la membrana se lava con tampón fosfatado de pH = 7,4 (20 mL aproximadamente)
3. Relajado el vacío se pone la membrana en contacto con una solución del colorante (10 mL) durante 5 minutos.
4. Se aspira el colorante y se lava nuevamente la membrana con el tampón fosfatado (20 mL aproximadamente)
5. Se lava con isopropanol (20 mL aproximadamente) y se mantiene la aspiración un momento para permitir que la membrana se seque totalmente.
6. Se coloca una gota de aceite de montaje sobre un portaobjetos, se transfiere la membrana sobre la cual se coloca una segunda gota de aceite de montaje y, sobre ésta, el cubreobjetos.
7. Se observa la preparación al microscopio de epifluorescencia, enfocando con el objetivo de 40X para levaduras o 100X para bacterias.

Epifluorescencia con LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits.

Procedimiento:

1. Concentrar los microorganismos por centrifugación en eppendorf de 1 mL de vino durante 5 minutos a 10000 xg.
2. Desechar el sobrenadante y agregar 1 mL de agua destilada previamente esterilizada por filtración, para lavar y eliminar cualquier sustancia que interfiera en la coloración o el recuento.
3. Centrifugar 5 minutos a 10000 xg.
4. Desechar el sobrenadante y resuspender en 1 mL de agua destilada esterilizada por filtración.

5. Combinar volúmenes iguales de los componentes A y B del kit (colorantes), mezclar y agregar 3 µl de esta mezcla a 1 mL de la suspensión bacteriana.
6. Mezclar e incubar 15 minutos a oscuras y a temperatura ambiente.
7. Filtrar un volumen adecuado de la mezcla (diluida con un poco de agua) sobre una membrana de policarbonato de 25 mm de diámetro y 0,45 – 0,60 µm.
8. Poner una gota de aceite de montaje en un portaobjetos (provisto en el kit). Colocar la membrana, sobre ésta otra gota de aceite de montaje y un cubreobjetos.
9. Contar los microorganismos en el microscopio de epifluorescencia.

d) Control de imposición

Para comprobar la imposición de las cepas inoculadas en los vinos del estudio de la influencia del momento de inoculación de las BL en el vino sobre la formación de CE (apartado 4.4) en la presente tesis se tomaron muestras de los vinos cuando habían transcurrido dos terceras partes de la FML y se empleó para su tipificación la técnica RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA) utilizando como único cebador el M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') (Stendid *et al.*, 1994), como se describe en Masqué *et al.* (2010).

3.4 PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Para realizar el análisis estadístico de los datos se empleó el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc. 1989 – 2006), que permitió realizar el procedimiento de correlaciones bivariadas, los análisis de regresión, la comparación de medias, pruebas T, análisis de varianza (ANOVA) de un factor y el Análisis de Conglomerados Jerárquico.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 INFLUENCIA DE DIFERENTES CONDICIONES DE VINIFICACIÓN SOBRE LA FORMACIÓN DE CE

Los resultados de este estudio han dado lugar a un artículo (Bordons, A., Gil, J., Araque, I., Reguant, C., Carreté, R., Romero, S. y Masqué M. C. (2004) Estudios para la minimización de producción de carbamato de etilo por las bacterias lácticas. *Tecnología del Vino*, 4, 18, pp. 94-100) y un capítulo de libro (Romero, S. V., Masqué, M. C., Bordons A. (2003) Estudio de la producción de carbamato de etilo en vinos tintos. Gobierno de La Rioja (ed.) *VII Jornadas Científicas de los Grupos de Investigación Enológica GIENOL* (pp. 77-79) Logroño: Gobierno de La Rioja) que se presentan en los anexos A y B respectivamente.

4.1.1 Antecedentes

Durante la vendimia de 2002 se realizó un ensayo de vinificación para establecer la influencia de distintas condiciones de vinificación, ampliamente extendidas en enología, sobre la formación de CE, como la maceración, la crianza sobre lías, el origen de las bacterias que realizan la fermentación maloláctica y el tiempo de conservación o envejecimiento en botella.

La maceración del mosto o vino tinto, fundamentalmente, con sus hollejos y semillas, es la responsable de sus características específicas que lo diferencian a la vista, al olfato y al gusto de los vinos blancos. Se extraen, primordialmente, compuestos fenólicos (antocianos y taninos) que participan en el color y la estructura del vino (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). El tiempo en que este fenómeno ocurra dependerá del tipo de vino tinto que se quiere obtener. Además de compuestos fenólicos, durante la maceración también se liberan en el mosto o vino aromas y precursores aromáticos, polisacáridos (en particular, pectinas), minerales y compuestos nitrogenados (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Dentro de éstos últimos podrían encontrarse precursores del CE. Además, las BL aportadas por la uva se desarrollan sobre todo en el orujo; su multiplicación tiene más oportunidades de ser importante en la medida en que el encubado sea prolongado (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1992). De acuerdo con Ribéreau-Gayon *et al.* (1992) un encubado corto separa las bacterias muy pronto y retarda el inicio de la FML espontánea.

En los últimos años se está recuperando la crianza del vino tinto con lías, con o sin fermentación maloláctica, que presenta diversos efectos ventajosos para el vino. Por una parte, las lías consumen oxígeno, protegiendo al vino de la oxidación tanto a nivel de color como a nivel de aromas. Otro efecto positivo es el hecho constatado de que las levaduras sufren durante su contacto con el vino un proceso de autólisis en el que liberan manoproteínas y polisacáridos, que pueden ejercer diversos efectos muy positivos sobre la calidad del vino. Pueden actuar como coloides protectores frente a posibles precipitaciones. Además, estos coloides incrementan la sensación de untuosidad o de grasa y pueden interactuar con los compuestos fenólicos, mejorando la estabilidad del color y disminuyendo la astringencia. También se ha comprobado recientemente que la presencia de lías en la barrica durante la crianza del vino tinto favorece la síntesis del furfuriltiol, que presenta un agradable aroma de café tostado (Zamora, 2003). Finalmente, otro aspecto interesante que se atribuye a la crianza del vino tinto sobre lías es el hecho de que su presencia disminuye el impacto del sabor y del aroma de madera de las barricas, impidiendo que predomine la crianza sobre el vino (Zamora, 2003). De todo lo expuesto se deduce que la crianza del vino tinto sobre lías puede ser una herramienta muy interesante para la elaboración de vinos de gran calidad. Sin embargo, esta metodología también presenta ciertos inconvenientes, como una posible reducción o un mayor riesgo de desviaciones microbiológicas (Zamora, 2003) y se liberan aminoácidos y proteínas en el vino (Butzke y Bisson, 1997), posibles precursores del CE.

En la Introducción, en el apartado 1.1 sobre las BL del vino y la FML, se trata ampliamente la FML y la influencia de las BL en la formación del CE en el apartado 1.2.

Con el envejecimiento del vino en botella se busca suavizar y, sobre todo, desarrollar los bouquets de los vinos finos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1992). Con esta experiencia queríamos comprobar la evolución del CE en el tiempo de conservación del vino en botella a temperatura ambiente.

4.1.2 Condiciones de vinificación estudiadas

Las condiciones de vinificación examinadas en la experiencia que planteamos fueron:

- tiempo de maceración con los hollejos durante la FA
- FML inducida o espontánea
- FML sobre lías
- conservación en botella

4.1.3 Características de las vinificaciones

Para realizar este estudio, se utilizó uva tinta de la variedad Tempranillo procedente de la viña de la Facultad de Enología de la Universitat Rovira i Virgili, ubicada en Constantí (Mas dels Frares). Las vinificaciones se realizaron en la bodega experimental de la Estació Enològica de Reus (INCAVI). En la tabla 4.1 se presentan las características analíticas del mosto utilizado.

Tabla 4.1. Caracterización enológica del mosto Tempranillo utilizado para estudiar la influencia de diferentes condiciones de vinificación sobre la formación de CE.

PARÁMETRO	
°Brix	20,8
Grado alcohólico probable (% vol)	11,95
pH	3,42
Acidez total (g/L)	6,9
Ácido tartárico (g/L)	4,93
Ácido málico (g/L)	2,59
Ácido cítrico (mg/L)	292
Ácido glucónico (mg/L)	1892
Glicerol (g/L)	0,75
Nitrógeno total (mg/L)	173

La uva, en buen estado sanitario, despallada, estrujada y sulfitada se inoculó con una levadura comercial. Aproximadamente a mitad de la FA (densidad 1030) se paró la maceración de la mitad del volumen y el resto se dejó macerando hasta el final de la FA. Una vez finalizada la FA el volumen de cada depósito se fraccionó nuevamente para realizar la FML en distintas condiciones:

- FML espontánea o inducida
- FML espontánea sobre lías o sin lías

La FML se realizó a 20 °C y, al finalizar, el vino se trasegó, sulfitó y embotelló.

Para comprobar la influencia del tiempo de conservación o envejecimiento en botella sobre la formación de CE y la evolución de sus precursores, los vinos embotellados se mantuvieron a temperatura ambiente y se cogieron muestras para su análisis cada 3 meses, hasta los 12 meses.

Toda la experiencia se llevó a cabo por duplicado, siguiendo el esquema que se presenta en la figura 4.1.

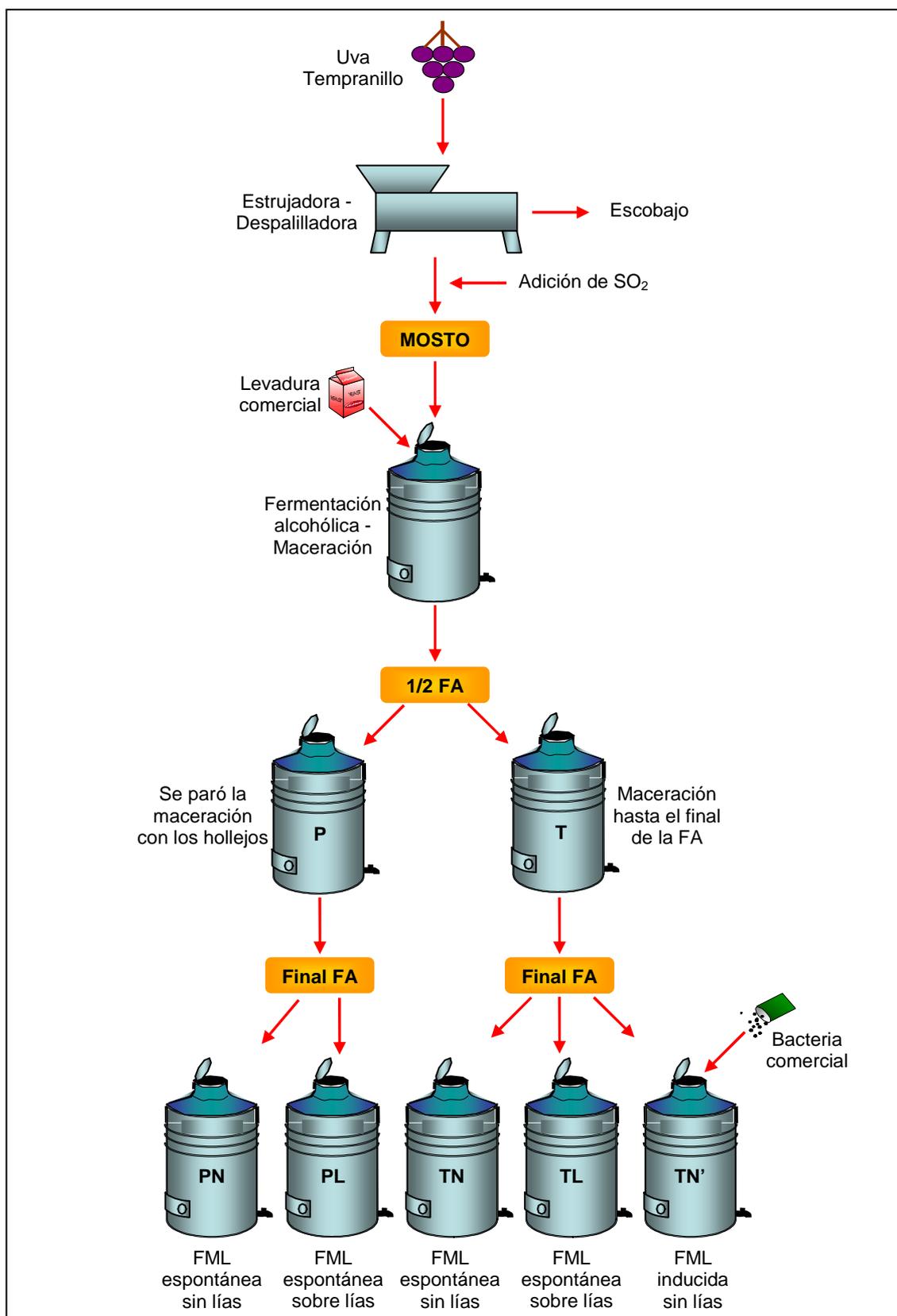


Figura 4.1. Esquema de vinificación

En la tabla 4.2 se resumen las condiciones estudiadas y los códigos utilizados para designar las diferentes vinificaciones.

Tabla 4.2. Códigos utilizados para designar las diferentes condiciones de vinificación ensayadas

CÓDIGO	FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA
PN	maceración con hollejos hasta la mitad de la FA	en ausencia de lías/espontánea
PL	maceración con hollejos hasta la mitad de la FA	en presencia de lías/espontánea
TN	maceración con hollejos hasta el final de la FA	en ausencia de lías/espontánea
TL	maceración con hollejos hasta el final de la FA	en presencia de lías/espontánea
TN'	maceración con hollejos hasta el final de la FA	en ausencia de lías/inducida

4.1.4 Control de la vinificación

La FA se controló mediante densidad y temperatura diariamente. Para el seguimiento de la FML se determinaron periódicamente el consumo de ácido L-málico y la población de BL viables. El seguimiento de la población de BL se realizó por recuento en placa de unidades formadoras de colonias (ufc/mL) y por recuento de células viables por microscopía de epifluorescencia con LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits, tal como se describe en el apartado 3.3.5 de Materiales y Métodos.

4.1.5 Determinación de la población viable

Para el control de la población viable en esta experiencia se puso a punto la técnica de recuento de células viables por microscopía de epifluorescencia.

Como ya se ha mencionado, el control por epifluorescencia se ha realizado utilizando un kit comercial, LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits, pero inicialmente se pretendía poner a punto la técnica con el colorante naranja de acridina y, luego de experimentar con diversas muestras de vinos, se concluyó que esta técnica no es eficaz para el recuento de BL en vino cuando se emplean colorantes de primera generación, como el naranja de acridina. La principal razón es la dificultad de la visualización de las bacterias, ya que la membrana de filtración también adquiere algo de la coloración y la fluorescencia es poco persistente. Además, las impurezas

propias del vino dificultan a veces el proceso de filtración, haciéndola dificultosa sobre todo en muestras con una baja población de BL donde es necesario filtrar un mayor volumen de muestra.

Antes de utilizar el método de recuento de microorganismos por epifluorescencia con LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits se verificó su trazabilidad comparando los resultados con los obtenidos con el método de referencia de recuento en placa. Para ello se compararon conjuntos de resultados pareados, obtenidos al analizar con ambos métodos (el de ensayo y el de referencia) un conjunto de muestras de vino cuyas concentraciones se encontraban dentro del intervalo de las muestras de trabajo. Para cada muestra se obtuvieron un par de resultados, el obtenido por el método de ensayo (epifluorescencia) y el obtenido por el método de referencia (recuento en placa). Posteriormente, se calculó la diferencia entre ambos resultados, d_i , para cada muestra analizada, el valor medio de las diferencias, x_d , y la desviación típica del conjunto de diferencias, s_d , para obtener el estadístico t calculado (t_{cal}):

$$t_{cal} = \frac{x_d}{s_d / \sqrt{n}}$$

donde n es el número de muestras analizadas. El valor de t_{cal} se comparó entonces con el valor tabulado, $t_{\alpha/2, n-1}$, (t_{tab}) asociado a una distribución t de dos colas para un nivel de significación α y $n-1$ grados de libertad. Si $t_{cal} < t_{tab}$, el procedimiento es trazable a la referencia utilizada en el intervalo de concentraciones de las muestras analizadas.

Aplicando este estadístico se comprobó que el método de recuento de células viables por la técnica de la epifluorescencia no es trazable al método de recuento en placa en el rango de concentraciones estudiado (de 10^3 a 10^8 ufc/mL). Como se puede observar en la figura 4.2, hay más de dos órdenes de magnitud de diferencia entre los resultados obtenidos por ambos métodos, y las máximas desviaciones se advierten a bajas concentraciones (menores a 10^5 ufc/mL), por lo que se calculó nuevamente el estadístico t para concentraciones mayores a 10^5 ufc/mL y se comprobó que en este rango de concentraciones el método **es trazable** al método de referencia, lo que se puede ver también en la figura 4.3.

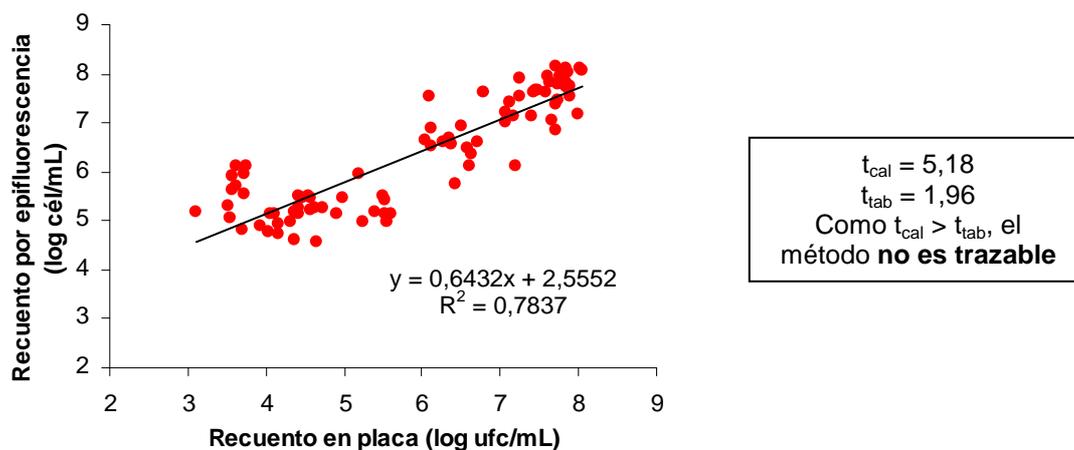


Figura 4.2. Comparación mediante regresión lineal de los resultados obtenidos mediante los dos métodos analíticos para determinar la población viable en todo el intervalo de concentraciones estudiado.

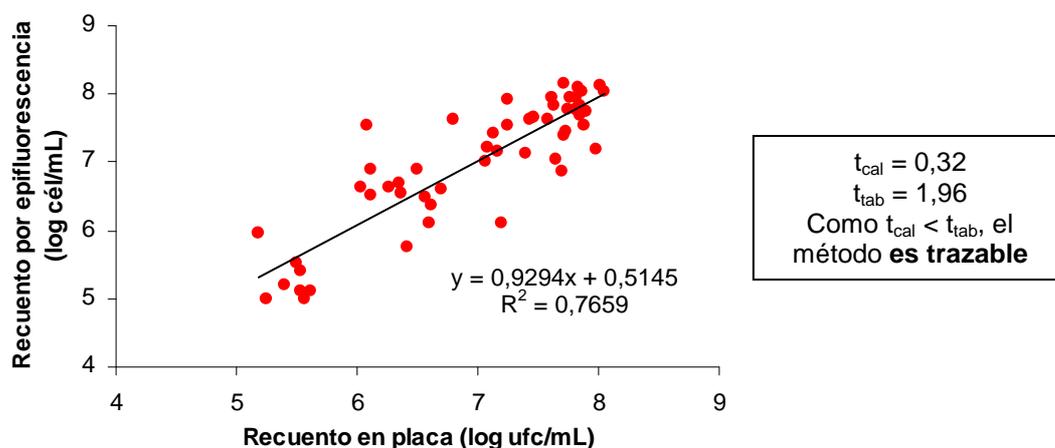


Figura 4.3. Comparación mediante regresión lineal de los resultados obtenidos mediante los dos métodos analíticos para determinar la población viable para concentraciones mayores a 10^5 ufc/mL.

Generalmente, los resultados obtenidos por el método de recuento de células viables por epifluorescencia son un orden de magnitud mayores a los obtenidos por el método de recuento en placa, con variaciones para las diferentes cepas y especies. Hay que tener en cuenta que por medio del recuento en placa se valoran unidades formadoras de colonias (ufc) generadas por células viables que tienen capacidad para

crecer y reproducirse en un medio nutritivo, generando las colonias que luego se evaluarán. Cabe aquí realizar una aclaración conceptual. Valentine y Bradfield propusieron el término "viables" para describir las células capaces de multiplicarse y formar colonias, pero sugirieron el término "vivas" para aquellas células que muestran otros signos de viabilidad (Valentine y Bradfield, 1954). Teniendo esto en cuenta, con la técnica de epifluorescencia se valoran las células vivas con sus membranas intactas. Algunas de estas células podrían haber perdido la capacidad para reproducirse y no generan colonias en placa. Además, con el método de la epifluorescencia se pueden observar las células como una unidad, una única célula que podría generar una colonia en un medio adecuado en placa, mientras que en una placa las células al crecer y reproducirse podrían dar lugar a colonias que se fusionan unas con otras.

Una vez verificada la trazabilidad del método de recuento de células viables por epifluorescencia, se calculó la incertidumbre del mismo aprovechando la información obtenida en la verificación de la trazabilidad. En la misma se genera información sobre la varianza asociada al método analítico en condiciones intermedias de precisión (cambio de analista, condiciones de uso, ubicación, tiempo, reactivos, etc.) que garantizan la obtención de una estimación de la incertidumbre asociada a los resultados de las muestras problema que incorpora la variación de estos factores.

Es de interés conocer la incertidumbre porque los resultados de una misma muestra problema obtenidos en diferentes condiciones (por ejemplo, en días diferentes y/o por diferentes analistas) deben ser comparables. Es decir, el resultado obtenido unos días después debe estar contenido dentro del intervalo de valores proporcionado por el resultado del primer análisis realizado y la incertidumbre asociada al método analítico.

La incertidumbre (U) se puede calcular a partir de la información generada al verificar la trazabilidad con la siguiente fórmula:

$$U = k \cdot \sqrt{\frac{s_d^2 + \underline{s_d}^2}{n}}$$

donde k es el factor de cobertura o incertidumbre (generalmente 2 ó 3 para obtener aproximadamente un nivel de confianza del 95% o del 99% respectivamente),

s_d es la desviación típica del conjunto de diferencias y n es el número de muestras analizadas.

La incertidumbre de la técnica de recuento de células viables por epifluorescencia así calculada es de **1,02**. Este valor es absoluto para las muestras con concentraciones mayores a 10^5 ufc/mL y era totalmente previsible, como ya se expuso anteriormente.

Con este kit se consigue evitar algunas de las desventajas del método de recuento de microorganismos con la técnica de epifluorescencia con colorantes de primera generación (naranja de acridina), como son:

- Al no tener que concentrar el vino por filtración sobre membrana, evitamos los problemas que esto ocasiona, sobre todo, en vinos tintos con muchas impurezas o con poca población microbiana.
- Disminución de la fluorescencia de fondo y mayor persistencia de la tinción sobre las células.

Pero aún tenemos algunas desventajas:

- Si el recuento microbiano es menor a 10^4 cél/ml la correlación con el método tradicional (recuento en placa) no es buena.
- Si las células están unidas a partículas en suspensión del vino (taninos, proteínas, sustancias clarificantes, etc.) o se encuentran formando agregados entre ellas o con levaduras, no es posible su recuento.
- Los colorantes que integran el kit se unen a los ácidos nucleicos. El yoduro de propidio es un mutágeno potencial y aún no hay datos claros sobre la mutagenicidad y toxicidad del SYTO 9. Ambos colorantes se presentan en solución de dimetilsulfóxido (DMSO), por lo que hay que tomar precauciones especiales para manipular estas soluciones, ya que el DMSO tiene facilidad para penetrar en las moléculas orgánicas de los tejidos.

4.1.6 Caracterización enológica del vino

En el mosto, en los vinos de mitad y final de FA y en los vinos de mitad y final de FML se determinaron CE y sus precursores (citrulina, arginina, urea y nitrógeno). En los vinos de final de FA y final de FML se determinaron, además, grado alcohólico,

acidez total, pH, concentración de anhídrido sulfuroso total y libre, acidez volátil, ácidos orgánicos (L-málico, L-láctico, cítrico, glucónico), azúcares (glucosa y fructosa) y otros compuestos secundarios como el glicerol.

4.1.7 Evolución de las fermentaciones

La FA evolucionó paralelamente para el tratamiento con maceración parcial (P) y el tratamiento con maceración total (T) y tuvo una duración de 9 días. En cuanto a la FML, en todos los tratamientos estudiados el ácido L-málico fue totalmente degradado, aunque no con la misma velocidad (figura 4.4).

Como se puede observar en la figura 4.4, no hubo diferencias notables en cuanto a la progresión de la FML en las vinificaciones donde la misma fue llevada a cabo por cepas autóctonas, sólo un ligero retraso en los tratamientos en los que hubo maceración con los hollejos hasta el final de la FA (TN y TL). Esto puede ser explicado por el hecho de que durante la maceración son solubilizados en el vino taninos derivados de las partes sólidas de la uva y recientes investigaciones han demostrado que ciertos taninos de la uva pueden tener una influencia negativa sobre las bacterias malolácticas y, por consiguiente, sobre el desarrollo de la FML (Lonvaud-Funel, 2002). Donde sí se observa una gran diferencia en la cinética de la FML es en el tratamiento donde se inoculó una cepa comercial (TN'). Aquí el desarrollo de la FML fue mucho más rápido y el ácido L-málico fue totalmente consumido en la mitad del tiempo que emplearon las cepas autóctonas para hacerlo. Esto se ha debido a que el desarrollo de la población viable de las BL comerciales fue más rápido que el observado para las autóctonas (figuras 4.5 y 4.6), lo que se correlaciona con una más rápida degradación del ácido L-málico observada (figura 4.4).

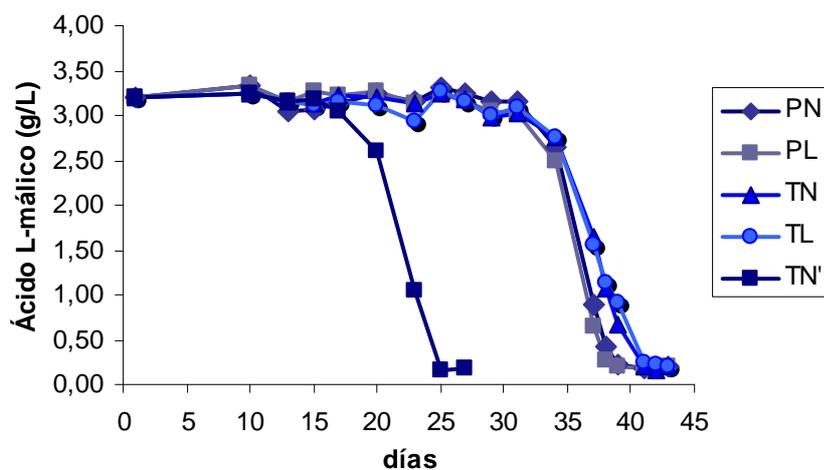


Figura 4.4. Degradación del ácido L-málico durante la FML en todas las vinificaciones (Para referencias remitirse a la tabla 4.2).

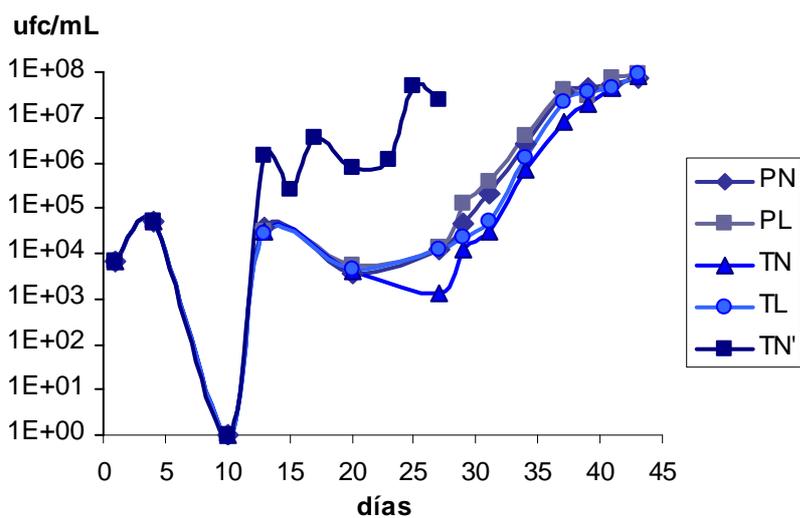


Figura 4.5. Evolución de la población viable de BL en las vinificaciones determinada mediante recuento de unidades formadoras de colonias en placa (Para referencias remitirse a la tabla 4.2).

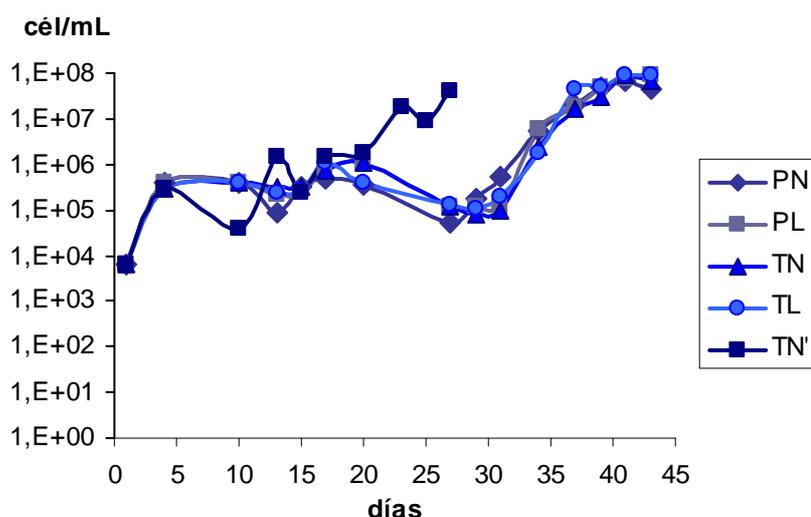


Figura 4.6. Evolución de la población viable de BL en las vinificaciones determinada mediante recuento de células viables por epifluorescencia (Para referencias remitirse a la tabla 4.2).

De las figuras 4.4, 4.5 y 4.6 podemos deducir también que el comienzo de la degradación del ácido L-málico coincide con la presencia de una población bacteriana del orden de 10^6 ufc/mL, tal como se describe en la bibliografía (Wibowo *et al.*, 1985; García *et al.*, 1992; Lonvaud-Funel, 1994; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). La población viable total de BL al final de la FML es similar en todos los vinos (del orden de 10^7 por ambos métodos utilizados para el recuento de BL), aunque levemente inferior en el vino en que la FML fue llevada a cabo por una BL comercial (TN') (figuras 4.5 y 4.6).

En las figuras 4.5 y 4.6 podemos observar que los resultados obtenidos para el recuento de la población viable por la técnica de epifluorescencia y por el método de referencia de recuento en placa son equivalentes, lo que concuerda con los resultados obtenidos en el estudio de trazabilidad del método de recuento de células viables por epifluorescencia. Como ya se ha mencionado en dicho estudio, observamos que los resultados difieren más para recuentos de viables en placa menores a 10^5 ufc/mL. Hay que aclarar en este punto que el gran descenso de población viable en placa que se observa el día 10 para todas las vinificaciones, y que no concuerda con la población viable obtenida por recuento de células viables por epifluorescencia, puede haberse debido a un error de dilución que impidió el correcto recuento y a una contaminación de las placas con otros microorganismos (levaduras), cuyo desarrollo impidió la correcta visualización de las colonias bacterianas que eventualmente puedan haberse desarrollado. Por ello, es más representativo de la población en ese momento el resultado obtenido por determinación de la población viable por epifluorescencia.

4.1.8 Dinámica de poblaciones de cepas de BL aisladas

Durante el transcurso de esta experiencia se realizó, además, el aislamiento de las cepas que se desarrollaron a lo largo de la FML en las vinificaciones no inoculadas con una cepa comercial en distintos momentos de la misma. Las cepas aisladas se identificaron inicialmente como BL mediante la tinción de Gram y la prueba de la catalasa. Posteriormente se identificaron como pertenecientes a la especie *O. oeni* mediante PCR específica de especie (Zapparoli *et al.*, 1998), y se tipificaron a nivel de cepa mediante amplificación al azar (RAPD-PCR) con el cebador M13 en la Estación de Viticultura y Enología de Vilafranca del Penedés.

La tipificación de las cepas mediante RAPD-PCR generó 6 perfiles diferentes. En la figura 4.7 se puede ver la proporción de cada uno de estos perfiles a lo largo de la FML en el conjunto de las vinificaciones.

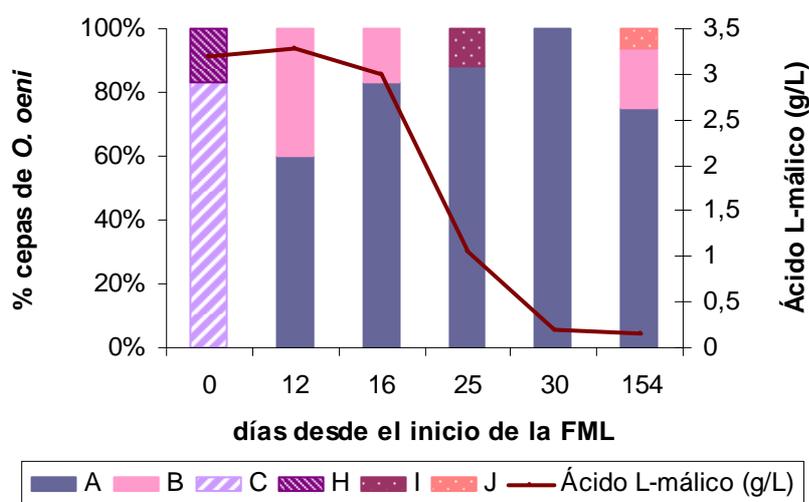


Figura 4.7. Proporciones de cada una de las cepas autóctonas aisladas en el conjunto de las vinificaciones no inoculadas con cepas comerciales durante la FML

Como podemos evidenciar en la figura 4.7, al final de la FML (día 30) el perfil de la totalidad de las cepas aisladas pertenece a una sola cepa, la cepa A, que venía siendo la cepa mayoritaria presente en las vinificaciones espontáneas desde pocos días del comienzo de la FML.

4.1.9 Resultados analíticos de los vinos

Con respecto a la caracterización enológica del vino, se observa una gran similitud entre todos los tratamientos estudiados para todos los parámetros evaluados (ácidos orgánicos, azúcares y otros compuestos secundarios), como se observa en la siguiente tabla (tabla 4.3). En el caso del grado alcohólico volumétrico adquirido, el glicerol y el ácido glucónico, sólo se indica el valor determinado al final de la fermentación alcohólica.

Tabla 4.3. Resultados analíticos de los vinos obtenidos en el estudio de la influencia de diferentes condiciones de vinificación sobre la formación de CE.

Vino	P	PN	PL	T	TN	TL	TN'
Etapa	Final FA	Final FML	Final FML	Final FA	Final FML	Final FML	Final FML
pH	3,71	3,80	3,84	3,74	3,86	3,86	3,94
Acidez total (g/L)	6,85	5,10	5,50	5,50	5,35	5,20	5,10
Acidez volátil (g/L)	0,36	0,70	0,69	0,39	0,76	0,74	0,62
Ácido málico (g/L)	2,60	0,20	0,20	2,69	0,18	0,19	0,18
Ácido láctico (g/L)	0,02	1,90	1,88	0,02	1,84	1,86	1,90
Glucosa/ Fructosa (g/L)	inapr.	inapr.	inapr.	inapr.	inapr.	inapr.	inapr.
Ácido cítrico (mg/L)	316	78	16	344	52	40	208
Ácido tartárico (g/L)	1,19	1,98	1,95	0,41	2,04	2,02	ND
Ácido glucónico (mg/L)	1534	-	-	1515	-	-	-
Glicerol (g/L)	7,9	-	-	6,5	-	-	-
Grado alcohólico (% vol)	11,90	-	-	11,45	-	-	-

inapr.: inapreciable.

ND: No determinado.

Para referencias remitirse a la tabla 4.2.

Podemos advertir que el vino que ha sido inoculado con una BL comercial para realizar la FML muestra una diferenciación, con respecto a los demás tratamientos, en los resultados obtenidos de ácido cítrico y acidez volátil. Concretamente, al final de la FML las cepas autóctonas han degradado entre el 75 y el 94% del ácido cítrico presente al final de la FA, mientras que en el vino inoculado con una cepa comercial se ha consumido cerca de un 40% del ácido cítrico, o sea, que la cepa comercial ha degradado alrededor de la mitad de la cantidad de ácido cítrico que han degradado las cepas autóctonas en este caso. La capacidad de conversión del ácido cítrico durante

la FML puede ser una propiedad muy dependiente de la cepa (Shimazu *et al.*, 1985). Actualmente, las cepas aisladas para ser utilizadas como cultivos iniciadores para inducir la FML son caracterizadas en base a criterios enológicos, que permitan conocer su tolerancia a los distintos parámetros del vino, a los procesos de producción, sus efectos organolépticos y sus propiedades metabólicas, entre estas últimas, el metabolismo del ácido cítrico (Bou y Powell, 2006). En general, las cepas comerciales presentes en el mercado para realizar la FML presentan una menor capacidad para degradar el ácido cítrico que las cepas autóctonas presentes en los mostos y vinos, tal como se desprende también de los resultados aquí obtenidos. La formación de ácido acético es también dependiente de la cepa y especie que realiza la FML, entre otros factores. Cuando se observan aumentos importantes de AV al final de la FML son debidas generalmente a la presencia y al crecimiento de bacterias indígenas. Estas bacterias deben crecer en el vino para alcanzar la población necesaria que permita iniciar el metabolismo del ácido málico, utilizando azúcares como fuente de energía y produciendo ácido acético (Theodore, 2006). Por ello, es usual observar que los niveles de ácido acético alcanzados al final de la FML son más elevados en aquellos vinos en los que la misma fue llevada a cabo por cepas autóctonas que en los vinos que han sido inoculados con cepas de BL comerciales para iniciar la FML. El ácido acético puede aparecer también durante el desarrollo de la FML en los vinos como resultado del metabolismo de otros compuestos presentes en los mismos. El metabolismo del ácido cítrico en *O. oeni* tiene como producto final al ácido acético, entre otros productos (Shimazu *et al.*, 1985). El aumento de la concentración de ácido acético asociado al metabolismo del ácido cítrico depende de la concentración inicial de sustrato, del potencial de óxido-reducción y del pH del vino, pero normalmente puede aumentar hasta 0,1-0,2 g/L (Costello, 2006, Krieger 2006a). Estas dos razones expuestas, la falta de necesidad que presentan las cepas comerciales de utilizar los azúcares residuales para crecer y alcanzar la población necesaria para comenzar el consumo del ácido L-málico, al haberse inoculado ya esa población, y una menor capacidad para degradar el ácido cítrico, explican el menor aumento observado en el nivel de ácido acético en el vino inoculado con una BL comercial (TN') para realizar la FML respecto a los demás tratamientos con FML espontánea.

En cuanto al CE y sus precursores, se observa que la máxima producción de CE se produce durante la FA (figura 4.8), período en el que también se observa la

máxima disminución de urea y arginina, corroborando los resultados obtenidos por otros autores (Monteiro *et al.*, 1989; Trioli y Colagrande, 1991). Los valores de urea han descendido desde los 53 mg/L contenidos en el mosto a 0 mg/L en todos los tratamientos a mitad de la FA, sin modificaciones posteriores. Durante la FML los valores de CE se mantienen estables en todos los tratamientos. No se observan diferencias significativas entre los tratamientos con FML sobre lías (PL, TL) respecto a los demás (PN, TN). Estos resultados obtenidos se correlacionan con los alcanzados por otros autores (Tegmo-Larsson y Henick-Kling, 1990b) en cuanto al efecto que tiene el contacto del vino sobre lías en la formación de CE, y nos permitirían proponer que la realización de la FML sobre lías parece ser una práctica segura en cuanto a la prevención de la liberación de precursores del CE y la consecuente formación del mismo en las condiciones ensayadas. Un tiempo mayor de exposición con los hollejos durante la FA (TN, TL) tampoco parece afectar a la producción de CE durante la FML. Durante el periodo de conservación estudiado no se ha advertido producción de CE.

En cualquier caso, los valores de CE son inferiores a 2 µg/L, muy por debajo de los límites fijados por algunos países.

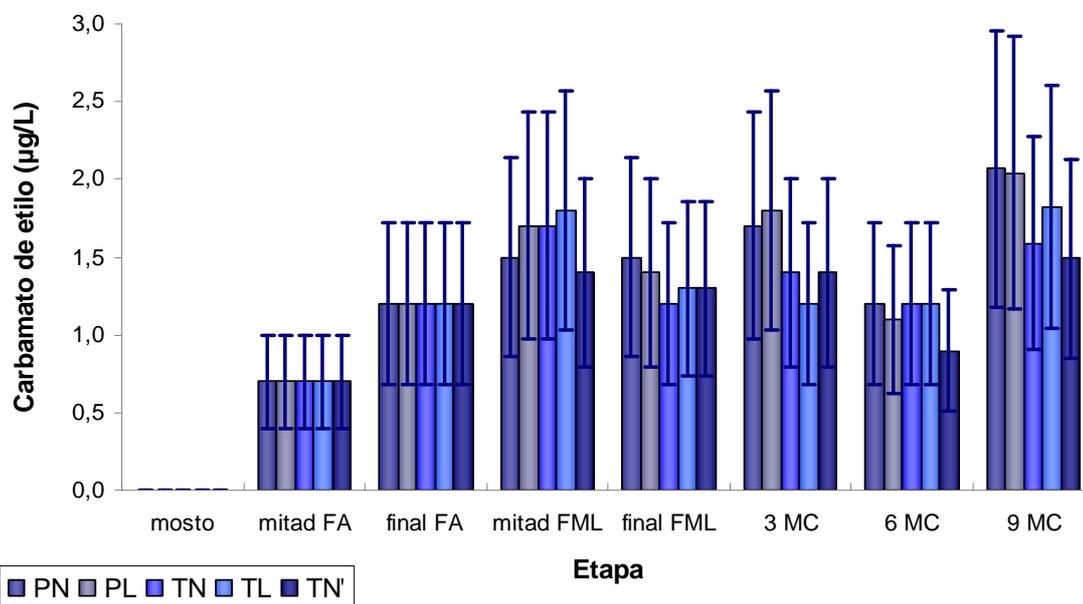


Figura 4.8. Evolución de la concentración de carbamato de etilo a lo largo de las vinificaciones (FA: fermentación alcohólica, FML: fermentación maloláctica, MC: meses de conservación) (Para resto de referencias remitirse a la tabla 4.2).

Los valores encontrados de CEP (ver apartado 3.3.3 de Materiales y Métodos) tampoco son muy elevados. Al final de la FA se observa que el CEP, aquel que podría formarse en períodos largos de conservación a temperaturas normales de almacenamiento, es mayor en aquellos vinos en los que la maceración con los hollejos se mantuvo hasta el final de la misma (tabla 4.9), algo coherente con la liberación de compuestos nitrogenados que ocurre durante la maceración del vino con los hollejos, entre los que pueden encontrarse precursores del CE. Esto nos indica que una mayor duración de la maceración puede llevar a la formación de mayores cantidades de CE durante el periodo de envejecimiento o almacenamiento. Al final de la FML, el vino que se maceró parcialmente con los hollejos y realizó la FML en ausencia de lías (PN) presenta el valor más bajo de CE potencial, aunque las diferencias entre los distintos tratamientos no son significativas (tabla 4.9). Sí observamos que el desarrollo de la FML provoca un aumento, evidente aunque no importante, del CE potencial en todos los vinos, indicando que el metabolismo de las BL en el vino genera precursores del CE y aumenta el potencial del mismo para formar CE en un período posterior de conservación o envejecimiento.

Creemos interesante destacar que la concentración de citrulina se mantiene prácticamente estable a partir del final de la FA, o de la mitad de la FML, según el caso, pero ligeramente superior en los vinos obtenidos en los tratamientos con maceración total con los hollejos durante la FA (Tabla 4.5). Esto podría explicar en parte los valores más elevados de CE potencial observados en aquellos vinos de final de FA y de final de FML en los que hubo maceración hasta el final de la FA (Tabla 4.9).

Con respecto al contenido nitrogenado (tablas 4.6, 4.7 y 4.8), se observa una rápida disminución en todos los tratamientos seguidos durante la FA y un ligero aumento a partir del comienzo de la FML en todas las vinificaciones, aunque es más significativo en aquellas en las que la FML se realizó sobre lías (PL y TL). Esto era de esperar ya que durante el envejecimiento sobre lías se liberan aminoácidos y proteínas en el vino (Butzke y Bisson 1997), que pueden ser una fuente potencial de CE. Como se puede ver en la tabla 4.7, el nitrógeno amoniacal disminuye drásticamente en la primera mitad de la FA, hasta ser prácticamente nulo al final de la misma. A partir del comienzo de la FML, hay un ligero aumento del nitrógeno amoniacal en todas las condiciones, ligeramente superior, aunque no significativo, en las condiciones sobre lías. Pero el aumento observado en el estatus nitrogenado

durante la FML se debe principalmente a un aumento del nitrógeno amínico en todas las condiciones, significativamente superior en las condiciones llevadas a cabo sobre lías. No se observan cambios significativos en el estatus nitrogenado durante la conservación.

Todos estos resultados se pueden consultar en las tablas 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 y 4.9.

Tabla 4.4. Evolución del contenido de arginina (mg/L) en las vinificaciones del estudio de la influencia de diferentes condiciones de vinificación sobre la formación de CE.

ETAPA	PN	PL	TN	TL	TN'
Mosto	160	160	160	160	160
Mitad FA	33	33	33	33	33
Final FA	35	35	52	52	52
Mitad FML	41	44	67	66	65
Final FML	40	33	57	56	66
3 meses conservación	36	41	59	59	60
6 meses conservación	18	20	30	30	34
9 meses conservación	23	20	35	31	35
12 meses conservación	23	26	42	42	37

Para referencias remitirse a la tabla 4.2

Tabla 4.5. Evolución del contenido de citrulina (mg/L) en las vinificaciones del estudio de la influencia de diferentes condiciones de vinificación sobre la formación de CE.

ETAPA	PN	PL	TN	TL	TN'
Mosto	0	0	0	0	0
Mitad FA	0	0	0	0	0
Final FA	48	48	83	83	83
Mitad FML	80	74	95	86	91
Final FML	80	70	117	94	88
3 meses conservación	90	91	149	89	142
6 meses conservación	104	105	133	84	118
9 meses conservación	83	56	123	89	113
12 meses conservación	108	84	141	113	120

Para referencias remitirse a la tabla 4.2

Tabla 4.6. Evolución del contenido de nitrógeno total (mg/L) en las vinificaciones del estudio de la influencia de diferentes condiciones de vinificación sobre la formación de CE.

ETAPA	PN	PL	TN	TL	TN'
Mosto	173	173	173	173	173
Mitad FA	32	32	32	32	32
Final FA	16	16	38	38	38
Mitad FML	22	39	46	60	43
Final FML	20	42	50	65	44
3 meses conservación	22	44	54	69	55
6 meses conservación	54	51	56	73	57
9 meses conservación	28	47	51	65	53
12 meses conservación	30	45	52	65	50

Para referencias remitirse a la tabla 4.2

Tabla 4.7. Evolución del contenido de nitrógeno amoniacal (mg/L) en las vinificaciones del estudio de la influencia de diferentes condiciones de vinificación sobre la formación de CE.

ETAPA	PN	PL	TN	TL	TN'
Mosto	104	104	104	104	104
Mitad FA	6	6	6	6	6
Final FA	2	2	0	0	0
Mitad FML	5	6	6	7	5
Final FML	5	7	9	11	7
3 meses conservación	9	10	15	17	16
6 meses conservación	10	11	12	15	14
9 meses conservación	12	13	13	14	14
12 meses conservación	11	11	13	14	13

Para referencias remitirse a la tabla 4.2

Tabla 4.8. Evolución del contenido de nitrógeno amínico (mg/L) en las vinificaciones del estudio de la influencia de diferentes condiciones de vinificación sobre la formación de CE.

ETAPA	PN	PL	TN	TL	TN'
Mosto	70	70	70	70	70
Mitad FA	26	26	26	26	26
Final FA	14	14	38	38	38
Mitad FML	17	33	40	53	38
Final FML	15	35	41	54	37
3 meses conservación	13	34	39	52	39
6 meses conservación	16	40	44	58	43
9 meses conservación	16	35	38	52	40
12 meses conservación	19	34	39	51	37

Para referencias remitirse a la tabla 4.2

Tabla 4.9. Evolución del contenido de carbamato de etilo potencial ($\mu\text{g/L}$) en las vinificaciones del estudio de la influencia de diferentes condiciones de vinificación sobre la formación de CE.

ETAPA	PN	PL	TN	TL	TN'
Mosto	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Final FA	8,3	8,3	11,0	11,0	11,0
Final FML	11,8	13,7	13,6	13,3	12,7

Para referencias remitirse a la tabla 4.2

4.1.10 Conclusiones

En este trabajo pudimos comprobar que la técnica de recuento de células viables por microscopía de epifluorescencia utilizando colorantes de primera generación, como el naranja de acridina, no resulta eficaz para el recuento de BL en vino debido, principalmente, a la dificultad para la visualización de las bacterias y a que las impurezas propias del vino dificultan el proceso de filtración que requiere la técnica.

Por el contrario, el método de recuento de microorganismos por epifluorescencia con el kit LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kits resultó ser trazable al método de referencia para la determinación de bacterias viables para concentraciones bacterianas mayores a 10^5 ufc/mL, además de solventar las desventajas que presentaba este método cuando se utilizan colorantes de primera generación. En conclusión, esta técnica resulta ser rápida y adecuada para el seguimiento de la FML.

Pudimos comprobar que la máxima producción de CE se produce durante la FA y que es también en la FA donde se observa la máxima disminución de precursores del CE (urea y arginina).

No observamos influencia de la FML en las concentraciones de CE y sus precursores en este estudio, tanto si la FML era espontánea como inducida con una cepa comercial. No obstante, el desarrollo de la FML provocó un aumento, aunque no importante, del CEP, indicando que el metabolismo de las BL en el vino genera precursores del CE y aumenta el potencial del mismo para formar CE en un período posterior de conservación o envejecimiento.

La realización de la FML sobre lías no evidenció elevación de los niveles de CE o de sus precursores en los vinos, por lo que parece ser una práctica segura en cuanto

a la prevención de la liberación de precursores del CE y la consecuente formación del mismo.

Un tiempo mayor de exposición con los hollejos durante la FA no afectó la producción de CE, pero sí de CEP. Los valores más elevados de CEP observados en aquellos vinos de final de FA en los que hubo maceración con los hollejos hasta el final de la FA podrían ser explicados por concentraciones de citrulina más elevadas en estos vinos.

No se advirtió en este estudio producción de CE después de la conservación del vino por 12 meses.

4.2 EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES VÍNICAS SOBRE LA FORMACIÓN DE CE EN VINO SIMULADO

Los resultados de este estudio generaron dos artículos (Romero, S. V., Reguant, C., Bordons, A., Masqué, M. C. (2009) Potential formation of ethyl carbamate in simulated wine inoculated with *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Science & Technology*. 44, pp. 1206-1213 y Romero, S. V., Bordons A., Franquet, R, Masqué, M. C., (2007) Efecto de diferentes condiciones en vino simulado sobre la formación de carbamato de etilo por *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum*. *Le Bulletin de l'OIV*. 80, pp. 437-444), que se presentan en los anexos C y D respectivamente.

Se investigó en laboratorio la capacidad potencial de producción de CE y de sus precursores en vino simulado durante la FML por parte de diferentes cepas y especies de BL frente a distintas condiciones de pH, concentración de etanol, temperatura y concentración de ácido málico.

El uso de un vino simulado permitió realizar este estudio en laboratorio bajo condiciones similares a las que se encuentran en un vino. La presencia de mosto concentrado en el vino simulado provee todos los nutrientes necesarios para el metabolismo y el crecimiento de las BL en un medio similar a un vino fermentado, pero sin la presencia de metabolitos indefinidos producidos por las levaduras que podrían variar la composición del medio y afectar a las BL.

4.2.1 Características de los cultivos

Las cepas utilizadas se precultivaron en medio MRSmT líquido, a partir de Cryo-Billes, a 30°C hasta que se observó el máximo crecimiento, el cual se dedujo visualmente por cambios en la turbidez del medio. Este cultivo fue utilizado como inóculo. Para ello se inocularon al 1% tantos recipientes con vino simulado como condiciones a ser ensayadas para que tuvieran lugar las FMLs a 22 °C (Liu, 1994) o 25 °C (Azevedo, 2002). El vino simulado se preparó tal como se explica en el apartado 3.2.1 de Materiales y Métodos y se modificó previamente con ácido DL-málico, para obtener una concentración final de ácido L-málico de 3 g/L ó 6 g/L, etanol, hasta una concentración final de 10% ó 15% (v/v) (Azevedo *et al.*, 2002), e NaOH 10 N, para obtener distintos valores de pH (3,3; 3,6 y 3,9) (Mira de Orduña *et al.*, 2001). Luego de

esterilizar los diferentes vinos sintéticos, los valores de pH resultaron ligeramente superiores a los planteados inicialmente, siendo los valores finales los que se señalan en la tabla 4.10. Esta experiencia se realizó por duplicado para todas las cepas ensayadas.

La población inicial de bacterias fue de $6,0 \times 10^7$; $2,8 \times 10^7$; $9,6 \times 10^7$; $1,4 \times 10^7$ y $1,1 \times 10^7$ ufc/mL para las cepas A (*O. oeni*), CECT 217^T (*O. oeni*), CECT 5671 (*L. plantarum*), CECT 4121^T (*L. brevis*) y CECT 219^T (*Lc. mesenteroides*) respectivamente.

En la figura 4.9 se esquematiza el proceso de inoculación y en la tabla 4.10 se presentan las características estudiadas y los códigos con los que se referencian.

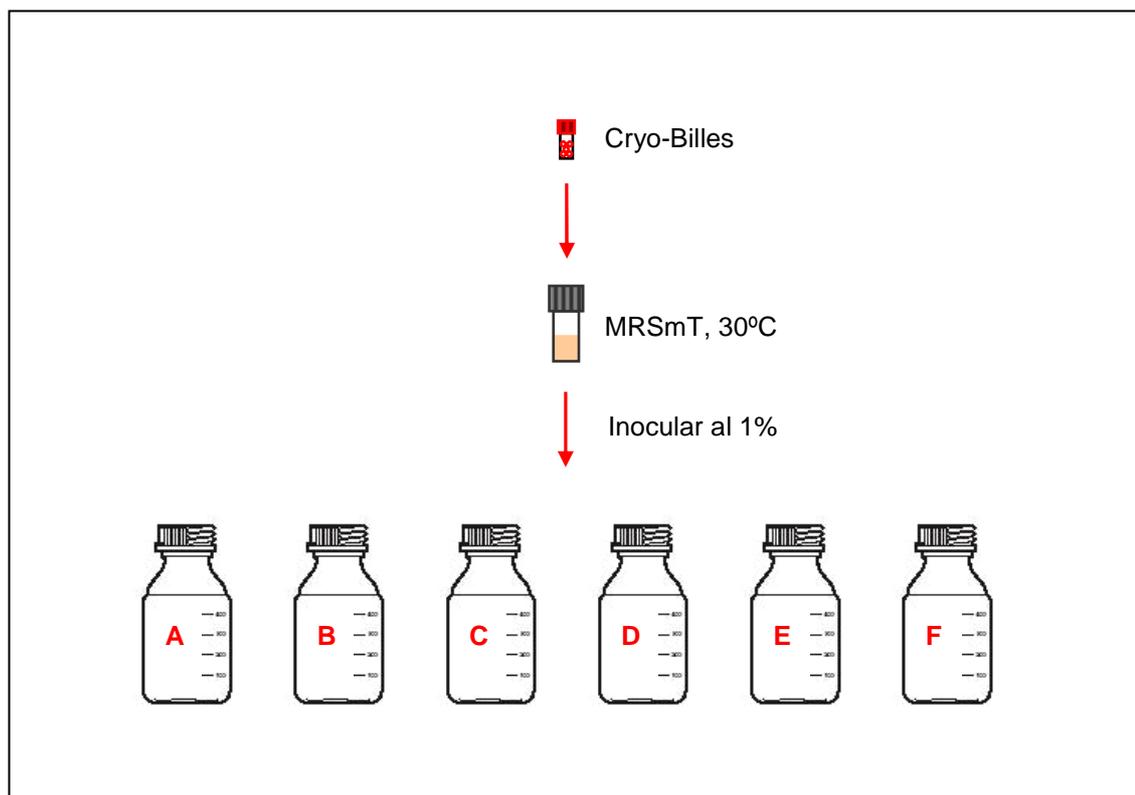


Figura 4.9. Procedimiento seguido para la inoculación de vino simulado.

Tabla 4.10. Códigos utilizados para las diferentes condiciones de vinificación ensayadas en vino simulado.

CÓDIGO	A	B	C	D	E	F
Concentración de etanol	10 %	15 %	10 %	10 %	10 %	10 %
pH	3,7	3,7	3,4	4,0	3,7	3,7
Temperatura	25 °C	22 °C				
Concentración de ácido málico	3 g/L	3 g/L	3 g/L	3 g/L	6 g/L	3 g/L

4.2.2 Controles analíticos

Las muestras se tomaron cada 2 ó 3 días para determinar la población bacteriana y los contenidos de ácido L-málico, arginina y citrulina y se almacenaron congeladas para realizar los demás análisis posteriormente.

Al inicio del ensayo, luego de la inoculación, se determinaron acidez volátil, ácido L-málico, ácido L-láctico, glucosa y fructosa, ácido cítrico, pH, nitrógeno asimilable y amoniacal, CE, CEP y sus precursores (urea, arginina y citrulina), además de controlar la población por medición de la DO 600nm y por recuento en placa en medio MRSmT.

Cada dos días se controló la población bacteriana por determinación de la DO 600nm y se determinaron ácido L-málico, arginina y citrulina, para controlar su metabolismo. También se realizó el control de la población microbiana por recuento en placa periódicamente para comprobar su correlación con la DO 600nm.

Al final del consumo de ácido L-málico y del consumo de arginina se determinaron, además, CE, CEP, sus precursores (urea, arginina y citrulina), pH y el contenido nitrogenado (nitrógeno asimilable y amoniacal).

También se determinaron al final del consumo del ácido L-málico acidez volátil, ácido L-láctico, glucosa y fructosa y ácido cítrico.

A continuación se presentan los resultados obtenidos para las cepas de *O. oeni* A y CECT 217^T y para la cepa de *L. plantarum* CECT 5671. Las cepas de *L. brevis* CECT 4121^T y *Lc. mesenteroides* CECT 219^T no fueron capaces de degradar el ácido

L-málico en ninguna de las condiciones aquí propuestas después de 45 días de experiencia.

4.2.3 Determinación de la población viable

Como se ha expuesto anteriormente, la población bacteriana viable se controló en esta experiencia determinando la DO 600nm. Para comprobar la fiabilidad de este método, se realizaron determinaciones periódicas paralelamente por el método de referencia de recuento en placa. Se determinó la correlación entre ambos métodos por medio del cálculo del coeficiente de correlación para cada cepa separadamente. Los resultados obtenidos se representan en las figuras 4.10, 4.11 y 4.12 para las cepas A (*O. oeni*), CECT 217^T (*O. oeni*) y CECT 5671 (*L. plantarum*) respectivamente.

Como puede observarse, podemos afirmar que, para cada cepa en particular, existe una buena correlación entre la determinación de la DO 600nm y el método de referencia de recuento en placa, lo que permite, en esta experiencia, utilizar la determinación de la DO 600nm como un buen indicador de la población de bacterias viables.

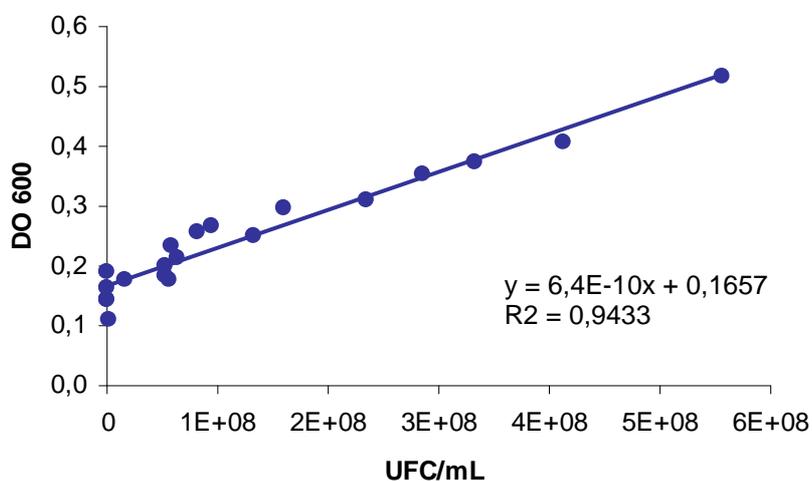


Figura 4.10. Comparación mediante regresión lineal de los resultados obtenidos para la determinación de la población de bacterias viables mediante los dos métodos analíticos ensayados para la cepa de *O. oeni* A.

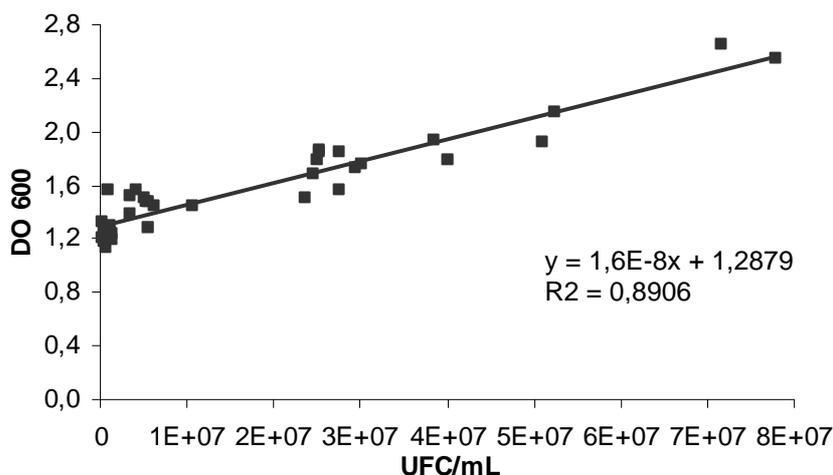


Figura 4.11. Comparación mediante regresión lineal de los resultados obtenidos para la determinación de la población de bacterias viables mediante los dos métodos analíticos ensayados para la cepa de *O. oeni* CECT 217^T.

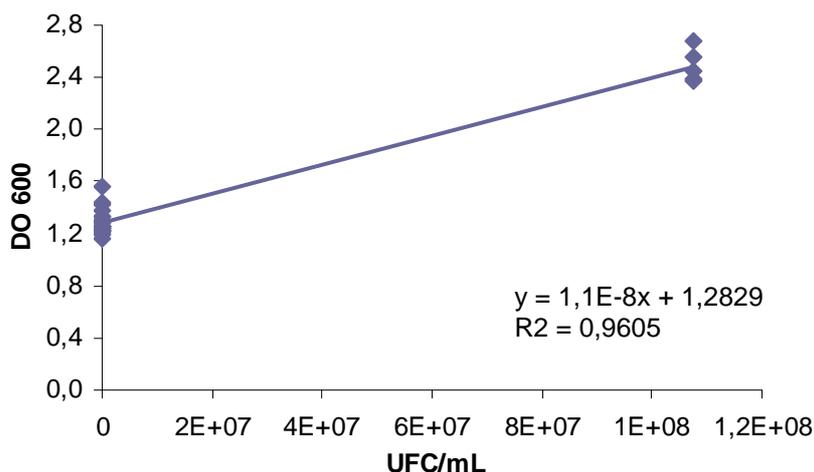


Figura 4.12. Comparación mediante regresión lineal de los resultados obtenidos para la determinación de la población de bacterias viables mediante los dos métodos analíticos ensayados para la cepa de *L. plantarum* CECT 5671.

4.2.4 Efectos sobre el crecimiento de las cepas de BL, la degradación de ácido L- málico y el metabolismo de la arginina

En la figura 4.13 podemos ver que *O. oeni* A consumió completamente el ácido L- málico en 5 días o menos en todas las condiciones estudiadas, excepto en la condición B, que presentaba una mayor graduación alcohólica, en la que necesitó 16 días para completar la degradación.

Esta cepa metabolizó la arginina en todas las condiciones, excepto en la condición B (figura 4.13). Se observa que un pH más alto favorece el metabolismo de la arginina, el cual se vio acelerado en la condición con pH 4,0 (condición D), el pH más alto de los estudiados, con respecto a la condición A, con iguales condiciones alcohólicas, de temperatura y concentración de ácido L- málico, pero con pH 3,7. El metabolismo de la arginina se vio retrasado, con respecto a la condición A, en aquellas condiciones en las que se realizó la FML a una menor temperatura (condición F), un pH más bajo (condición C) y en presencia de un mayor contenido de ácido L-málico (condición E) (figura 4.13).

El consumo de ácido L- málico se correlaciona con el aumento de la biomasa, pero no explica totalmente este aumento, ya que, en algunos casos, luego de la degradación del ácido L- málico se observa una mayor población bacteriana, que se correlaciona bien con la degradación de la arginina, sobre todo en las condiciones A, D y F (figura 4.13), las tres condiciones en las que el metabolismo de la arginina se vio más adelantado.

El consumo de arginina se correlaciona bien con la producción de citrulina (figura 4.13). En general, se degradó un 91% de la arginina presente en todas las condiciones estudiadas, exceptuando la B, y el rango de conversión de arginina a citrulina (P/P) fue de un 16% en la condición A, sobre el 12% en la condición C, 19% en la condición D, 17% en la E y un 9% en la condición F.

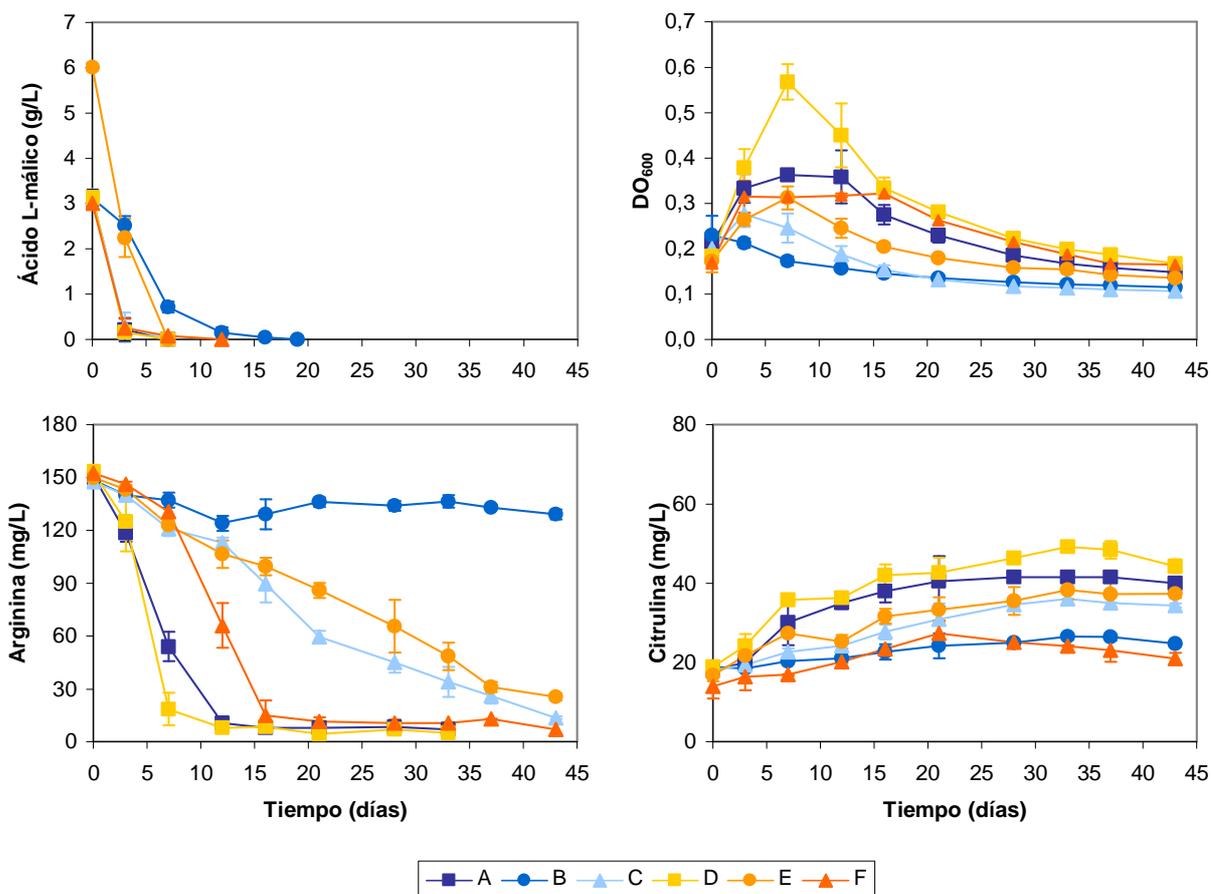


Figura 4.13. Degradación de ácido L-málico, consumo de arginina, producción de citrulina y evolución de la población para *O. oeni* A en todas las condiciones ensayadas en vino simulado (A, B, C, D, E, F: Véase Tabla 4.10).

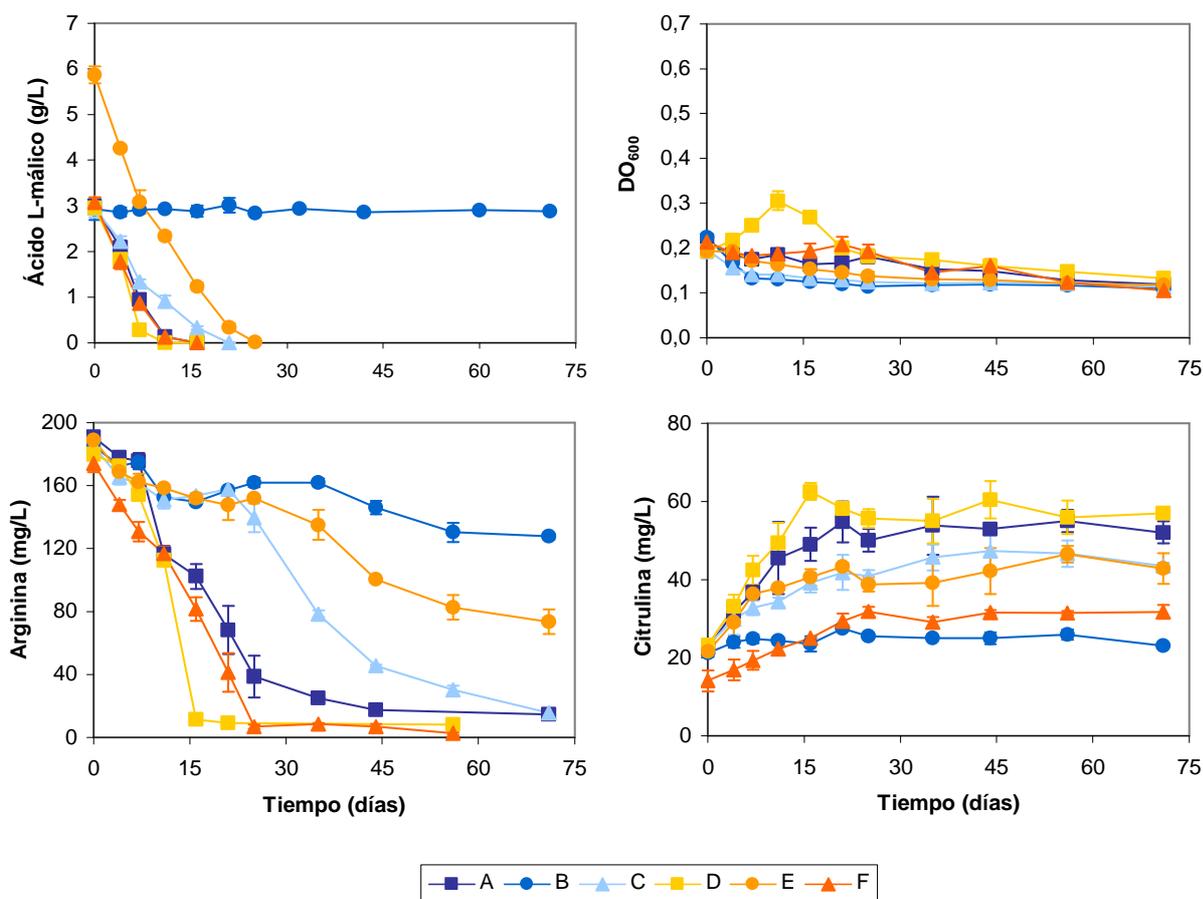


Figura 4.14. Degradación de ácido L-málico, consumo de arginina, producción de citrulina y evolución de la población para *O. oeni* CECT 217^T en todas las condiciones ensayadas en vino simulado (A, B, C, D, E, F: Véase Tabla 4.10).

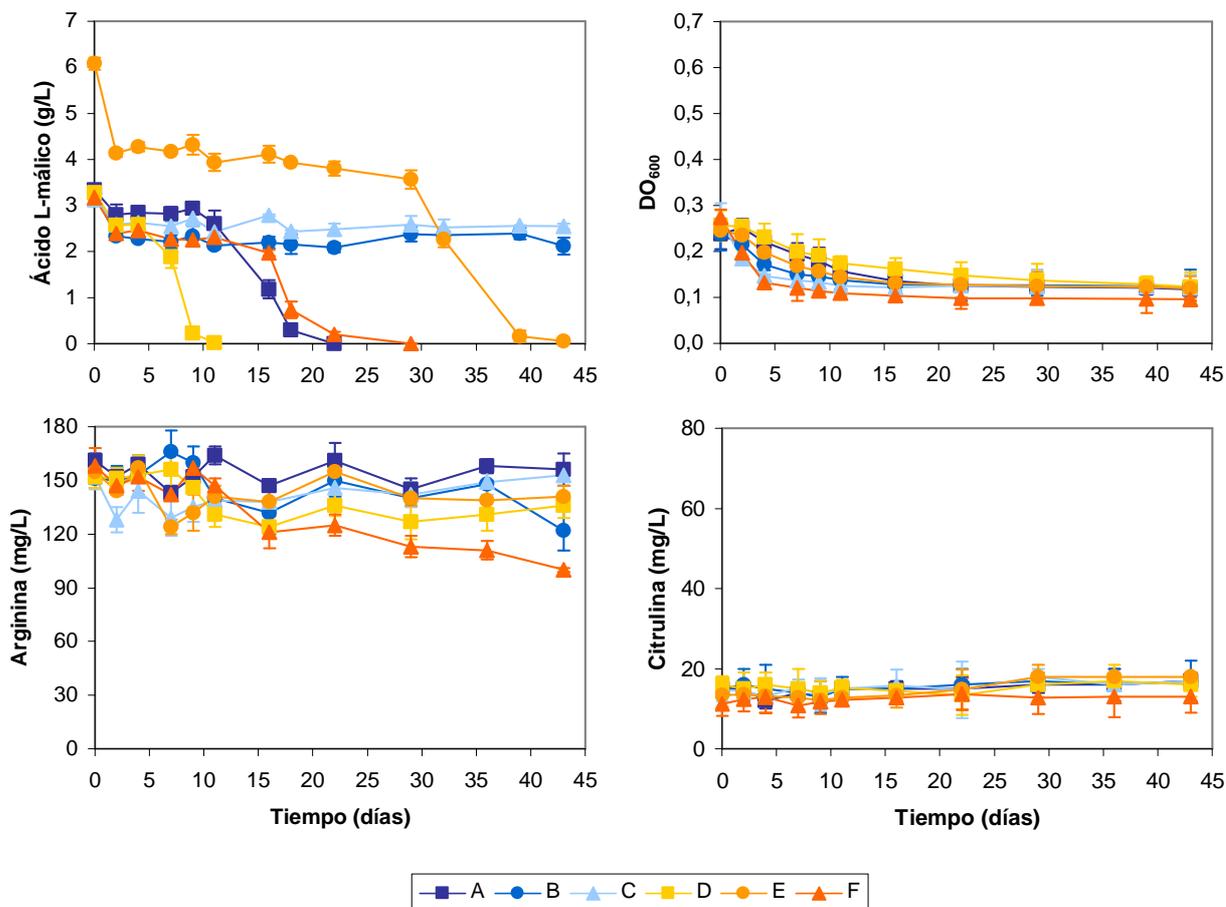


Figura 4.15. Degradación de ácido L-málico, consumo de arginina, producción de citrulina y evolución de la población para *L. plantarum* CECT 5671 en todas las condiciones ensayadas en vino simulado (A, B, C, D, E, F: Véase Tabla 4.10).

Los datos observados para la cepa A son confirmados por la cepa tipo de *O. oeni* (CECT 217^T) (figura 4.14), aunque esta cepa necesitó más tiempo que la cepa A para completar la degradación del ácido L-málico y no fue capaz de degradarlo en la condición con 15% de etanol (condición B).

Esta cepa tampoco consumió la arginina en la condición B, y necesitó 120 días para completarla en la condición E, que tenía un contenido de ácido L-málico que duplicaba al de las demás condiciones ensayadas, condición en la que la degradación de la arginina también se vio retrasada para la cepa A. En este caso también se observa que la degradación de arginina se vio acelerada en la condición D y retrasada

en las condiciones C y E, con respecto a la condición A, pero, a diferencia de lo que ocurrió para la cepa A, se vio más adelantada en la condición F, respecto a la condición A.

Nuevamente, se observa una correlación entre la degradación de ácido L-málico y la densidad de población y entre ésta y la degradación de arginina en las condiciones A, D y F, las tres condiciones en las que la degradación de arginina se ve más adelantada con respecto a las demás (figura 4.14).

Los rangos de degradación de arginina y sus correspondientes rangos de excreción de citrulina se correlacionan bien (figura 4.14). Exceptuando la condición B, en la que sólo se degradó un 30% de la arginina presente después de 75 días de experiencia, esta cepa degradó un 94% de la arginina inicial como media en todas las condiciones estudiadas. Los rangos de conversión de arginina a citrulina (P/P) fueron similares a los observados con la cepa A, y fueron del 17%, 11%, 19%, 17% y 18% en las condiciones A, C, D, E y F respectivamente.

Las cepas de *O. oeni* alcanzaron una población celular de 10^7 a 10^8 ufc/mL en el vino simulado, valores similares a la población celular que se observa cuando se desarrollan las BL en vino (Davis *et al.*, 1986).

Las dos cepas estudiadas de *O. oeni* consumieron completamente el ácido L-málico presente en todos los experimentos, exceptuando el caso de *O. oeni* CECT 217^T a la mayor concentración alcohólica estudiada (condición B) (figura 4.14). En las experiencias llevadas a cabo con ambas cepas de *O. oeni* el consumo de ácido L-málico se correlacionó con el aumento de la biomasa, aunque, como ya se expuso, no explica totalmente este aumento, ya que, en algunas condiciones, se observa una mayor población bacteriana después del agotamiento del ácido L-málico, que se correlaciona bien con la degradación de la arginina para las dos cepas, principalmente en las condiciones A, D y F, las tres condiciones en las que la degradación de la arginina fue más adelantada (figuras 4.13 y 4.14). Mira de Orduña *et al.* (2001) también observaron un patrón similar de crecimiento bifásico en cepas de *O. oeni*. Se ha demostrado que cepas de BL vínicas que poseen la maquinaria enzimática completa para el catabolismo de la arginina pueden ser muy competitivas en crecimiento, ya que pueden conseguir energía extra (ATP) a partir de la degradación de la arginina (reacción 3) (Liu *et al.*, 1994). De hecho, se ha comprobado que el catabolismo de la arginina puede favorecer el crecimiento en algunas BL. Algunos

autores observaron que la degradación de la arginina aumentó el crecimiento de cepas de *Lactobacillus* pero no de las cepas de *O. oeni* examinadas (Liu, 1993; Mira de Orduña *et al.*, 2001). A partir de los resultados aquí obtenidos podemos concluir que el catabolismo de la arginina aumenta el crecimiento de *O. oeni* en algunas condiciones.

Estas cepas han sido capaces de degradar la arginina en las condiciones estudiadas y de excretar cantidades considerables de citrulina, que puede reaccionar con el etanol llevando a la formación de CE.

Se ha demostrado que el metabolismo de la arginina por *O. oeni* es afectado por el pH. Diferentes autores han observado que *O. oeni* podía degradar la arginina a niveles de pH vínicos altos (3,9 - 4,0) pero no a niveles de pH más bajos (3,2 - 3,3) (Liu *et al.*, 1995a; Mira de Orduña *et al.*, 2001). En este estudio las dos cepas de *O. oeni* estudiadas fueron capaces de degradar completamente la arginina a todos los niveles de pH estudiados (3,4; 3,7 y 4,0), en aquellos casos en los que la FML tuvo lugar, pero el rango de conversión de arginina a citrulina (P/P) fue ligeramente mayor (19%) a pH 4,0 que a valores de pH más bajos (9 a 18%).

Se sabe que el etanol influye en el crecimiento y la actividad metabólica de las BL (Rodríguez y Manca de Nadra, 1998). A partir de los resultados de este estudio parece que el metabolismo de la arginina también es afectado por el contenido de etanol, ya que ninguna de las dos cepas examinadas de *O. oeni* degradó la arginina en la condición B, la de mayor contenido alcohólico (con 15% v/v de etanol) (figuras 4.7 y 4.8). El consumo de la arginina disminuyó al aumentar la concentración de etanol, como también observaron Arena y Manca de Nadra (2005). No obstante, la actividad maloláctica de la cepa A no fue inhibida por una concentración de etanol de 15% v/v, sugiriendo que la enzima maloláctica tiene una mayor resistencia al etanol que otras actividades metabólicas.

La cepa de *L. plantarum* CECT 5671 no fue capaz de completar la degradación de ácido L- málico en las condiciones de mayor graduación alcohólica (condición B) y de mayor acidez (condición C) (figura 4.15). Esto era de esperar, ya que esta especie no es muy resistente a altas graduaciones alcohólicas y es más sensible al pH del vino que *O. oeni*, como ha sido observado en resultados de otros estudios (Wibowo *et al.*, 1985; Masqué, 1992; Liu *et al.*, 1995a). La combinación del pH, el etanol y la limitación de nutrientes puede ser una causa de esta selectividad. A pesar de esto, esta especie es una buena candidata como cultivo iniciador para realizar la FML en determinados

Resultados y Discusión

vinos, ya que, como se mencionó antes, es una especie heterofermentativa facultativa, fermenta la glucosa por la vía homofermentativa de Embden-Meyerhof, transformando prácticamente todas las hexosas que cataboliza, especialmente la glucosa, en ácido láctico, y fermenta las pentosas a ácidos láctico y acético por la vía heterofermentativa de las pentosas fosfato. De esta manera, no eleva la acidez volátil de un vino al consumir hexosas residuales que pueden estar presentes en el vino al final de la FA. Además, esta cepa ha mostrado mantener actividad maloláctica en condiciones en las que no se detectaron células en crecimiento.

Esta cepa ha demostrado un perfil de no hidrólisis de arginina en estudios previos (Masqué, 1992). En el presente estudio tanto el consumo de arginina como la producción de citrulina fueron virtualmente nulos en casi todas las condiciones estudiadas. Sólo en la condición F, en la que se ensayaba una menor temperatura, se ha observado un ligero consumo de arginina.

En aquellos casos en los que el ácido L-málico fue completamente degradado, la degradación de la arginina siempre fue retrasada con respecto a la degradación del ácido L-málico, ocurrió al final del consumo del ácido L-málico o se inició luego del comienzo de la degradación del mismo, en todas las cepas testadas. Esto tiene importancia enológica, permite al enólogo evitar la degradación de arginina eliminando las células o inhibiendo la actividad celular cuando ha terminado el consumo del ácido L-málico en el vino. Esto es importante para evitar no sólo la formación de citrulina sino, también, un gran ascenso del pH, que puede provocar un cambio en las características organolépticas del vino y favorecer la propagación de microorganismos indeseables. También hay que considerar que la degradación del ácido cítrico comienza una vez que se ha degradado el ácido L-málico (Radler, 1963). Sabemos que el metabolismo del ácido cítrico puede producir diacetilo, compuesto que confiere aroma a mantequilla a los vinos (Bartowsky y Henschke, 2004). Si el enólogo pretende la degradación de ácido cítrico para obtener los beneficios organolépticos de la producción de diacetilo, existe también el riesgo de degradación de arginina.

Hay que señalar que no hemos observado (o ha sido mínima) degradación de arginina en los casos en que no ha ocurrido la FML. Probablemente, las células bacterianas fueron incapaces de sobrellevar la FML ya que todo metabolismo se ha visto afectado por las duras condiciones ambientales y, en esta situación, también el catabolismo de la arginina se ve afectado.

4.2.5 Formación de CE

En la tabla 4.11 se observa que los niveles de CE al final de la FML conducida por *O. oeni* A fueron muy bajos, no llegando a 4 µg/L. Sólo fue significativamente diferente el valor de CE obtenido en la condición B con respecto al observado en las demás condiciones. Esto era de esperar, ya que esta condición contenía un 50% más de etanol, precursor del CE, que las demás condiciones estudiadas. Ough (1988a) ya demostró la relación directa entre la concentración de etanol y el CE formado.

El contenido en CEP se relaciona directamente con el aumento en el contenido de citrulina al final del consumo del ácido L-málico. Se observó una buena correlación ($r = 0,90$) entre los niveles de CEP y las concentraciones de citrulina al final de la degradación del ácido L-málico a partir de las experiencias realizadas en vino simulado con 10% (v/v) de etanol (condiciones A, C, D y F).

Tabla 4.11. Concentraciones de CE y CEP al final de los consumos de ácido L-málico y de arginina para las cepas *O. oeni* A, *O. oeni* 217^T y *L. plantarum* CECT 5671 en todas las condiciones estudiadas.

Condición	Final del consumo del ácido L-málico						Final del consumo de la arginina ^a					
	CE (µg/L)			CE potencial (µg/L)			CE (µg/L)			CE potencial (µg/L)		
	A	CECT 217 ^T	CECT 5671	A	CECT 217 ^T	CECT 5671	A	CECT 217 ^T	CECT 5671	A	CECT 217 ^T	CECT 5671
A	1,4	2,9	4,3	119	165	124	2,4	2,6	3,5	257	227	183
B	3,6	^b	^c	157	^b	^c	4,7	5,6	3,5	163	172	301
C	1,8	6,4	^c	78	82	^c	4,0	4,7	2	132	165	131
D	1,7	1,8	2,9	153	98	167	1,7	1,9	2,4	177	267	177
E	1,8	4,2	5,4	202	88	200	1,9	6,9	5,4	145	207	200
F	ND ^d	2,3	1,1	108	142	141	4,1	1,9	1,1	251	400	141

Los valores son un promedio de dos replicados.

^a Final de la incubación en el caso de *L. plantarum* CECT 5671

^b Los consumos de ácido L- málico y de arginina no fueron completos.

^c El consumo de ácido L- málico no fue completo.

^d ND: no detectado

Los niveles de CE al final de la degradación de la arginina también fueron bajos y no alcanzaron los 5 µg/L.

En las experiencias llevadas a cabo con la cepa de *O. oeni* CECT 217^T en vino simulado, los niveles de CE obtenidos fueron menores a 7 µg/L (tabla 4.11).

Se observó una correlación lineal ($r = 0,95$) entre los niveles de CE potencial y de citrulina al final de la degradación del ácido L-málico en las experiencias conducidas a 10% (v/v) de etanol, exceptuando la experiencia a una temperatura más baja (condición F). Para esta cepa también se observó una buena correlación ($r = 0,97$) entre los niveles de CEP y de citrulina al final de la degradación de la arginina, para las mismas condiciones.

La correlación obtenida para las cepas de *O. oeni* A y CECT 217^T entre la citrulina producida y el CEP en las experiencias llevadas a cabo a 10% (v/v) de etanol permite anticipar los niveles de CEP que se pueden obtener al final del consumo del ácido L-málico en base a los niveles de citrulina producidos durante el metabolismo bacteriano de la arginina en la FML, utilizando la ecuación de regresión obtenida para cada cepa, lo que evita tener que realizar la determinación del CEP, tal como han descrito previamente Liu *et al.* (1994) para *L. buchneri* y Azevedo *et al.* (2002) para *L. hilgardii* en vino fortificado. Esto tiene importancia enológica, ya que estos niveles de CE podrían formarse durante periodos de almacenamiento prolongados a temperaturas normales de conservación de los vinos (Stevens y Ough, 1993), tal como justifican los mayores niveles de CE encontrados en vinos crianza y reserva españoles en comparación a los hallados en vinos jóvenes (Uthurry *et al.*, 2004; Uthurry, 2005).

A partir de las experiencias de este estudio, observamos que las condiciones que principalmente favorecen la formación de CE al final de la FML llevada a cabo por las cepas de *O. oeni* fueron un mayor contenido en etanol para la cepa A y un pH vínico más bajo para la cepa CECT 217^T. Se sabe que la etanólisis (reacción entre etanol y un compuesto carbamílico) se ve favorecida a bajo pH (Ough *et al.*, 1988a; Monteiro *et al.*, 1989). No obstante, la formación potencial de CE ha sido en el presente ensayo mayor a pHs más altos, una condición que, hemos visto, favorece el crecimiento y metabolismo de las BL.

La conversión química de citrulina en CE fue dependiente de cepa. El rendimiento fue de 3,5% y 2,6% para las cepas A y CECT 217^T respectivamente en términos molares. Estos niveles son levemente superiores a los observados por Liu *et al.* (1994) y fueron mayores en la condición B, con mayor contenido en etanol. Sin

embargo, la conversión molar de citrulina a CE es baja, lo que concuerda con los estudios cinéticos llevados a cabo por Ough *et al.* (1988a).

Para la cepa de *L. plantarum* CECT 5671, los niveles obtenidos de CE fueron similares a los alcanzados por las cepas estudiadas de *O. oeni*, y fueron menores a 6 µg/L al final del ensayo. Aunque la degradación de arginina y la producción de citrulina han sido virtualmente nulas, los niveles de CEP son comparables a los obtenidos con las cepas de *O. oeni* estudiadas. Podría haber otro u otros compuestos presentes que puedan contribuir a la formación de CE por esta cepa, proveniente, quizás, del mosto concentrado utilizado para preparar el vino simulado. Se excluyen metabolitos derivados de la actividad metabólica de las levaduras con la utilización de vino simulado.

Arena y Manca de Nadra (2005) reportaron un aumento de un 23% en los niveles de CE si el etanol del medio aumentaba de 10 a 15%. En el presente trabajo, para el mismo incremento en las concentraciones de etanol, se observa un aumento de un 123%, como media, en los niveles de CE (valores entre 96 y 157%, tabla 4.11) para las cepas de *O. oeni* ensayadas y variando solamente el contenido en etanol. Esto no es tan claro para *L. plantarum*.

4.2.6 Consumo de azúcares, producción de ácido acético y cambios de pH

En la tabla 4.12 se presenta el consumo de azúcares (glucosa y fructosa) y la producción de ácido acético durante la degradación del ácido L-málico para todas las cepas ensayadas.

O. oeni A degradó más azúcares en aquellas condiciones en las que el ácido L-málico fue consumido más rápidamente, lo que también se vio reflejado en mayores rangos de crecimiento. Para la cepa de *O. oeni* CECT 217^T el consumo de azúcares fue más uniforme en todas las condiciones.

La producción de ácido acético se correlacionó bien con el consumo de azúcares, especialmente en las cepas de *O. oeni* ensayadas, con las que se obtuvieron coeficientes de correlación de 0,94 y 0,71 para las cepas A y 217^T respectivamente. Los niveles de ácido acético alcanzados por las cepas de *O. oeni*

fueron menores a 0,25 g/L, niveles que normalmente se alcanzan cuando la FML ocurre en vino.

Tabla 4.12. Consumo de ácido L-málico y glucosa, y producción de ácido acético para las cepas *O. oeni* A, *O. oeni* 217^T y *L. plantarum* CECT 5671 en todas las condiciones estudiadas.

Condición	Consumo de ácido L-málico (%)			Consumo de Glucosa/Fruktosa (g/L)*			Producción de ácido acético (g/L)		
	A	CECT 217 ^T	CECT 5671	A	CECT 217 ^T	CECT 5671	A	CECT 217 ^T	CECT 5671
A	100	100	100	0,71	1,80	1,78	0,20	0,14	0,11
B	98	0	35	0	0	0	0,09	0,05	0,06
C	100	100	19	0	1,60	0	0,13	0,18	0
D	100	100	99	1,95	1,18	2,12	0,25	0,21	0,04
E	100	100	99	0,41	1,48	2,74	0,13	0,24	0,08
F	98	99	99	1,20	1,30	1,23	0,21	0,16	0,03

Los valores son un promedio de dos replicados.

*La concentración inicial de azúcares (glucosa y fructosa) fue de $4,07 \pm 0,14$ g/L.

L. plantarum CECT 5671 consumió, en general, más azúcares que las cepas de *O. oeni* en aquellas condiciones en las que fue capaz de degradar el ácido L-málico, pero los niveles de ácido acético producidos fueron menores que los alcanzados por aquellas, lo que se justifica por su carácter heterofermentativo facultativo.

El consumo de azúcares tiene importancia enológica debido a que cepas heterofermentativas pueden consumir azúcares residuales presentes en el vino llevando a la formación de cantidades variables de ácido acético que podrían exceder los límites legales o tornar un vino inaceptable desde un punto de vista sensorial (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

La tabla 4.13 muestra los valores de pH al final de la incubación para todas las cepas y experiencias realizadas. Los valores alcanzados por ambas cepas de *O. oeni* (cepas A y CECT 217^T) fueron más altos que los adquiridos por *L. plantarum* CECT 5671. Esto puede ser explicado por la capacidad de las cepas de *O. oeni* para degradar efectivamente la arginina, lo que eleva los niveles de nitrógeno amoniacal (los datos no se muestran), elevando así los niveles de pH del medio, y también por la mayor efectividad que mostraron estas cepas para consumir el ácido L-málico.

Tabla 4.13. Valores de pH al final de la incubación de las cepas *O. oeni* A, *O. oeni* 217^T y *L. plantarum* CECT 5671 en todas las condiciones estudiadas.

Condición	A	B	C	D	E	F
pH previo a la FML	3,70	3,74	3,41	4,01	3,72	3,73
<i>O. oeni</i> A (43 días)	4,06	3,93	3,82	4,24	4,01	4,20
<i>O. oeni</i> CECT 217 ^T (74 días)*	4,15	3,80	3,85	4,32	4,08	4,10
<i>L. plantarum</i> CECT 5671 (43 días)	3,58	3,83	3,44	3,69	3,72	3,65

Los valores son un promedio de dos replicados.

FML: fermentación maloláctica.

*120 días en la condición E.

4.2.7 Conclusiones

El consumo de ácido L-málico se correlacionó con el aumento de la biomasa en las experiencias llevadas a cabo con las dos cepas de *O. oeni* ensayadas, pero no explicó totalmente este aumento, ya que se observó una mayor población bacteriana después del agotamiento del ácido L-málico en las condiciones en las que la degradación de la arginina fue más adelantada, que se correlacionó bien con la degradación de la arginina para las ambas cepas. De estas observaciones podemos concluir que el catabolismo de la arginina aumenta el crecimiento de *O. oeni* en algunas condiciones.

Diferentes autores observaron que *O. oeni* podía degradar la arginina a niveles de pH vínicos altos (3,9 - 4,0) pero no a niveles de pH más bajos (3,2 - 3,3) (Liu *et al.*, 1995a; Mira de Orduña *et al.*, 2001), demostrando que el metabolismo de la arginina por *O. oeni* es afectado por el pH. En este estudio, las cepas estudiadas de *O. oeni* fueron capaces de degradar la arginina a todos los niveles de pH estudiados (3,4; 3,7 y 4,0), en aquellos casos en los que la FML tuvo lugar, y de excretar cantidades considerables de citrulina.

El pH influyó el rango de conversión de arginina a citrulina, que fue ligeramente mayor a pH 4,0 que a valores de pH más bajos.

El metabolismo de la arginina por las cepas de *O. oeni* se vio afectado por el contenido de etanol y, aunque el consumo de la arginina disminuyó al aumentar la concentración de etanol, la actividad maloláctica de la cepa A de *O. oeni* no fue

inhibida por una concentración de etanol de 15% v/v, lo que sugiere que la enzima maloláctica tiene mayor resistencia al etanol que otras actividades metabólicas.

En aquellos casos en los que el ácido L-málico fue completamente degradado, la degradación de la arginina siempre fue retrasada con respecto a la degradación del mismo en todas las cepas testadas. Esto representa una ventaja técnica, al permitir al enólogo evitar la degradación de la arginina eliminando las células o inhibiendo la actividad celular cuando ha terminado el consumo del ácido L-málico en el vino, con el fin de evitar no sólo la formación de citrulina sino, también, un gran ascenso del pH, que puede provocar un cambio en las características organolépticas del vino y favorecer la propagación de microorganismos indeseables. No se observó (o ha sido mínima) degradación de arginina en los casos en que no se realizó la FML.

Para las cepas ensayadas de *O. oeni* el contenido en CEP se correlacionó directamente con el aumento en el contenido de citrulina al final del consumo del ácido L-málico, y fue mayor en aquellas condiciones donde se observó un crecimiento y metabolismo más rápido. Por lo tanto, la citrulina es un buen indicador de las concentraciones de CE que podrían formarse en el vino luego de periodos prolongados de almacenamiento.

Las condiciones que principalmente favorecieron la formación de CE al final de la FML llevada a cabo por las cepas de *O. oeni* fueron un mayor contenido en etanol, un precursor, y un pH vínico más bajo, tal y como ya se ha descrito en la bibliografía (Ough et al., 1988a, Trioli y Colagrande, 1991). Pero la formación potencial de CE resultó mayor a pHs más alcalinos del vino, condición que, hemos visto, favorece el crecimiento y metabolismo de las BL. En el caso de *L. plantarum*, las condiciones que observamos más favorecen la producción de CE, y también de CEP, durante la FML son las concentraciones de etanol y de ácido L-málico.

La cepa estudiada de *L. plantarum* no fue capaz de degradar la arginina y no excretó citrulina en las diferentes condiciones estudiadas, aunque los niveles obtenidos de CE fueron similares a los alcanzados por las cepas testadas de *O. oeni*. Proponemos que podría haber otro u otros compuestos presentes que puedan contribuir a la formación de CE por esta cepa.

4.3 RELACIÓN ENTRE CARACTERÍSTICAS ENOLÓGICAS DE MOSTOS Y VINOS Y LA FORMACIÓN DE CE

Con los resultados de este estudio se está elaborando un artículo titulado *Relation between oenological characteristics of musts and wines and the formation of ethyl carbamate*.

4.3.1 Antecedentes

En la vendimia de 2003 se recogieron muestras de mostos y de vinos, tanto al finalizar la FA (FFA) como al finalizar la FML (FFML), de 81 vinificaciones llevadas a cabo en la bodega experimental de la Estación Enológica de Reus (INCAVI) con el fin de evaluar la influencia de diferentes parámetros, como la variedad de la uva, la procedencia y otros parámetros enológicos habituales, sobre el metabolismo de la arginina y la producción de CE y sus precursores. También se pretendía determinar la posible influencia sobre el metabolismo de la arginina de la infección de la uva por *Botrytis cinerea* (Sponholz, 1991) con estas muestras.

El nivel de nitrógeno asimilable presente en mostos es específico del viñedo y varía con el tipo de suelo en que está implantado, la variedad de uva, el portainjerto utilizado, la fertilización y las prácticas de riego, el grado de madurez, así como con el deterioro microbiológico que puede ocurrir previo a la cosecha (Zoecklein *et al.*, 1995). En lo que a esto se refiere, el crecimiento de hongos en la uva puede alterar significativamente la distribución cualitativa y cuantitativa de los aminoácidos (Dittrich, 1987). Sponholz (1991) informó que el metabolismo de *B. cinerea* en uvas infectadas puede alterar la composición y el contenido de aminoácidos. Como media, el hongo consume un 41% del total de aminoácidos, aunque la disminución individual para cada aminoácido es bastante diferente, pudiendo variar entre 7% y 61% dependiendo del aminoácido. Se observó también un consumo de 24% del amonio. Con esta disminución, el nivel de nitrógeno asimilable en el mosto puede caer por debajo de los niveles necesarios para que *S. cerevisiae* complete la FA. Sponholz (1991) evidenció también que la utilización de aminoácidos aumentaba en casos de uva infectada por *B. cinerea*. Además, la utilización de aminoácidos es diferente para los diferentes aminoácidos y depende de la composición del mosto. Algunos aminoácidos son totalmente consumidos durante la FA pero, si la composición de aminoácidos es

suficiente para la nutrición de la levadura, la levadura no utiliza grandes cantidades de arginina con este fin. La levadura acumula aminoácidos como la arginina en grandes concentraciones en vacuolas. Ante una carencia de nitrógeno la arginina es liberada y utilizada más intensamente (Sponholz, 1991). En el presente trabajo se pretendía confirmar la disminución en los niveles de nitrógeno asimilable y, más concretamente, de arginina en uvas afectadas por *B. cinerea*, la mayor utilización de arginina en estas uvas y su posible influencia en la formación de citrulina y de CE.

4.3.2 Controles analíticos

En el mosto, vino de FFA y vino de FFML se realizaron las determinaciones analíticas habituales: grado alcohólico probable, acidez total, pH, ácidos L-málico, tartárico y glucónico y glicerol en mosto; masa volúmica, grado alcohólico adquirido, acidez total, pH, acidez volátil, glucosa y fructosa, glicerol y ácidos L-málico, tartárico y glucónico en vino de FFA; grado alcohólico adquirido, acidez total, pH, acidez volátil, SO₂ libre, SO₂ total, glucosa y fructosa, glicerol, ácidos L-málico, tartárico y L-láctico e índice de polifenoles totales en vino de FFML. Además, se determinaron citrulina, arginina, urea y nitrógeno en mostos, vinos de FFA y vinos de FFML.

Como los valores de SO₂ libre y SO₂ total determinados en los vinos de FFML no derivaban del metabolismo microbiano, no se han tenido en cuenta en el análisis estadístico de los datos.

4.3.3 Análisis de Correlaciones I

Los resultados de los análisis de los parámetros enológicos de los mostos y vinos de FFA, y de FFML de las 81 vinificaciones estudiadas se encuentran en el anexo E.

Como en muchos casos varias de las vinificaciones estudiadas provenían de clones y los vinos obtenidos dentro de cada grupo de clones presentaban unos resultados analíticos muy similares, se realizó una primera criba de las muestras totales, resultando finalmente el volumen de vinificaciones estudiadas de 56. En los mostos y vinos obtenidos de estas 56 vinificaciones se realizaron las analíticas para la determinación de los precursores de CE y del contenido nitrogenado y se calcularon

los consumos de arginina y producción de citrulina durante la FA y la FML. Estos resultados se presentan en el anexo F.

Con los resultados de los vinos y mostos de estas 56 vinificaciones se realizó un primer análisis de correlación para determinar si existía alguna relación entre las distintas variables determinadas, principalmente, buscando una correlación entre la concentración de precursores del CE, el consumo de arginina o la producción de citrulina y algún parámetro enológico de los mostos y vinos. Para ello se realizó el procedimiento de correlaciones bivariadas con el programa SPSS que calcula el coeficiente de correlación de Pearson. El coeficiente de correlación de Pearson permite cuantificar el grado de asociación lineal entre dos variables cuantitativas. El coeficiente de correlación de Pearson toma valores entre -1 y 1: un valor de 1 indica relación lineal perfecta positiva; un valor de -1 indica relación lineal perfecta negativa; un valor de 0 indica relación lineal nula. Es importante señalar que, aunque dos variables estén perfectamente relacionadas, el coeficiente de correlación de Pearson no será un estadístico adecuado para medir su asociación si esa asociación no es lineal. Además, un coeficiente de correlación alto no implica causalidad. Dos variables pueden estar linealmente relacionadas sin que esto implique que una sea la causa de la otra.

En las tablas 4.14, 4.15, 4.16, 4,17 y 4.18 se resumen las correlaciones obtenidas entre las diferentes variables. Estas tablas ofrecen información referida al coeficiente de correlación de Pearson. El programa SPSS ofrece una matriz de correlaciones cuadrada, con *unos* (1) en la diagonal (pues la relación entre una variable y ella misma es perfecta) y con los coeficientes de correlación de Pearson entre cada dos variables, duplicados en los triángulos superior e inferior de la matriz. Cada coeficiente aparece acompañado del número de casos sobre el que ha sido calculado (*N*) y del nivel crítico bilateral que le corresponde (*Sig. bilateral*). El nivel crítico permite decidir sobre la hipótesis nula de independencia lineal, o sea, sobre la hipótesis de que el coeficiente de correlación vale cero en la población. Rechazaremos la hipótesis nula de independencia, concluyendo que **existe relación lineal significativa, cuando el nivel crítico sea menor que** el nivel de significación establecido, **0,05**. Aquí no se exponen la totalidad de los resultados obtenidos entre todos los factores y parámetros analizados, sino sólo aquellos en los que hubo correlación y que presentaban alguna trascendencia en el presente estudio. Estos últimos se destacan en negrita.

Tabla 4.14. Correlaciones bivariadas obtenidas entre parámetros enológicos, precursores del CE y contenido nitrogenado del **mosto**.

		Grado de podrido	Ácido Tartárico	Ácido Glucónico	Arginina	Urea	Amonio	Nitrógeno Total
Grado de podrido	C. P.	1	-0,51(**)	0,95(**)	-0,43(**)	-0,25	-0,49(**)	-0,44(**)
	S. (b)		0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00
	N	56	56	56	56	56	56	56
Ácido Tartárico	C. P.	-0,51(**)	1	-0,57(**)	0,56(**)	0,42(**)	0,65(**)	0,52(**)
	S. (b)	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	N	56	56	56	56	56	56	56
Ácido Glucónico	C. P.	0,95(**)	-0,57(**)	1	-0,35(**)	-0,19	-0,50(**)	-0,35(**)
	S. (b)	0,00	0,00		0,01	0,15	0,00	0,01
	N	56	56	56	56	56	56	56
Arginina	C. P.	-0,43(**)	0,56(**)	-0,35(**)	1	0,45(**)	0,52(**)	0,60(**)
	S. (b)	0,00	0,00	0,01		0,00	0,00	0,00
	N	56	56	56	56	56	56	56
Urea	C. P.	-0,25	0,42(**)	-0,194	0,46(**)	1	0,79(**)	0,76(**)
	S. (b)	0,06	0,00	0,15	0,00		0,00	0,00
	N	56	56	56	56	56	56	56
Amonio	C. P.	-0,49(**)	0,65(**)	-0,50(**)	0,52(**)	0,79(**)	1	0,82(**)
	S. (b)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00
	N	56	56	56	56	56	56	56
Nitrógeno Total	C. P.	-0,44(**)	0,52(**)	-0,35(**)	0,60(**)	0,76(**)	0,82(**)	1
	S. (b)	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	
	N	56	56	56	56	56	56	56

C. P.: Correlación de Pearson

S. (b): Sig. (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Tabla 4.15. Correlaciones bivariadas obtenidas entre parámetros enológicos, precursores del CE, contenido nitrogenado, consumo de arginina y producción de citrulina de los vinos de FFA.

	Grado de podrido	Tipo	Grado alcohólico	Acidez Total	Acidez Volátil	pH	Ácido Máfico	Ácido Tartárico	Glicerol	Amonio	Arginina	Citrulina	Consumo de Arginina	Producción de Citrulina	
Grado de podrido	C. P.	1	-0,12	-0,06	0,22	0,50(**)	-0,13	0,03	-0,27(*)	0,22	0,26	-0,23	-0,16	0,32(*)	-0,05
	S. (b)		0,37	0,63	0,11	0,00	0,33	0,83	0,05	0,11	0,05	0,08	0,25	0,02	0,69
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
Tipo	C. P.	-0,12	1	-0,10	-0,16	-0,46(**)	-0,23	-0,34(*)	0,35(**)	-0,28(*)	-0,26(*)	-0,31(*)	0,44(**)	-0,23	0,29(*)
	S. (b)	0,37		0,45	0,24	0,00	0,09	0,01	0,01	0,04	0,05	0,02	0,00	0,09	0,03
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
Grado alcohólico	C. P.	-0,06	-0,10	1	0,22	0,31(*)	0,03	0,07	-0,14	0,49(**)	0,08	0,43(**)	-0,22	-0,03	-0,11
	S. (b)	0,63	0,45		0,11	0,02	0,84	0,62	0,31	0,00	0,56	0,10	0,82	0,43	
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	
Acidez Total	C. P.	0,22	-0,16	0,22	1	0,57(**)	-0,56(**)	0,28(*)	0,01	0,13	-0,08	-0,24	-0,08	0,30(*)	-0,16
	S. (b)	0,11	0,24	0,11		0,00	0,00	0,03	0,94	0,34	0,58	0,07	0,58	0,02	0,24
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
Acidez Volátil	C. P.	0,50(**)	-0,46(**)	0,31(*)	0,57(**)	1	-0,08	0,28(*)	-0,44(**)	0,57(**)	0,32(*)	0,20	-0,41(**)	0,42(**)	-0,29(*)
	S. (b)	0,00	0,00	0,02	0,00		0,54	0,03	0,00	0,00	0,02	0,15	0,00	0,00	0,03
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
pH	C. P.	-0,13	-0,23	0,03	-0,56(**)	-0,08	1	0,50(**)	-0,70(**)	0,34(*)	0,44(**)	0,54(**)	-0,38(**)	-0,03	-0,04
	S. (b)	0,33	0,09	0,84	0,00	0,54		0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,84	0,74	
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	
Ácido Máfico	C. P.	0,03	-0,34(*)	0,07	0,28(*)	0,28(*)	0,50(**)	1	-0,63(**)	0,23	0,26	0,14	-0,36(**)	0,08	-0,05
	S. (b)	0,83	0,01	0,62	0,03	0,03	0,00		0,00	0,10	0,06	0,32	0,01	0,54	0,73
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
Ácido Tartárico	C. P.	-0,27(*)	0,35(**)	-0,14	0,01	-0,44(**)	-0,70(**)	-0,63(**)	1	-0,60(**)	-0,59(**)	-0,50(**)	0,58(**)	-0,28(*)	0,19
	S. (b)	0,05	0,01	0,31	0,94	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,03	0,16	
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	
Glicerol	C. P.	0,22	-0,28(*)	0,49(**)	0,13	0,57(**)	0,34(*)	0,23	-0,60(**)	1	0,52(**)	0,63(**)	-0,36(**)	0,23	-0,28(*)
	S. (b)	0,11	0,04	0,00	0,34	0,00	0,01	0,10	0,00		0,00	0,00	0,01	0,08	0,04
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	
Amonio	C. P.	0,26	-0,26(*)	0,08	-0,08	0,32(*)	0,44(**)	0,26	-0,59(**)	0,52(**)	1	0,52(**)	-0,43(**)	0,22	-0,19
	S. (b)	0,05	0,05	0,56	0,58	0,02	0,00	0,06	0,00	0,00		0,00	0,10	0,17	
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	
Arginina	C. P.	-0,23	-0,31(*)	0,43(**)	-0,24	0,20	0,54(**)	0,14	-0,50(**)	0,63(**)	0,52(**)	1	-0,40(**)	0,14	-0,25
	S. (b)	0,08	0,02	0,00	0,07	0,15	0,00	0,32	0,00	0,00	0,00		0,00	0,32	0,06
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
Citrulina	C. P.	-0,16	0,44(**)	-0,22	-0,08	-0,41(**)	-0,38(**)	-0,36(**)	0,58(**)	-0,36(**)	-0,43(**)	-0,40(**)	1	-0,08	0,29(*)
	S. (b)	0,25	0,00	0,10	0,58	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00		0,53	0,03
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
Consumo de Arginina	C. P.	0,32(*)	-0,23	-0,03	0,30(*)	0,42(**)	-0,03	0,08	-0,28(*)	0,23	0,22	0,14	-0,08	1	-0,72(**)
	S. (b)	0,02	0,09	0,82	0,02	0,00	0,84	0,54	0,03	0,08	0,10	0,32	0,53		0,00
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
Producción de Citrulina	C. P.	-0,05	0,29(*)	-0,11	-0,16	-0,29(*)	-0,04	-0,05	0,19	-0,28(*)	-0,19	-0,25	0,29(*)	-0,72(**)	1
	S. (b)	0,69	0,03	0,43	0,24	0,03	0,74	0,73	0,16	0,04	0,17	0,06	0,03	0,00	
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56

C. P.: Correlación de Pearson

S. (b): Sig. (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Tabla 4.16. Correlaciones bivariadas obtenidas entre **parámetros enológicos del mosto** y **precursores del CE, consumo de arginina y producción de citrulina de los vinos al FFA.**

		°Brix	Grado Probable	Ácido Málico	Ácido Tartárico	Arginina mosto	Urea mosto	Amonio mosto	Nitrógeno Total mosto	Arginina FFA	Citrulina FFA	Consumo de Arginina FFA	Producción de Citrulina FFA
°Brix	C. P.	1	1,00(**)	0,06	0,33(*)	0,10	0,11	0,35(**)	0,42(**)	0,46(**)	-0,31(*)	0,18	-0,34(*)
	S. (b)		0,00	0,65	0,01	0,45	0,42	0,01	0,00	0,00	0,02	0,18	0,01
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
Grado Probable	C. P.	1,00(**)	1	0,06	0,33(*)	0,10	0,11	0,35(**)	0,42(**)	0,46(**)	-0,31(*)	0,18	-0,34(*)
	S. (b)		0,00	0,66	0,01	0,44	0,42	0,01	0,00	0,00	0,02	0,18	0,01
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
Ácido Málico	C. P.	0,06	0,06	1	-0,26	-0,23	0,32(*)	0,06	0,27(*)	0,02	-0,30(*)	-0,06	0,05
	S. (b)		0,65	0,66	0,06	0,08	0,02	0,68	0,04	0,91	0,03	0,64	0,72
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
Ácido Tartárico	C. P.	0,33(*)	0,33(*)	-0,26	1	0,56(**)	0,42(**)	0,65(**)	0,52(**)	0,36(**)	-0,04	-0,25	-0,05
	S. (b)		0,01	0,06	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,74	0,06	0,74
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
Arginina mosto	C. P.	0,10	0,10	-0,23	0,56(**)	1	0,46(**)	0,52(**)	0,60(**)	0,38(**)	0,10	-0,59(**)	0,20
	S. (b)		0,45	0,44	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,45	0,00	0,15
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
Urea mosto	C. P.	0,11	0,11	0,32(*)	0,42(**)	0,46(**)	1	0,79(**)	0,76(**)	0,26	-0,06	-0,37(**)	0,08
	S. (b)		0,42	0,42	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,64	0,00	0,56
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
Amonio mosto	C. P.	0,35(**)	0,35(**)	0,06	0,65(**)	0,52(**)	0,79(**)	1	0,82(**)	0,34(*)	-0,08	-0,40(**)	0,08
	S. (b)		0,01	0,01	0,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,55	0,00	0,54
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
Nitrógeno Total mosto	C. P.	0,42(**)	0,42(**)	0,27(*)	0,52(**)	0,60(**)	0,76(**)	0,82(**)	1	0,57(**)	-0,23	-0,38(**)	0,06
	S. (b)		0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,66
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
Arginina FFA	C. P.	0,46(**)	0,46(**)	0,02	0,36(**)	0,38(**)	0,26	0,34(*)	0,57(**)	1	-0,40(**)	0,14	-0,25
	S. (b)		0,00	0,91	0,01	0,00	0,05	0,01	0,00	0,00	0,00	0,32	0,06
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
Citrulina FFA	C. P.	-0,31(*)	-0,31(*)	-0,30(*)	-0,04	0,10	-0,06	-0,08	-0,23	-0,40(**)	1	-0,08	0,29(*)
	S. (b)		0,02	0,02	0,03	0,74	0,45	0,64	0,55	0,00	0,083	0,53	0,03
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
Consumo de Arginina FFA	C. P.	0,18	0,18	-0,06	-0,25	-0,59(**)	-0,37(**)	-0,40(**)	-0,38(**)	0,14	-0,08	1	-0,72(**)
	S. (b)		0,18	0,18	0,64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,32	0,53	0,53	0,00
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56
Producción de Citrulina FFA	C. P.	-0,34(*)	-0,34(*)	0,05	-0,05	0,20	0,08	0,08	0,06	-0,25	0,29(*)	-0,72(**)	1
	S. (b)		0,01	0,01	0,72	0,74	0,15	0,56	0,66	0,06	0,03	0,00	0,00
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56

C. P.: Correlación de Pearson

S. (b): Sig. (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

FFA: final de fermentación alcohólica.

Tabla 4.17. Correlaciones bivariadas obtenidas entre parámetros enológicos, precursores del CE, contenido nitrogenado, consumo de arginina y producción de citrulina de los vinos al FFML.

		Grado de podrido	Procedencia	Grado alcohólico	G/F residual	Acidez Total	Acidez Volátil	Glicerol	A280	Amonio	Nitrógeno Total	Arginina	Citrulina	Consumo de Arginina	Producción de Citrulina
Grado de podrido	C. P.	1	-0,28(*)	-0,08	-0,20	0,11	0,20	0,07	-0,17	-0,49(**)	0,53(**)	-0,39(*)	-0,17	0,11	-0,06
	S. (b)		0,05	0,56	0,17	0,43	0,15	0,60	0,22	0,00	0,00	0,02	0,31	0,53	0,73
	N	56	56	53	53	53	53	53	52	38	38	38	38	38	38
Procedencia	C. P.	-0,27(*)	1	0,21	0,07	0,32(*)	-0,48(**)	0,02	0,28(*)	0,05	-0,38(*)	0,08	0,33(*)	0,15	0,23
	S. (b)			0,13	0,63	0,02	0,00	0,89	0,04	0,78	0,02	0,65	0,04	0,38	0,16
	N	56	56	53	53	53	53	53	52	38	38	38	38	38	38
Grado alcohólico	C. P.	-0,08	0,21	1	0,57(**)	0,23	-0,04	0,50(**)	0,16	0,28	-0,23	0,60(**)	-0,29	0,22	-0,15
	S. (b)				0,00	0,10	0,80	0,00	0,26	0,10	0,17	0,00	0,08	0,20	0,37
	N	53	53	53	53	53	53	53	52	36	36	36	36	36	36
G/F residual	C. P.	-0,19	0,07	0,57(**)	1	0,51(**)	-0,11	0,29(*)	-0,13	0,36(*)	-0,14	0,57(**)	0,01	-0,18	-0,05
	S. (b)					0,00	0,44	0,03	0,35	0,03	0,40	0,00	0,95	0,31	0,76
	N	53	53	53	53	53	53	53	52	36	36	36	36	36	36
Acidez Total	C. P.	0,11	0,32(*)	0,23	0,51(**)	1	-0,20	0,24	-0,00	-0,20	-0,12	-0,45(**)	0,58(**)	-0,14	0,40(*)
	S. (b)						0,16	0,08	0,98	0,25	0,50	0,01	0,00	0,42	0,01
	N	53	53	53	53	53	53	53	52	36	36	36	36	36	36
Acidez Volátil	C. P.	0,20	-0,48(**)	-0,04	-0,11	-0,20	1	0,58(**)	0,47(**)	0,12	0,46(**)	0,09	0,03	-0,39(*)	-0,05
	S. (b)							0,00	0,00	0,49	0,00	0,60	0,86	0,02	0,76
	N	53	53	53	53	53	53	53	52	36	36	36	36	36	36
Glicerol	C. P.	0,07	0,02	0,50(**)	0,29(*)	0,24	0,58(**)	1	0,45(**)	0,23	-0,00	0,21	0,19	-0,34(*)	0,10
	S. (b)					0,08	0,00		0,00	0,18	0,99	0,22	0,27	0,04	0,56
	N	53	53	53	53	53	53	53	52	36	36	36	36	36	36
A280	C. P.	-0,17	0,28(*)	0,16	-0,13	-0,00	0,47(**)	0,45(**)	1	-0,06	-0,34(*)	0,03	0,43(**)	-0,08	0,22
	S. (b)					0,98	0,00	0,00		0,74	0,04	0,87	0,01	0,65	0,21
	N	52	52	52	52	52	52	52	52	36	36	36	36	36	36
Amonio	C. P.	0,49(**)	0,05	0,28	0,36(*)	-0,20	0,20	0,23	-0,06	1	0,22	0,44(**)	0,02	-0,37(*)	-0,01
	S. (b)					0,25	0,49	0,18	0,74		0,19	0,00	0,88	0,02	0,94
	N	38	38	36	36	36	36	36	36	38	38	38	38	38	38
Nitrógeno Total	C. P.	0,53(**)	-0,38(*)	-0,23	-0,14	-0,12	0,46(**)	-0,00	-0,34(*)	0,22	1	0,05	-0,35(*)	-0,11	-0,14
	S. (b)					0,49	0,00	0,99	0,04	0,19		0,77	0,03	0,51	0,41
	N	38	38	36	36	36	36	36	36	38	38	38	38	38	38
Arginina	C. P.	-0,39(*)	0,08	0,60(**)	0,57(**)	-0,45(**)	0,09	0,21	0,03	0,44(**)	0,05	1	-0,48(**)	0,28	-0,23
	S. (b)					0,01	0,60	0,22	0,87	0,00	0,77		0,00	0,09	0,17
	N	38	38	36	36	36	36	36	36	38	38	38	38	38	38
Citrulina	C. P.	-0,17	0,33(*)	-0,29	0,01	0,58(**)	0,03	0,19	0,43(**)	0,02	-0,35(*)	-0,48(**)	1	-0,50(**)	0,46(**)
	S. (b)					0,00	0,86	0,27	0,01	0,88	0,03	0,00		0,00	0,00
	N	38	38	36	36	36	36	36	36	38	38	38	38	38	38
Consumo de Arginina	C. P.	0,11	0,15	0,22	-0,18	-0,14	-0,39(*)	-0,34(*)	-0,08	-0,37(*)	-0,11	0,28	-0,50(**)	1	0,12
	S. (b)					0,42	0,02	0,04	0,65	0,02	0,51	0,09	0,00		0,48
	N	38	38	36	36	36	36	36	36	38	38	38	38	38	38
Producción de Citrulina	C. P.	-0,06	0,23	-0,15	-0,05	0,40(*)	-0,05	0,10	0,22	-0,01	-0,14	-0,23	0,46(**)	0,12	1
	S. (b)					0,01	0,76	0,56	0,21	0,94	0,41	0,17	0,00	0,48	
	N	38	38	36	36	36	36	36	36	38	38	38	38	38	38

C. P.: Correlación de Pearson

S. (b): Sig. (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

G/F: glucosa + fructosa.

Tabla 4.18. Correlaciones bivariadas obtenidas entre **parámetros enológicos del mosto y** precursores del CE, consumo de arginina y producción de citrulina de los **vinos al FFML.**

		°Brix	Grado Probable	Acidez Total	Ácido Málico	Ácido Tartárico	Ácido Glucónico	Urea	Amonio	Nitrógeno Total	Arginina FFML	Citrulina FFML	Consumo de Arginina FML	Producción de Citrulina FML
°Brix	C. P.	1	1,00(**)	0,40(**)	0,06	0,33(*)	-0,19	0,11	0,35(**)	0,42(**)	0,42(**)	0,22	-0,21	0,09
	S. (b)		0,00	0,00	0,65	0,01	0,15	0,42	0,01	0,00	0,01	0,19	0,20	0,58
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	38	38	38
Grado Probable	C. P.	1,00(**)	1	0,40(**)	0,06	0,33(*)	-0,19	0,11	0,35(**)	0,42(**)	0,42(**)	0,22	-0,21	0,09
	S. (b)	0,00		0,00	0,66	0,01	0,15	0,42	0,01	0,00	0,01	0,19	0,20	0,58
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	38	38	38
Acidez Total	C. P.	0,40(**)	0,40(**)	1	0,37(**)	-0,15	0,27(*)	-0,05	-0,18	-0,08	-0,43(**)	0,38(*)	-0,17	0,37(*)
	S. (b)	0,00	0,00		0,00	0,28	0,05	0,70	0,17	0,54	0,01	0,02	0,31	0,02
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	38	38	38	38
Ácido Málico	C. P.	0,06	0,06	0,37(**)	1	-0,26	0,10	0,32(*)	0,06	0,27(*)	-0,05	-0,34(*)	0,23	-0,11
	S. (b)	0,65	0,66	0,00		0,06	0,45	0,02	0,68	0,04	0,76	0,04	0,16	0,52
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	38	38	38	38
Ácido Tartárico	C. P.	0,33(*)	0,33(*)	-0,15	-0,26	1	-0,57(**)	0,42(**)	0,65(**)	0,52(**)	0,46(**)	-0,10	-0,17	-0,30
	S. (b)	0,01	0,01	0,28	0,06		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,54	0,31	0,07
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	38	38	38	38
Ácido Glucónico	C. P.	-0,19	-0,19	0,27(*)	0,10	-0,57(**)	1	-0,19	-0,50(**)	-0,36(**)	-0,34(*)	-0,22	0,04	-0,10
	S. (b)	0,15	0,15	0,05	0,50	0,00		0,15	0,00	0,01	0,03	0,19	0,82	0,56
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	38	38	38	38
Urea	C. P.	0,11	0,11	-0,05	0,32(*)	0,42(**)	-0,20	1	0,79(**)	0,76(**)	0,51(**)	-0,51(**)	0,17	-0,26
	S. (b)	0,42	0,42	0,70	0,02	0,00	0,15		0,00	0,00	0,00	0,00	0,32	0,12
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	38	38	38	38
Amonio	C. P.	0,35(**)	0,35(**)	-0,18	0,06	0,65(**)	-0,50(**)	0,79(**)	1	0,82(**)	0,68(**)	-0,41(*)	0,21	-0,19
	S. (b)	0,01	0,01	0,17	0,68	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,01	0,21	0,25
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	38	38	38	38
Nitrógeno Total	C. P.	0,42(**)	0,42(**)	-0,08	0,27(*)	0,52(**)	-0,36(**)	0,76(**)	0,82(**)	1	0,74(**)	-0,45(**)	0,01	-0,23
	S. (b)	0,00	0,00	0,54	0,04	0,00	0,01	0,00	0,00		0,00	0,00	0,96	0,16
	N	56	56	56	56	56	56	56	56	56	38	38	38	38
Arginina FFML	C. P.	0,42(**)	0,42(**)	-0,43(**)	-0,05	0,46(**)	-0,34(*)	0,51(**)	0,68(**)	0,74(**)	1	-0,48(**)	0,28	-0,23
	S. (b)	0,01	0,01	0,01	0,76	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00		0,00	0,09	0,17
	N	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38
Citrulina FFML	C. P.	0,22	0,22	0,38(*)	-0,34(*)	-0,10	-0,22	-0,51(**)	-0,41(*)	-0,45(**)	-0,48(**)	1	-0,50(**)	0,46(**)
	S. (b)	0,19	0,19	0,02	0,04	0,54	0,19	0,00	0,01	0,00	0,00		0,00	0,00
	N	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38
Consumo de Arginina FML	C. P.	-0,21	-0,21	-0,17	0,23	-0,17	0,04	0,17	0,21	0,01	0,28	-0,50(**)	1	0,19
	S. (b)	0,20	0,20	0,31	0,16	0,31	0,82	0,32	0,21	0,96	0,09	0,00		0,48
	N	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38
Producción de Citrulina FML	C. P.	0,09	0,09	0,37(*)	-0,11	-0,30	-0,10	-0,26	-0,19	-0,23	-0,23	0,46(**)	0,12	1
	S. (b)	0,58	0,58	0,02	0,52	0,07	0,56	0,12	0,25	0,16	0,17	0,00	0,48	
	N	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38	38

C. P.: Correlación de Pearson

S. (b): Sig. (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

FFML: final de fermentación maloláctica.

En la tabla 4.14 es de destacar que la arginina contenida en mosto se correlaciona negativamente con el contenido de ácido glucónico y con el nivel de afectación de la uva por *B. cinerea* (podrido). También, como es lógico, se correlaciona positivamente con el contenido nitrogenado (amonio, nitrógeno total y urea) y, entre los parámetros enológicos del mosto, con la concentración de ácido tartárico.

Como ya se enunció, en este trabajo se pretendía confirmar que una infección de las uvas por *B. cinerea* disminuye los niveles de nitrógeno asimilable y, por ende, de arginina en las uvas, lo que, según se describe en la bibliografía (Sponholz, 1991), lleva a una mayor utilización de la arginina en los mostos provenientes de estas uvas durante la FA, tanto absoluta como porcentualmente. Como podemos ver en los datos de la tabla 4.14, hay una correlación negativa entre el nivel de podredumbre de la uva y los niveles de nitrógeno total, arginina y amonio. Las siguientes figuras (4.16, 4.17 y 4.18) muestran los estadísticos y los resultados de las pruebas T para muestras independientes obtenidos con el programa SPSS. La prueba T para dos muestras independientes permite contrastar hipótesis referidas a la diferencia entre dos medias independientes. Al realizar esta prueba, el SPSS nos muestra en primer lugar el contraste de Levene (F) sobre homogeneidad o igualdad de varianzas. Para las medias de nitrógeno total en uvas sanas y afectadas por *B. cinerea* la probabilidad asociada al estadístico de Levene es mayor a 0,05, por lo que debemos aceptar la hipótesis de igualdad de varianzas y concluir que las varianzas de las medias para uvas sanas y afectadas son iguales en los casos analizados. Consecuentemente, utilizamos la información de las filas encabezadas *Se han asumido varianzas iguales*. Para las medias de arginina y amonio en uvas sanas y afectadas por *B. cinerea* las varianzas son diferentes, por lo que utilizamos la información de las filas encabezadas *No se han asumido varianzas iguales*. Observamos entonces el estadístico t , que nos permite contrastar la hipótesis de igualdad de medias. En todos los casos evaluados el nivel crítico bilateral asociado al estadístico t es menor que 0,05, por lo que podemos rechazar la hipótesis de igualdad de medias y concluir que, en este estudio, las concentraciones medias de nitrógeno total, arginina y amonio en mostos de uvas sanas y afectadas por *B. cinerea* son diferentes y, como observamos en las figuras 4.16, 4.17 y 4.18, siempre menores en uvas afectadas por *B. cinerea*. Cabe aquí puntualizar que en este trabajo el número de muestras afectadas por *B. cinerea* era

pequeño, por lo que sería necesario un estudio mayor para generalizar esta conclusión.

Estadísticos de grupo

	Grado de podrido	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
	AFFECTADA	4	116,00	26,34	13,17

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
Se han asumido varianzas iguales	3,82	0,06	3,56	54	0,00	142,82	40,13	62,37	223,28
No se han asumido varianzas iguales			8,32	8,40	0	142,82	17,16	103,58	182,07

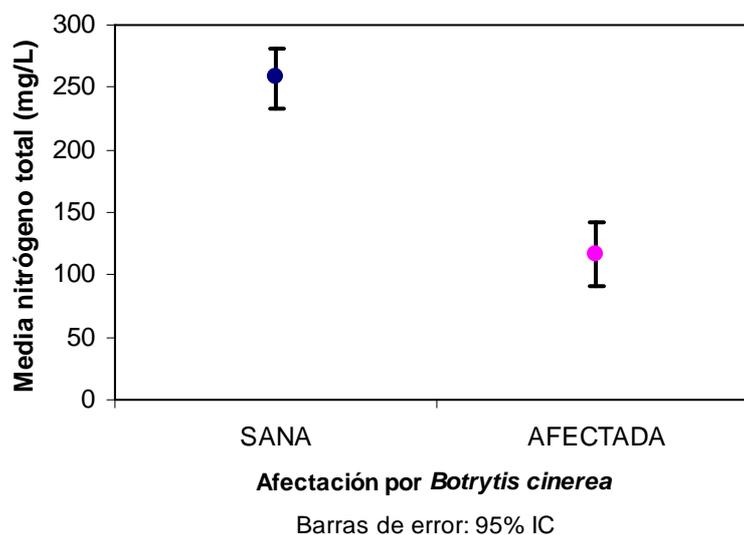


Figura 4.16. Comparación de medias de los niveles de nitrógeno total en mostos de uvas sanas y afectadas por *B. cinerea*.

Estadísticos de grupo

Arginina	Grado de podrido	Estadísticos de grupo		Desviación típ.	Error típ. de la media
		N	Media		
Arginina	SANA	52	129,02	57,06	7,91
	AFECTADA	4	29,25	16,50	8,25

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
Se han asumido varianzas iguales	5,64	0,02	3,46	54	0	99,77	28,84	41,94	157,59
No se han asumido varianzas iguales			8,73	10,53	0	99,77	11,43	74,47	125,06

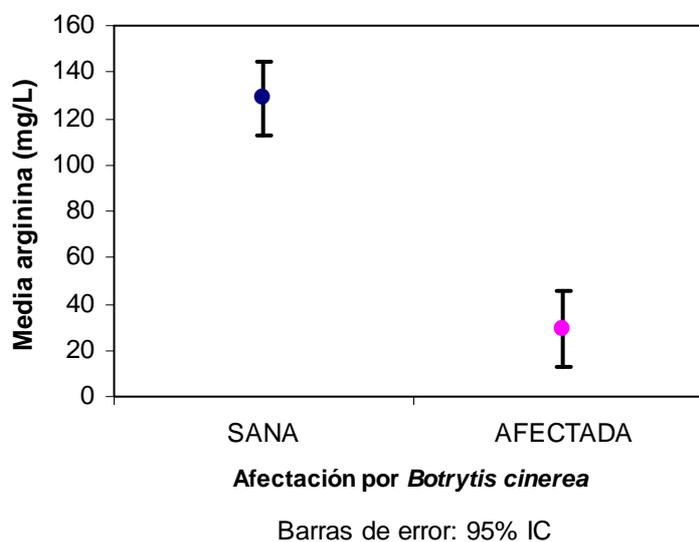


Figura 4.17. Comparación de medias de los niveles de arginina en mostos de uvas sanas y afectadas por *B. cinerea*.

Estadísticos de grupo

Grado de podrido	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Amonio SANA	52	110,97	41,48	5,75
Amonio AFECTADA	4	24,00	13,22	6,61

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
Se han asumido varianzas iguales	6,17	0,02	4,14	54	0	86,97	20,98	44,91	129,03
No se han asumido varianzas iguales			9,93	8,97	0	86,97	8,76	67,14	106,80

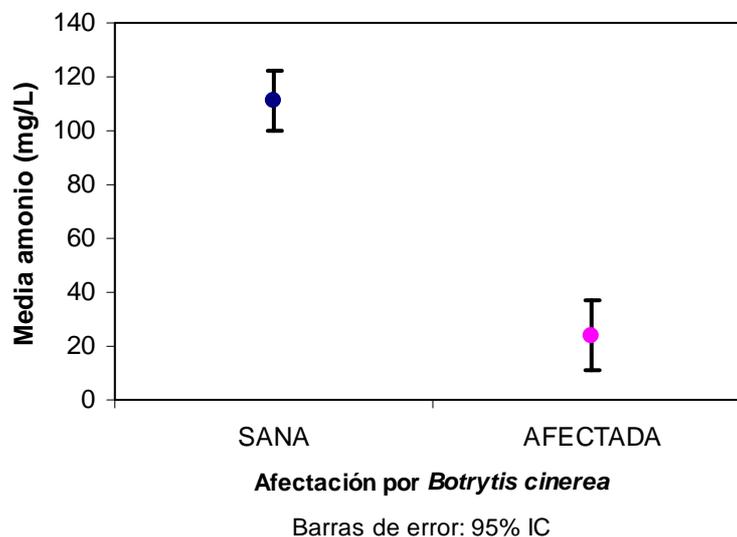


Figura 4.18. Comparación de medias de los niveles de amonio en mostos de uvas sanas y afectadas por *B. cinerea*.

En los resultados de las correlaciones bivariadas obtenidas al evaluar los parámetros de los vinos al FFA (tabla 4.16) vemos que, nuevamente, el contenido de arginina se correlaciona con el amonio. Se correlaciona también positivamente con el grado alcohólico obtenido, con el pH y la concentración de glicerol y negativamente con el ácido tartárico y el nivel de citrulina al FFA. La citrulina, además de correlacionarse negativamente con el contenido de arginina, lo hace de igual manera con la acidez volátil, el pH y los contenidos de ácido málico, de glicerol y de amonio y, positivamente, con el contenido de ácido tartárico. Con los resultados aquí obtenidos evidenciamos que el nivel de podredumbre de la uva no sólo se correlaciona con el contenido de arginina del mosto sino, también, con el consumo de arginina durante la FA. Este último se correlaciona también positivamente con la acidez volátil y negativamente con la acidez total y el ácido tartárico y, como es lógico, se correlaciona negativamente con la producción de citrulina durante la FA. Tanto los niveles de citrulina y arginina como el consumo de citrulina al FFA se correlacionan con el tipo de vino (blanco o tinto). La producción de citrulina, además de correlacionarse con el contenido de citrulina en los vinos al FFA y con el consumo de arginina, como es lógico, se correlaciona negativamente con los contenidos de acidez volátil y de glicerol, dos metabolitos secundarios que se producen por la actividad de las levaduras durante la FA.

Ya hemos concluido que las concentraciones medias de nitrógeno total, arginina y amonio son significativamente menores en mostos de uvas afectadas por *B. cinerea* respecto a los contenidos en uvas sanas. En este estudio pretendíamos también confirmar la observación realizada por Sponholz (1991) de una mayor utilización de aminoácidos en casos de uvas infectadas por *B. cinerea* durante la FA y, en particular, una mayor utilización de arginina. Como ya enunciamos, el nivel de afectación de la uva por *B. cinerea* se correlaciona con el consumo de arginina durante la FA. En la figura 4.19 se presentan los resultados de la prueba T para muestras independientes realizada para evaluar si las medias en el consumo de la arginina en uvas sanas y afectadas por *B. cinerea* presentaban una diferencia significativa.

Estadísticos de grupo

	Grado de podrido	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Consumo de Arginina durante la FA	SANA	52	-66,87	35,60	4,94
	AFECTADA	4	-20,00	51,83	25,91

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Superior	Inferior
Se han asumido varianzas iguales	1,40	0,24	-2,46	54	0,02	-46,86	19,04	-85,03	-8,70
No se han asumido varianzas iguales			-1,78	3,22	0,17	-46,86	26,38	-127,64	33,91

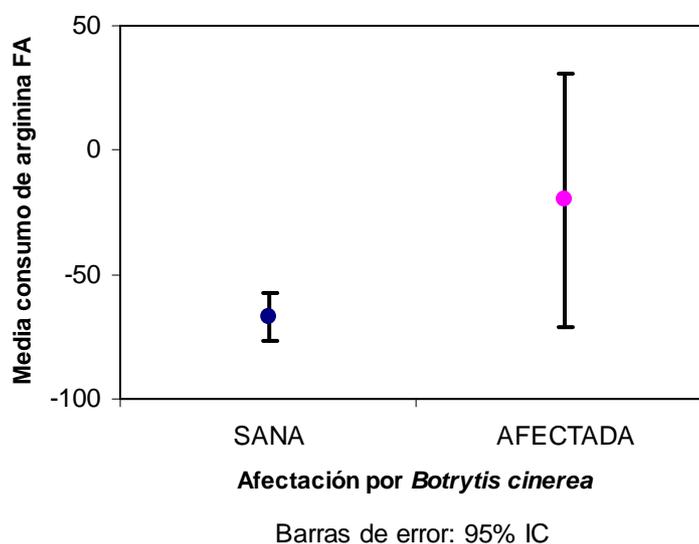


Figura 4.19. Comparación de medias de consumo de arginina durante la FA para uvas sanas y afectadas por *B. cinerea*.

En este caso, como la probabilidad asociada al estadístico de Levene es mayor que 0,05, podemos suponer que las varianzas poblacionales son iguales y, consecuentemente, utilizamos la información de la fila *Se han asumido varianzas iguales*. El nivel crítico bilateral asociado al estadístico t es mayor a 0,05, por lo que rechazamos la hipótesis de igualdad de medias concluyendo que las medias en los consumos de arginina para uvas sanas y afectadas por el hongo no son significativamente diferentes en la población estudiada.

En la tabla 4.16 vemos, además, que tanto el contenido de arginina al FFA (correlación positiva) como el consumo de la misma durante la FA (correlación negativa) se correlacionan con el contenido nitrogenado y el contenido de arginina del mosto. El contenido de arginina al FFA también se correlaciona con el contenido de ácido tartárico del mosto, como ya lo hacía el contenido de arginina del mosto, aunque, en este caso, la correlación es positiva. El consumo de arginina durante la FA se correlaciona negativamente con el contenido de urea del mosto. Tanto la citrulina al FFA como la producción de la misma durante la FA se correlacionan negativamente con el °Brix y grado alcohólico probable del mosto. El nivel de citrulina al FFA se correlaciona también negativamente con el contenido de ácido L-málico del mosto.

En la tabla 4.17 se presentan las correlaciones bivariadas obtenidas al evaluar los parámetros de los vinos al FFML. Así como ocurrió con los datos de mostos y vinos de FFA, el contenido de arginina se correlaciona con el amonio. Como también vimos al analizar los datos de mostos, el contenido de arginina al FFML se correlaciona negativamente con el nivel de podredumbre en la uva; también, negativamente, con la acidez total y, positivamente, con el grado alcohólico adquirido, como ya ocurrió al FFA, y el nivel de azúcares residuales en los vinos. La concentración de citrulina al FFML se correlaciona negativamente con el contenido de arginina, su consumo durante la FML y positivamente con su producción durante la FML, como es lógico. Se correlaciona, además, negativamente, con el contenido de nitrógeno total al FFML y, positivamente, con la procedencia de la uva, la acidez total y el índice de polifenoles totales (A280) de los vinos. El consumo de arginina durante la FML se correlaciona negativamente con los contenidos de acidez volátil, glicerol y amonio. La producción de citrulina durante la FML se correlaciona positivamente con la acidez total.

En la tabla 4.18 vemos que la producción de citrulina durante la FML también se correlaciona positivamente con la acidez total del mosto. Nuevamente, el contenido de arginina al FFML se correlaciona positivamente con los contenidos de nitrógeno

total, amonio y urea del mosto. Asimismo, se correlaciona positivamente con el °Brix, el grado alcohólico probable y el contenido de ácido tartárico del mosto, como ya vimos con el contenido de arginina al FFA; y negativamente con la acidez total y el contenido de ácido glucónico del mosto. El contenido de citrulina al FFML se correlaciona positivamente con la acidez total y el contenido de nitrógeno total de los mostos y negativamente con los contenidos de urea y de ácido L-málico del mosto, como ya ocurrió al FFA con éste último.

4.3.4 Análisis de Conglomerados Jerárquicos de los casos

Ya se ha comentado que se realizó una primera criba de las muestras, al provenir muchas de ellas de clones de un mismo viñedo y presentar resultados analíticos muy similares. Como aún muchos de los mostos y vinos presentaban muchas similitudes analíticas, se decidió realizar una clasificación de las mismas utilizando la técnica de Análisis de Conglomerados Jerárquicos con el programa SPSS. El Análisis de Conglomerados Jerárquico es una técnica aglomerativa: partiendo de los elementos muestrales individualmente considerados, va creando grupos hasta llegar a la formación de un único grupo o conglomerado constituido por todos los elementos de la muestra. Aunque el análisis termina con la agrupación de todos los casos en un único conglomerado, el objetivo de este análisis es descubrir la existencia de grupos homogéneos que pudieran existir entre los casos. El resultado obtenido se representa en el dendograma de la figura 4.19. Las variables utilizadas para realizar esta clasificación y obtener el dendograma han sido todos los parámetros analíticos que se habían examinado en cada caso.

En el dendograma quedan representadas las distancias existentes entre los elementos fundidos, en este caso, las distintas vinificaciones analizadas, en una escala estandarizada de 25 puntos. Las líneas verticales identifican elementos fundidos (conglomerados) y la posición de las líneas verticales indica la distancia existente entre los elementos fundidos.

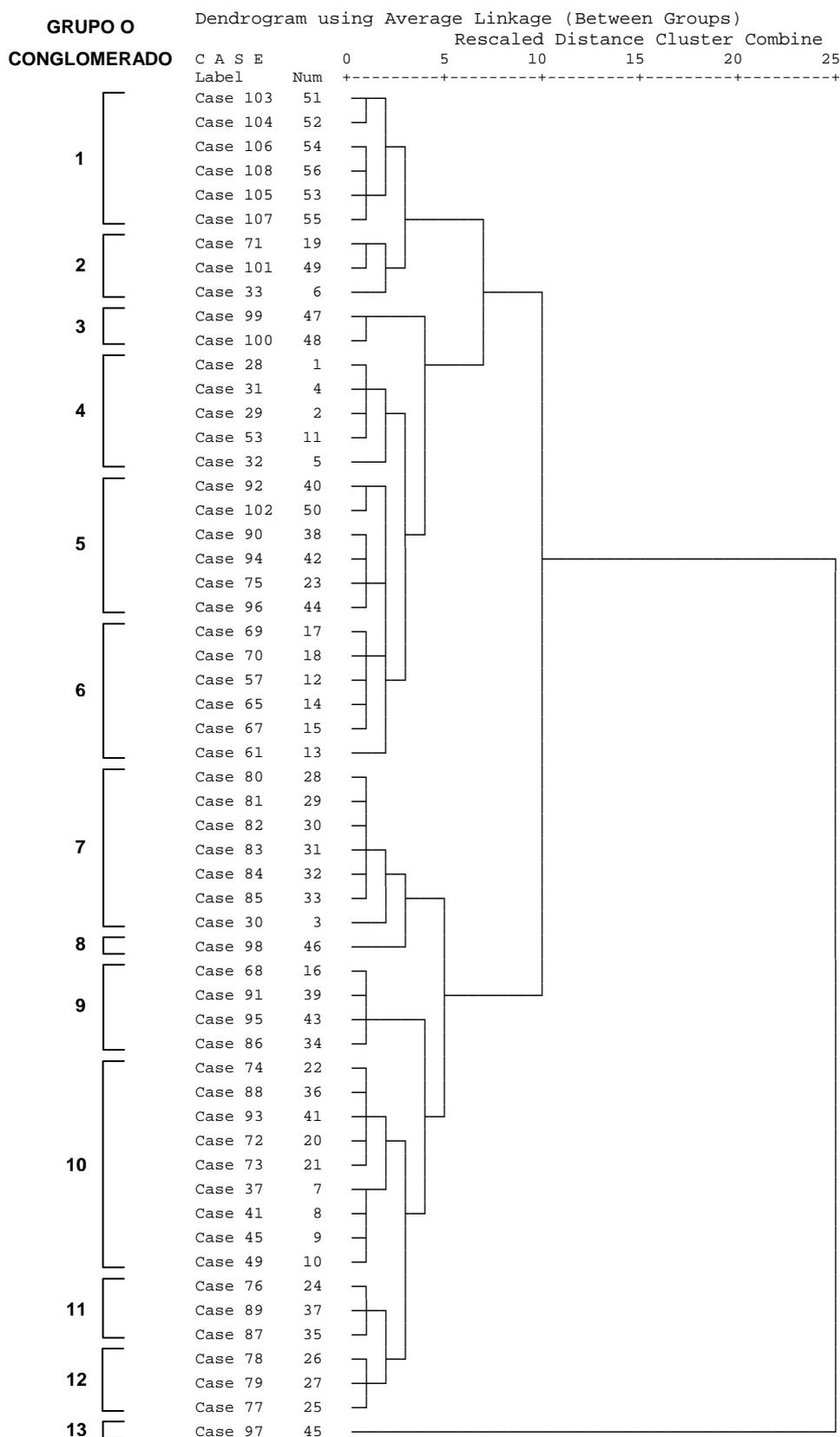


Figura 4.19. Dendrograma de las vinificaciones estudiadas obtenido con SPSS en base a los datos analíticos.

Las fusiones que se producen cerca del origen de la escala (izquierda) indican que el conglomerado formado es bastante homogéneo. Por el contrario, las fusiones que se producen en la zona final de la escala (derecha) indican que el conglomerado formado es bastante heterogéneo. Una manera de decidir cuál ha de ser el número de conglomerados idóneo es recorrer el dendograma de derecha a izquierda y detener la atención allí donde las líneas verticales están unidas al origen de la escala con trazos horizontales cortos (o no demasiados largos). Tras esto, basta con seguir cada línea horizontal hacia la izquierda para identificar los casos que componen cada grupo o conglomerado.

Si observamos el dendograma obtenido de derecha a izquierda podemos ver que, al ir llegando al origen, a la izquierda del mismo, se van formando grupos entre los casos analizados, en nuestro caso, las diferentes vinificaciones. A continuación se trasladan a una lista los grupos o conglomerados obtenidos a partir del análisis de conglomerados jerárquicos de los casos y que podemos ver en el dendograma de la figura 4.19:

Conglomerado 1: 103-104-105-106-107-108

Conglomerado 2: 33-71-101

Conglomerado 3: 99-100

Conglomerado 4: 28-29-31-32-53

Conglomerado 5: 75-90-92-94-96-102

Conglomerado 6: 57-61-65-67-69-70

Conglomerado 7: 30-80-81-82-83-84-85

Conglomerado 8: 98

Conglomerado 9: 68-86-91-95

Conglomerado 10: 37-41-45-49-72-73-74-88-93

Conglomerado 11: 76-87-89

Conglomerado 12: 77-78-79

Conglomerado 13: 97

4.3.5 Análisis de Correlaciones II

Una vez clasificadas las muestras en 13 grupos o conglomerados, se escogió una muestra representativa de cada grupo o conglomerado para realizar las determinaciones de CE y CEP de las muestras de vinos de FFA y de FFML. Los resultados se muestran en el anexo G. No se muestran los resultados de los niveles obtenidos de CE al resultar menores o muy cercanos al límite de detección del método.

En los datos de la tabla 4.19 podemos ver que tanto los niveles de CEP al FFA como al FFML se correlacionan, como era de prever, con el contenido nitrogenado, concretamente, con los niveles de amonio y nitrógeno total del mosto y de arginina de mosto y vinos de FFA y de FFML. También, como es lógico, estos niveles se correlacionan entre ellos y con la producción de citrulina durante la FML. A partir de estos resultados podemos concluir que estos niveles nitrogenados, principalmente, los niveles de arginina, sobre todo en vinos al FFA y al FFML, pueden ser buenos indicadores de los niveles finales de CEP en los vinos.

Tabla 4.19. Correlaciones bivariadas obtenidas entre **CEP al FFA y FFML** y parámetros enológicos, precursores del CE, consumo de arginina y producción de citrulina de mostos y vinos de FFA y de FFML.

		Acidez total mosto	Arginina mosto	Amonio mosto	Nitrógeno total mosto	Acidez total FFA	Glicerol FFA	Arginina FFA	Arginina FFML	Producción de Citrulina FML	CEP FFA	CEP FFML
Acidez total mosto	C. P.	1	-0,20	-0,18	-0,08	0,78(**)	0,20	-0,16	-0,43(**)	0,37(*)	-0,30	-0,72(*)
	S. (b)		0,14	0,17	0,54	0,00	0,14	0,23	0,01	0,02	0,32	0,02
	N	56	56	56	56	56	56	56	38	38	13	10
Arginina mosto	C. P.	-0,20	1	0,52(**)	0,60(**)	-0,38(**)	0,11	0,38(**)	0,61(**)	-0,25	0,73(**)	0,64(*)
	S. (b)	0,14		0,00	0,00	0,00	0,43	0,00	0,00	0,13	0,00	0,04
	N	56	56	56	56	56	56	56	38	38	13	10
Amonio mosto	C. P.	-0,18	0,52(**)	1	0,82(**)	-0,23	0,13	0,34(*)	0,68(**)	-0,19	0,58(*)	0,67(*)
	S. (b)	0,17	0,00		0,00	0,09	0,35	0,01	0,00	0,25	0,04	0,03
	N	56	56	56	56	56	56	56	38	38	13	10
Nitrógeno total mosto	C. P.	-0,08	0,60(**)	0,82(**)	1	-0,28(*)	0,35(**)	0,57(**)	0,74(**)	-0,23	0,69(**)	0,64(*)
	S. (b)	0,54	0,00	0,00		0,03	0,01	0,00	0,00	0,16	0,01	0,05
	N	56	56	56	56	56	56	56	38	38	13	10
Acidez total FFA	C. P.	0,78(**)	-0,38(**)	-0,23	-0,28(*)	1	0,13	-0,24	-0,55(**)	0,42(**)	-0,36	-0,67(*)
	S. (b)	0,00	0,00	0,09	0,03		0,34	0,07	0,00	0,01	0,23	0,04
	N	56	56	56	56	56	56	56	38	38	13	10
Glicerol FFA	C. P.	0,20	0,11	0,13	0,35(**)	0,13	1	0,63(**)	0,31	-0,06	0,60(*)	0,44
	S. (b)	0,14	0,43	0,35	0,01	0,34		0,00	0,06	0,74	0,03	0,20
	N	56	56	56	56	56	56	56	38	38	13	10
Arginina FFA	C. P.	-0,16	0,38(**)	0,34(*)	0,57(**)	-0,24	0,63(**)	1	0,77(**)	-0,27	0,67(*)	0,77(**)
	S. (b)	0,23	0,00	0,01	0,00	0,07	0,00		0,00	0,11	0,01	0,01
	N	56	56	56	56	56	56	56	38	38	13	10
Arginina FFML	C. P.	-0,43(**)	0,61(**)	0,68(**)	0,74(**)	-0,55(**)	0,31	0,77(**)	1	-0,23	0,84(**)	0,84(**)
	S. (b)	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00		0,17	0,00	0,00
	N	38	38	38	38	38	38	38	38	38	10	10
Producción de Citrulina FML	C. P.	0,37(*)	-0,25	-0,19	-0,23	0,42(**)	-0,06	-0,27	-0,27	1	-0,75(*)	-0,68(*)
	S. (b)	0,02	0,13	0,25	0,16	0,01	0,74	0,11	0,17		0,01	0,03
	N	38	38	38	38	38	38	38	38	38	10	10
CEP FFA	C. P.	-0,30	0,73(**)	0,58(*)	0,69(**)	-0,36	0,60(*)	0,67(*)	0,84(**)	-0,75(*)	1	0,95(**)
	S. (b)	0,32	0,00	0,04	0,01	0,23	0,03	0,01	0,00	0,01		0,00
	N	13	13	13	13	13	13	13	10	10	13	10
CEP FFML	C. P.	-0,72(*)	0,64(*)	0,67(*)	0,64(*)	-0,67(*)	0,44	0,77(**)	0,84(**)	-0,68(*)	0,94(**)	1
	S. (b)	0,02	0,04	0,03	0,05	0,04	0,20	0,01	0,00	0,03	0,00	
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

C. P.: Correlación de Pearson

S. (b): Sig. (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

FFA: final de fermentación alcohólica.

FFML: final de fermentación maloláctica.

Un objetivo de este estudio era encontrar una correlación entre algún parámetro enológico fácil y habitualmente medible en mostos y vinos y el CE, o CEP, para poder utilizarlo como predictor de los niveles finales en los vinos de CE. En este

estudio se ha podido establecer una correlación positiva entre los niveles de glicerol y de CEP al FFA. Ya habíamos advertido anteriormente que existía correlación entre los niveles de glicerol de los vinos de FFA y los niveles, en los mismos vinos, de arginina, citrulina y producción de citrulina. Tanto los niveles de glicerol como de CE que puedan encontrarse en los vinos al FFA derivan del metabolismo de las levaduras que llevan a cabo la FA. Una actividad metabólica más extensa de las levaduras puede explicar mayores niveles de glicerol en los vinos al FFA y también de CEP. Asimismo, podemos evidenciar que existe correlación, negativa en este caso, entre los niveles de CEP de los vinos al FFML y los niveles de acidez total de mostos y vinos de FFA. Esta observación concuerda con otras ya realizadas en la presente tesis (apartado 4.2), cuando observamos en vino simulado mayores niveles de CEP a pHs más altos, o sea, menores niveles de acidez total, condiciones que favorecían el metabolismo bacteriano. De estas observaciones se desprende que aquellas vinificaciones en las que se evidencien menores niveles de acidez total en mostos o al FFA, o mayores niveles de glicerol al FFA, pueden ser más propensas a producir mayores niveles de CE durante un periodo de almacenamiento, por lo que sería interesante entonces realizar un mayor control de estos vinos y guardar mayores precauciones si van a sufrir un periodo largo de crianza o almacenamiento.

4.3.6 Conclusiones

Comprobamos la disminución de las concentraciones medias de nitrógeno total, arginina y amonio en mostos de uvas afectadas por *B. cinerea*.

El nivel de afectación de la uva por *B. cinerea* se correlacionó con el consumo de arginina durante la FA, aunque las medias en los consumos de arginina para uvas sanas y afectadas por el hongo no resultaron significativamente diferentes en la población estudiada.

Los niveles de CEP al FFA y al FFML correlacionaron con los niveles de amonio y nitrógeno total del mosto y de arginina de mosto y vinos de FFA y de FFML, con lo que estos niveles nitrogenados, principalmente los niveles de arginina, pueden ser buenos indicadores de los niveles finales de CEP en los vinos.

Observamos correlación positiva entre los niveles de glicerol y de CEP al FFA y negativa entre los niveles de CEP al FFML y los niveles de acidez total de mostos y

Resultados y Discusión

vinos al FFA, por lo que aquellas vinificaciones en las que se evidencien menores niveles de acidez total en mostos o vinos al FFA o mayores niveles de glicerol al FFA, pueden ser más propensas a producir mayores niveles de CEP.

4.4 INFLUENCIA DEL MOMENTO DE INOCULACIÓN DE LAS BL EN EL VINO SOBRE LA FORMACIÓN DE CE

4.4.1 Antecedentes

La inoculación de BL seleccionadas con el fin de inducir y controlar el desarrollo de la FML es, hoy en día, una práctica ampliamente extendida. Aunque, generalmente, se realiza en el vino una vez finalizada la FA, para evitar el riesgo de que las BL degraden los azúcares provocando el picado láctico, la inoculación de BL en otros momentos de la vinificación, al comienzo o durante el desarrollo de la FA, es una herramienta que puede ofrecer al enólogo algunas ventajas técnicas para ciertos estilos de vino. Por un lado, la coinoculación, inoculación de bacterias durante la FA, permite que las BL inoculadas se aclimaten mejor al ambiente vínico, lo que resulta en un mejor desarrollo de la FML, debido a la ausencia de etanol y el aún alto contenido en nutrientes del mosto (Beelman y Kunkee, 1985; King y Beelman, 1986). Por otro lado, los vinos elaborados con coinoculación resultan más afrutados y conservan más aromas varietales frente a los obtenidos por medio de la clásica inoculación secuencial de las BL seleccionadas, al final de la FA (Krieger, 2006b). Otra de las ventajas que parece presentar la coinoculación levaduras/BL es la estabilidad microbiológica del vino, ya que la realización temprana de la FML evita la inmovilización del vino desprotegido de SO₂ durante períodos largos a merced del posible desarrollo de microorganismos perjudiciales para el vino, como bacterias acéticas y lácticas contaminantes o *Brettanomyces* (Krieger, 2006b).

En España se está comenzando a estudiar la coinoculación, no sólo a nivel de investigación, sino también en vinificaciones industriales en bodega. Ya existe aquí algún trabajo realizado al respecto, pero de coinoculación con cultivos de *L. plantarum* (Franco, 1992; Masqué *et al.*, 1994). En éstos, la FML se realizaba simultáneamente a la FA siempre que ésta última no fuera muy rápida, ya que, por definición, la especie *L. plantarum* tiene como límite de tolerancia un 8 % v/v de alcohol. No se observaron interferencias en la evolución de la FA.

Con el fin de determinar cuál es el momento de inoculación en que se observa un mejor desarrollo de la FML y una menor formación de CE y de sus precursores en mostos y vinos de pH elevado, se realizó la siguiente experiencia en la bodega

experimental de la Estación de Viticultura y Enología de Reus (INCAVI). Para ello se inocularon mostos de dos variedades de uva en distintos momentos de la vinificación con distintas cepas bacterianas, dos de ellas comerciales.

La mayoría de las cepas bacterianas que se comercializan como estárter para conducir la FML pertenecen a la especie *O. oeni*. En la mayoría de los casos, el uso de estos cultivos bacterianos acarrea un pequeño aumento de la acidez volátil en el vino, por la posible degradación del ácido cítrico al final de la degradación del ácido L-málico y por la posible utilización de azúcares residuales que pueda haber presentes en el vino, al ser una especie heterofermentativa. *L. plantarum* ha sido indicado como un candidato interesante para conducir la FML, ya que no produce cantidades significativas de ácido acético (Murphy *et al.*, 1985). Sin embargo, a causa de su escasa tolerancia al etanol, necesita ser inoculado en el mosto antes de la fermentación alcohólica (Radler, 1982). Actualmente, se encuentra disponible alguna cepa comercial de esta especie y está en preparación una nueva selección, tolerante a altos niveles de etanol y con un buen desempeño en condiciones de pH alto (Krieger, 2006c).

En este ensayo también se examinó una cepa de *L. plantarum*. Se pretendía estudiar su comportamiento como cultivo iniciador para conducir la FML, luego de ser inoculado en distintos momentos en el vino, y evaluar la influencia del momento de inoculación de las BL sobre el desarrollo y evolución de la FML y sobre la formación de CE y sus precursores.

4.4.2 Características de las vinificaciones

Las vinificaciones se realizaron con dos variedades de uva tinta, Tempranillo y Merlot, procedentes de la viña de la Facultad de Enología de la Universitat Rovira i Virgili, ubicada en Constantí (Mas dels Frares), en la bodega experimental de la Estación de Viticultura y Enología de Reus (INCAVI), Tarragona.

La caracterización de los mostos utilizados se presenta a continuación (tabla 4.20):

Tabla 4.20. Caracterización enológica de los mostos Tempranillo y Merlot utilizados para estudiar la influencia del momento de inoculación de las bacterias lácticas en el vino sobre la formación de carbamato de etilo.

PARÁMETRO	TEMPRANILLO	MERLOT
°Brix	20,3	23,7
Grado alcohólico probable (% vol)	11,64	13,95
pH	3,51	3,37
Acidez total (g/L)	4,0	5,3
Ácido tartárico (g/L)	4,58	4,56
Ácido málico (g/L)	2,38	2,06
Ácido cítrico (mg/L)	209	210
Ácido glucónico (mg/L)	394	768
Glicerol (g/L)	0,47	0,95
Nitrógeno total (mg/L)	120	128

El proceso de elaboración fue el habitual para vino tinto (figura 4.20) y se siguió tanto para el vino Tempranillo como para el Merlot. Un mismo lote de uva se estrujó y despalilló, luego se homogeneizó y se fraccionó en 13 partes iguales de unos 100 kg. Todos los lotes fueron sulfitados a razón de 5 g/hL, se les añadió la enzima de maceración Lallzyme EXV y se inocularon con la misma levadura específica para vinos tintos, VN[®], proporcionada por Lallemand. Cuando habían transcurrido 2/3 partes de la FA se añadió el nutriente específico para levaduras Fermaid[®], provisto también por Lallemand. En esta experiencia se ensayaron dos cepas bacterianas de inoculación directa comerciales de la especie *O. oeni* proporcionadas por Lallemand (Lalvin 31[®] y Lalvin Elios1[®]) y la cepa no comercial de la especie *L. plantarum*, CECT 5671. Cada cepa fue inoculada en distintos momentos durante la vinificación:

- A: 24 horas después del inicio de la FA
- B: a mitad de la FA
- C: cuando quedaban unos 10 g/L de azúcares por fermentar
- D: una vez finalizada la FA

Además, se dejó una fracción como testigo sin inocular para que realizara la FML espontáneamente.

La FA tuvo lugar en cámara termostatzada a 19°C, para ralentizar la FA y favorecer la FML en los casos de coinoculación. La evolución de la FA se controló diariamente mediante densidad y temperatura. También se realizaron determinaciones periódicas de la concentración de azúcares (glucosa y fructosa). Las determinaciones de la densidad del mosto y de los azúcares permitieron precisar los distintos momentos en que debían ser inoculadas las distintas fracciones con las bacterias examinadas. La evolución de la FML se controló determinando periódicamente la concentración de ácido L-málico y la población de BL viables mediante recuento en placa de las unidades formadoras de colonias (ufc/mL).

Una vez finalizada la FML, y si la FA había terminado, el vino era trasegado, sulfitado y clarificado. Si la FA no había finalizado se esperaba al fin de la FA antes de trasegar.

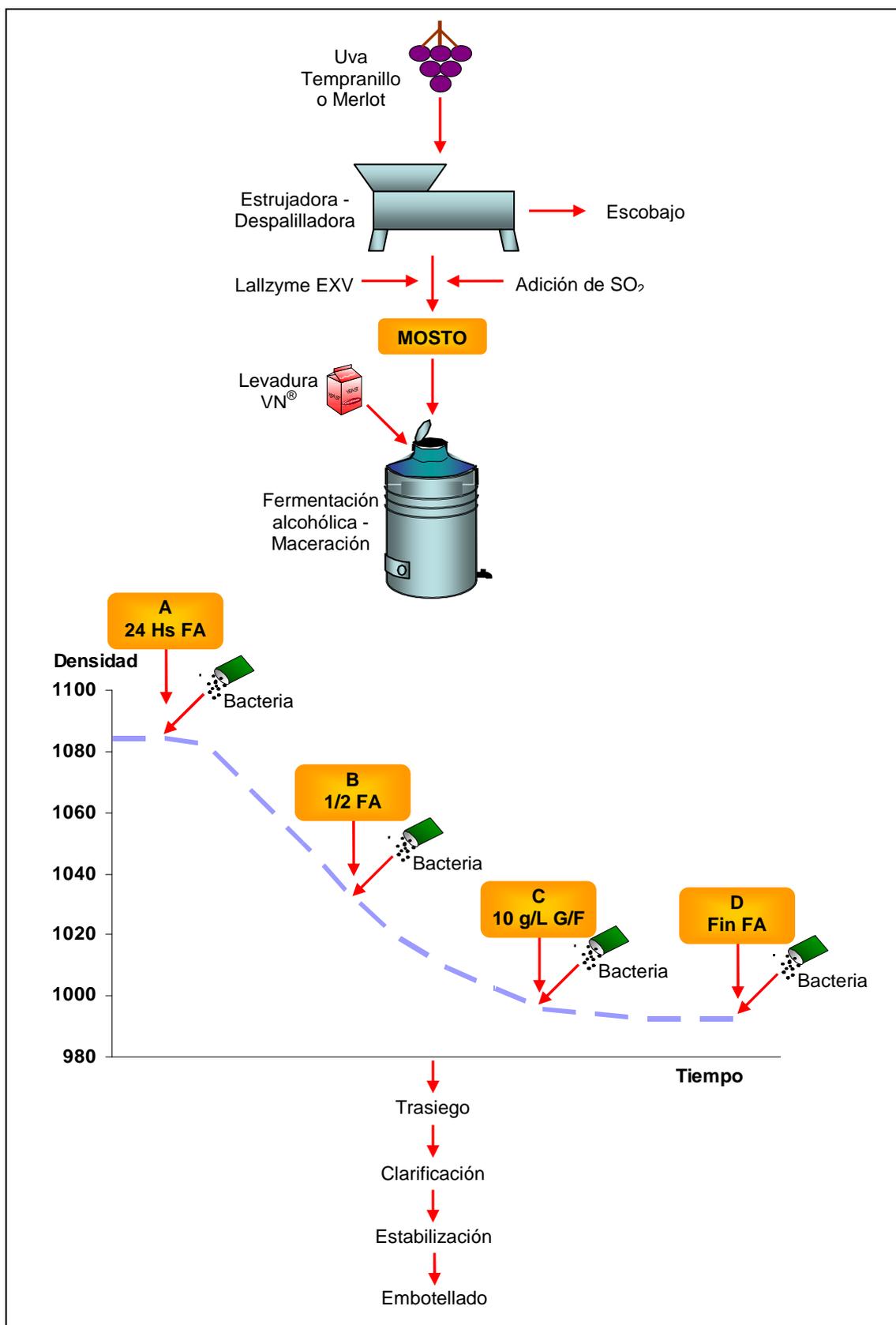


Figura 4.20. Esquema de vinificación.

4.4.3 Caracterización enológica del vino

Al final de la FA y de la FML se realizó una caracterización analítica de los vinos, que nos permitiría evaluar si la presencia y desarrollo de las BL habían tenido alguna influencia en el desarrollo de la FA. Principalmente, la diferencia entre el grado alcohólico adquirido por el vino y el grado alcohólico probable del mosto nos indicaría si el rendimiento de la FA había sido el mismo en las fracciones en que la FA se había realizado en presencia de BL y aquellas en que la misma se desarrolló en ausencia de las mismas.

Como ya se ha comentado anteriormente, uno de los posibles problemas que podría presentarse cuando se realiza la inoculación de poblaciones elevadas de BL durante la FA es que éstas metabolicen los azúcares produciendo, entre otros productos, altas concentraciones de ácido láctico y, en el caso de cepas heterofermentativas como *O. oeni*, aumentos considerables de la acidez volátil. Por esta razón, cada dos o tres días se determinaron también las concentraciones de azúcares (glucosa y fructosa) y de ácido acético, metabolitos que nos ayudarían a detectar un posible picado láctico. Estos parámetros podrían indicarnos si tanto la FA como la FML se estaban llevando a cabo con normalidad o si se estaba produciendo alguna alteración microbiana.

Se tomaron muestras de los vinos cuando habían transcurrido dos terceras partes de la FML para comprobar la imposición de las cepas inoculadas por medio de RAPD-PCR.

Ya se ha comentado que con esta experiencia se pretendía también determinar si la inoculación de las BL en distintos momentos durante la vinificación y la realización de la FML junto a la FA influyen en la formación del CE. Para ello se determinaron CE, sus precursores y CEP en los vinos al final de la FA y al final de la FML.

4.4.4 Evolución de la fermentación alcohólica en las vinificaciones

La FA se desarrolló con normalidad en cada una de las fracciones ensayadas en la variedad Tempranillo. No se observan diferencias en cuanto a la duración de la misma entre las fracciones que realizaron la FA en presencia de las BL y aquellas en las que las BL no se encontraban presentes durante el desarrollo de la FA (cuando las

BL se inocularon al final de la FA y en el testigo con FML espontánea). Tampoco son significativas las diferencias en cuanto al grado alcohólico adquirido en los distintos vinos (tabla 4.21).

Tabla 4.21. Evolución de la FA en los distintos ensayos realizados con la variedad Tempranillo.

CEPA	Momento de inoculación	Grado alcohólico probable (% vol)	Duración de la FA (días)	Glucosa/ Fructosa (g/L)	Grado alcohólico adquirido (% vol)	Ácido acético (g/L)
Lalvin 31®	24 Hs FA	11,67	14	0,00	11,00	0,46
	1/2 FA	11,60	14	0,00	11,10	0,37
	10 g/L G/F	11,60	14	0,02	11,35	0,23
	Fin FA	11,75	14	0,22	11,15	0,15
Elios 1®	24 Hs FA	11,67	14	0,13	11,40	0,26
	1/2 FA	11,75	14	0,11	11,35	0,35
	10 g/L G/F	11,54	14	0,06	11,30	0,25
	Fin FA	11,75	14	0,06	11,15	0,20
CECT 5671	24 Hs FA	11,60	14	0,03	11,05	0,26
	1/2 FA	11,54	14	0,01	11,10	0,27
	10 g/L G/F	11,54	14	0,04	11,35	0,21
	Fin FA	11,67	14	0,21	11,60	0,14
Testigo	Sin inocular	11,60	12	0,00	11,05	0,30

En la tabla 4.21 se observa que la presencia de las BL durante el desarrollo de la FA no ha interferido en ningún caso en el desarrollo de la FA y tampoco se puede apreciar un consumo de azúcares por parte de las BL en los vinos Tempranillo.

En los ensayos realizados con la variedad Merlot tampoco se aprecian diferencias en cuanto al desarrollo de la FA en las distintas fracciones ni un aparente consumo de azúcares por parte de las BL (tabla 4.22).

Tabla 4.22. Evolución de la FA en los distintos ensayos realizados con la variedad Merlot.

CEPA	Momento de inoculación	Grado alcohólico probable (% vol)	Duración de la FA (días)	Glucosa/ Fructosa (g/L)	Grado alcohólico adquirido (% vol)	Ácido acético (g/L)
Lalvin 31®	24 Hs FA	14,01	19	0,00	13,15	0,58
	1/2 FA	13,94	19	0,00	13,65	0,54
	10 g/L G/F	14,01	19	0,00	13,75	0,52
	Fin FA	14,01	19	0,00	13,60	0,55
Elios 1®	24 Hs FA	13,94	19	0,00	13,45	0,52
	1/2 FA	13,94	19	0,00	13,45	0,53
	10 g/L G/F	13,94	19	0,00	13,15	0,54
	Fin FA	13,80	19	0,02	13,50	0,48
CECT 5671	24 Hs FA	13,94	19	0,00	13,45	0,52
	1/2 FA	14,08	19	0,02	13,45	0,54
	10 g/L G/F	13,94	19	0,00	13,55	0,54
	Fin FA	13,87	19	0,00	13,45	0,50
Testigo	Sin inocular	14,01	19	0,00	13,65	0,49

En la variedad Merlot tampoco se ha observado interferencia de las BL en el desarrollo de la FA.

4.4.5 Evolución de la FML en las vinificaciones

En las siguientes tabla y figuras se presentan los resultados sobre la evolución de la FML en los vinos de la variedad Tempranillo con las tres cepas ensayadas:

Tabla 4.23. Evolución de la FML en los distintos ensayos realizados con la variedad Tempranillo.

CEPA	Momento de inoculación	Duración de la FML* (días)	Ácido acético (g/L)	Ácido L-málico (g/L)
Lalvin 31®	24 Hs FA	14	0,42	0,12
	1/2 FA	14	0,34	0,14
	10 g/L G/F	18	0,37	0,15
	Fin FA	18	0,48	0,18
Elios 1®	24 Hs FA	16	0,23	0,13
	1/2 FA	14	0,31	0,14
	10 g/L G/F	11	0,46	0,14
	Fin FA	12	0,36	0,15
CECT 5671	24 Hs FA	18	0,18	0,35
	1/2 FA	29	0,48	0,16
	10 g/L G/F	24	0,27	0,15
	Fin FA	24	0,23	0,11
Testigo	Sin inocular	20**	0,50	0,15

* desde la inoculación de las bacterias hasta la total degradación del ácido L-málico.

** desde el final de la FA hasta la total degradación del ácido L-málico.

A partir de los datos de la tabla 4.23, podemos adelantar que la FML se ha desarrollado más rápidamente en aquellos vinos en los que se han inoculado las cepas comerciales de *O. oeni* (Lalvin 31 y Lalvin Elios 1), siendo en todos los casos el desarrollo de la FML más rápido que en el vino testigo sin inocular, en comparación a las inoculaciones con el cultivo no comercial de *L. plantarum* (CECT 5671), en cuyo caso la duración de la FML ha sido en todos los momentos de inoculación mayor a la del testigo, excepto cuando esta cepa se inoculó más tempranamente en el vino.

También podemos apuntar que, con excepción de la inoculación a mitad de la FA, el ácido acético ha sido menor al final de la FML en aquellos vinos inoculados con la cepa de *L. plantarum* CECT 5671 en relación a aquellos inoculados con las cepas de *O. oeni* ensayadas. De cualquier manera, el ácido acético ha resultado ser menor al final de la FML en todos los vinos que han sido inoculados, independientemente de la cepa inoculada, respecto al testigo sin inocular.

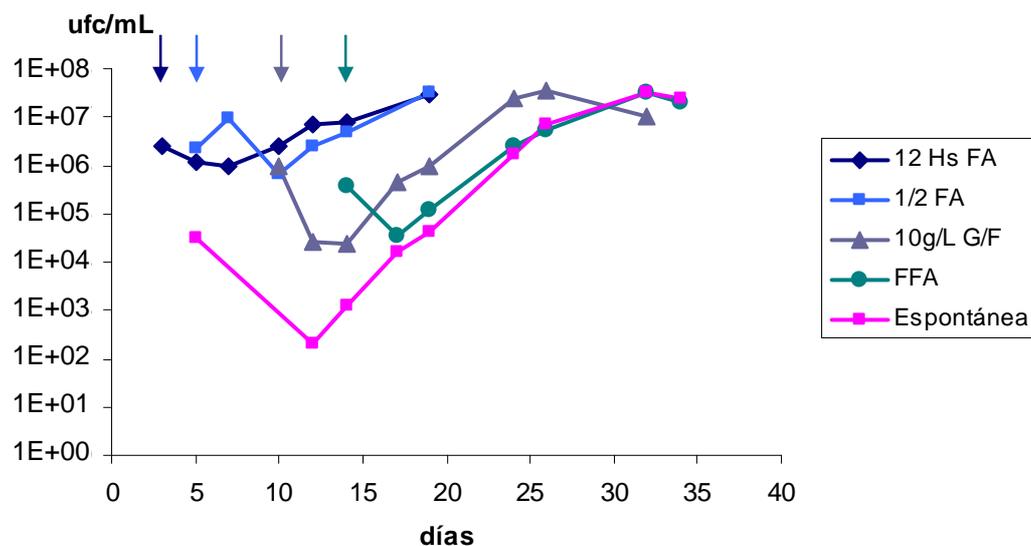


Figura 4.21. Evolución de la población de la bacteria Lalvin 31 en los vinos de la variedad Tempranillo (las flechas indican los distintos momentos en que se ha inoculado la cepa bacteriana).

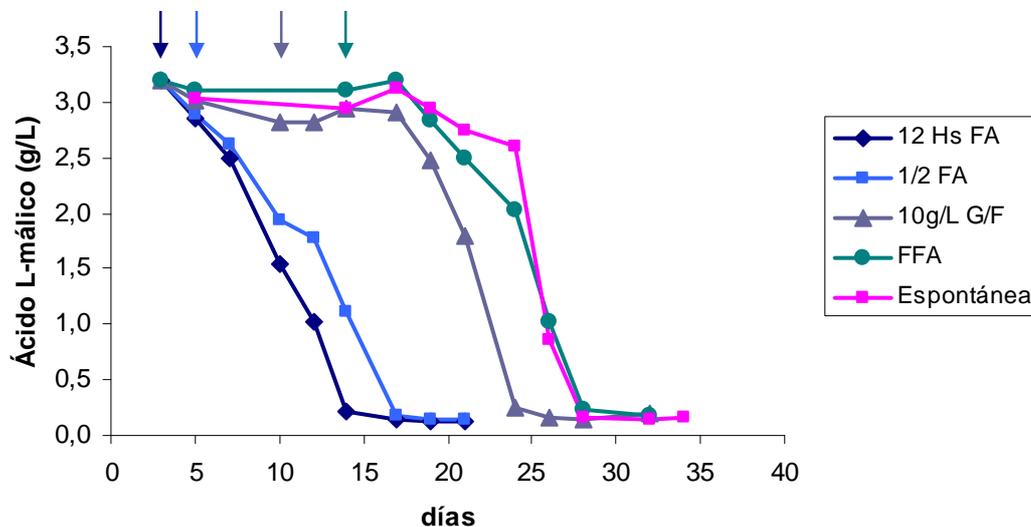


Figura 4.22. Cinética de degradación del ácido L-málico durante la FML llevada a cabo por Lalvin 31 en los vinos de la variedad Tempranillo (las flechas indican los distintos momentos en que se ha inoculado la cepa bacteriana).

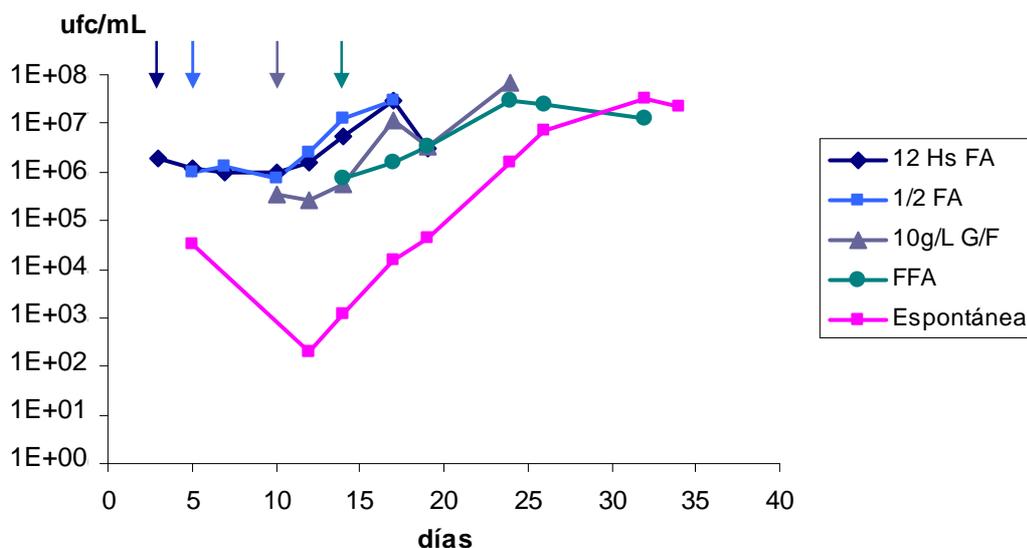


Figura 4.23. Evolución de la población de la bacteria *Lalvin Elios 1* en los vinos de la variedad Tempranillo (las flechas indican los distintos momentos en que se ha inoculado la cepa bacteriana).

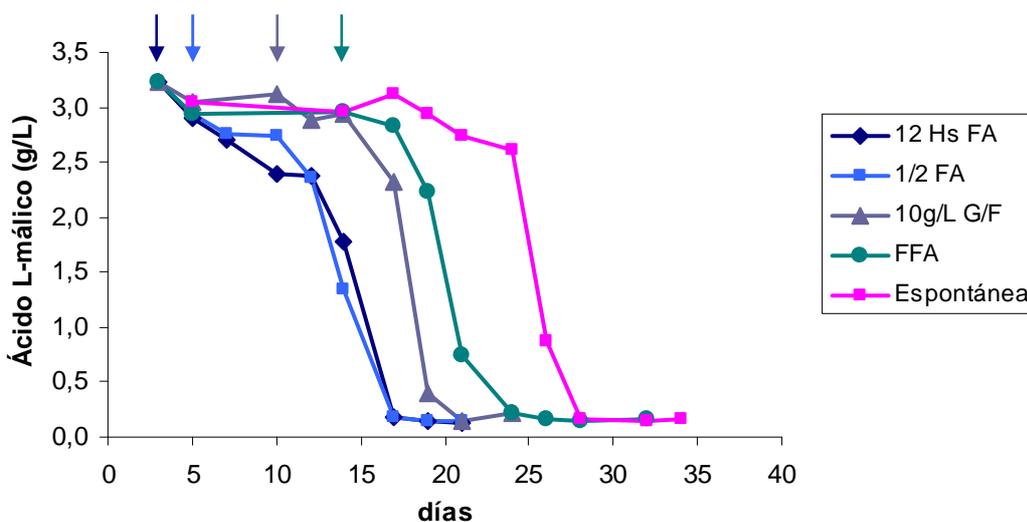


Figura 4.24. Cinética de degradación del ácido L-málico durante la FML llevada a cabo por *Lalvin Elios 1* en los vinos de la variedad Tempranillo (las flechas indican los distintos momentos en que se ha inoculado la cepa bacteriana).

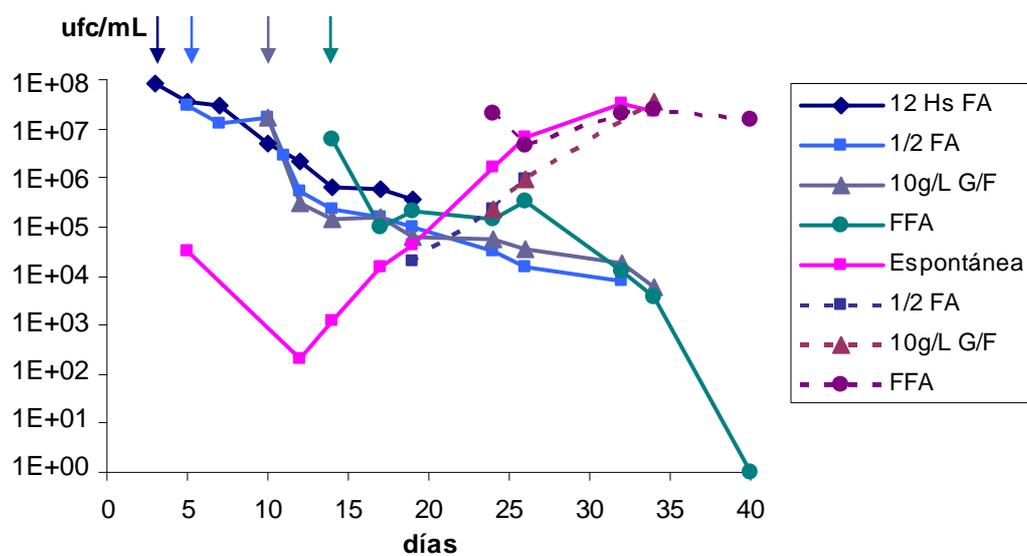


Figura 4.25. Evolución de la población de la bacteria CECT 5671 en los vinos de la variedad Tempranillo. En línea punteada, población de cepas autóctonas de *O. oeni* (las flechas indican los distintos momentos en que se ha inoculado la cepa bacteriana).

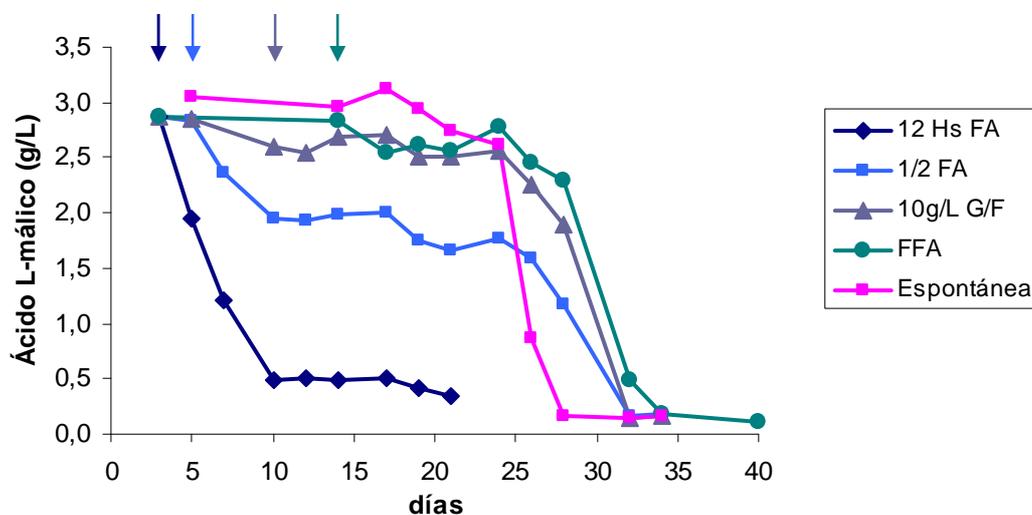


Figura 4.26. Cinética de degradación del ácido L-málico durante la FML llevada a cabo por CECT 5671 en los vinos de la variedad Tempranillo (las flechas indican los distintos momentos en que se ha inoculado la cepa bacteriana).

En cuanto a la evolución de las BL, en los vinos de la variedad Tempranillo, apuntamos que no se observan grandes diferencias cuando comparamos la viabilidad bacteriana de las dos cepas comerciales de *O. oeni* ensayadas y que apenas hubo mortalidad de bacterias cuando la inoculación se realizó a las 12 horas del comienzo de la FA y a la mitad de la misma (figuras 4.21 y 4.23). En general, se observa un mejor desarrollo de la bacteria Elios 1 en los vinos Tempranillo. En los casos en que las bacterias fueron inoculadas cuando quedaban 10 g/L de azúcares por fermentar y al final de la FA, observamos que hubo mortalidad para la bacteria Lalvin 31. Contrariamente, hubo un buen desarrollo de Lalvin Elios 1, con la que no observamos una evidente mortalidad de las bacterias inoculadas en ninguno de los distintos momentos de inoculación examinados. Este hecho es muy relevante porque al evitar un posterior crecimiento bacteriano se limita el metabolismo secundario de las BL sobre los azúcares y el ácido cítrico, disminuyendo así el riesgo de incremento de la acidez volátil y un excesivo carácter aromático láctico del vino por la producción de diacetilo. De acuerdo a la información proporcionada por el productor en las fichas técnicas de ambas bacterias comerciales, eran de esperar los resultados observados, ya que Lalvin Elios 1 se indica como una cepa bacteriana con buena implantación en vinos con pHs mayores a 3,4 y Lalvin 31 es una cepa bacteriana más indicada para vinos con pHs más ácidos (ver Anexo D). Las cinéticas de degradación del ácido L-málico (figuras 4.22, 4.24 y 4.26) se correlacionan con las cinéticas poblacionales. La bacteria Lalvin Elios 1 ha sido capaz de degradar completamente el ácido L-málico antes que las bacterias autóctonas en el vino testigo en todos los vinos Tempranillo en los que fue inoculada (figura 4.24). En cambio, la bacteria Lalvin 31 ha completado la degradación del ácido L-málico antes que en la FML espontánea sólo en los casos en que fue inoculada más tempranamente en el vino, a las 12 horas del comienzo de la FA y a la mitad de la misma (figura 4.22). En estos casos la degradación del ácido L-málico ha ocurrido simultáneamente al metabolismo de los azúcares por las levaduras. El metabolismo del ácido L-málico por Lalvin 31, al inocularse cuando quedaban 10 g/L de azúcares por fermentar, no es muy diferente al observado en el testigo sin inocular, aunque sí se completa unos días antes que en el testigo. Cuando esta cepa fue inoculada al final de la FA la cinética de degradación del ácido L-málico es prácticamente idéntica a la observada para la FML espontánea, así como también la población bacteriana en este momento de inoculación es similar a la observada en el vino con FML espontánea. Esto es indicativo de que posiblemente aquí se haya

implantado una cepa indígena y haya sido esta cepa la que ha desarrollado la FML, como se confirmó posteriormente con los resultados de los análisis de imposición (tabla 4.24). En la tabla 4.24 vemos que la cepa Lalvin 31 sólo ha conseguido imponerse en los vinos Tempranillo cuando se inoculó más tempranamente en los mismos, a las 12 horas del comienzo de la FA y a la mitad de la misma. En cambio, la cepa Lalvin Elios 1 ha demostrado una buena imposición en todos los momentos de inoculación en que fue inoculada en los vinos Tempranillo.

En cuanto a la cepa examinada de *L. plantarum*, CECT 5671, no observamos crecimiento bacteriano en ninguno de los momentos en que ha sido inoculada, muy por el contrario la población bacteriana va decreciendo desde el momento de inoculación (figura 4.25). A pesar de ello, podemos observar en la figura 4.26 que en el caso en que esta cepa se inoculó cuando habían transcurrido 12 horas del comienzo de la FA ha habido desde la inoculación una degradación constante del ácido L-málico, simultánea al desarrollo de la FA, y que esta cepa ha podido degradar casi un 90 % del contenido inicial de dicho ácido, quedando en el vino una concentración residual del mismo de 0,35 g/L. Gracias a la diferente morfología, tanto a nivel macroscópico como microscópico, entre las especies *L. plantarum* y *O. oeni*, se ha podido comprobar que en la mayoría de los vinos inoculados con la cepa CECT 5671 aparecía luego del final de la FA una población creciente de *O. oeni* en cultivo. Podemos ver en la figura 4.25, en los casos en que CECT 5671 se inoculó a mitad de FA, cuando quedaban 10 g/L de azúcares por fermentar y al final de la FA, el desarrollo de una población de cepas autóctonas de *O. oeni* que ocurre paralelamente al observado en el testigo sin inocular. El desarrollo de esta población autóctona se correlacionó con el metabolismo del ácido L-málico en estos casos (figura 4.26), lo que sugiere que fue esta población la responsable de la consecución de la FML en estos momentos de inoculación, como confirmaron los resultados de los análisis de imposición (tabla 4.24). Hay que destacar que, también en el caso de la inoculación de la bacteria a mitad de la FA, la cepa CECT 5671 ha sido capaz de metabolizar, desde el momento de inoculación, un 40 % del contenido inicial de ácido L-málico, antes de la aparición en el vino de una población creciente de cepas autóctonas de *O. oeni*.

Como observamos en la tabla 4.24, en los vinos Tempranillo inoculados con la cepa de *L. plantarum* CECT 5671 han sido cepas de *O. oeni*, como se confirmó previamente con pruebas gram y catalasa, las que finalmente se impusieron y sobrellevaron la FML en los vinos en que se inoculó dicha cepa a mitad de FA, cuando

quedaban 10 g/L de azúcares por fermentar y al final de FA. Se comprobó, además, que en los dos últimos casos ha sido la cepa Lalvin Elios 1 la que se impuso en los vinos y que esta cepa evidencia una mayor presencia en los vinos Tempranillo inoculados con CECT 5671 cuanto más tarde se han inoculado estos vinos. En el caso del vino Tempranillo inoculado con CECT 5671 a las 12 horas de la FA, no se obtuvo amplificación del ADN bacteriano aislado, con lo que fue imposible su identificación y confirmar, como se suponía, que la cepa impuesta había sido la inoculada. Observamos también una importante presencia de Lalvin Elios 1 en el vino testigo sin inocular, resultando ser la cepa mayoritaria entre todas las aisladas.

Tabla 4.24. Resultados de imposición de las cepas inoculadas en los vinos de la variedad Tempranillo.

CEPA	Momento de inoculación	% Imposición de la cepa inoculada	Otras cepas		Comentarios
			Perfiles diferentes	% cepa mayoritaria	
Lalvin 31®	24 Hs FA	93	1	7	
	1/2 FA	100	0	0	
	10 g/L G/F	0	7	20	
	Fin FA	0	12	15	
Lalvin Elios 1®	24 Hs FA	89	2	7	
	1/2 FA	100	0	0	
	10 g/L G/F	77	3	11	
	Fin FA	100	0	0	
CECT 5671	24 Hs FA	-	-	-	no hubo amplificación
	1/2 FA	7	5 (Lalvin 31 y Lalvin Elios 1)	50	28% Lalvin Elios 1 y 7% Lalvin 31
	10 g/L G/F	0	4 (Lalvin Elios 1)	86 (Lalvin Elios 1)	
	Fin FA	0	2 (Lalvin Elios 1)	93 (Lalvin Elios 1)	
Testigo	Sin inocular	-	7 (Lalvin Elios 1)	50 (Lalvin Elios 1)	

A continuación se presentan los resultados obtenidos durante el desarrollo de la FML de los vinos de la variedad Merlot inoculados con las tres cepas ensayadas en el presente trabajo.

Tabla 4.25. Evolución de la FML en los distintos ensayos realizados con la variedad Merlot.

CEPA	Momento de inoculación	Duración de la FML* (días)	Ácido acético (g/L)	Ácido L-málico (g/L)
Lalvin 31®	24 Hs FA	20	0,67	0,20
	1/2 FA	28	0,77	0,15
	10 g/L G/F	34	0,69	0,15
	Fin FA	30	0,65	0,20
Elios 1®	24 Hs FA	38	0,72	0,15
	1/2 FA	36	0,76	0,16
	10 g/L G/F	38	0,69	0,12
	Fin FA	30	0,58	0,18
CECT 5671	24 Hs FA	44	0,89	0,12
	1/2 FA	42	0,64	0,12
	10 g/L G/F	38	0,63	0,13
	Fin FA	23	0,63	0,21
Testigo	Sin inocular	30**	0,61	0,18

* desde la inoculación de las bacterias hasta la total degradación del ácido L-málico.

** desde el final de la FA hasta la total degradación del ácido L-málico.

En general, en el caso de los vinos Merlot también ha sido más rápido el desarrollo de la FML en los vinos inoculados con las cepas comerciales de *O. oeni* (Lalvin 31 y Lalvin Elios 1), respecto a aquellas desarrolladas en los vinos inoculados con la cepa CECT 5671 de *L. plantarum* (CECT 5671).

En estos vinos, la producción de ácido acético no presenta una tendencia por cepa y es mayor a la del vino testigo no inoculado en la mayoría de los vinos obtenidos luego de la inoculación de BL para el desarrollo de la FML.

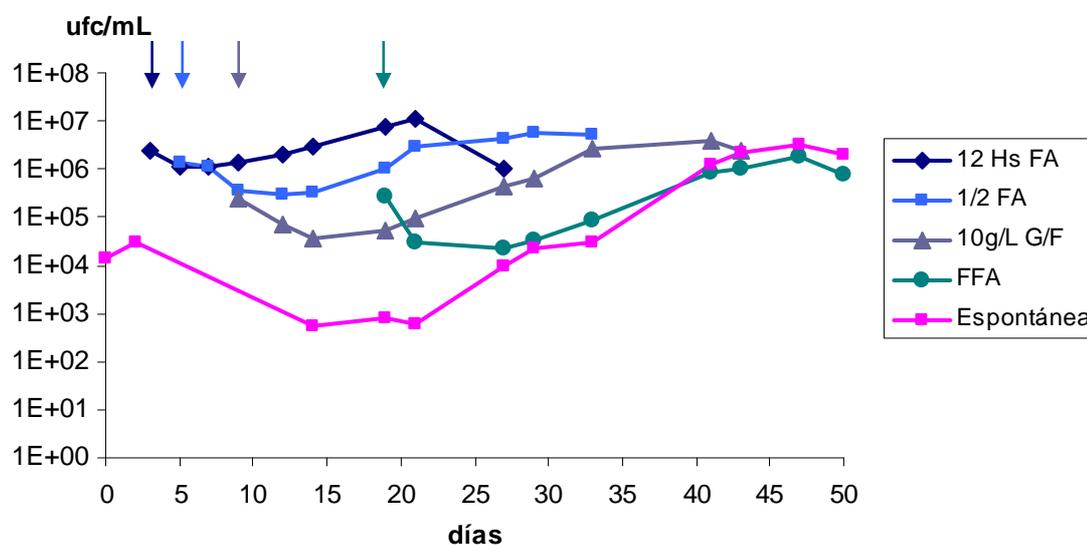


Figura 4.27. Evolución de la población de la bacteria Lalvin 31 en los vinos de la variedad Merlot (las flechas indican los distintos momentos en que se ha inoculado la cepa bacteriana).

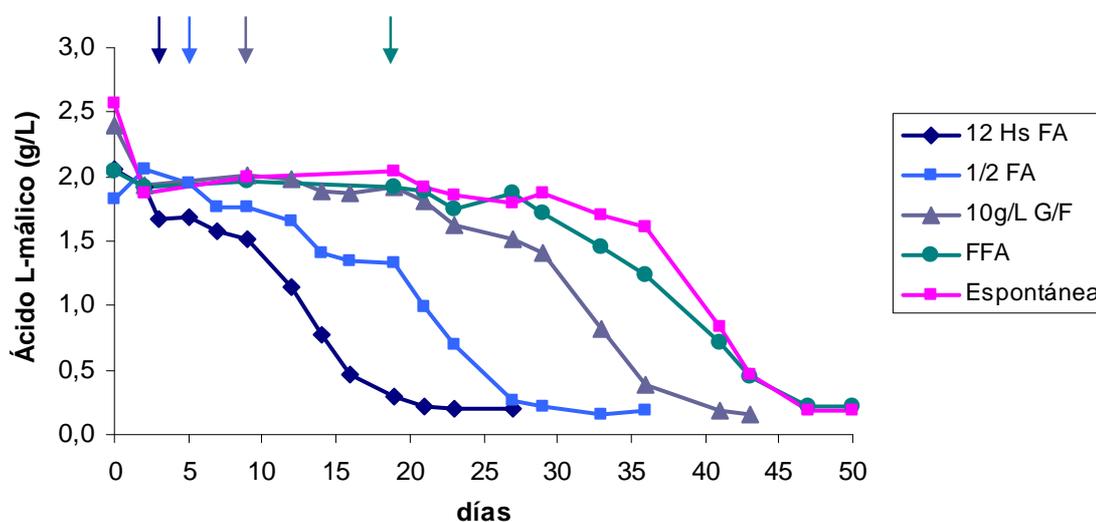


Figura 4.28. Cinética de degradación del ácido L-málico durante la FML llevada a cabo por Lalvin 31 en los vinos de la variedad Merlot (las flechas indican los distintos momentos en que se ha inoculado la cepa bacteriana).

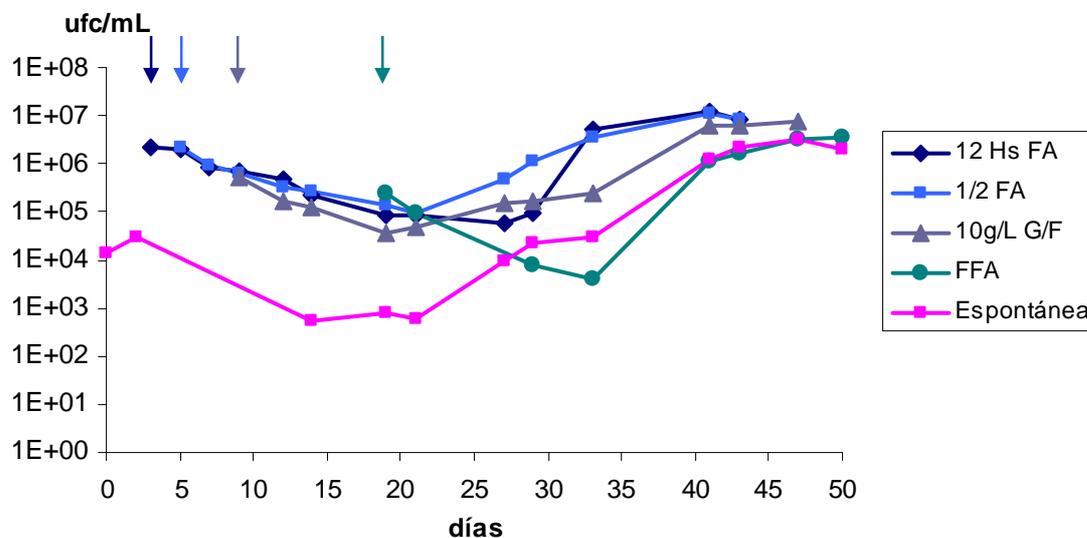


Figura 4.29. Evolución de la población de la bacteria Lalvin Elios 1 en los vinos de la variedad Merlot (las flechas indican los distintos momentos en que se ha inoculado la cepa bacteriana).

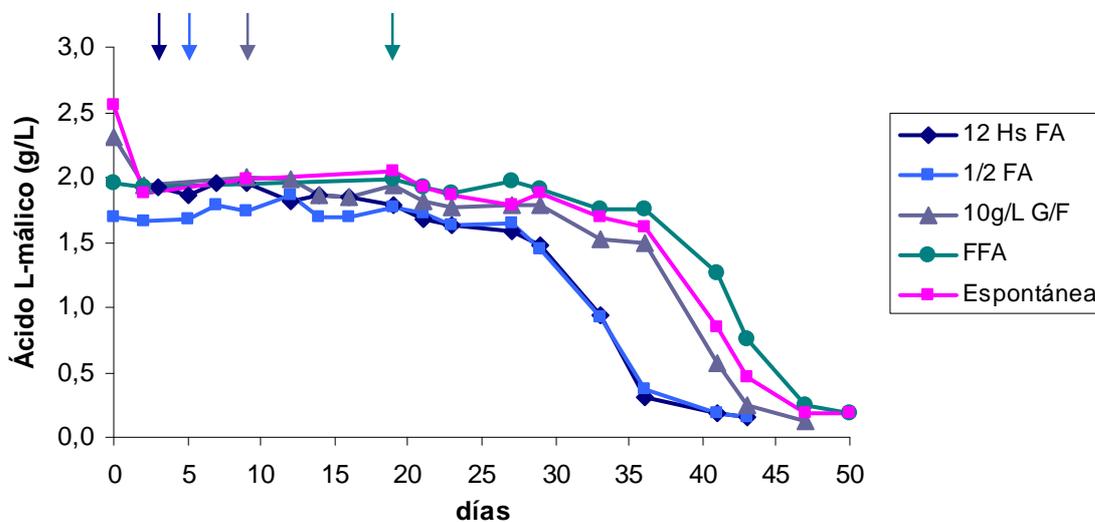


Figura 4.30. Cinética de degradación del ácido L-málico durante la FML llevada a cabo por Lalvin Elios 1 en los vinos de la variedad Merlot (las flechas indican los distintos momentos en que se ha inoculado la cepa bacteriana).

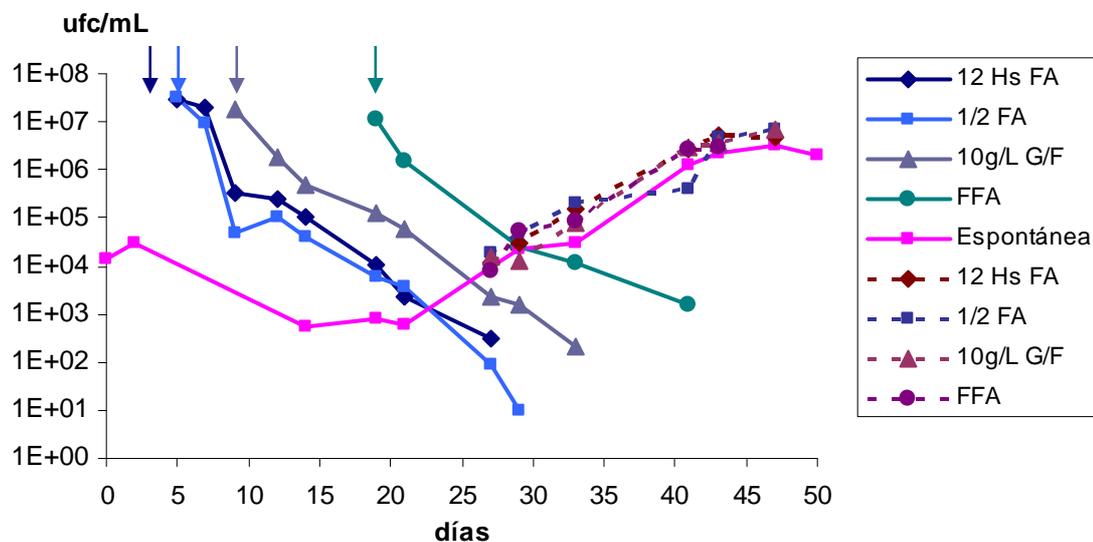


Figura 4.31. Evolución de la población de la bacteria CECT 5671 en los vinos de la variedad Merlot. En línea punteada, población de cepas autóctonas de *O. oeni* (las flechas indican los distintos momentos en que se ha inoculado la cepa bacteriana).

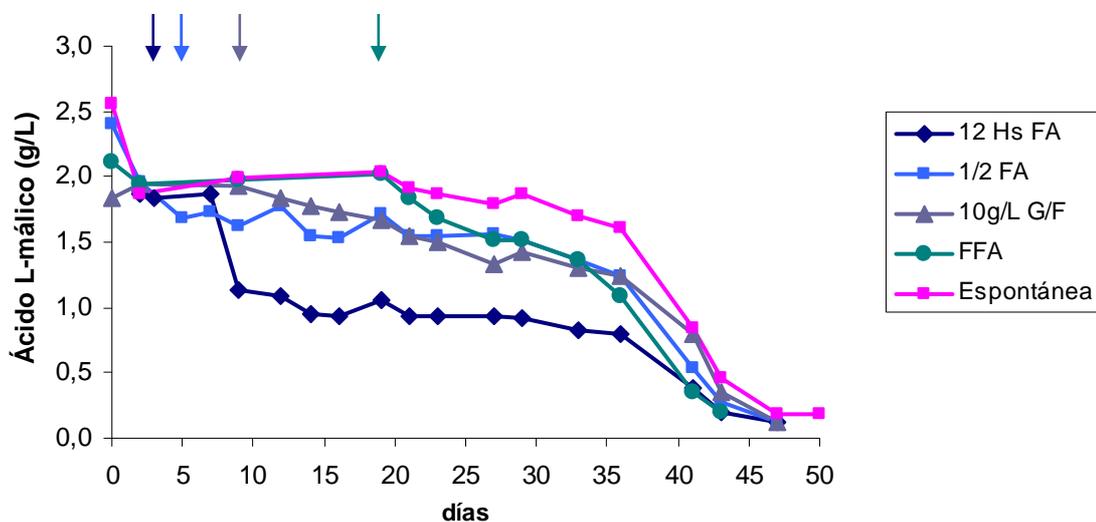


Figura 4.32. Cinética de degradación del ácido L-málico durante la FML llevada a cabo por CECT 5671 en los vinos de la variedad Merlot (las flechas indican los distintos momentos en que se ha inoculado la cepa bacteriana).

En los vinos de esta variedad podemos observar un desarrollo diferente de la población bacteriana al comparar las dos cepas comerciales ensayadas (figuras 4.27 y 4.29). La cepa Lalvin 31 evidenció un mejor desarrollo y viabilidad en todos los momentos en los que se había inoculado, en comparación con la cepa Lalvin Elios 1. Lalvin 31 mostró una menor mortalidad y una recuperación de la población más rápida que Lalvin Elios 1 en todos los momentos en los que fue inoculada. Observamos que una inoculación de la bacteria Lalvin 31 más temprana en el mosto-vino resultó en una menor mortalidad de las bacterias. Esto es lógico ya que cuanto más cerca del comienzo de la FA más fáciles son las condiciones para el desarrollo bacteriano y esto resulta en un menor crecimiento posterior de las bacterias para recuperar la población necesaria para que comience el metabolismo del ácido L-málico. Además, las poblaciones máximas alcanzadas de las bacterias inoculadas fueron mayores cuanto antes se inocularon y había menos alcohol en el medio, asegurando una dominancia de éstas antes que las BL autóctonas. Como hemos señalado, Lalvin Elios 1 no ha mostrado un buen desarrollo en los vinos Merlot, sino que ha habido una evidente mortalidad en los distintos vinos en que se ha inoculado. La recuperación de esta población ha sido lenta en todos los casos y sólo cuando las bacterias se inocularon más temprano en el mosto-vino evidenciamos que la población bacteriana se recupera antes del desarrollo de las bacterias autóctonas en el vino testigo. Cuando Lalvin Elios 1 se inoculó al final de la FA, la recuperación de la población bacteriana fue ligeramente posterior al desarrollo de la población bacteriana en el testigo sin inocular. En cuanto a la degradación del ácido L-málico, ocurrió de manera paralela al desarrollo bacteriano. Cuando comparamos la inoculación a las 12 horas de iniciada la FA, Lalvin 31 tardó 20 días en consumir el ácido L-málico, mientras que Lalvin Elios 1 necesitó casi el doble de tiempo para completar este consumo. Como ya hemos señalado, Lalvin Elios 1 es una cepa bacteriana más adaptada a vinos con pHs mayores a 3,4 y, en este caso, esperábamos una mejor evolución de la cepa Lalvin 31, más adaptada a pHs vínicos más bajos. En los vinos inoculados con la bacteria Lalvin 31 observamos que la FML terminó en el mosto inoculado a las 12 horas del comienzo de la FA prácticamente un mes antes que cuando la bacteria se inoculó al final de la FA o en el vino con FML espontánea. Esta es una de las principales ventajas que ofrece la coinoculación levadura-bacteria frente a la inoculación secuencial, el poder disponer del vino terminado y estabilizado en un periodo menor de tiempo. En el caso en que Lalvin 31 se inoculó a las 12 horas del comienzo de la FA, la degradación del

ácido L-málico ocurrió simultáneamente al desarrollo de la FA, así como parte del consumo del ácido L-málico ocurrió durante el desarrollo de la FA cuando la bacteria se inoculó a mitad de la FA. En cambio, en todos los casos en que se ha inoculado la bacteria Lalvin Elios 1 en el vino Merlot el desarrollo de la FML ha sido posterior al consumo de los azúcares por las levaduras, y sólo las curvas de degradación del ácido L-málico correspondientes a las inoculaciones más tempranas de las bacterias en el mosto-vino (inoculaciones a las 12 horas del comienzo de la FA y a mitad de la FA) difieren, aunque ligeramente, de aquellas correspondientes a las inoculaciones cuando quedaban 10 g/L de azúcares por fermentar, al final de la FA y el testigo sin inocular, demostrando nuevamente que una inoculación más temprana asegura una mejor imposición de las bacterias inoculadas, tal como confirman los análisis de imposición. Cuando esta bacteria se inocula después de finalizada la FA, la cinética de degradación del ácido L-málico es muy similar a la FML espontánea, lo que puede ser indicativo de una posible mala imposición. Estas observaciones han sido confirmadas por los análisis de imposición. En la tabla 4.26 podemos advertir que Lalvin Elios 1 sólo consiguió imponerse a las cepas indígenas en los vinos Merlot en que se inoculó más tempranamente, a las 12 horas del comienzo de la FA y a mitad de la misma. En cambio, Lalvin 31 se impuso en casi todos los vinos en que fue inoculada, exceptuando el vino en que fue inoculada cuando quedaban 10 g/L de azúcares por fermentar. Lalvin 31 ha logrado imponerse incluso en el vino Merlot en que se inoculó al final de la FA, que evidenciaba tanto una cinética poblacional como una degradación de ácido L-málico muy similares a las observadas en el vino testigo, lo que nos hacía presumir una mala imposición.

Tal como ya observamos en los vinos de la variedad Tempranillo inoculados con la cepa de *L. plantarum* CECT 5671, en los vinos Merlot podemos ver también que la población de esta cepa bacteriana ha ido decreciendo desde el momento de la inoculación. Con esta cepa, observamos que el desarrollo de las FMLs ha sido lento y la degradación del ácido L-málico ha finalizado prácticamente al mismo tiempo en los vinos inoculados y en el testigo sin inocular. En el caso de coinoculación a las 12 horas del comienzo de la FA, podemos ver que CECT 5671 ha sido capaz de degradar el 50% de la concentración inicial de ácido L-málico simultáneamente al consumo de los azúcares por las levaduras. En este caso, el consumo del ácido L-málico se detuvo cuando quedaban unos 7 g/L de azúcares por fermentar, o sea, cuando el vino había adquirido un grado alcohólico demasiado alto para soportar la actividad de esta cepa

de *L. plantarum*. En el caso de las inoculaciones de la bacteria a mitad de la FA y cuando quedaban 10 g/L de azúcares por fermentar, podemos evidenciar que hubo también un ligero consumo del ácido L-málico por la cepa CECT 5671 simultáneamente al desarrollo de la FA y antes de que comenzáramos a evidenciar la aparición de una población de cepas autóctonas de *O. oeni* después del final de la FA y paralelamente al desarrollo de la población bacteriana en el testigo sin inocular. Por lo que podemos deducir de las figuras 4.31 y 4.32, han sido estas cepas autóctonas de *O. oeni* las responsables de completar el consumo del ácido L-málico en todos los casos. Esta suposición se ha visto confirmada nuevamente por los resultados de los análisis de imposición. No se obtuvo amplificación del ADN bacteriano aislado en los casos en que CECT 5671 fue inoculada a las 12 horas de la FA y a mitad de la misma, con lo que no fue posible el análisis de imposición en estos casos. En los vinos en que esta cepa se inoculó cuando quedaban 10 g/L de azúcares por fermentar y al final de la FA se comprobó la presencia de varias cepas de *O. oeni* y la ausencia de CECT 5671. Entre estas cepas de *O. oeni* se observa la presencia de Lalvin 31, en mayor porcentaje cuanto más tarde se inoculó el vino con la cepa ensayada de *L. plantarum*, como ya se observaba para Lalvin Elios 1 en los vinos Tempranillo. En el vino testigo se observa la presencia tanto de Lalvin 31 como de Elios 1, aunque ninguna de estas cepas fue la mayoritaria ni ha logrado imponerse en este vino.

Podemos también apuntar que las FMLs han durado más tiempo en los vinos de la variedad Merlot que en aquellos de la variedad Tempranillo. Muy probablemente esto se ha debido a las condiciones más restrictivas para el desarrollo bacteriano que presentaba el mosto Merlot en comparación al Tempranillo, básicamente, un mayor grado alcohólico y un menor pH, aunque pueden haber influido también otros factores. Recientes investigaciones han demostrado que ciertos taninos de la uva pueden tener una influencia negativa sobre las BL y, por consiguiente, sobre el desarrollo de la FML. De hecho, algunas investigaciones han indicado que ciertas variedades tintas, como la Merlot, pueden presentar grandes dificultades a la hora de llevar a cabo la FML (Vivas *et al.*, 2000; Lonvaud-Funel, 2002; Loubser, 2006).

Tabla 4.26. Resultados de imposición de las cepas inoculadas en los vinos de la variedad Merlot.

CEPA	Momento de inoculación	% Imposición de la cepa inoculada	Otras cepas		Comentarios
			Perfiles diferentes	% cepa mayoritaria	
Lalvin 31®	24 Hs FA	93	1	7	
	1/2 FA	93	1	7	
	10 g/L G/F	0	9	14	
	Fin FA	100	0	0	
Lalvin Elios 1®	24 Hs FA	90	3	7	
	1/2 FA	100	0	0	
	10 g/L G/F	21	7	(todas iguales)	
	Fin FA	0	6	20	
CECT 5671	24 Hs FA	-	-	-	no hubo amplificación
	1/2 FA	-	-	-	no hubo amplificación
	10 g/L G/F	0	6 (Lalvin 31)	38	28% Lalvin 31
	Fin FA	0	5 (Lalvin 31)	65 (Lalvin 31)	
Testigo	Sin inocular	-	9 (Lalvin 31 y Lalvin Elios 1)	35	15% Lalvin 31 y 10% Lalvin Elios 1

4.4.6 Resultados analíticos de los vinos

A continuación, se presentan los resultados analíticos de los vinos Tempranillo y Merlot ya clarificados, estabilizados y embotellados obtenidos en los distintos ensayos con las tres cepas bacterianas estudiadas y para los distintos momentos de inoculación investigados.

Examinando los datos analíticos de los vinos de la variedad Tempranillo (tabla 4.27) es importante señalar que todos los vinos terminaron secos y no se percibieron problemas de paradas de fermentación ni una FA languideciente. En definitiva, no se observaron interferencias entre los desarrollos de la FA y la FML.

Tabla 4.27. Datos analíticos de los vinos de la variedad Tempranillo.

CEPA	Momento de inoculación	Grado alcohólico adquirido (% vol)	Glucosa/ Fructosa (g/L)	pH	Acidez total (g/L)	Ácido acético (g/L)	Ácido L-málico (g/L)	Ácido L-láctico (g/L)	Ácido cítrico (mg/L)	Glicerol (g/L)
Lalvin 31®	24 Hs FA	11,00	0,00	3,83	4,3	0,46	0,13	1,54	4	7,15
	1/2 FA	11,10	0,00	3,86	4,2	0,34	0,18	1,12	2	7,05
	10 g/L G/F	11,35	0,00	3,91	4,1	0,34	0,15	1,29	4	7,04
	Fin FA	11,15	0,00	3,91	4,2	0,28	0,13	1,23	12	6,99
Lalvin Elios 1®	24 Hs FA	11,40	0,00	3,87	4,1	0,26	0,14	1,31	10	7,39
	1/2 FA	11,35	0,00	3,82	4,3	0,33	0,16	1,43	4	6,92
	10 g/L G/F	11,30	0,00	3,91	4,2	0,35	0,15	1,25	9	7,05
	Fin FA	11,15	0,02	3,87	4,3	0,44	0,17	1,19	6	6,85
CECT 5671	24 Hs FA	11,05	0,00	3,80	4,2	0,35	0,14	1,18	4	7,02
	1/2 FA	11,10	0,02	3,83	4,3	0,49	0,15	1,16	4	6,95
	10 g/L G/F	11,35	0,00	3,81	4,3	0,38	0,14	1,13	10	6,80
	Fin FA	11,60	0,00	3,81	4,2	0,30	0,16	1,20	1	6,43
Testigo	Sin inocular	11,05	0,00	3,86	4,3	0,39	0,14	1,32	Inapr.	6,69

Inapr.: Inapreciable

No vemos una tendencia clara en cuanto a la producción de ácido acético en los distintos momentos de inoculación. Con respecto a las cepas de *O. oeni* ensayadas, con la cepa Lalvin 31 observamos que el valor más bajo de ácido acético se obtuvo cuando las bacterias se inocularon al vino al final de FA, en cambio con la cepa Lalvin Elios 1, el menor valor de ácido acético en vino terminado se obtuvo en el vino en el que la bacteria se inoculó a las 24 Hs del comienzo de la FA. En general, el ácido acético del vino testigo sin inocular fue mayor que el que presentaban los vinos inoculados con bacterias, excepto en tres casos, el vino inoculado con Lalvin 31 a las 24 Hs del comienzo de la FA, el vino inoculado con Lalvin Elios 1 al final de la FA y el vino inoculado con *L. plantarum* CECT 5671 a mitad de la FA (tabla 4.27). Esto podría hacernos pensar en una posible imposición de cepas indígenas en estos vinos, pero esto solo ha sido así en el caso del vino inoculado con CECT 5671 (tabla 4.24). En cualquier caso, los valores de ácido acético obtenidos son valores normales y, lo que es más importante, no se observa en ningún caso de coinoculación un valor discrepante con respecto a los obtenidos en vinos en los que las bacterias se inocularon o desarrollaron luego del final de la degradación de los azúcares. Este era uno de los principales objetivos de este trabajo, comprobar que, a pesar del pH

elevado, la acidez volátil no tiene por qué incrementarse cuando las bacterias se inoculan en un vino con azúcares.

Ya se ha señalado que la capacidad para degradar el ácido málico fue la misma en todos los casos y las concentraciones finales de ácido láctico tampoco varían. El ácido cítrico ha sido ampliamente degradado, no existiendo diferencias significativas entre cepas de bacterias ni momentos de inoculación. Como luego veremos, el consumo del ácido cítrico ha sido más extenso en los vinos Tempranillo que en los Merlot, degradándose casi totalmente en los primeros (tablas 4.27 y 4.28).

No existen diferencias significativas tampoco para los vinos de la variedad Tempranillo en los resultados analíticos de etanol, acidez total, glicerol y pH, siendo valores completamente similares en todos los casos.

Respecto a los datos analíticos de los vinos acabados de la variedad Merlot (tabla 4.28), observamos, como en el caso anterior, que todos los vinos terminaron secos sin presentar ningún problema de paradas de fermentación ni observamos que la FML pudiera causar interferencias en el desarrollo de la FA.

Tabla 4.28. Datos analíticos de los vinos de la variedad Merlot.

CEPA	Momento de inoculación	Grado alcohólico adquirido (% vol)	Glucosa/ Fructosa (g/L)	pH	Acidez total (g/L)	Ácido acético (g/L)	Ácido L- málico (g/L)	Ácido L- láctico (g/L)	Ácido cítrico (mg/L)	Glicerol (g/L)
Lalvin 31®	24 Hs FA	13,15	0,00	3,62	5,6	0,67	0,20	1,09	9	11,20
	1/2 FA	13,65	0,00	3,61	5,5	0,77	0,15	1,06	20	11,30
	10 g/L G/F	13,75	0,00	3,68	5,6	0,69	0,15	1,07	141	11,80
	Fin FA	13,60	0,00	3,59	5,5	0,65	0,20	1,07	55	11,60
Elios 1®	24 Hs FA	13,45	0,00	3,63	5,6	0,72	0,15	1,04	11	11,50
	1/2 FA	13,45	0,00	3,60	5,6	0,76	0,16	1,05	16	11,70
	10 g/L G/F	13,15	0,00	3,63	5,6	0,69	0,12	1,06	51	11,60
	Fin FA	13,50	0,02	3,56	5,5	0,58	0,18	1,18	41	11,20
CECT 5671	24 Hs FA	13,45	0,00	3,59	5,8	0,89	0,12	1,06	17	11,20
	1/2 FA	13,45	0,02	3,60	5,7	0,64	0,12	1,11	99	11,50
	10 g/L G/F	13,55	0,00	3,64	5,4	0,63	0,13	1,11	52	8,57
	Fin FA	13,45	0,00	3,60	5,5	0,63	0,21	1,12	97	9,46
Testigo	Sin inocular	13,65	0,00	3,59	5,3	0,61	0,18	1,12	26	13,70

Tampoco observamos en este caso, como ya apuntamos en las experiencias con la variedad Tempranillo, una clara tendencia en cuanto a la producción de ácido acético en los distintos momentos de inoculación de las cepas ensayadas aunque, para la bacteria Lalvin Elios 1, podríamos intuir una tendencia a disminuir el ácido acético producido cuando más tarde se siembra la bacteria en el vino. En esta variedad los valores de ácido acético de los vinos inoculados fueron similares o incluso mayores que aquel obtenido en el vino testigo sin inocular.

Respecto a las concentraciones de los demás ácidos orgánicos, ya se ha señalado que el ácido L-málico fue completamente degradado en todos los casos por las cepas ensayadas y también por las bacterias autóctonas en el testigo sin inocular y, como confirman los resultados de los análisis de implantación realizados, también en algunos de los vinos inoculados, sin diferencias significativas en los valores finales del mismo. Tampoco varían significativamente las concentraciones finales de ácido láctico. El ácido cítrico sí parece presentar una tendencia a ser más extensamente degradado por las bacterias cuanto más tempranamente se inoculan éstas en el vino, especialmente en el caso de la bacteria Lalvin 31, que muestra el mayor contenido final de ácido cítrico en el tratamiento en el que la bacteria se inoculó cuando quedaban 10 g/L de azúcares por fermentar, aunque éste es justamente el único de los vinos Merlot en que esta cepa fue inoculada y no consiguió imponerse. En los vinos Merlot inoculados con Lalvin Elios 1 también observamos una menor concentración final de ácido cítrico y, por lo tanto, mayor degradación del mismo, en los casos en que esta cepa se ha logrado imponer, cuando se inoculó a las 24 horas del comienzo de la FA y a mitad de la misma (tabla 4.26).

No se observan diferencias significativas en el alcohol adquirido, la acidez total, y el pH, siendo valores completamente similares en todos los casos ensayados. En el glicerol tampoco vemos diferencias en los valores obtenidos para los vinos inoculados con las cepas comerciales de *O. oeni* (Lalvin 31 y Lalvin Elios 1), pero sí evidenciamos que su valor fue ligeramente menor en los vinos inoculados con la cepa de *L. plantarum* CECT 5671 cuando ésta se inocula más tarde en el vino, concretamente cuando quedan 10 g/L de azúcares por fermentar y al final de la FA. Como podemos observar, ni el ácido acético ni el grado alcohólico obtenidos al final de la FA en estos vinos difieren de los obtenidos en los otros vinos Merlot en los que se ha inoculado esta cepa bacteriana (tabla 4.28), lo que nos indica que las diferencias obtenidas en la concentración de glicerol no se deben haber producido durante el desarrollo de las

fermentaciones alcohólica y glicero-pirúvica. Entonces, esta diferencia podría ser explicada por una mayor degradación del glicerol durante la FML por parte de las bacterias autóctonas de *O. oeni* que se han desarrollado en estos vinos, junto a Lalvin 31 que, como hemos comprobado en los análisis de imposición, también se desarrolló en estos vinos (tabla 4.26), aunque el resto de parámetros determinados tampoco nos aclaran demasiado esta cuestión. No hay muchos estudios sobre la degradación de glicerol por distintas cepas y especies de bacterias lácticas vínicas, pero en un estudio de seis cepas aisladas de vino, pertenecientes a diferentes especies de cocos y bacilos, se vio que el uso del glicerol aumentaba cuando la concentración de azúcares en el medio disminuía (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Esta observación se correlaciona con los resultados aquí obtenidos, y podemos inferir que las cepas bacterianas que finalmente realizaron la FML se desarrollaron más tardíamente en estos vinos, cuando el contenido de azúcares era menor, evidenciando una mayor degradación de glicerol.

4.4.7 Formación de CE

A continuación se presentan los resultados de arginina, citrulina y CEP obtenidos en los mostos y vinos de las variedades Tempranillo y Merlot. Para los vinos de la variedad Merlot también se presentan los resultados de CE de los vinos. No se presentan los valores de CE determinados en los vinos de la variedad Tempranillo por encontrarse muy cerca o por debajo del límite de detección del método de determinación. Arginina y citrulina se han determinado en el mosto y en dos momentos en los vinos, cuando había finalizado la degradación de azúcares y al finalizar el consumo del ácido L- málico. El CE y CEP sólo se determinaron al final de la FML, y no en los vinos de final de FA, ya que, en este estudio, en el momento en que finaliza la degradación de los azúcares los vinos no son equivalentes; algunos habían comenzado la degradación del ácido L-málico y otros no, con lo que obtener conclusiones a partir de la comparación no sería viable.

Tabla 4.29. Contenidos de arginina (mg/L) en los mostos y vinos de la variedad Tempranillo.

CEPA	Momento de inoculación	Mosto	FFA	FFML
Lalvin 31®	24 Hs FA	17	16	32
	1/2 FA	17	16	29
	10 g/L G/F	17	18	37
	Fin FA	17	16	37
Lalvin Elios 1®	24 Hs FA	17	25	31
	1/2 FA	17	28	23
	10 g/L G/F	17	28	23
	Fin FA	17	20	19
CECT 5671	24 Hs FA	17	17	36
	1/2 FA	17	16	40
	10 g/L G/F	17	22	33
	Fin FA	17	21	39
Testigo	Sin inocular	17	25	38

FFA: final de fermentación alcohólica
 FFML: final de fermentación maloláctica

Tabla 4.30. Contenidos de citrulina (mg/L) en los mostos y vinos de la variedad Tempranillo.

CEPA	Momento de inoculación	Mosto	FFA	FFML
Lalvin 31®	24 Hs FA	0	0	0
	1/2 FA	0	0	5
	10 g/L G/F	0	0	16
	Fin FA	0	14	55
Lalvin Elios 1®	24 Hs FA	0	5	30
	1/2 FA	0	0	10
	10 g/L G/F	0	0	12
	Fin FA	0	0	5
CECT 5671	24 Hs FA	0	0	2
	1/2 FA	0	0	5
	10 g/L G/F	0	0	2
	Fin FA	0	0	0
Testigo	Sin inocular	0	0	12

FFA: final de fermentación alcohólica
 FFML: final de fermentación maloláctica

Tabla 4.31. Contenidos de CEP ($\mu\text{g/L}$) en los vinos de la variedad Tempranillo.

CEPA	Momento de inoculación	FFML
Lalvin 31®	24 Hs FA	84
	1/2 FA	45
	10 g/L G/F	47
	Fin FA	46
Lalvin Elios 1®	24 Hs FA	60
	1/2 FA	66
	10 g/L G/F	71
	Fin FA	72
CECT 5671	24 Hs FA	65
	1/2 FA	72
	10 g/L G/F	55
	Fin FA	51
Testigo	Sin inocular	59

FFML: final de fermentación maloláctica

De los resultados obtenidos en los vinos de la variedad Tempranillo, contenidos en las tablas 4.29, 4.30 y 4.31 podemos evidenciar que, en este estudio es difícil establecer una correlación entre los distintos parámetros que permita establecer una conclusión clara.

Con respecto a los niveles de arginina, podemos advertir que su concentración no disminuye con el desarrollo de los microorganismos en el vino. Al final de la FA los valores se han mantenido respecto a los iniciales encontrados en el mosto para los vinos inoculados con la cepa Lalvin 31, han aumentado en los vinos inoculados con Lalvin Elios 1 y en el testigo sin inocular y, en los vinos inoculados con CECT 5671, se han mantenido en aquellos vinos en los que la bacteria se inoculó más tempranamente en el mosto-vino (inoculaciones a las 24 horas de iniciada la FA y a mitad de la FA) y aumentaron ligeramente en las demás inoculaciones (cuando quedaban 10 g/L de azúcares por fermentar y al final de la FA). Al final de la FML los valores de arginina aumentaron en los vinos inoculados con las cepas Lalvin 31, CECT 5671, en el testigo sin inocular y en el vino inoculado con Lalvin Elios 1 a las 24 horas del comienzo de la FA. En los demás vinos inoculados con la cepa Lalvin Elios 1 las concentraciones de arginina disminuyeron con respecto a los observados al final de FA. Los aumentos en las concentraciones de arginina pueden ser explicados por la presencia de las lías de

levadura en los vinos durante el desarrollo de la FML, en mayor o menor medida dependiendo del momento de inoculación. A partir de estos resultados podríamos concluir que la cepa Lalvin Elios 1 presenta una mayor capacidad para degradar la arginina, ya que es en los vinos finales inoculados con esta cepa en los que observamos los valores más bajos de arginina.

Los valores de citrulina sólo han aumentado, muy ligeramente, en dos de los vinos Tempranillo al final de la FA, el vino inoculado con Lalvin 31 al final de la FA y el inoculado con Lalvin Elios 1 a las 24 horas de iniciada la misma. Como ya se anunció, no se observa una clara correlación entre los valores finales obtenidos de arginina y los de citrulina. Sí podemos observar que, al final de la FML, la cepa Lalvin 31 muestra una tendencia a dar valores más altos de citrulina cuanto más tarde se inocula en el vino. Esta observación es la opuesta a la que se advierte con la otra cepa ensayada de *O. oeni*, Lalvin Elios 1. Los valores finales de citrulina en los vinos inoculados con la cepa de *L. plantarum* CECT 5671 son muy bajos, o nulos en algún caso, los más bajos entre todos los vinos obtenidos.

Respecto a los valores obtenidos de CEP, nuevamente hay que destacar que no hallamos una clara correlación con los valores finales de arginina o citrulina. Evaluando los resultados obtenidos para cada cepa podemos decir que, en el caso de los vinos inoculados con la cepa Lalvin 31, los niveles de CEP son menores al obtenido en el vino testigo en todos los casos, exceptuando el vino inoculado con la bacteria a las 24 Hs del comienzo de la FA. Por el contrario, los niveles obtenidos con Lalvin Elios 1 son, en todos los casos, ligeramente superiores al del testigo sin inocular. En estos vinos podemos ver una tendencia a dar niveles más altos de CEP cuanto más tarde se inocula la bacteria en el mosto-vino, pero las diferencias entre los valores obtenidos en los distintos vinos inoculados con Lalvin Elios 1 tampoco son significativas como para elaborar una sentencia concluyente. En los vinos inoculados con la cepa de *L. plantarum* CECT 5671 los niveles finales de CEP son ligeramente superiores al del vino testigo en los vinos inoculados más tempranamente con la bacteria y, en cambio, son ligeramente inferiores al del vino testigo en los vinos en los que la bacteria se inocula más tarde en el vino. Como ya observamos con esta cepa en las experiencias realizadas en vino simulado, los niveles alcanzados de CEP son similares, o incluso superiores, a los que presentan los vinos que fueron inoculados con las cepas comerciales de *O. oeni*, aunque la producción de citrulina ha sido mínima o nula, dependiendo el caso.

Tabla 4.32. Contenidos de arginina (mg/L) en los mostos y vinos de la variedad Merlot.

CEPA	Momento de inoculación	Mosto	FFA	FFML
Lalvin 31®	24 Hs FA	17	13	32
	1/2 FA	17	17	31
	10 g/L G/F	17	18	32
	Fin FA	17	17	30
Lalvin Elios 1®	24 Hs FA	17	28	30
	1/2 FA	17	31	27
	10 g/L G/F	17	25	22
	Fin FA	17	20	20
CECT 5671	24 Hs FA	17	17	33
	1/2 FA	17	16	35
	10 g/L G/F	17	23	30
	Fin FA	17	20	37
Testigo	Sin inocular	17	26	35

FFA: final de fermentación alcohólica

FFML: final de fermentación maloláctica

Tabla 4.33. Contenidos de citrulina (mg/L) en los mostos y vinos de la variedad Merlot.

CEPA	Momento de inoculación	Mosto	FFA	FFML
Lalvin 31®	24 Hs FA	0	49	48
	1/2 FA	0	34	42
	10 g/L G/F	0	32	38
	Fin FA	0	43	58
Lalvin Elios 1®	24 Hs FA	0	45	43
	1/2 FA	0	38	66
	10 g/L G/F	0	22	48
	Fin FA	0	29	49
CECT 5671	24 Hs FA	0	28	31
	1/2 FA	0	42	0
	10 g/L G/F	0	26	39
	Fin FA	0	49	17
Testigo	Sin inocular	0	38	32

FFA: final de fermentación alcohólica

FFML: final de fermentación maloláctica

Tabla 4.34. Contenidos de CE y CEP ($\mu\text{g/L}$) en los vinos de la variedad Merlot.

CEPA	Momento de inoculación	CE ($\mu\text{g/L}$)	CEP ($\mu\text{g/L}$)
Lalvin 31®	24 Hs FA	3,7	53,9
	1/2 FA	4,5	34,9
	10 g/L G/F	4,6	21,1
	Fin FA	2,6	26,3
Lalvin Elios 1®	24 Hs FA	1,3	97,4
	1/2 FA	2,1	73,0
	10 g/L G/F	4,8	80,3
	Fin FA	1,6	61,1
CECT 5671	24 Hs FA	1,4	90,9
	1/2 FA	ND	61,9
	10 g/L G/F	1,2	58,8
	Fin FA	ND	52,2
Testigo	Sin inocular	3,0	51,3

CE: carbamato de etilo

CEP: carbamato de etilo potencial

ND: no detectado

En los vinos de la variedad Merlot observamos una situación similar a la ya observada con aquellos de la variedad Tempranillo.

Al evaluar los niveles de arginina de los vinos de la variedad Merlot, advertimos que, prácticamente, se repiten las observaciones realizadas para los vinos de la variedad Tempranillo. La presencia de lías de levadura durante el desarrollo de la FML y el desarrollo simultáneo en los vinos tanto de levaduras como de bacterias pueden explicar los aumentos en las concentraciones de arginina observados y la imposibilidad de encontrar tendencias claras en los niveles de arginina, citrulina y CE.

Como ya evidenciamos en los vinos Tempranillo, la concentración de arginina, en general, aumenta en los vinos luego del desarrollo de las fermentaciones alcohólica y maloláctica. Nuevamente, observamos que al final de la FA los niveles de arginina se han mantenido prácticamente igual a los iniciales hallados en el mosto en los vinos en los que se ha inoculado la cepa Lalvin 31, en los vinos inoculados con Lalvin Elios 1 han aumentado, así como en el vino testigo con FML espontánea, y en los vinos inoculados con CECT 5671 los niveles de arginina se han mantenido en los vinos inoculados a las 24 horas de iniciada la FA y a mitad de la FA con esta cepa y han

aumentado, aunque muy ligeramente, en los vinos inoculados cuando quedaban 10 g/L de azúcares por fermentar y al final de la FA. En los vinos de final de FML los niveles finales de arginina han aumentado respecto a los niveles iniciales y a los encontrados a final de FA en los vinos inoculados con las cepas Lalvin 31, CECT 5671 y en el vino control no inoculado. En los vinos inoculados con Lalvin Elios 1 observamos que las concentraciones de arginina se mantienen o disminuyen ligeramente respecto a las observadas al final de FA. La conclusión ya realizada sobre la mayor capacidad para degradar la arginina que parece presentar la cepa Lalvin Elios 1 es válida también en este caso.

Contrariamente a lo observado en los vinos de la variedad Tempranillo, los valores de citrulina de los vinos de la variedad Merlot al final de la FA han aumentado respecto a los iniciales encontrados en el mosto, sin una clara tendencia ni una correlación con los valores hallados de arginina en este punto. Los valores de citrulina en los vinos al final de la FML han aumentado o se han mantenido, respecto a aquellos presentes al final de FA, en aquellos vinos inoculados con las cepas comerciales de *O. oeni* y son, en todos los casos, más altos que en el vino testigo sin inocular, aunque no se observa una tendencia notoria para los vinos inoculados con Lalvin 31, como se observaba en los vinos Tempranillo. Los valores de citrulina de los vinos inoculados con Lalvin Elios 1 aumentan en todos los casos al final de la FML, excepto en el vino inoculado con la bacteria a las 24 horas de iniciada la FA, cuyo valor se mantiene respecto al encontrado al final de la FA. Concretamente, el vino en el que la bacteria se inoculó a mitad de la FA muestra el valor más elevado de citrulina entre todos los vinos Merlot, una concentración que duplica la encontrada en el vino testigo. Como ya observamos también para los vinos Tempranillo, los valores de citrulina al final de la FML en los vinos inoculados con la cepa de *L. plantarum* CECT 5671 son, en general, menores a los obtenidos en los vinos inoculados con las cepas de *O. oeni*, y son también, menores al del vino control no inoculado, exceptuando el vino inoculado cuando quedaban 10 g/L de azúcares por fermentar, que muestra un valor de citrulina ligeramente superior al del vino testigo. Hay que recordar en este punto que en los vinos inoculados con esta cepa de *L. plantarum* se desarrollaron cepas autóctonas de *O. oeni*, que fueron responsables del consumo de todo o una parte, según el caso, del contenido del ácido L-málico y podrían ser también responsables de estos valores.

Al comparar los niveles de CE de los vinos de final de FML inoculados con las dos cepas comerciales de *O. oeni*, observamos que son considerablemente mayores en los vinos inoculados con Lalvin 31 respecto a los vinos inoculados con Lalvin Elios 1, excepto en el caso de los vinos inoculados cuando quedaban 10 g/L de azúcares por fermentar, que muestran niveles semejantes de CE y los valores más altos para los vinos inoculados con cada una de estas cepas. Exceptuando el vino inoculado a final de FA, los vinos inoculados con Lalvin 31 evidencian niveles de CE mayores a los del vino testigo sin inocular. En cambio, los vinos inoculados con Lalvin Elios 1 muestran valores de CE menores a los del vino testigo en todos los casos excepto para el vino inoculado cuando quedaban 10 g/L de azúcares por fermentar. Los vinos inoculados con *L. plantarum* CECT 5671 muestran, al final de la FML, valores muy bajos de CE o nulos, inferiores, en cualquier caso, al del vino control no inoculado y a los vinos homólogos inoculados con las cepas comerciales de *O. oeni* ensayadas, exceptuando el vino inoculado con Lalvin Elios 1 a las 24 horas de iniciada la FA, cuyo valor de CE no difiere significativamente del que muestra el vino inoculado con CECT 5671 en el mismo momento de la vinificación.

Nuevamente, hay que recalcar que no se puede establecer una correlación entre los valores de CEP en los vinos al final de la FML y los hallados en ese momento de arginina y citrulina. Pero se confirman en los vinos de la variedad Merlot las consideraciones ya realizadas para los vinos de la variedad Tempranillo, en cuanto a los resultados obtenidos de CEP. Como ya se señaló al evaluar los vinos Tempranillo, los vinos Merlot inoculados con la cepa Lalvin 31 evidencian valores de CEP menores a los de los vinos inoculados con Lalvin Elios 1 y al del vino testigo no inoculado, exceptuando el vino inoculado a las 24 horas del comienzo de la FA, como ya ocurrió en la variedad Tempranillo. Tal como se observó en la variedad Tempranillo, los niveles de CEP de los vinos Merlot inoculados con Lalvin Elios 1 son superiores al del vino testigo. Pero, contrariamente a lo observado en los vinos Tempranillo inoculados con esta cepa, se advierte en los vinos Merlot una tendencia a dar niveles mayores de CEP cuanto antes se inoculan las bacterias comerciales en el mosto-vino. Esta tendencia se observa también en los vinos Merlot inoculados con la cepa de *L. plantarum* CECT 5671. A diferencia de los resultados alcanzados con esta cepa en los vinos Tempranillo, en los vinos Merlot los niveles de CEP de todos los vinos son superiores al del vino control. Nuevamente, destacar que los niveles de CEP obtenidos en los vinos inoculados con esta cepa de *L. plantarum* se encuentran en el orden de

aquellos que alcanzaron las cepas comerciales de *O. oeni*, y que estos valores podrían también ser explicados por el desarrollo en estos vinos de cepas autóctonas de *O. oeni*.

4.4.8 Análisis estadístico

Como ya se ha explicado, en este estudio no ha sido posible advertir una correlación entre los valores de CE o CEP en los vinos al final de la FML, tanto de la variedad Tempranillo como de la variedad Merlot, y los hallados en ese momento de arginina y citrulina.

Para comprobar si existía alguna correlación entre CE, sus precursores o CEP y alguno de los parámetros enológicos analizados se realizó el análisis estadístico con los resultados obtenidos. Para ello se empleó el procedimiento de correlaciones bivariadas del programa SPSS. Las tablas resultantes ofrecen el coeficiente de correlación de Pearson, el nivel crítico bilateral que corresponde a ese coeficiente (*Sig. bilateral*) y el número de casos válidos (*N*) sobre el que se han efectuado los cálculos. Sólo se resumen aquí los resultados en los que se ha observado correlación, los que se destacan en negrita.

La tabla 4.35 resume las correlaciones obtenidas al analizar los resultados de los vinos de la variedad Tempranillo. Vemos que el CEP se correlaciona positivamente con el ácido acético, a la vez que éste se correlaciona negativamente con el contenido de citrulina al final de la FML. El ácido acético es un producto secundario del metabolismo microbiano en el vino, derivado de la actividad tanto de levaduras como de bacterias (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Es lógico entonces que una mayor actividad microbiana resultante en un mayor contenido de ácido acético resulte también en un mayor nivel de CEP. La citrulina contenida al final de la FML se correlaciona también positivamente con el pH. Esta tendencia se observó también en el apartado 4.2, en los ensayos realizados con las cepas de *O. oeni*, en los que resultó un mayor nivel de citrulina al final de la FML cuanto mayor era el pH del vino simulado. La concentración de citrulina al final de la FML se correlaciona también positivamente con el nivel de ácido cítrico, que hemos visto difería según la cepa inoculada y también según el momento de inoculación de las cepas.

Tabla 4.35. Correlaciones bivariadas obtenidas entre parámetros enológicos, precursores del CE y CEP de los vinos de la variedad Tempranillo.

		pH	Ácido acético	Ácido cítrico	Citrulina FFML	CEP FFML
pH	C. P.	1	-0,26	0,39	0,65(*)	-0,26
	S. (b)		0,39	0,18	0,02	0,39
	N	13	13	13	13	13
Ácido acético	C. P.	-0,26	1	-0,31	-0,57(*)	0,67(*)
	S. (b)	0,39		0,31	0,04	0,01
	N	13	13	13	13	13
Ácido cítrico	C. P.	0,39	-0,31	1	0,62(*)	-0,04
	S. (b)	0,18	0,31		0,02	0,90
	N	13	13	13	13	13
Citrulina FFML	C. P.	0,65(*)	-0,57(*)	0,62(*)	1	-0,41
	S. (b)	0,02	0,04	0,02		0,16
	N	13	13	13	13	13
CEP FFML	C. P.	-0,26	0,67(*)	-0,04	-0,41	1
	S. (b)	0,39	0,01	0,90	0,16	
	N	13	13	13	13	13

C. P.: Correlación de Pearson

S. (b): Sig. (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

FML: fermentación maloláctica.

FFML: final de fermentación maloláctica.

CEP: carbamato de etilo potencial.

En la tabla 4.36 se presentan las correlaciones obtenidas al analizar los resultados de los vinos de la variedad Merlot. En esta variedad el nivel de CEP en los vinos al final de la FML se correlaciona negativamente con el grado alcohólico adquirido. Este resultado es contradictorio e incoherente con otras observaciones realizadas en la presente tesis así como las formalizadas por otros autores (Ough *et al.*, 1988a; Trioli y Colagrande, 1991; Arena y Manca de Nadra, 2005).

Tabla 4.36. Correlaciones bivariadas obtenidas entre parámetros enológicos, precursores del CE, CE y CEP de los vinos de la variedad Merlot.

		Cepa	Grado alcohólico adquirido	Arginina FFML	Citrulina FFA	Citrulina FFML	CE FFML	CEP FFML
Cepa	C. P.	1	0,04	0,33	-0,10	-0,56(*)	-0,59(*)	0,12
	S. (b)		0,89	0,26	0,75	0,05	0,04	0,70
	N	13	13	13	13	13	13	13
Grado alcohólico adquirido	C. P.	0,04	1	0,29	-0,08	-0,09	-0,01	-0,79(**)
	S. (b)	0,89		0,34	0,81	0,77	0,98	0,00
	N	13	13	13	13	13	13	13
Arginina FFML	C. P.	0,33	0,29	1	0,57(*)	-0,64(*)	-0,31	-0,31
	S. (b)	0,26	0,34		0,04	0,02	0,31	0,31
	N	13	13	13	13	13	13	13
Citrulina FFA	C. P.	-0,10	-0,08	0,57(*)	1	-0,18	-0,33	0,02
	S. (b)	0,75	0,81	0,04		0,55	0,28	0,95
	N	13	13	13	13	13	13	13
Citrulina FFML	C. P.	-0,56(*)	-0,09	-0,64(*)	-0,18	1	0,50	-0,00
	S. (b)	0,05	0,77	0,02	0,55		0,08	0,99
	N	13	13	13	13	13	13	13
CE FFML	C. P.	-0,59(*)	-0,01	-0,31	-0,33	0,50	1	-0,10
	S. (b)	0,04	0,98	0,31	0,28	0,08		0,75
	N	13	13	13	13	13	13	13
CEP FFML	C. P.	0,12	-0,79(**)	-0,31	0,02	-0,00	-0,10	1
	S. (b)	0,70	0,00	0,31	0,95	0,99	0,75	
	N	13	13	13	13	13	13	13

C. P.: Correlación de Pearson

S. (b): Sig. (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

FFA: final de fermentación alcohólica.

FFML: final de fermentación maloláctica.

CE: carbamato de etilo.

CEP: carbamato de etilo potencial.

En los vinos Merlot la cepa inoculada para realizar la FML ha influido en los niveles encontrados al final de la FML tanto de citrulina como de CE. En la figura 4.33 podemos ver los resultados obtenidos luego de realizar el análisis de varianza (ANOVA) de un factor con el programa SPSS, para comparar varios grupos, en este caso, varias cepas, en una variable cuantitativa, la citrulina. Este análisis pone a prueba la hipótesis de que las medias poblacionales a comparar son iguales.

Descriptivos

Citrulina FFML	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Lalvin 31	4	46,50	8,70	4,35	32,66	60,34	38	58
Lalvin Elios 1	4	51,50	10,02	5,01	35,56	67,44	43	66
CECT 5671	4	21,75	17,12	8,56	-5,48	48,98	0	39
Testigo	1	32,00	32	32
Total	13	39,31	17,06	4,73	29,00	49,62	0	66

Prueba de homogeneidad de varianzas

Citrulina FFML			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,515(a)	2	9	0,27

(a) Los grupos con un único caso se ignorarán al calcular la prueba de homogeneidad de la varianza para Citrulina FFML

ANOVA

Citrulina FFML					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	2088,02	3	696,01	4,45	0,04
Intra-grupos	1406,75	9	156,31		
Total	3494,77	12			

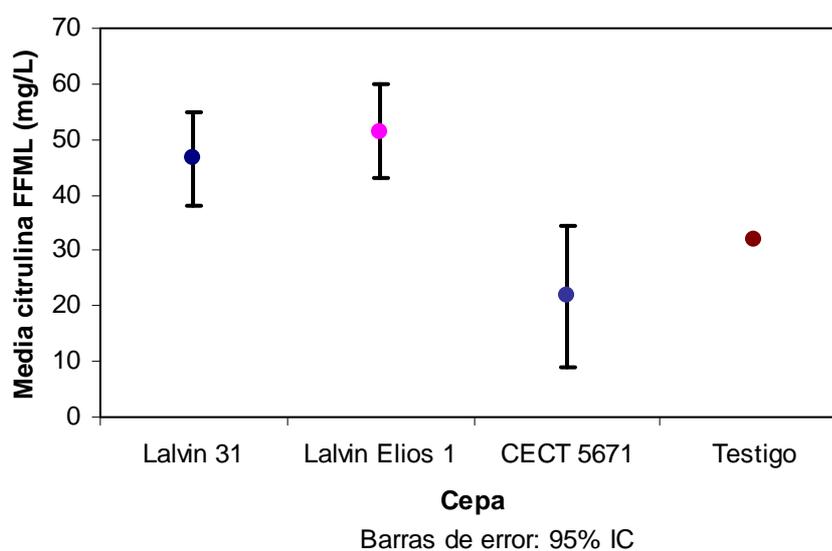


Figura 4.33. Comparación de medias de los niveles de citrulina en los vinos Merlot al final de la FML para las distintas cepas inculadas y testigo.

En el análisis de las varianzas el programa ha excluido al vino testigo al presentar un único caso.

El estadístico de Levene permite contrastar la hipótesis de que las varianzas son iguales. Como su nivel crítico es mayor que 0,05, aceptamos la hipótesis de igualdad de varianzas y concluimos que, en las poblaciones definidas por las tres cepas examinadas, las varianzas de la concentración de citrulina al final de la FML son iguales.

El estadístico F es el cociente entre dos estimadores diferentes de la varianza poblacional. Uno de estos estimadores se obtiene a partir de la variación existente entre las medias de los grupos (variación *Inter-grupos*). El otro estimador se obtiene a partir de la variación existente entre las puntuaciones dentro de cada grupo (variación *Intra-grupos*). El cociente entre las medias cuadráticas de cada estimador de la varianza poblacional nos proporciona el valor estadístico F . Como el nivel de significación (*Sig.*) observado en la prueba ANOVA es menor que 0,05, rechazamos la hipótesis de igualdad de medias concluyendo que las medias de citrulina al final de la FML son diferentes en los vinos Merlot dependiendo de la cepa inoculada.

El estadístico F del ANOVA nos permite rechazar la hipótesis de que los promedios contrastados son iguales, pero no conocemos dónde se encuentran las diferencias. Para ello utilizamos el contraste denominado comparaciones múltiples *post hoc*. De este análisis se ha excluido al vino testigo por tener menos de dos casos.

Puesto que, de acuerdo a los resultados de la prueba de Levene, asumíamos que las varianzas poblacionales eran iguales hemos seleccionado para el análisis *post hoc* la diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey, que asume que las varianzas son iguales. De los resultados obtenidos (tabla 4.37) podemos concluir que los promedios de las concentraciones de citrulina al final de la FML de los vinos inoculados con *L. plantarum* CECT 5671 difieren significativamente de los obtenidos en los vinos inoculados con ambas cepas comerciales de *O. oeni*, Lalvin 31 y Lalvin Elios 1.

Tabla 4.37. Comparaciones múltiples (*Tukey*) del procedimiento ANOVA de un factor para los vinos Merlot y la variable dependiente Citrulina FFML en función de la cepa inoculada.

Comparaciones múltiples

Citrulina FFML

	(I) Cepa	(J) Cepa	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Tukey HSD	Lalvin 31	Lalvin Elios 1	-5,00	8,84	0,84	-29,68	19,68
		CECT 5671	24,75 [*]	8,84	0,05	0,07	49,43
	Lalvin Elios 1	Lalvin 31	5,00	8,84	0,84	-19,68	29,68
		CECT 5671	29,75 [*]	8,84	0,02	5,07	54,43
	CECT 5671	Lalvin 31	-24,75 [*]	8,84	0,05	-49,43	-,07
		Lalvin Elios 1	-29,75 [*]	8,84	0,02	-54,43	-5,07

* La diferencia entre las medias es significativa al nivel 0,05.

Tabla 4.38. Subgrupos homogéneos del procedimiento ANOVA de un factor para los vinos Merlot y la variable dependiente Citrulina FFML en función de la cepa inoculada.

Citrulina FFML

Cepa	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
HSD de Tukey ^a CECT 5671	4	21,75	
Lalvin 31	4		46,50
Lalvin Elios 1	4		51,50
Sig.		1,00	0,84

^a Como tamaño muestral se utiliza la media armónica de los tamaños de cada grupo = 4,000.

La tabla 4.38 nos ofrece una clasificación de los grupos basada en el grado de parecido existente entre sus medias. Así, el subgrupo 1 incluye a *L. plantarum* CECT 5671, que, obviamente, no difiere de sí mismo (*significación* = 1,000), y el subgrupo 2 incluye dos grupos, Lalvin 31 y Lalvin Elios 1, cuyas medias no difieren significativamente (*significación* = 0,841), resultados que podíamos extraer del gráfico de comparación de medias de la figura 4.33.

La figura 4.34 nos ofrece los resultados obtenidos luego de realizar el análisis ANOVA para comparar, en este caso, las medias de CE en los vinos Merlot al final de FML en función de las cepas inoculadas. Nuevamente, el programa SPSS ha excluido al vino testigo del análisis de las varianzas al presentar un único caso.

Nuevamente, se repiten los resultados estadísticos obtenidos al analizar las varianzas de las concentraciones de citrulina al final de la FML. El nivel crítico del estadístico de Levene es mayor que 0,05, con lo que aceptamos la hipótesis de igualdad de varianzas y, por lo tanto, concluimos que las varianzas de la concentración de CE al final de la FML de los vinos Merlot son iguales para las poblaciones de las tres cepas examinadas.

El nivel de significación (*Sig.*) observado en la prueba ANOVA para el estadístico *F* es menor que 0,05, lo que nos permite rechazar la hipótesis de igualdad de medias concluyendo, en este caso, que las medias de CE al final de la FML de los vinos Merlot son diferentes dependiendo de la cepa inoculada.

Nuevamente se ha utilizado la diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey para evaluar dónde se encuentran las diferencias. El programa ha excluido de este análisis al vino testigo por tener menos de dos casos.

Los resultados obtenidos, luego de realizar el análisis de comparaciones múltiples *post hoc* para la variable CE al final de la FML, nos permiten concluir que las medias de los niveles de CE al final de la FML de los vinos Merlot inoculados con *L. plantarum* CECT 5671 difieren significativamente de los obtenidos en los vinos inoculados con Lalvin 31 (tabla 4.39).

En la tabla 4.40 observamos que la cepa Lalvin Elios 1 aparece en los dos grupos definidos y que la media de CE de los vinos de final de FML inoculados con esta cepa no difiere significativamente ni de la media de CE al final de la FML de los vinos inoculados con CECT 5671 (*significación* = 0,123) ni de aquella de los vinos inoculados con Lalvin 31 (*significación* = 0,251), resultados que podíamos intuir del gráfico de comparación de medias de la figura 4.34.

Descriptivos

CE FFML	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Lalvin 31	4	3,85	0,926	0,46	2,38	5,32	2,6	4,6
Lalvin Elios 1	4	2,45	1,60	0,80	-0,10	5,00	1,3	4,8
CECT 5671	4	0,65	0,76	0,38	-0,55	1,85	0,0	1,4
Testigo	1	3,00	3,0	3,0
Total	13	2,37	1,66	0,46	1,37	3,37	0,0	4,8

Prueba de homogeneidad de varianzas

CE FFML			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,080(a)	2	9	0,38

(a) Los grupos con un único caso se ignorarán al calcular la prueba de homogeneidad de la varianza para CE FFML

ANOVA

CE FFML					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	21,02	3	7,01	5,27	0,02
Intra-grupos	11,97	9	1,33		
Total	33,00	12			

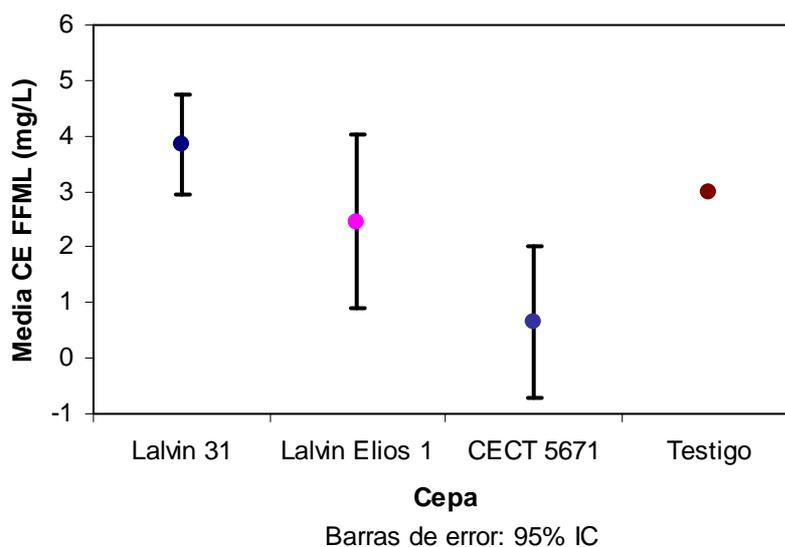


Figura 4.34. Comparación de medias de los niveles de CE en los vinos Merlot al final de la FML para las distintas cepas inoculadas y testigo.

Tabla 4.39. Comparaciones múltiples (*Tukey*) del procedimiento ANOVA de un factor para los vinos Merlot y la variable dependiente CE FFML en función de la cepa inoculada.

Comparaciones múltiples

CE FFML		(I) Cepa	(J) Cepa	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
							Límite inferior	Límite superior
Tukey HSD	Lalvin 31	Lalvin Elios 1	1,40	0,82	0,25	-0,88	3,68	
		CECT 5671	3,20 [*]	0,82	0,01	0,92	5,48	
	Lalvin Elios 1	Lalvin 31	-1,40	0,82	0,25	-3,68	0,88	
		CECT 5671	1,80	0,82	0,12	-0,48	4,08	
	CECT 5671	Lalvin 31	-3,20 [*]	0,82	0,01	-5,48	-0,92	
		Lalvin Elios 1	-1,80	0,82	0,12	-4,08	0,48	

* La diferencia entre las medias es significativa al nivel 0,05.

Tabla 4.40. Subgrupos homogéneos del procedimiento ANOVA de un factor para los vinos Merlot y la variable dependiente CE FFML en función de la cepa inoculada.

CE FFML		Cepa	N	Subset for alpha = 0.05	
				1	2
HSD de Tukey ^a	CECT 5671	4	0,650		
	Lalvin Elios 1	4	2,450	2,450	
	Lalvin 31	4		3,850	
	Sig.		0,123	0,251	

^a Como tamaño muestral se utiliza la media armónica de los tamaños de cada grupo = 4,000.

A continuación se presentan las correlaciones bivariadas obtenidas al analizar todos los resultados en conjunto, tanto los generados en los ensayos con los vinos Tempranillo como con los Merlot.

Tabla 4.41. Correlaciones bivariadas obtenidas entre parámetros enológicos, precursores del CE y CEP de todos los vinos estudiados.

	Variedad	Cepa	Duración FML	Grado alcohólico adquirido	Ácido acético	Citrulina FFA	Citrulina FFML	CE FFML	CEP FFML	
Variedad	C. P.	1	0,00	0,79(**)	0,99(**)	0,91(**)	0,95(**)	.(a)	0,00	
	S. (b)		1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	
	N	26	26	26	26	26	26	13	26	
Cepa	C. P.	0,00	1	0,27	0,01	0,00	-0,02	-0,06	-0,59(*)	0,12
	S. (b)			1,00	0,97	0,99	0,92	0,78	0,04	0,56
	N	26	26	26	26	26	26	26	13	26
Duración FML	C. P.	0,79(**)	0,27	1	0,79(**)	0,80(**)	0,66(**)	0,65	-0,24	-0,04
	S. (b)				1,00	0,00	0,00	0,00	0,43	0,86
	N	26	26	26	26	26	26	26	13	26
Grado alcohólico adquirido	C. P.	0,99(**)	0,01	0,79(**)	1	0,88(**)	0,94(**)	0,92	-0,01	-0,09
	S. (b)					1,00	0,00	0,00	0,98	0,67
	N	26	26	26	26	26	26	26	13	26
Ácido acético	C. P.	0,91(**)	0,00	0,80(**)	0,88(**)	1	0,85(**)	0,81	0,16	0,11
	S. (b)						1,00	0,00	0,61	0,59
	N	26	26	26	26	26	26	26	13	26
Citrulina FFA	C. P.	0,94(**)	-0,06	0,65(**)	0,92(**)	0,81(**)	1	0,66(**)	-0,33	-0,03
	S. (b)							1,00	0,28	0,87
	N	26	26	26	26	26	26	26	13	26
Citrulina FFML	C. P.	0,66(**)	-0,35	0,44(*)	0,65(**)	0,55(**)	0,66	1	0,50	-0,15
	S. (b)								1,00	0,47
	N	26	26	26	26	26	26	26	13	26
CE FFML	C. P.	.(a)	-0,59(*)	-0,24	-0,01	0,16	-0,33	0,50	1	-0,10
	S. (b)									1,00
	N	13	13	13	13	13	13	13	13	13
CEP FFML	C. P.	0,00	0,12	-0,04	-0,09	0,11	-0,03	-0,15	-0,10	1
	S. (b)									
	N	26	26	26	26	26	26	26	13	26

C. P.: Correlación de Pearson

S. (b): Sig. (bilateral)

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

FFA: final de fermentación alcohólica.

FFML: final de fermentación maloláctica.

CE: carbamato de etilo.

CEP: carbamato de etilo potencial.

Como vemos en la tabla 4.41, el nivel de CE al final de la FML correlaciona negativamente con la cepa de bacteria inoculada. Los datos para esta correlación sólo provenían de los resultados obtenidos en las experiencias con los vinos Merlot, ya que, como se mencionó, no se presentaron los valores de CE para los vinos Tempranillo. Por ello, esta correlación ya se comentó al tratar los resultados de los vinos Merlot.

Los niveles de citrulina alcanzados tanto al final de la FA como de la FML se correlacionan con la variedad de uva.

Descriptivos

Citrulina FFA	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
					Tempranillo	13		
Merlot	13	36,54	8,84	2,45	31,20	41,88	22	49
Total	26	19,00	19,11	3,75	11,28	26,72	0	49

Prueba de homogeneidad de varianzas

Citrulina FFA			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
11,389	1	24	0,003

ANOVA

Citrulina FFA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	7997,54	1	7997,54	169,79	0,00
Intra-grupos	1130,46	24	47,10		
Total	9128,00	25			

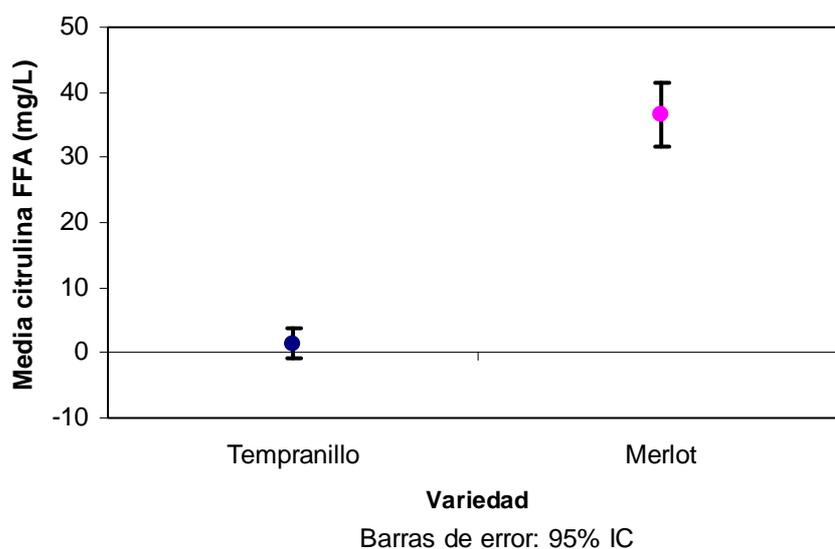


Figura 4.35. Comparación de medias de los niveles de citrulina al final de la FA en los vinos Tempranillo y Merlot.

El análisis ANOVA de un factor para comparar las medias de las concentraciones de citrulina en los vinos Tempranillo y Merlot al final de la FA se muestra en la figura 4.35.

De acuerdo con el nivel de significación (*Sig.*) de la prueba ANOVA para el estadístico F y con el nivel crítico del estadístico de Levene concluimos que, tanto las medias de las concentraciones de citrulina en los vinos Tempranillo y Merlot al final de la FA, como sus varianzas, son significativamente diferentes. Estas conclusiones pueden también deducirse del gráfico de comparación de medias de la figura 4.35.

En la figura 4.36 se presentan los resultados del análisis ANOVA de un factor al comparar las medias de las concentraciones de citrulina en los vinos Tempranillo y Merlot al final de la FML.

De acuerdo con el nivel crítico del estadístico de Levene, concluimos que las varianzas de las medias de las concentraciones de citrulina en los vinos Tempranillo y Merlot al final de la FML no presentan una diferencia significativa, como puede también deducirse del gráfico de comparación de medias de la figura 4.36.

Del nivel de significación (*Sig.*) de la prueba ANOVA para el estadístico F podemos concluir que las medias de citrulina en los vinos Tempranillo y Merlot al final de la FML son significativamente diferentes. Esta conclusión también podía extraerse del gráfico de comparación de medias de la figura 4.36.

Descriptivos

Citulina FFML								
	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Tempranillo	13	11,85	15,35	4,26	2,57	21,12	0	55
Merlot	13	39,31	17,06	4,73	29,00	49,62	0	66
Total	26	25,58	21,19	4,16	17,02	34,14	0	66

Prueba de homogeneidad de varianzas

Citulina FFML			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
0,205	1	24	0,655

ANOVA

Citulina FFML					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4901,88	1	4901,88	18,61	0,00
Intra-grupos	6322,46	24	263,44		
Total	11224,35	25			

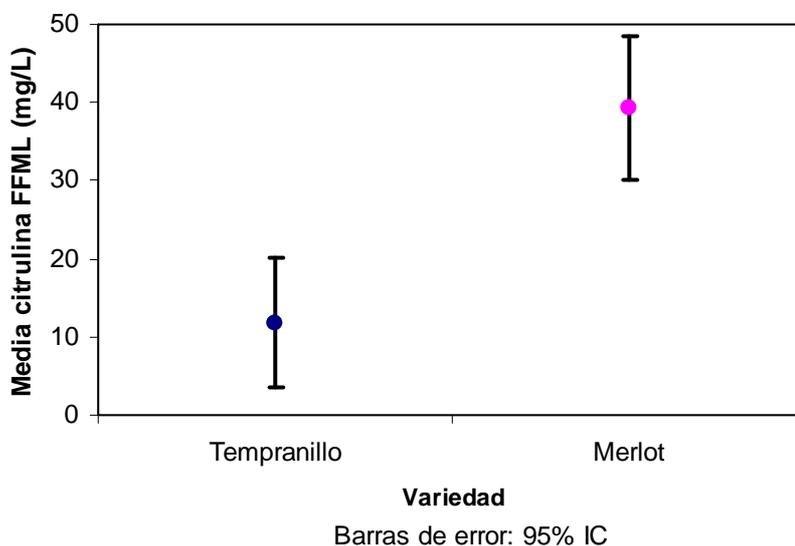


Figura 4.36. Comparación de medias de los niveles de citulina al final de la fermentación maloláctica en los vinos Tempranillo y Merlot.

Volviendo a la tabla 4.41 de correlaciones bivariadas, observamos una correlación positiva entre los niveles de citrulina, tanto al final de la FA como de la FML, y la duración de la FML y el grado alcohólico adquirido. Un mayor tiempo de duración de la FML lleva a una mayor producción de citrulina lo que, con el tiempo, podría generar mayores niveles de CE en los vinos.

Los niveles de citrulina al final de la FA y de la FML correlacionan también positivamente con el nivel de ácido acético que, como ya se ha comentado, es un producto secundario del metabolismo tanto de levaduras como de bacterias en el vino (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). Como hemos explicado más arriba, una mayor duración de la FML y, simultáneamente, una mayor actividad microbiana resultan en un mayor contenido de ácido acético a la vez que mayor concentración de citrulina en los vinos.

4.4.9 Conclusiones

No se detectaron interferencias entre los desarrollos de la FA y la FML en ninguno los momentos de inoculación estudiados y las diferencias en acidez volátil de los vinos no fueron significativas, incluso al pH más elevado estudiado.

Se observó una menor mortalidad de las bacterias comerciales de *O. oeni* con la técnica de coinoculación, principalmente cuando ésta se realiza al inicio del proceso fermentativo, en el mosto. Esto permitió una mejor imposición de las mismas, lo que asegura un mejor control de la FML. La degradación del ácido L-málico fue más rápida cuando la inoculación se había realizado a las 12 horas de iniciada la FA comparando con la inoculación secuencial, al FFA, y principalmente con la FML espontánea.

Existieron diferencias en cuanto a cinética fermentativa, poblaciones y porcentajes de imposición entre las BL comerciales ensayadas en los vinos Merlot y Tempranillo, mostrando mejor adaptación a cada vino una cepa diferente. Esto pone en evidencia la importancia en la elección de la cepa más adaptada a las condiciones particulares de cada vino.

La población de la cepa CECT 5671 de *L. plantarum* ha ido decreciendo en los vinos desde el momento de su inoculación, aunque se observó actividad maloláctica, mayor cuanto antes se ha inoculado la BL en los mostos.

Se evidenció diferente capacidad para degradar la arginina por parte de las dos cepas comerciales de *O. oeni* ensayadas en este estudio, así como diferentes niveles de CEP.

No se encontró correlación en ninguno de los ensayos entre los niveles de CE o CEP y las concentraciones de arginina o citrulina.

Los niveles de CEP de los vinos inoculados con *L. plantarum* CECT 5671 fueron similares a los que presentaban los vinos inoculados con las cepas de *O. oeni*, aunque podrían ser en parte explicados por el desarrollo en estos vinos de cepas autóctonas de *O. oeni*.

En los vinos Tempranillos se observó correlación entre los niveles de CEP y la concentración de ácido acético. En los vinos Merlot las medias de las concentraciones de citrulina y de CE al FFML fueron diferentes dependiendo de la cepa inoculada.

Las concentraciones de citrulina tanto al FFA como al FFML difieren en las variedades de uva ensayadas y presentaron correlación tanto con el tiempo de duración de la FML como con las concentraciones de ácido acético.

5. DISCUSIÓN GENERAL

Es conocida desde hace tiempo la influencia de las levaduras en la formación del CE en el vino, desde el momento en que se sabe que la urea es probablemente el principal precursor del mismo en los vinos. La urea es producida por las levaduras en la FA como producto intermedio del catabolismo de la arginina, el aminoácido asimilable por las levaduras más abundante en mostos, y de las purinas (Ough *et al.*, 1988b; Monteiro *et al.*, 1989; Trioli y Colagrande, 1991; Ough, 1991 Butzke, 1998;). Debido a esto, la influencia de la urea y del metabolismo de las levaduras sobre la formación del CE en el vino, así como diferentes factores vitícolas y/o enológicos que influyen sobre ellos, ha sido extensamente estudiada en vinos (Ough *et al.*, 1988a; Monteiro *et al.*, 1989; Tegmo-Larsson y Henick-Kling, 1990b; Ough, 1991; Trioli y Colagrande, 1991; Butzke y Bisson, 1997; Butzke 1998; Suárez Lepe e Íñigo, 2004).

Se sabe también que las BL pueden formar en los vinos precursores del CE, citrulina y carbamil-fosfato, a partir del metabolismo de la arginina (Liu *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1995; Mira de Orduña *et al.*, 2000a), aunque no es ampliamente aceptada la afectación de las BL y de la FML sobre la formación del CE (Tegmo-Larsson *et al.*, 1989). Se ha demostrado la excreción de citrulina durante la degradación de arginina por parte de diferentes especies de BL y la correspondiente formación de CE en el vino (Ough *et al.*, 1988a; Liu *et al.*, 1994). En función de la especie y la cepa de BL, existe bastante variabilidad en la capacidad de degradación de arginina (Araque *et al.*, 2009). Si esta degradación no es completa se pueden acumular los intermediarios citrulina y/o carbamil-fosfato en los vinos (Bordons *et al.*, 2004).

Con este trabajo pretendíamos ampliar el conocimiento sobre la afectación de la FML y del metabolismo de las BL sobre la formación de CE en los vinos, qué condiciones de vinificación pueden aumentar la posibilidad de producción de precursores de CE y la potencialidad de formación de éste a partir de los precursores durante el desarrollo de la FML en los vinos.

La determinación de BL por el método de referencia de cultivo en placa de Petri es una técnica fácil de realizar pero que presenta algunas desventajas. Entre ellas, la más importante es que requiere un tiempo de incubación muy largo, de 7 a 10 días. Para alcanzar los objetivos marcados en la presente tesis era necesario realizar el seguimiento de poblaciones de BL en los distintos trabajos planteados, para lo que resultaba imprescindible poner a punto una técnica fácil y, sobretudo, rápida. Fuimos capaces de realizar el seguimiento de poblaciones de BL y de la FML con una técnica relativamente sencilla, el recuento de microorganismos por epifluorescencia, que

resultó ser fiable y, sobretodo, rápida. Se pueden obtener resultados en aproximadamente una hora y media a partir de vino, lo que permite reaccionar rápidamente ante un problema de parada de FML o evitar efectos organolépticos y la formación de metabolitos indeseables que puedan afectar a la seguridad alimentaria como resultado de un crecimiento indeseado de las BL en los vinos.

Comprobamos que, tal como se describe en la bibliografía (Monteiro *et al.*, 1989; Trioli y Colagrande, 1991), es durante la FA cuando se produce la mayor parte del CE en los vinos. Entre diferentes prácticas de vinificación examinadas, y normalmente utilizadas en las bodegas, ni la realización de la FML sobre lías ni la conservación del vino por 12 meses en condiciones normales de almacenamiento afectaron los niveles de CE de los vinos, por lo que podemos considerar seguras estas prácticas en cuanto a la prevención de la formación de CE en los vinos. Aunque el desarrollo de la FML, tanto espontánea como inducida con una BL comercial, y un mayor tiempo de exposición con los hollejos durante la FA no influyeron los niveles de CE en los vinos, sí provocaron un aumento del CEP, por lo que podemos decir que estas prácticas aumentan el potencial de los vinos para formar CE en un periodo posterior de conservación o envejecimiento a temperaturas normales. En los ensayos de diferentes momentos de inoculación de bacterias también comprobamos que la variedad de uva y el tiempo de duración de la FML influyen en las concentraciones de citrulina que se forman en los vinos.

A diferencia de otros autores, que observaron que *O. oeni* podía degradar la arginina a niveles de pH vínicos altos (3,9 - 4,0) pero no a niveles de pHs más bajos (3,2 - 3,3) (Liu *et al.*, 1995a; Mira de Orduña *et al.*, 2001), en nuestros estudios en vino simulado comprobamos que las cepas ensayadas de *O. oeni* fueron capaces de degradar la arginina a todos los niveles de pH estudiados (3,4; 3,7 y 4,0), aunque el rango de conversión de arginina a citrulina fue mayor al pH más alto ensayado, condición que vimos favorecía el metabolismo de *O. oeni*. En estas condiciones el contenido en CEP fue mayor y se correlacionó directamente con el aumento en el contenido de citrulina al final del consumo del ácido L-málico, lo que señala a la citrulina como un buen predictor de las concentraciones de CE que podrían formarse en el vino luego de periodos prolongados de almacenamiento, como ya han descrito previamente Liu *et al.* (1994) para *L. buchneri* y Azevedo *et al.* (2002) para *L. hilgardii* en vino fortificado. En estas condiciones de pH más elevado, pudimos también comprobar que el catabolismo de la arginina aumentaba el crecimiento de *O. oeni*.

Tiene importancia técnica el hecho de que no observamos degradación de arginina en los casos en que no se realizó la FML y que, en aquellos casos en los que el ácido L-málico fue completamente degradado, la degradación de la arginina siempre fue retrasada con respecto a la degradación del mismo para todas las cepas testadas, lo que permite al enólogo evitar la degradación de la arginina eliminando las células o inhibiendo la actividad celular cuando ha terminado el consumo del ácido L-málico en el vino, con el fin de evitar no sólo la formación de citrulina sino, también, un gran ascenso del pH, que puede provocar un cambio en las características organolépticas del vino y favorecer la propagación de microorganismos indeseables.

Aunque se ha descrito en la bibliografía (Ough et al., 1988a, Trioli y Colagrande, 1991) que las condiciones que principalmente favorecen la formación de CE son un mayor contenido en etanol y un pH vínico más bajo, lo que también pudimos comprobar en las FMLs en vino simulado llevadas a cabo por las cepas de *O. oeni*, lo que es más importante, la formación potencial de CE, resultó mayor a pHs más alcalinos del vino, condición que, como ya hemos expresado, favorece el crecimiento y metabolismo de las BL.

La metodología para la determinación del CE es relativamente cara y, sobretodo, laboriosa, requiriendo, además, un equipamiento especial que precisa ser puesto a punto y utilizado por personal cualificado. La falta de tecnologías sencillas para su estimación ha impedido estudiar más a fondo este compuesto (Suárez Lepe e Íñigo, 2004) y hace que el CE no sea un analito fácil y habitualmente medible en las bodegas. Por ello, queríamos encontrar en los mostos y/o vinos algunos compuestos, entre parámetros enológicos que habitualmente se determinan en los mismos, que pudieran servir como marcadores o previsores de los niveles de CE que pueden llegar a formarse en los mismos. Los niveles nitrogenados, sobre todo, los niveles de amonio y nitrógeno total de mostos y arginina de mostos y vinos, correlacionaron bien en nuestros estudios con los niveles de CEP al FFA y al FFML. El nitrógeno total es un parámetro relativamente fácil y muy habitualmente determinado en mostos de muchas bodegas, y puede ser un buen indicador de los niveles de CEP que se pueden llegar a alcanzar en los vinos. Otros indicadores de los niveles de CE que potencialmente se pueden formar en los vinos resultaron ser los niveles de glicerol al FFA y los niveles de acidez total de mostos y vinos al FFA. Técnicamente, estas observaciones se traducen en que, en aquellas vinificaciones en las que se evidencien mayores niveles nitrogenados en mostos, menores niveles de acidez total en mostos o vinos al FFA o

mayores niveles de glicerol al FFA deberían tomarse mayores precauciones ante la formación de CE durante un periodo de almacenamiento o crianza.

Respecto a la cepa ensayada de *L. plantarum*, de la cual pretendíamos conocer su comportamiento en relación con una menor formación de CE y como cultivo iniciador, no hemos observado degradación de arginina ni excreción de citrulina en las diferentes condiciones estudiadas en vino simulado, aunque los niveles obtenidos de CE, tanto en las experiencias en vino simulado como en los ensayos de diferentes momentos de inoculación, fueron similares a los alcanzados en los casos en que se utilizaron las cepas de *O. oeni*. Son necesarias más investigaciones para dilucidar las razones, y posibles metabolitos precursores, que llevan a la formación de CE por esta cepa en concreto y esta especie en general.

La inoculación de las BL en diferentes momentos durante la vinificación no mostró interferencias sobre el desarrollo de las levaduras y la FA y tampoco influencia sobre la formación de CE o de sus precursores. Aunque no fuimos capaces de encontrar una tendencia hacia la formación de CE o de sus precursores en función del momento de inoculación de las BL en los mostos o una correlación entre el CE y sus precursores, sí comprobamos en los vinos Merlot que las concentraciones de citrulina y de CE al FFML dependían de la cepa inoculada. Las dos cepas comerciales ensayadas de *O. oeni* mostraron diferente capacidad para degradar la arginina, así como diferentes niveles de CEP, además de diferencias en cuanto a poblaciones, imposición y cinética de fermentación en los diferentes vinos utilizados en las experiencias. Esto pone en evidencia la importancia en la elección de la cepa más adaptada a las condiciones de cada vino en particular, para asegurar unas buenas cinética e imposición, pero, además, es importante también tener en cuenta la diferente capacidad de las cepas bacterianas para degradar la arginina y formar precursores de CE en los vinos a la hora de su selección.

Con nuestro trabajo hemos sido capaces de ampliar nuestro conocimiento sobre la influencia de las BL en la formación de CE y de sus precursores en los vinos y también sobre cómo pueden influir ciertas prácticas enológicas y parámetros vínicos sobre aquellos. Resta aún dilucidar la posibilidad de producción de precursores del CE distintos a los ya conocidos por parte de diferentes cepas y especies de BL, la misma *O. oeni*, más ampliamente utilizada como cultivo iniciador de la FML, y también por parte de especies diferentes a ésta, que ya se están utilizando como cultivos iniciadores en los vinos.

6. CONCLUSIONES

1. En este trabajo se empleó con éxito para el seguimiento de la FML y la población de BL la técnica de recuento de células viables por microscopía de epifluorescencia.
2. En el estudio de la influencia de diferentes condiciones de vinificación sobre la formación de CE la FML no influyó las concentraciones de CE o de sus precursores, aunque el desarrollo de la FML sí provocó un aumento del CEP.
3. La realización de la FML sobre lías no evidenció aumento de los niveles de CE o de sus precursores en los vinos.
4. Un tiempo mayor de exposición con los hollejos durante la FA no afectó la producción de CE, pero sí de CEP.
5. Durante la conservación del vino por 12 meses no se advirtió producción de CE.
6. En los estudios en vino simulado observamos que el catabolismo de la arginina aumentó el crecimiento de *O. oeni* en algunas condiciones.
7. Las cepas ensayadas de *O. oeni* fueron capaces de degradar la arginina a todos los niveles de pH estudiados (3,4; 3,7 y 4,0), aunque el rango de conversión de arginina a citrulina fue ligeramente mayor a pH 4,0 que a valores de pH más bajos.
8. La degradación de la arginina siempre fue retrasada con respecto a la degradación del ácido L-málico en todas las cepas testadas. No se observó (o ha sido mínima) degradación de arginina en los casos en que no se llevó a cabo la FML.
9. Para las cepas ensayadas de *O. oeni* el contenido en CEP se correlacionó directamente con el aumento en el contenido de citrulina al final del consumo del ácido L-málico, por lo que la citrulina es un buen indicador de las concentraciones de CE que podrían formarse en el vino luego de periodos prolongados de almacenamiento.

10. La cepa ensayada en vino simulado de *L. plantarum* no fue capaz de degradar la arginina y no excretó citrulina en las diferentes condiciones estudiadas, aunque los niveles obtenidos de CE fueron similares a los alcanzados en los casos en que se utilizaron las cepas de *O. oeni*.
11. En el estudio de la relación entre características enológicas de mostos y vinos y la formación de CE los niveles de CEP al FFA y al FFML correlacionaron con los niveles de amonio y nitrógeno total del mosto y de arginina de mosto y vinos de FFA y de FFML, por lo que estos niveles nitrogenados pueden ser buenos indicadores de los niveles de CEP en los vinos.
12. Las correlaciones entre los niveles de glicerol y de CEP al FFA y entre los niveles de CEP al FFML y los niveles de acidez total de mostos y vinos al FFA, indican que aquellas vinificaciones en las que se evidencien menores niveles de acidez total en mostos o vinos al FFA o mayores niveles de glicerol al FFA, pueden ser más propensas a producir mayores niveles de CE durante un periodo de almacenamiento.
13. Las concentraciones medias de nitrógeno total, arginina y amonio fueron menores y significativamente diferentes en mostos de uvas afectadas por *B. cinerea*. Observamos mayor consumo de arginina durante la FA en uvas afectadas por *B. cinerea*, aunque no diferencias significativas con respecto a uvas sanas. .
14. En el estudio de la influencia del momento de inoculación de las bacterias lácticas en el vino sobre la formación de CE, no se detectaron interferencias entre los desarrollos de la FA y la FML en ninguno de los momentos de inoculación estudiados.
15. Se evidenció diferente capacidad para degradar la arginina por parte de las dos cepas comerciales de *O. oeni* ensayadas, así como diferentes niveles de CEP.
16. Los niveles de CEP de los vinos inoculados con *L. plantarum* CECT 5671 fueron similares a los que presentaban los vinos inoculados con las cepas de *O. oeni* y

podrían ser en parte explicados por el desarrollo en estos vinos de cepas autóctonas de *O. oeni*.

17. En los vinos Tempranillo se observó correlación entre los niveles de CEP y la concentración de ácido acético. En los vinos Merlot las medias de las concentraciones de citrulina y de CE al FFML fueron diferentes dependiendo de la cepa inoculada.
18. Las concentraciones de citrulina tanto al FFA como al FFML difirieron en las variedades de uva ensayadas y presentaron correlación tanto con el tiempo de duración de la FML como con las concentraciones de ácido acético.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abdelal, A. T. (1979). Arginine catabolism by microorganisms. *Annual Reviews of Microbiology*. 33, pp. 139-168.

Alexandre, H., Costello, P. J., Remize, F., Guzzo J. y Guilloux-Benatier, M.. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* – *Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *International Journal of Food Microbiology*. 93, pp. 141-154.

Araque, I., Gil, J., Carreté, R., Bordons, A. y Reguant, C. (2009). Detection of *arc* genes related with the ethyl carbamate precursors in wine lactic acid bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57 (5), pp. 1841-1847.

Archibald, R. M. (1944). Determination of citrulline and allantoin and demonstration of citrulline in blood plasma. *The Journal of biological chemistry*. 156, pp. 121-142.

Arena, M.E., Saguir, F. M. y Manca de Nadra, M. C. (1999). Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine. *International Journal of Food Microbiology*. 52, pp. 155-161.

Arena, M.E. y Manca de Nadra, M. C. (2005). Influence of ethanol and low pH on arginine and citrulline metabolism in lactic acid bacteria from wine. *Research in Microbiology*. 156 (8), pp. 858-864.

Azevedo, Z., Couto, J. A. y Hogg, T. (2002). Citrulline as the main precursor of ethyl carbamate in model fortified wines inoculated with *Lactobacillus hilgardii*: a marker of the levels in a spoiled fortified wine. *Letters in Applied Microbiology*. 34, pp. 32-36.

Bartowsky, E. J. y Henschke, P. A. (2004). The “buttery” attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. *International Journal of Food Microbiology*. 96, pp. 235-252.

Beelman, R.B. y Kunkee, R. E. (1985). Inducing simultaneous malolactic-alcoholic fermentation in red table wines. En Lee, T. H. (ed.). *Proceedings of the Australian Society of Viticulture and Oenology Seminar on Malolactic Fermentation*. (pp. 97-112) Urrbrae, Australia: Australian Wine Research Institute.

Beland, F.A., Benson, R. W., Mellick, P. W., Kovatch, R. M., Roberts, D. W., Fang, J. L., Doerge, D. R., Beelman, R. B. y Kunkee, R. E. (2005). Effect of ethanol on

the tumorigenicity of urethane (ethyl carbamate) in B6C3F1 mice. *Food and Chemical Toxicology*. 43 (1), pp. 1-19.

Berta, P. y Spertino, M. (1998). Nuove tecniche di determinazione di lieviti e batteri in epifluorescenza. *L'Enotecnico*. Marzo, pp. 57-61.

Berta, P., Spertino, M. y Vallini, E. (1998). Determinazione rapida di batteri nel vino. *Vignevini*. 9, pp. 54-56.

Bordons de Porrata-Doria, A. (1997). Els bacteris làctics del vi i la fermentació malolàctica. En Vilafranca del Penedès: Ajuntament (ed.). *Enologia avui*. (pp. 29-39). Vilafranca del Penedès.

Bordons, A., Gil, J., Araque, I., Reguant, C., Carreté, R., Romero, S. y Masqué, M. C. (2004). Estudios para la minimización de la producción de carbamato de etilo por las bacterias lácticas. *Tecnología del vino*. 4 (18), pp.94-100.

Bou, M y Powell, C. (2006). Técnicas de selección de cepas. En Morenzoni, R., Specht, K. y Dumont A. (ed.) *La Fermentación Maloláctica del Vino. Conocimientos Científicos y Prácticos* (pp. 6:1-6:8). Montreal, Canadá: Lallemand Inc.

Butzke, C.E. y Bisson, L.F. (1997). *Ethyl Carbamate Preventative Action Manual*. Recuperado el 13 de abril de 2003, de <http://vm.cfsan.fda.gov/~frf/ecaction.html>.

Butzke, C. E. (1998). *Impact of juice nitrogen status on wine quality*. Recuperado el 24 de octubre de 2002, de <http://www.u-bourgogne.fr/IUVV/Butzke/Butzke.html>.

Cavazza, A. y Poznanski, E. (1998). Le analisi microbiologiche nel laboratorio enologico. *Vignevini*. 6, pp. 42-53.

Comitini, F., Ferretti, R., Clementi, F., Mannazzu, I. y Ciani, M. (2005). Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and malolactic bacteria: preliminary characterization of a yeast proteinaceous compound(s) active against *Oenococcus oeni*. *Journal of Applied Microbiology*. 99, pp. 105-111.

Costello, P. (2006). La química de la fermentación maloláctica. En Morenzoni, R., Specht, K. y Dumont A. (ed.) *La Fermentación Maloláctica del Vino. Conocimientos Científicos y Prácticos* (pp. 4:1-4:11). Montreal, Canadá: Lallemand Inc.

Cox, D. J. y Henick-Kling, T. (1990). A comparison of lactic acid bacteria for energy-yielding (ATP) malolactic enzyme systems. *American Journal of Enology and Viticulture*. 41, pp. 215-218.

Cox, D. J. y Henick-Kling, T. (1995). Protonmotive force and ATP generation during malolactic fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*. 46, pp. 319-323.

Crow, V. L. y Thomas, T. D. (1982). Arginine metabolism in lactic streptococci. *Journal of Bacteriology*. 150, pp. 1024-1032.

Davis, C. R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T. H. y Fleet, G. H. (1985). Practical implications of malolactic fermentation: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*. 36, pp. 290-301.

Davis, C. R., Wibowo, D., Lee, T. H. y Fleet, G. H. (1986). Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH. *Applied and Environmental Microbiology*. 51, pp. 539-545.

Davis, C. R., Wibowo, D., Fleet, G. H. y Lee, T. H. (1988). Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance. *American Journal of Enology and Viticulture*. 39, pp. 137-142.

de la Torre, M. C. y Buxaderas, S. (1997). El carbamato de etilo: situación del problema. *ACE Revista d'Enologia*. 39, pp. 3-7.

De Man, J. C., Rogosa, M. y Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*. 23, pp. 130-135.

Delfini, C. y Formica, J. V. (2001). *Wine Microbiology: Science and Technology*. New York: Marcel Dekker, Inc.

Diario Oficial de las Comunidades Europeas. (1999). Determinación del carbamato de etilo en el vino: método de detección selectiva por cromatografía en fase gaseosa/espectrometría de masas. Luxemburgo: Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas. (L99: 12-14) (disponibilidad Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas)

Dittrich, H. H. (1987). *Mikrobiologie des Weines*. 2. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.

Divol, B., Tonon, T., Morichon, S., Gindreau, E. y Lonvaud-Funel, A. (2003). Molecular characterization of *Oenococcus oeni* genes encoding proteins involved in arginine transport. *Journal of Applied Microbiology*. 94, pp. 738-746.

Dukes, B. C. y Butzke, C. E. (1998). Rapid determination of primary amino acids in grape juice using an o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine spectrophotometric assay. *American Journal of Enology and Viticulture*. 49, pp. 125-134.

Farley, D. (1988, septiembre). *Urethane in Alcoholic Beverages*. Recuperado el 3 de mayo de 2002, de <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/fc0988ur.html>.

Foulke, J. E. (1993, enero-febrero). *Urethane in Alcoholic Beverages Under Investigation*. Recuperado el 3 de mayo de 2002, de <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/fc0293ur.html>.

Franco, E. (1992). Fermentación maloláctica con uvas y vinos de Aragón. Inducción en uvas con *Lactobacillus plantarum* y en vinos con *Leuconostoc oenos*. *Vitivinicultura*, 9-10, pp. 54-57.

Gallander, J. F. (1979). Research Note. Effect of time of bacterial inoculation on the stimulation of malo-lactic fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*. 30, pp. 157-159.

García, M. J., Zúñiga, M. y Uruburu, F. (1992). Revisión: El metabolismo y el control de las bacterias lácticas en el vino. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 32 (3), pp. 233-268.

Garrity, G. M., Bell, J. A. y Lilburn T. G. (2004). *Taxonomic Outline of the Prokaryotes: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Release 5.0, May 2004*. New York: Springer-Verlag.

Gerbaux, V. (2006) Incidencia cualitativa de la siembra bacteriana en los vinos tintos. En *Informe Técnico "Fermentación Maloláctica"*. (pp. 77-83). Madrid: Fundación para la cultura del vino.

Giannakopoulos, P. I., Markakis, P. y Howell, G. S. (1984). The influence of malolactic strain on the fermentation on wine quality of three eastern red wine grape cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*. 35, pp. 1-4.

Gilboe, D. D. y Williams, J. N. (1956). Evaluation of the Sakaguchi reaction for quantitative determination of arginine. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 91(4), pp. 535-536.

Gockowiak, H. y Henschke, P. A. (2003). Interaction of pH, ethanol concentration and wine matrix on induction of malolactic fermentation with commercial "direct inoculation" starter cultures. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 9, pp. 200-209.

Herbert, P., Santos, L. y Alves, A. (2001). Simultaneous quantification of primary, secondary amino acids, and biogenic amines in musts and wines using OPA/3-MPA/FMOC-Cl fluorescent derivatives. *Journal of Food Science*. 66, pp. 1319-1325.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath P. H. A., Staley, J. T. y Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. (9ª ed.). Baltimore: Williams & Wilkins.

Holz, H. M. (1990). *Lo que debiera saberse sobre la microscopia de fluorescencia*. (4º ed. Revisada). Alemania Occidental: Carl Zeiss.

Huang, Y.-C., Edwards, C. G., Peterson, J. C. y Haag, K. M. (1996). Relationship between sluggish fermentations and the antagonism of yeast by lactic acid bacteria. *American Journal of Enology and Viticulture*. 47, pp. 1-10.

Ingargiola, M-C. (1992). *Etude du carbamate d'ethyle dans les vins*. Tesis doctoral. Universite de Bordeaux II. Bordeaux.

Kandler, O. y Weiss, N. (1986). Regular, nonsporing gram-positive rods. En Holt, J. G., Sneath, P. H. A. (ed.) *Bergey's manual of sistematic bacteriology: Vol. 2*. (pp. 1208-1234). Baltimore: Williams and Wilkins Co.

King, S. W. y Beelman, R. B. (1986). Metabolic interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system. *American Journal of Enology and Viticulture*. 37, pp. 53-60.

Krieger, S. (2005). Determining when to add malolactic bacteria. En Morenzoni, R. y Spech, K. (ed) *Malolactic Fermentation in Wine: Understanding the science and the practice*. (pp. 12:1-12:10). Montréal, Canada: Lallemand Inc.

Krieger, S. (2006a). Historia de la bacteria maloláctica en el vino. En *Informe Técnico "Fermentación Maloláctica"*. (pp. 9-17). Madrid: Fundación para la cultura del vino.

Krieger, S. (2006b). Los tipos de vino y el momento óptimo para la inoculación: Cómo controlar el proceso. En *Informe Técnico "Fermentación Maloláctica"*. (pp. 87-95). Madrid: Fundación para la cultura del vino.

Krieger, S. (2006c). Mirando al futuro. En Morenzoni, R., Specht, K. y Dumont A. (ed.) *La Fermentación Maloláctica del Vino: Conocimientos Científicos y Prácticos*. (pp. 15:1-15:6). Montreal, Canadá. Lallemand Inc.

Kristiansen, E., Clemmensen, S. y Meyer, O. (1990). Chronic ethanol intake and reduction of lung tumours from urethane in strain A mice. *Food and Chemical Toxicology*. 28 (1), pp. 35-38.

Kunke, R. E. (1967). Malo-lactic fermentation. *Advances in Applied Microbiology*. 9, pp. 235-279.

Kyne, A. y Gertsen-Briand, S. (2006). Guía para resolver problemas: aplicación práctica. En *Informe Técnico "Fermentación Maloláctica"*. (pp. 47-50). Madrid: Fundación para la cultura del vino.

Lallemand Inc. (1998). *Lallemand Winemaking Update: Number 1. Stuck Fermentations*. Recuperado el 4 de agosto de 2005, de <http://www.lallemand.com/oenology/Images/PDF/WinemakingUpdate/1-1Stuckferm.pdf>.

Lallemand Inc. (2000). *Lallemand Winemaking Update: Issue 3. Malolactic bacteria*. Recuperado el 4 de agosto de 2005, de <http://www.lallemand.com/Oenology/Images/PDF/WinemakingUpdate/1-3Malobact.pdf>.

Landete, J. M., Ferrer, S. y Pardo, I. (2001). Producción de aminas biogénicas por bacterias lácticas de origen enológico. En Editorial de la UPV (ed.). *Gienol: VI jornadas científicas; Grupos de investigación enológica* (pp. 277-281). Valencia: Editorial UPV.

Laure, F. y Froudière, I. (1994). La epifluorescencia puede contar los microorganismos vivos. En *Temas actuales en la microbiología enológica: IX Cursos Rioja'94, Haro* (pp. 91-106). Haro: Ayuntamiento.

Laurent, M. H., Henick-Kling, T. y Acree, T. E. (1994). Changes in the aroma and odor of Chardonnay due to malolactic fermentation. *Wein-Wissenschaft*. 49, pp. 3-10.

Liu, S.-Q. (1993). *Arginine metabolism in malolactic wine lactic acid bacteria and its oenological implications*. Tesis doctoral. Massey University, Palmerston North. New Zealand.

Liu, S.-Q., Pritchard, G. G., Hardman, M. J. y Pilone, G. J. (1994). Citrulline production and ethyl carbamate (urethane) precursor formation from arginine degradation by wine lactic acid bacteria *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus buchneri*. *American Journal of Enology and Viticulture*. 45, pp. 235-242.

Liu, S.-Q., Davis, C. R., y Brooks, J. D. (1995a). Growth and metabolism of selected lactic acid bacteria in synthetic wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 46, pp. 166-174.

Liu, S.-Q., Pritchard, G. G., Hardman, M. J. y Pilone, G. J. (1995b). Occurrence of arginine deiminase pathway enzymes in arginine catabolism by wine lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, pp. 310-316.

Liu, S.-Q., Pritchard, G. G., Hardman, M. J. y Pilone, G. J. (1996). Arginine catabolism in wine lactic acid bacteria: is it via the arginine deiminase pathway or the arginase-urease pathway? *Journal of Applied Bacteriology*. 81, pp. 486-492.

Liu, S.-Q. (2002). A review. Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification. *Journal of Applied Microbiology*. 92, pp. 589-601.

Lofroth, G y Gejvall, T. (1971). Diethyl pyrocarbonate: Formation of urethan in treated beverages. *Science*. 174, pp. 1248-1250.

Lonvaud-Funel, A. (1994). La fermentación maloláctica hoy. En *Temas actuales en la microbiología enológica: IX Cursos Rioja'94, Haro* (pp. 81-90). Haro: Ayuntamiento.

Lonvaud-Funel, A. (2001). Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 199, pp. 9-13.

Lonvaud-Funel, A. (2002). Interactions between lactic acid bacteria of wine and phenolic compounds. En *Nutritional Aspects II - Synergy between Yeast and Bacteria: Les Entretiens Scientifiques Lallemand*. (pp. 27-32). Francia: Lallemand S.A.

Lonvaud-Funel, A. (2006) Bacterias lácticas y fermentación maloláctica. En *Informe Técnico "Fermentación Maloláctica"* (pp. 23-29). Madrid: Fundación para la cultura del vino.

Loubser, P. (2006). Factores ambientales que afectan a la fermentación maloláctica. En Morenzoni, R., Specht, K. y Dumont A. (ed.) *La Fermentación Maloláctica del Vino. Conocimientos Científicos y Prácticos*. (pp. 9:1-9:5). Montreal, Canadá: Lallemand Inc.

Masqué, M. C. (1992). *Fermentació malolàctica en vins negres de les comarques del sud de Catalunya: aïllament, selecció i estudi de bacteris autòctons*. Tesis doctoral. Universitat Rovira i Virgili. Tarragona.

Masqué, M. C., Bordons, A. y Guardiola, S. (1994). La fermentación maloláctica en los vinos. *Ibérica, tecnología de alimentos*. Febrero 94, pp. 92-96.

Masqué, M. C., Soler, M., Zaplana, B., Franquet, R., Rico, S., Elorduy, X., Puig, A., Bertran, E., Capdevila, F., Palacios, A. T., Romero, S. V., Heras, J. M., Krieger-Weber, S. (2010). Ethyl carbamate content in wines with malolactic fermentation induced at different points of the vinification process. *Annals of Microbiology*. In Press. DOI: 10.1007/s13213-010-0071-y.

Mesas, J. M. y Alegre, M. T. (1999). El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. 2 (4): 174-183.

Minguez, S. (1988). *Informe referente a la jornada de estudio sobre el carbamato de etilo*. Vilafranca del Penedès (disponibilidad Biblioteca de Enología de la Universitat Rovira i Virgili).

Mira de Orduna R., Liu, S.-Q., Patchett, M. L. y Pilone, G. J. (2000a). Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 183 (1), pp. 31-35.

Mira de Orduna R., Liu, S.-Q., Patchett, M. L. y Pilone, G. J. (2000b). Kinetics of the arginine metabolism of malolactic wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* CUC-3 and *Oenococcus oeni* Lo111. *Journal of Applied Microbiology*. 89, pp. 547-552.

Mira de Orduna R., Patchett, M. L., Liu, S.-Q. y Pilone, G. J. (2001). Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* and *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, pp. 1657-1662.

Molecular Probes Inc (2004). *LIVE/DEAD[®] BacLight. Bacterial Viability Kits. Product Information*. Recuperado el 5 de mayo de 2005, de <http://www.probes.com>.

Molina Úbeda, R. (2000). *Teoría de la clarificación de mostos y vinos y sus aplicaciones prácticas*. Madrid: AMV Ediciones. Mundi Prensa.

Monteiro, F. F., Trousdale, E. K. y Bisson, L. F. (1989). Ethyl carbamate formation in wine: use of radioactively labeled precursors to demonstrate the involvement of urea. *American Journal of Enology and Viticulture*. 40, pp. 1-8.

Murphy, M. G., L. O'Connor, D. Walsh, y S. Condon. (1985). Oxygen dependent lactate utilization by *Lactobacillus plantarum*. *Archives of Microbiology*. 121, pp 75-79.

OIV (2009). *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. Edition 2009*. Paris: International Organisation of Vine and Wine.

Ough, C. S. (1976a) Ethylcarbamate in fermented beverages and foods. I. Naturally occurring ethylcarbamate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 24, pp. 323-328.

Ough, C. S. (1976b) Ethylcarbamate in fermented beverages and foods. II. Possible formation of ethylcarbamate from diethyl dicarbonate addition to wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 24, pp. 328-331.

Ough, C. S. y Amerine, M. A. (1988). Nitrogen compound. En *Methods for analysis of musts and wines*. (2^a ed). (pp.172-195). New York: John Wiley & Sons.

Ough, C. S., Crowell, E. A. y Gutlove, B. R. (1988a). Carbamyl compound reactions with ethanol. *American Journal of Enology and Viticulture*. 39, pp. 239-242.

Ough, C. S., Crowell, E. A. y Mooney, L. A. (1988b). Formation of ethyl carbamate precursors during grape juice (chardonnay) fermentation. I. Addition of amino acids, urea, and ammonia: effects of fortification on intracellular and extracellular precursors. *American Journal of Enology and Viticulture*. 39, pp. 243-249.

Ough, C. S. (1991) Influence of nitrogen compounds in grapes on ethyl carbamate formation in wines. En: *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine* (pp. 165-171). Davis: American Society for Enology and Viticulture.

Pardo, I., García, M. J., Zúñiga, M. y Uruburu, F. (1988). Evaluation of the API 50 CHL system for identification of *Leuconostoc oenos*. *American Journal of Enology and Viticulture*. 39, pp. 347-350.

Pilone, G. J. y Kunkee, R. E. (1976). Stimulatory effect of malo-lactic fermentation on the growth rate of *Leuconostoc oenos*. *Applied and Environmental Microbiology*. 32, pp. 405-408.

Pilone, G. J., Clayton, M. G. y Van Duivenboden, R. J. (1991). Characterization of wine lactic acid bacteria: single broth culture for test of heterofermentation, mannitol from fructose, and ammonia from arginine. *American Journal of Enology and Viticultura*. 42, pp. 153-157.

Poolman, B., Driessen, A. J. M. y Konings, W. N. (1987). Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. 169, pp. 5597-5604.

Radler, F. (1963). Über die Milchsäurebakterien des Weines und den biologischen Säureabbau. Übersicht. II. Physiologie und Ökologie der Bakterien. *Vitis*. 3, pp. 207-236.

Radler, F. (1982). The metabolism of organic acids by *Saccharomyces*. *Grape and Wine Cent. Symposium*. (pp. 103-108). Davis: University of California.

Reguant, C. (2001). *Identificació molecular de soques d'Oenococcus oeni i efecte de diverses condicions de vinificació sobre la seva dinàmica de poblacions*. Tesis doctoral. Universitat Rovira i Virgili. Departament de Bioquímica i Biotecnologia Tarragona.

Reguant, C. y Bordons, A. (2003). Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *Journal of Applied Microbiology*. 95, pp. 344-353.

Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribéreau-Gayon, P., Sudraud, P. (1992). *Tratado de Enología. Ciencias y Técnicas del Vino. Tomo III: Vinificación. Transformación del Vino*. Argentina: Editorial Hemisferio Sur S.A.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. y Lonvaud-Funel, A. (2000). *Handbook of Enology: Volume. 1. The Microbiology of Wine and Vinifications*. England: John Wiley & Sons, Ltd.

Rodríguez, A. V. y Manca de Nadra, M. C. (1998). Mixed culture of *Pediococcus pentosaceus* and *Leuconostoc oenos*: Effect of ethanol on microbial interaction. *MAN Microbiologie, Aliments, Nutrition*. 16, pp. 9-16.

Rosi, I., Fia, G. y Canuti, V. (2003). Influence of different pH values and inoculation time on the growth and malolactic activity of a strain of *Oenococcus oeni*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 9, pp. 194-199.

Salema, M., Lolkema, J. S., San Romão, M. V. y Loureiro Dias, M. C.. (1996a). The proton motive force generated in *Leuconostoc oenos* by L-malate fermentation. *Journal of Bacteriology*. 178 (11), pp. 3127-3132.

Salema, M., Capucho, I., Poolman, B., San Romão, M. V. y Loureiro Dias, M. C. (1996b). In vitro reassembly of the malolactic fermentation pathway of *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*). *Journal of Bacteriology*. 178 (18), pp. 5537-5539.

Schlatter, J. y Lutz, W. K. (1990). The carcinogenesis potential of ethyl carbamate (urethane): risk assessment at human dietary exposure levels. *Food and Chemical Toxicology*. 28(3), pp. 205-221.

Schleifer, K. H. (1986). Gram-positive cocci. En Holt, J. G., Sneath, P. H. A. (ed.) *Bergey's manual of sistematyc bacteriology: Vol. 2*. (pp. 999-1103). Baltimore: Williams and Wilkins Co.

Schmahl, D., Port, R. y Warendorf, J. (1977). A dose-response study on urethane carcinogenesis in rats and mice. *International Journal of Cancer*. 19 (1), pp. 77-80.

Segal, M. (1988, abril). *Too Many Drinks Spiked with Urethane*. Recuperado el 3 de mayo de 2002, de <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/fc0488ur.html>

Shimazu, Y., Uehara, M. y Watanbe, M. (1985). Transformation of citric acid to acetic acid, acetoin and diacetyl by wine making lactic acid bacteria. *Agricultural and biological chemistry*. 49, pp. 2147-2157.

Singleton, P. (2004). *Bacterias en Biología, Biotecnología y Medicina*. Zaragoza: Editorial Acribia, S. A.

Sotomayor, R. E. y Washington, M. C. (1996). Formation of etheno and oxoethyl adducts in liver DNA from rats exposed subchronically to urethane in drinking water and ethanol. *Cancer Letters*. 100, pp. 155-161.

Spano, G., Chieppa, G., Beneduce, L. y Massa, S. (2004). Expression analysis of putative *arcA*, *arcB* and *arcC* genes partially cloned from *Lactobacillus plantarum* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*. 96, pp. 185–193.

Sponholz, W. R. (1991) Nitrogen compounds in grapes, must, and wine. En *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine* (pp. 67-77). Davis: American Society for Enology and Viticulture.

Stendid, J., Karlsson, J. O. y Hogberg, N. (1994) Intraspecific genetic variation in *Heterobasidium annosum* revealed by amplification of minisatellite DNA. *Mycology Research* 98, 57-63.

Stevens, D. F. y Ough, C. S. (1993). Ethyl carbamate formation: reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*. 44, pp. 309-312.

Suárez Lepe, J. A., Iñigo, B. (1988). *Microbiología enológica*. Bilbao: Ediciones Mundi-Prensa.

Suárez Lepe, J. A. (2001). La fermentación maloláctica y la generación de aminas biógenas y carbamato de etilo. En *Jornada Enológica Internacional de Firavi: Las bacterias lácticas en la Enología. Inducción, control y práctica de la Fermentación maloláctica*. Vilafranca del Penedès.

Suárez Lepe, J. A. e Iñigo Leal, B. (2004). *Microbiología enológica: Fundamentos de Vinificación*. (3ª ed.). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.

Tegmo-Larsson, I.-M, Spittler, T. D. y Rodriguez, S. B. (1989). Effect of malolactic fermentation on ethyl carbamate formation in chardonnay wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 40, pp. 106-108.

Tegmo-Larsson, I.-M y Henick-Kling, T. (1990a). Ethyl carbamate precursors in grape juice and the efficiency of acid ureasa on their removal. *American Journal of Enology and Viticulture*. 41, pp. 189-192.

Tegmo-Larsson, I.-M y Henick-Kling, T. (1990b). The effect of fermentation and extended lees contact on ethyl carbamate formation in New York wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 41, pp. 269-272.

Tegmo-Larsson, I.-M y Spittler, T. D. (1990). Temperature and light effects on ethyl carbamate formation in wine during storage. *Journal of Food Science*. 55 (4), pp.1166-7,1169.

Theodore, D. (2006) Panorámica-conocimientos prácticos de la fermentación maloláctica. En Morenzoni, R., Specht, K. y Dumont A. (ed.) *La Fermentación Maloláctica del Vino. Conocimientos Científicos y Prácticos*. (pp. 10:1-10:3). Montreal, Canadá: Lallemand Inc.

Tonon, T. y Lonvaud Funel, A. (2000). Metabolism of arginine and its positive effect on growth and revival of *Oenococcus oeni*. *Journal of Applied Microbiology*. 89, pp. 526-531.

Tonon, T., Bourdineaud, J. P. y Lonvaud Funel, A. (2001). The arcABC gene cluster encoding the arginine deiminase pathway of *Oenococcus oeni*, and arginine induction of a CRP-like gene. *Research in Microbiology*. 152, pp. 653-661.

Tonon, T. y Lonvaud Funel, A. (2002). Arginine metabolism by wine lactobacilli isolated from wine. *Food Microbiology*. 19, pp. 451-461.

Trioli, G. y Colagrande, O. (1991). El carbamato de etilo en el vino. *Vitivinicultura*. 2, pp. 45-50.

Uthurry, C. A., Varela, F., Colomo, B, Suárez Lepe, J. A., Lombardero, J y García del Hierro, J. R. (2004). Ethyl carbamate concentrations of typical Spanish red wines. *Food Chemistry*. 88, pp. 329-336.

Uthurry, C. A. (2005). *Contribución al estudio de la formación de carbamato de etilo en vinos tintos*. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Madrid.

Valentine, R. C. y Bradfield, J. R. G. (1954). The urea method for bacterial viability counts with the electron microscope and its relation to other viability counting methods. *Journal of General Microbiology*. 11, pp. 349-357.

Vivas, N., Augustin, M. y Lonvaud-Funel, A. (2000). Influence of oak wood and grape tannins on the lactic acid bacterium *Oenococcus Oeni* (*Leuconostoc Oenos*, 8413). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80 (11), pp. 1675-1678.

Wadell, W. J., Marlowe, C. y Pierce, W. M. (1987) Inhibition of the localization of urethane in mouse tissues by ethanol. *Food and Chemical Toxicology*. 25 (7), pp. 527-531.

Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C. R., Fleet, G. H. y Lee, T. H. (1985). Occurrence and Growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*. 36, pp. 302-313.

World Health Organization. (1966). *Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: some antimicrobials, antioxidants, emulsifiers, stabilizers, flour-treatment agents, acids, and bases. 9 report of the Joint FAO-WHO Expert Committee on Food Additives*. Rome, 13-20 December 1965. (Technical Report Series. 339, pp. 1-24).

World Health Organization. (1967). *Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: some emulsifiers and stabilizers and certain other substances. 10 report of the Joint FAO-WHO Expert Committee on Food Additives*. Geneva, 11-18 October 1966. (Technical Report Series. 373, pp. 5-47).

World Health Organization. (1973). *Evaluation of mercury, lead, cadmium and the food additives amaranth, diethylpyrocarbonate, and octyl gallate. 16 Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Geneva, 4-12 April 1972. (Technical Report Series. 505, pp. 25-26).

World Health Organization. (1974). *Toxicological evaluation of certain food additives with a review of general principles and of specifications. 17 report of the joint FAO-WHO Expert Committee on Food Additives*. Geneva, 25 June - 4 July 1973. (Technical Report Series. 539, pp. 1-40).

Yamamoto, T., Pierce, W. M., Hurst, H. E., Chen, D. y Wadell, W. J. (1988) Inhibition of the metabolism of urethane by ethanol. *Drug Metabolism and Disposition*. 16 (3), pp. 355-358.

Zambonelli, C. (1988). *Microbiologia e biotecnologia dei vini*. Bologna: Ed. Agricole.

Zamora, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. Madrid: A. Madrid Vicente, Ediciones y Ediciones Mundi-Prensa.

Zapparoli, G., Torriani, S., Pesente, P. y Dellaglio, F. (1998). Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Letters in Applied Microbiology*. 27, pp. 243-246.

Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump B. H. y Nury, F. S. (1995). *Wine analysis and production*. New York: Chapman and Hall.

Zuñiga, M., Pardo, I. y Ferrer, S. (1993). An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 18, pp. 37-42.

8. ANEXO A

Estudios para la minimización de producción de carbamato de etilo por las bacterias lácticas

A. Bordons, J. Gil, I. Araque, C. Reguant, R. Carreté
Dpto. Bioquímica i Biotecnologia, Unitat d'Enologia del
CeRTA, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona
S. Romero, y M.C. Masqué
Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI), Reus

El carbamato de etilo es uno de los pocos compuestos tóxicos para la salud, junto con las aminas biógenas, que ocasionalmente pueden aparecer en algunos vinos. Es un compuesto carcinogénico del que la legislación permite un máximo de 15-30 µg/l en vino. Se puede formar por reacción del etanol con la urea, o bien con la citrulina y el carbamilsulfato, productos de degradación de la arginina por las bacterias lácticas. En este trabajo se han realizado distintos estudios para conocer la capacidad de estas bacterias para producir los precursores del carbamato de etilo. Se ha evaluado la capacidad de degradar arginina y producir citrulina por parte de múltiples cepas. También se han puesto a punto técnicas moleculares para detectar la presencia de los genes implicados en la degradación de arginina por distintas especies de bacterias lácticas. Por otro lado se ha realizado una experiencia de vinificación en diferentes condiciones, cuantificando los niveles de carbamato de etilo y de sus precursores.

1. Introducción

1.1. Las bacterias lácticas y la fermentación maloláctica

El papel beneficioso más conocido de las bacterias lácticas (BL) en los vinos es la fermentación maloláctica (FML). La mayoría de mostos contiene una cierta cantidad de ácido L-málico (de 2 a 5 g/l), que tiene un gusto fuerte y no muy agradable. Normalmente después de la fermentación alcohólica (FA), las BL como *Oenococcus oeni* [9] realizan la FML, que es la descarboxilación de ácido L-málico a L-láctico, con desprendimiento de CO₂ [7]. Esta reacción la llevan a cabo porque tienen el enzima maloláctico, que requiere Mn⁺⁺ y NAD⁺ [24]. Como el málico es dicarboxílico y el láctico monocarboxílico, ello conlleva una reducción de la acidez, de 0,1 a 0,5 de pH. Esta desacidificación representa al mismo tiempo una mejora en la calidad del vino, al reducir el málico, y el láctico que aparece es más agradable y suave al gusto [13].

La intervención de *O. oeni* en los vinos conlleva otros aspectos beneficiosos, entre los que cabe destacar cambios en los contenidos de componen-

tes del vino, como el diacetilo, importante por su aroma de mantequilla o nata que caracteriza a muchos vinos que han realizado la FML [6]. Se produce por degradación del ácido cítrico por parte de las BL [20]. Finalmente, otro beneficio importante es la estabilidad microbiológica que se consigue con la FML, ya que los vinos en los que ésta ha tenido lugar se pueden embotellar sin riesgo de desarrollo posterior de las bacterias, que podría dar lugar a formación de gas (CO₂). Además, durante la FML las bacterias acaban el málico y otros nutrientes, disminuyendo el riesgo de crecimiento posterior de otras bacterias [13].

En algunas ocasiones el desarrollo de las BL y la misma FML pueden tener consecuencias negativas para la calidad de los vinos. Estos casos se producen esporádicamente, sobretudo cuando ha habido otros problemas previos a la FML, o de poco control de la vinificación. El más frecuente de estos perjuicios es el picado láctico, una producción en exceso de láctico y de acético. Puede suceder cuando hay proliferación de BL debido a que las levaduras no hayan acabado la FA, por diversos problemas de paradas de ésta [11].



1.2. El carbamato de etilo en vinos

Solamente hay dos compuestos tóxicos para los humanos que puedan ser atribuidos a las BL del vino: el carbamato de etilo (CE) y las aminas. Las aminas biógenas [28] como la histamina pueden llegar en ocasiones a más de 10 mg/l y su consumo puede conllevar diversas patologías, incluyendo trastornos cardíacos [27]. Pueden ser producidas por algunas BL por descarboxilación de los aminoácidos correspondientes y su aparición está relacionada con la falta de higiene durante la vinificación [18].

El carbamato de etilo ($\text{NH}_2\text{-CO-O-CH}_2\text{-CH}_3$) o uretano, tema objeto de este estudio, está considerado como carcinógeno. Se conoce su potencial carcinogénico en animales de experimentación, pero la información es insuficiente en humanos [26]. Se sabe que los metabolitos que se generan fisiológicamente a partir del CE, como el hidroxietiluretano, son capaces de establecer enlaces covalentes con el DNA, por lo que el CE puede considerarse genotóxico y por lo tanto carcinógeno [30]. Por ello, diferentes administraciones han establecido unos límites para la concentración de CE. Así, el Comité Codex de la FAO/OMS sobre aditivos alimentarios y contaminantes estableció en 1993 un máximo de referencia de 30 $\mu\text{g/l}$ en vinos de mesa. La legislación de USA regula su límite a un máximo de 15 $\mu\text{g/l}$. El CE no sólo se encuentra en vinos, sino que se ha detectado su presencia en otros alimentos obtenidos por fermentación, como el pan y los quesos, en concentraciones normalmente inferiores a 5 $\mu\text{g/kg}$ [21]. Los productos que contienen mayor cantidad son algunos destilados y licores, hasta 500 $\mu\text{g/l}$ [35].

El mecanismo de formación del CE más factible es la reacción del etanol con compuestos que poseen un grupo carbamilo (Fig. 1). Esta reacción se ve acelerada a temperatura elevada y

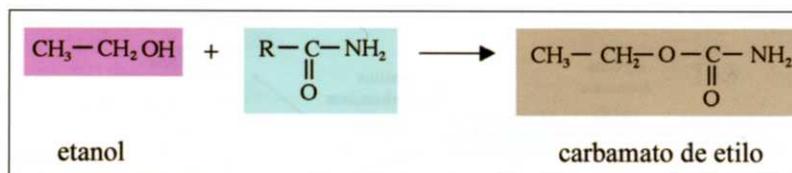


Figura 1. Formación de carbamato de etilo por reacción entre el etanol y los compuestos con un grupo carbamilo.

en ambiente ácido, como el del vino [22]. En el vino se encuentran de forma natural diversos compuestos carbamílicos que potencialmente podrían reaccionar con el etanol, dando CE. Algunos de estos compuestos son aminoácidos carbamílicos propios de la uva y otros proceden del metabolismo nitrogenado microbiano. Los principales son la urea, la citrulina y el carbamil fosfato.

La urea ($\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$) es probablemente el principal precursor del CE en el vino. Es producida por las levaduras en la FA como producto intermedio del catabolismo de la arginina y de las purinas. La arginina es degradada por la arginasa, dando ornitina y urea. En *Saccharomyces cerevisiae* la urea puede ser degradada a amoníaco y dióxido de carbono, pero esta degradación está regulada por arginina y por amonio, con lo cual si la fermentación tiene lugar en un medio rico en estos compuestos, una parte importante de la urea no será hidrolizada por las levaduras y se convertirá en producto final del metabolismo nitrogenado. La arginina es el aminoácido asimilable por las levaduras más abundante en la mayoría de mostos, hasta más de 2.000 mg/l. Si se fermenta un mosto con contenidos altos de nitrógeno (como arginina, sobretodo), es probable encontrar en el vino cantidades importantes de urea [34].

1.3. Los precursores de carbamato de etilo y la degradación de arginina por las bacterias lácticas

Aparte de la urea, los otros compuestos con grupo carbamilo que se pueden encontrar en vinos son la citrulina y el carba-

mil-fosfato. La citrulina ($\text{NH}_2\text{-CO-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}(-\text{NH}_2)\text{-COOH}$) es el único aminoácido que puede reaccionar con etanol dando algo de CE. Es un aminoácido no proteico presente en pequeñas cantidades en los mostos y en vinos (hasta unos 80 mg/l). Sobre una base molecular, la citrulina tiene un rango de formación de CE de aproximadamente una cuarta parte del de la urea [31]. La reacción de la citrulina con el etanol ocurre preferentemente a temperaturas elevadas, pero también puede ocurrir más lentamente a temperaturas más bajas, como las que se almacena el vino.

Citrulina y carbamil-fosfato son productos de la degradación de la arginina por las BL [17] (Fig. 1). Siendo la arginina el aminoácido más abundante en mostos y vinos, los productos de su degradación pueden aparecer en cantidades significativas, aunque pequeñas. Se ha demostrado [16] que las BL del vino pueden degradar la arginina mediante la vía de la arginina deiminasa (ADI), ruta conocida de antemano en otras BL y otros microorganismos [1]. En el caso de *O. oeni*, previamente *Leuconostoc oenos*, a pesar de que ya se habían descrito algunas cepas degradadoras de arginina en esta especie [14], su descripción en el Manual Bergey's de 1986 [29] mencionaba erróneamente que las cepas de *Leuconostoc* (incluido *O. oeni*) no eran capaces de hidrolizar arginina.

La ruta ADI implica tres enzimas (Fig. 2): arginina-deiminasa (EC 3.5.3.6) (ADI), ornitina-transcarbamilasa (EC 2.1.3.3) (OTC) y carbamato quinasa (EC 2.7.2.2) (CK). Como esta última reacción va acoplada a la síntesis de ATP,

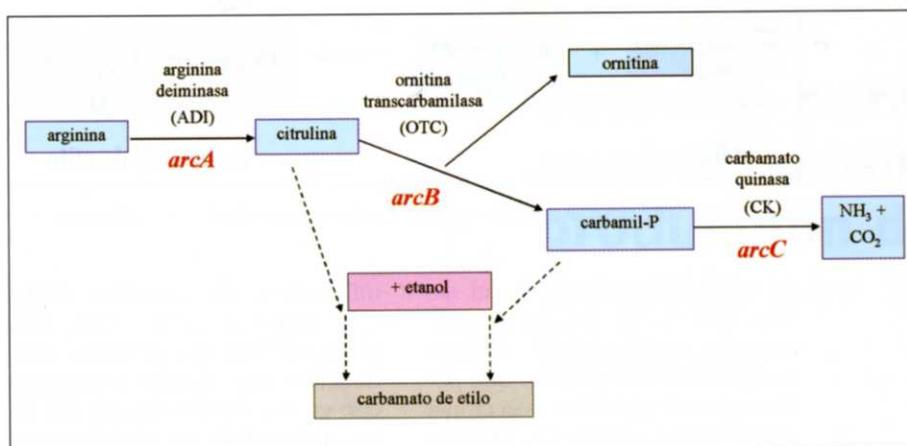


Figura 2. Vía ADI de degradación de arginina por bacterias lácticas y posible formación de carbamato de etilo al reaccionar la citrulina o el carbamil-fosfato con el etanol.

esta ruta es ventajosa energéticamente para las bacterias que la utilizan, de tal manera que la degradación completa de la arginina favorece su crecimiento [32]. Además de estos tres enzimas, también está involucrada en la degradación de arginina una proteína de transporte antiport de membrana, que intercambia la entrada celular de arginina con la salida de la ornitina producida [23]. Los genes que codifican para los tres enzimas de la ruta ADI (*arcA*, *arcB*, *arcC*) junto con el gen que codifica para la proteína de transporte (*arcD*) forman un operón y han sido secuenciados en *Oenococcus oeni* [33, 10] y otras bacterias.

En función de la especie y la cepa de BL, existe bastante variabilidad en la capacidad de degradación de arginina. Por otro lado, esta degradación puede ser completa, hasta amoníaco y CO₂. En este caso no hay acumulación de citrulina y carbamil-fosfato, precursores de CE, pero la forma-

ción de amoníaco implica una subida de pH, lo cual facilita el crecimiento de otras bacterias no deseadas en vino y tampoco es conveniente organolépticamente para vinos no muy ácidos. En otros casos la degradación de arginina puede ser incompleta. Hay especies o cepas que pueden tener inhibida la última reacción (carbamato-quinasa, CK) por la presencia de otras fuentes de energía o en función de las condiciones (pH, etanol, etc). En estos casos se pueden acumular los intermediarios citrulina y/o carbamil-fosfato [8].

Los tres enzimas, ADI, OTC y CK, de la ruta de degradación de la arginina han sido bien caracterizados en otras BL como *Lactobacillus sake* [36], *Lab. hilgardii* [3] y *Lab. plantarum* [2] pero en *O. oeni*, aunque se han analizado sus actividades en algunas cepas [16], todavía no se conocen con suficiente profundidad y tampoco se conoce el modo de regulación de los genes implicados.

De todo ello se deduce que es importante recabar información sobre la capacidad de distintas cepas de BL para degradar la arginina. En el caso de *O. oeni*, el estudio de sus diversas cepas está relacionado con el objetivo de seleccionar cultivos estériles que conduzcan la FML con un mínimo riesgo de producción de precursores de CE. En el caso de otras especies diferentes a *O. oeni*, es necesario conocer los riesgos de la aparición de los precursores de CE por las diferentes especies y en qué condiciones de vinificación puede aumentar la posibilidad de producción de estos precursores. Finalmente, también es necesario conocer cuáles son las condiciones de vinificación que minimicen la degradación de arginina, la producción de precursores de CE, y la potencialidad de aparición de éste a partir de los precursores. Nuestro grupo está estudiando estos diversos aspectos, con el objetivo final de minimizar la presencia de carbamato de etilo en vinos. A continuación se comentan algunos de los resultados más relevantes obtenidos hasta el momento.

2. Evaluación de la degradación de arginina por cepas de bacterias lácticas

Se ha evaluado la capacidad de degradación de arginina en ensayos a nivel de laboratorio por 50 cepas de *O. oeni* y 54 de otras especies de BL presentes en vinos. Entre las cepas se han incluido tanto algunas comerciales, como otras procedentes de

Tabla I. Degradación de arginina (5 g/l) en medio MRS modificado en cepas de bacterias lácticas

Especie	Cepas ensayadas	% Arg. degradada	Especie	Cepas ensayadas	% Arg. degradada
<i>Oenococcus oeni</i>	50	0-98	<i>Lactobacillus casei</i>	2	0
<i>Lactobacillus brevis</i>	12	78-100	<i>Lactob. plantarum</i>	3	0
<i>Lactob. hilgardii</i>	4	88-93	Otros <i>Lactobacillus</i>	12	0-99
<i>Lactob. buchneri</i>	3	61-99	<i>Pediococcus damnosus</i>	1	49
<i>Lactob. fructivorans</i>	1	19	<i>Ped. pentosaceus</i>	4	88-100
<i>Leuco. mesenteroides</i>	3	0	<i>Ped. acidilactici</i>	1	99
<i>Weissella confusa</i>	1	98	<i>Ped. parvulus</i>	4	0



colecciones de cultivo, incluyendo las cepas tipo de las diferentes especies, como otras aisladas previamente por nuestro grupo y otros. Para ello se ha hecho crecer cada cepa en 5 ml de medio MRS modificado [33] con la adición de 5 g/l arginina y 5 g/l glucosa a pH 4.5 a 27°C y una vez crecidas se ha determinado la arginina del sobrenadante mediante el método colorimétrico de Gilboe y Williams [12] basado en la reacción de Sakaguchi.

Se ha encontrado una gran variabilidad en la capacidad de degradación de arginina por *O. oeni* (Tabla I). Aproximadamente un tercio de las cepas ensayadas prácticamente no degradaron arginina, pero otro tercio degradaron más del 80% del contenido inicial, y en el resto se obtuvo degradación parcial, entre un 20 y un 60%. Respecto a las cepas de otras BL, se ha visto que la mayoría de lactobacilos heterofermentativos ensayados, como *Lac. brevis* y *Lac. hilgardii*, tiene una alta capacidad de degradación de arginina. También degradan casi toda la arginina las cepas de *Ped. pentosaceus*, *Ped. inopinatus* y *Ped. acidilactici*. Finalmente no se ha detectado degradación en *Leu. mesenteroides*, *Ped. parvulus*, y en los lactobacilos homofermentativos *Lac. casei* y *Lac. plantarum*.

Por otro lado, se ha procedido a estudiar en estas cepas la cinética de degradación de la arginina y aparición de citrulina, como posible precursor de CE. También se ha cuantificado la ornitina como producto de degradación de la citrulina (Fig. 2). Estos ensayos se han efectuado con células en reposo metabólico o no proliferantes (*resting cells*), estado parecido al que se encuentran en el vino, donde prácticamente no disponen de nutrientes. Para ello se ha hecho crecer cada cepa previamente en medio rico y se han recogido las células y se han resuspendido en un tampón con 7,5 g/l de ácido tartárico, 200 mg/l MgSO₄

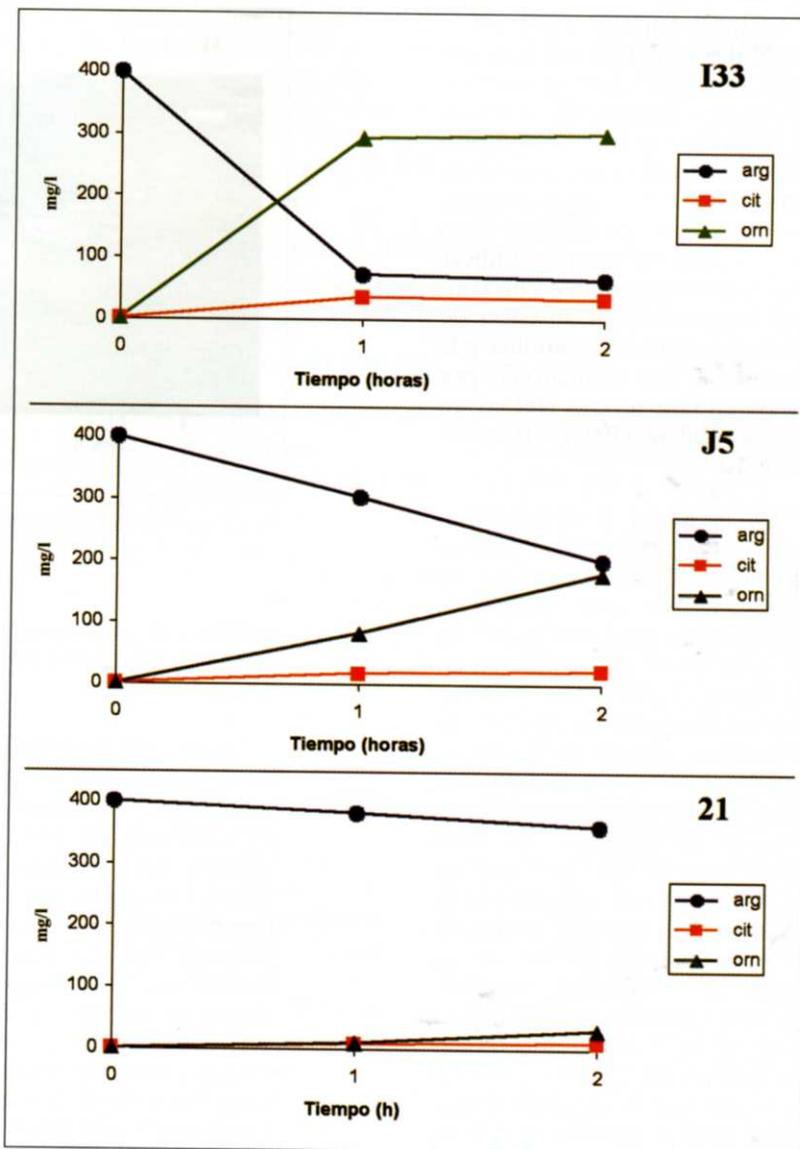


Figura 3. Ejemplos de diversas cinéticas de degradación de argina con formación de citrulina y ornitina en tres cepas (I33, J52 y 218).

Tabla II. Oligonucleótidos de DNA empleados como cebadores de PCR usados para la detección de los genes del operón ADI en *Oenococcus oeni*. arcA: arginina-deiminasa; arcB: ornitina-transcarbamilasa; arcC: carbamato-quinasa; arcD: proteína antiport arginina-ornitina. Programa de PCR aplicado: 2 min 94°C, 30 ciclos de (1 min 94°C, 1 min 60°C, 1 min 72°C) y 10 min 72°C. T_m: temperatura de fusión. pb: pares de bases (longitud del fragmento amplificado)

Gen	Nombre cebadores	Secuencia (5'-3')	T _m , °C	Amplificado (pb)
arcA	ADlon3	CATTGAAGGTGGAGACGAAC (20)	51,6	479
	ADlon2	GCATTCGAAACATAGTTCCTGTCAT (25)	65,9	
arcB	OTCon1	CAAGGTAGAAGTTTGTGGCTGAA (24)	65,1	984
	OTCon2	CCTCATCGGTCACTTCCATTCT (23)	67,1	
arcC	CKon1	CAGGCAGCTTACGTGAAACAG (22)	65,1	804
	CKon2	CCACAGCCTCCACAACCATT (22)	69,1	
arcD	ARCDon1	CCGCTATCGGAATGATTATGT (21)	62	680
	ARCDon2	GCCATTGCTGGTTGGCTTAGA (21)	64	

y 50 mg/l $MnSO_4$, a pH 3.6 a 25°C, al que se han añadido 400 mg/l arginina, y se han tomado muestras a lo largo de 2 horas. La arginina se ha cuantificado por el método colorimétrico de Staron-Allard [19], que determina guanidinas en general pero que es muy útil para cuantificar rápidamente arginina en un tampón como éste en ausencia de otras guanidinas. La citrulina y la ornitina se han cuantificado por HPLC en fase reversa [18] en un equipo Agilent 1100, de Hewlett-Packard Co.

En la figura 3 se muestran unos ejemplos representativos de los resultados obtenidos en estos ensayos con células no proliferantes para tres cepas de *O. oeni*. Como se puede ver, en las cepas que degradan arginina hay un aumento en paralelo de la ornitina, que de hecho se conoce que es excretada de las células por el sistema antiport de entrada de arginina. En cualquier caso se ha visto que en todos los casos estudiados la cantidad de citrulina excretada es muy pequeña, incluso en las cepas que degradan completamente la arginina, en que llega a unos 30 mg/l de citrulina (como en la cepa I33), por lo que cabe concluir que la arginina degradada pasa a citrulina y ésta es transformada prácticamente toda en ornitina.

3. Detección de los genes de la ruta ADI en cepas de bacterias lácticas

Una condición imprescindible para que una cepa pueda degradar arginina y exista la posibilidad de llegar a producir precursores de CE es que tenga los genes de la ruta ADI de degradación de arginina. Por ello se ha procedido a poner a punto unas técnicas moleculares para detectar estos genes en cepas de *O. oeni* y de otras BL. Para ello se han diseñado oligonucleótidos como cebadores adecuados para poder amplificar por PCR (reacción en cadena de la DNA-polimerasa) fragmentos es-

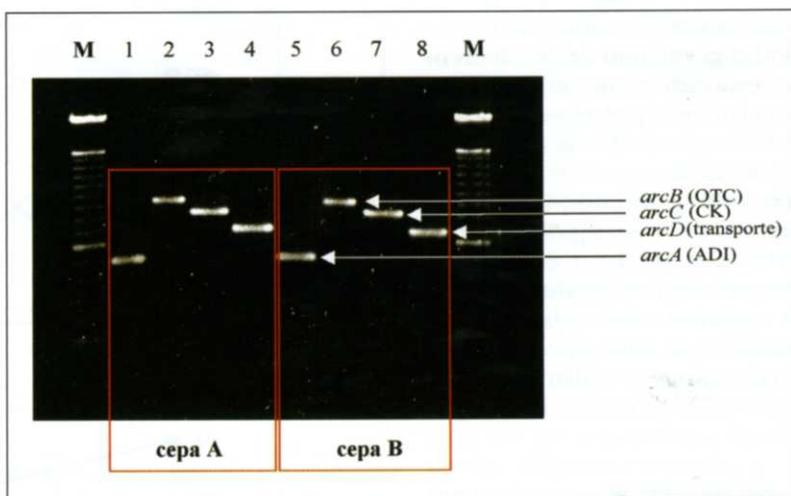


Figura 4. Fragmentos amplificados por PCR de los 4 genes del operon ADI de DNA de 2 cepas distintas de *O. oeni* (cepa A: calles 1, 2, 3, 4; cepa B: calles 5, 6, 7, 8). Calles M: marcador de peso molecular, ladder de 100 pb de Invitrogen.

pecíficos de estos genes y poder ver los amplificados por electroforesis.

En el caso de *O. oeni*, a partir de las secuencias genómicas publicadas para esta especie [33] de cada uno de los genes del operón ADI, se han diseñado varios cebadores posibles y se han escogido para ellos las condiciones óptimas para la PCR. También se ha comprobado que dichos cebadores no hibridaban con otros genes del mismo microorganismo. Después se encargó su síntesis (Ecogen) y se ensayaron varios pares de cebadores para cada gen con DNA de cepas de colección, se optimizaron las condiciones de PCR y finalmente se seleccionaron los de la Tabla II, que dan amplificados de diferentes tamaños, fácilmente discriminables en las electroforesis. El DNA de las células se ha extraído tras lisis celular con lisozima, siguiendo el método puesto a punto en nuestro laboratorio [25]. Se han utilizado geles de agarosa (1%) durante 1 hora a 100 V y los geles se han teñido con bromuro de etidio.

Estos cebadores se han ensayado en las 50 cepas de *O. oeni* mencionadas y se ha demostrado su presencia en todas ellas. En la figura 4 se muestran como ejemplo las electroforesis correspondientes a dos cepas de

O. oeni, con las bandas de DNA amplificados de los 4 genes del operón ADI. El hecho de que los genes de la ruta ADI estén presentes en todas las cepas de *O. oeni* sugiere que la variabilidad en la degradación de arginina y que algunas cepas no la degraden es debido a variabilidad en la expresión de estos genes, ya sea por diferencias entre cepas a nivel de los promotores de los genes, más o menos afines por la RNA-polimerasa, o bien por mecanismos de regulación distintos entre cepas, que pueden variar en función de los componentes y condiciones del medio.

Por ello ahora se está procediendo a analizar la expresión de estos genes en *O. oeni* mediante RT-PCR. Ello consiste en obtener RNA total de las células y con transcriptasa inversa se obtiene cDNA, que se amplifica por PCR. Se han diseñado ya cebadores específicos para amplificar los cDNA. Esta técnica se está aplicando para analizar los transcritos que se producen en diferentes condiciones de vino simulado, como diversas concentraciones de arginina, de etanol y diferentes pH.

Para detectar los genes ADI en cepas de otras especies de BL presentes en las vinificaciones, se han diseñado oligonucleótidos cebadores degenerados a partir



de alineamientos de las secuencias conocidas en otras BL. Estos cebadores se han utilizado para detectar los genes de ADI, OTC y CK en unas 20 cepas de diferentes *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* y se ha demostrado su presencia en todas las cepas de *Lac. bilgardii*, *Lac. brevis*, *Lac. buchneri* y *Ped. pentosaceus*, mientras que ha resultado negativo para las cepas de *Leu. mesenteroides* y *Ped. parvulus*, coincidiendo con su perfil degradativo de arginina. Los fragmentos amplificados obtenidos (266, 181 y 343 pb, respectivamente) se han secuenciado y se han comparado con las secuencias publicadas de estos genes de BL relacionadas, confirmando su homología.

4. Influencia de diferentes condiciones de vinificación en la aparición del carbamato de etilo

Durante la vendimia de 2002 se realizó un ensayo de vinificación para establecer la influencia de distintas condiciones sobre la formación del CE y de sus precursores. Para ello se utilizó uva tinta Tempranillo (catalán *Ull-de-Llebre*) procedente de las viñas de la Facultad de Enología de la URV en Constantí (Tarragona) y las vinificaciones se realizaron en la bodega experimental del Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI) de Reus. Las condiciones de vinificación estudiadas fueron: a) el tiempo de maceración con los hollejos durante la FA; b) la FML espontánea o bien inducida; c) la FML sobre las lías o no; y d) la conservación en botella.

La uva despalillada, estrujada y sulfitada se inoculó con una levadura comercial. A mitad de la FA (densidad 1.030 g/l) se paró la maceración de la mitad del volumen (maceración parcial: P), y el resto se dejó macerando hasta el final de la FA (maceración total: T). Acabadas las FAs el volumen de cada depósito se fraccionó de nuevo para realizar la FML en una parte sin lías y

otra parte con lías. Una parte del vino con maceración total y sin lías se inoculó con la cepa comercial de *O. oeni* Lactobacter de Laffort, S.A. Con ello se generaron 5 tipos de vinos en los que se realizó la FML:

- PN: maceración parcial, FML sin lías y espontánea.

- PL: maceración parcial, FML con lías y espontánea.

- TN: maceración total, FML sin lías y espontánea.

- TL: maceración total, FML con lías y espontánea.

- TNI: maceración total, FML sin lías e inoculada.

El vino se mantuvo a 20-22°C y al finalizar las FML el vino fue trasegado, sulfitado y embotellado. La experiencia se llevó a cabo por duplicado. Además de los análisis estándar de densidad, etanol, ácido málico, población de BL viables y otros, en las muestras se cuantificaron urea, arginina, citrulina y carbamato de etilo. Para la urea se usó el kit enzimático de Boehringer. La arginina se determinó por el método de Sakaguchi [12]. La citrulina se cuantificó por la reacción colorimétrica con acetil monoxima, previa ebullición [5]. El carbamato de etilo se cuantificó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas [4].

En la Tabla III se muestran los resultados encontrados de citrulina y de carbamato de etilo. El contenido en urea durante la FA era de unos 200 mg/l pero al final de ésta y en todas las muestras posteriores era prácticamente inapreciable. La concentración de arginina en el mosto era de 960 mg/l, a mitad de FA de unos 200 mg/l y al final y después de la FA se mantuvo entre 250 y 400 mg/l.

Cabe señalar en primer lugar el bajo contenido en CE en todos los casos, llegando como mucho a unos 2 µg/l. Dado que no se encontraron trazas del mismo en el mosto, se puede concluir que la mayor parte de estas pequeñas cantidades se produjo a lo largo de la FA, probablemente por reacción con la urea que quedaba, y durante la FML prácticamente no aumentó. Tampoco se observó producción de CE durante la conservación del vino en botella, pese a que la citrulina aumentó ligeramente en este período. En cuanto a las condiciones estudiadas, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con FML sobre lías respecto a los demás, ni tampoco la exposición con los hollejos parece que afectara a la producción de CE pero sí que dió lugar a un mayor contenido en el precursor citrulina.

Tabla III. Contenidos en citrulina y carbamato de etilo a lo largo de una experiencia de vinificación con diferentes condiciones. PN: maceración parcial, FML sin lías y espontánea; PL: maceración parcial, FML con lías y espontánea; TN: maceración total, FML sin lías y espontánea; TL: maceración total, FML con lías y espontánea; TNI: maceración total, FML sin lías e inoculada con *O. oeni* Lactobacter (Laffort, S.A.)

Citrulina (mg/l)					
Etapa	PN	PL	TN	TL	TNI
final FA	45	45	85	85	85
mitad FML	88	81	78	85	78
final FML	80	70	117	94	88
3 meses botella	128	97	188	174	164
Carbamato de etilo (µg/l)					
Etapa	PN	PL	TN	TL	TNI
mitad FA	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
final FA	1,5	1,5	1,4	1,4	1,4
mitad FML	1,8	2,1	2,0	2,1	1,7
final FML	1,8	1,7	1,5	1,5	1,7
3 meses botella	2,0	1,6	1,6	1,5	1,7

5. Conclusiones

En *O. oeni* se ha observado una gran variabilidad entre cepas en la degradación de arginina y por lo tanto en la potencial producción de precursores de CE como la citrulina. Dado que se ha visto que los genes de la ruta ADI de degradación de arginina se encuentran en todas las cepas de esta especie, es preciso seleccionar aquellas cepas que tengan menor capacidad de expresión de estos genes y conocer en qué condiciones de vinificación existe menor riesgo de su expresión, y por lo tanto de producción de precursores de CE. En una vinificación experimental con diferentes condiciones de maceración de hollejos y realización de la FML en presencia de lías, se ha observado que las cantidades de CE que aparecen son muy pequeñas, muy por debajo de los límites admitidos. Parece que esta pequeña cantidad de CE se produce sobre todo a expensas de la urea durante la FA, y por lo tanto las BL no habrían contribuido a ello. Tampoco se ha observado influencia de las diferentes condiciones sobre la cantidad de CE. Únicamente se observó un pequeño incremento en la citrulina en los casos de maceración total respecto a la maceración parcial. Se puede concluir que si la vinificación en bodega se realiza con una higiene correcta y se controla la temperatura de conservación del vino, es muy difícil que aparezca carbamato de etilo en cantidades significativas como para ser un riesgo para la salud. De todas maneras, es preciso un mayor estudio de la capacidad de producción de precursores del CE por las cepas de BL en diferentes condiciones de vinificación.

6. Bibliografía

- [1] Abdelal, A.T. "Arginine catabolism by microorganisms". Annual Reviews of Microbiology, 33, pág. 139-168 (1979).
- [2] Arena, M.E., Saguir, F.M. y Manca de Nadra, M.C. "Arginine dihydrolase pathway in *Lactobacillus plantarum* from orange". International Journal of Food Microbiology, 47: 203-209 (1999).
- [3] Arena, M.E., Manca de Nadra y M.C., Muñoz, R. "The arginine deiminase pathway in the wine lactic acid bacterium *Lactobacillus hilgardii* XI: structural and functional study of the arcABC genes". Gene 301:61-66 (2002).
- [4] Canas, B.J., Joe, F.L., Diachenko, G.W. y Burns, G. "Determination of ethyl carbamate in alcoholic beverages and soy sauce by gas chromatography with mass selective detection: collaborative study". J. AOAC Inter. 77, 1530-1536 (1994).
- [5] Crow, V.L. y Thomas, T.D. "Arginine metabolism in lactic streptococci". Journal of Bacteriology, 150, 1024-1032 (1982).
- [6] Davis, C. R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T.H. y Fleet, G.H. "Practical implications of malolactic fermentation: a Review". American Journal of Enology and Viticulture, 36 (4): 290-301 (1985).
- [7] Davis, C. R., Wibowo, D., Lee, T.H. y Fleet, G. H. "Properties of wine lactic acid bacteria: their potential enological significance". American Journal of Enology and Viticulture, 39: 137-142 (1988).
- [8] De Orduña, R.M., Liu, S.Q., Patchett, M.L. y Pilone, G.J. "Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria". FEMS Microbiology Letters, 183, 31-35 (2000).
- [9] Dicks, L.M.T., Dellaglio, F. y Collins, M.D. "Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov.". International Journal of Systematic Bacteriology 45, 395-397 (1995).
- [10] Divol, B., Tonon, T., Morichon, S., Gindreau, E. y Lonvaud-Funel, A. "Molecular characterization of *Oenococcus oeni* genes encoding proteins involved in arginine transport". Journal of Applied Microbiology, 94, 738-746 (2003).
- [11] García, M.J., Zúñiga, M. y Uruburu, F. "Revisión: El metabolismo y el control de las bacterias lácticas en el vino". Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 32 (3): 233-268 (1992).
- [12] Gilboe, D. y Williams, J.N. "Evaluation of the Sakaguchi Reactions for Quantitative determination of Arginine". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 91, 535-536 (1956).
- [13] Henick-Kling, T. "Malolactic fermentation". G. H. Fleet (Ed.). Wine microbiology and biotechnology (pp. 289-326). Amsterdam: Harwood Academic (1993).
- [14] Kuensch, U., Temperli, A. y Mayer, K. "Conversion of arginine to ornithine during malolactic fermentation in a red Swiss wine". American Journal of Enology and Viticulture, 25, 191-193 (1974)
- [15] Lehtonen, P. "Determination of amines and amino acids in wine - A review". American Journal of Enology and Viticulture, 47, 2 (1996).
- [16] Liu, S.Q., Pritchard, G.G., Hardman, M.J. y Pilone, G.J. "Occurrence or arginine deiminase pathway enzymes in arginine catabolism by wine lactic acid bacteria". Applied and Environmental Microbiology, 61, 310-316 (1995).
- [17] Liu, S.Q. y Pilone, G.J. "A review - Arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance". Journal of Applied Microbiology, 84, 315-327 (1998).
- [18] Lonvaud-Funel, A. "Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria". FEMS Microbiology Letters, 199, 9-13 (2001).
- [19] Micklus, M.J. y Stein, I.M. "The Colorimetric Determination of Mono and Disubstituted Guanidines". Analytical Biochemistry, 54, 545- 553 (1973).
- [20] Nielsen, J.C., Prah, C. y Lonvaud-Funel, A.. "Malolactic fermentation in wine by direct inoculation with freeze-dried *Leuconostoc oenos* cultures. American Journal of Enology and Viticulture, 47: 42-48 (1996).
- [21] Ough, C.S. "Ethyl carbamate in fermented beverages and foods. I. Naturally occurring ethyl carbamate". J. Agric and Food Chemistry, 24, 323-328 (1976).
- [22] Ough, C.S., Crowell, E.A. y Gutlove, B.R. "Carbamyl compound reactions with ethanol". Amer. J. Enol. Vitic., 39, 239-242 (1988)..
- [23] Poolman, B., Driessen, A.J.M. y Konings, W.N. "Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis*". J. Bacteriology, 169, 5597-5604 (1987).
- [24] Radler, F., Schütz, M. y Doelle, H.W. "Die beim abbau von L-äpfelsäure durch milchsäurebakterien entstehenden isomeren der milchsäure". Naturwissenschaften, 57: 672-675 (1970).
- [25] Reguant, C. y Bordons, A. "Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation". Journal of Applied Microbiology, 95, 2, 344-353 (2003).
- [26] Schlatter, J. y Lutz, W.K., "The carcinogenic potential of ethyl carbamate (urethane): risk assessment at human dietary exposure levels". Food Chem. Toxicol., 28:3, 205-11 (1990).
- [27] Shalaby, A.R. "Significance of biogenic amines to food safety and human health". Food Research International, 29, 675-690 (1996).
- [28] Silla-Santos, M.H. "Biogenic amines: their importance in foods". Int. J. Food Microbiol., 29, 213-231 (1996).
- [29] Sneath, P.H.A. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", vol. 2. Baltimore, MA: Williams and Wilkins. (1986).
- [30] Sotomayor, R.E. y Collins, T.F., "Mutagenicity, metabolism, and DNA interactions of urethane" Toxicol. Ind. Health, Jan, 6:1, 71-108 (1990).
- [31] Stevens, D.F. y Ough, C.S. "Ethyl carbamate formation: reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature conditions". American Journal of Enology and Viticulture, 44, 309-312 (1993).
- [32] Tonon, T. y Lonvaud-Funel, A. "Metabolism of arginine and its positive effect on growth and revival of *Oenococcus oeni*". Journal of Applied Microbiology, 89, 526-531 (2000).
- [33] Tonon, T., Bourdineaud, J.P. y Lonvaud-Funel, A. "The arcABC gene cluster encoding the arginine deiminase pathway of *Oenococcus oeni*, and arginine induction of a CRP-like gene". Res. Microbiol. 152, 653-661 (2001).
- [34] Trioli, G. y Colagrande, O. "El carbamato de etilo en el vino". Vitivinicultura, 2, 45-50 (1991).
- [35] Vahl, M. "A survey of ethyl carbamate in beverages, bread and acidified milks sold in Denmark". Food Addit. Contam., 10:5, 585-92 (1993).
- [36] Zuñiga, M., Champomier-verges, M., Zagorec, M. y Pérez Martínez, G. "Structural and Functional Analysis of the gene cluster Encoding the enzymes of the Arginine Deiminase Pathway of *Lactobacillus sake*". Journal of Bacteriology, 80, 4154-4159 (1998).

Agradecimientos: El presente trabajo se ha realizado en el marco del proyecto de investigación AGL2000-0827-C02-02 del Ministerio de Ciencia y Tecnología. Joana Gil, Isabel Araque y Silvana Romero tienen becas predoctorales respectivamente de la Universidad Rovira i Virgili, de la Universidad de Pamplona (Colombia) y de la Generalitat de Catalunya.



9. ANEXO B

20. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE CARBAMATO DE ETILO EN VINOS TINTOS

Silvana V. Romero y Carme Masqué

Estació de Viticultura i Enologia. Passeig Sunyer, 2-4. 43202. Reus. Correo-e: incavi.reus@troc.es; silvana2001@latinmail.com

Albert Bordons

Departament de Bioquímica i Biotecnologia. Universitat Rovira i Virgili. Pl. Imperial Tàrraco, 1. 43005 Tarragona. Correo-e: abpd@astor.urv.es

RESUMEN

Se ha estudiado el efecto de distintas condiciones de vinificación sobre la producción de carbamato de etilo (CE) en vinos tintos. Se observa que la máxima producción de CE se produce durante la fermentación alcohólica, mientras que durante la fermentación maloláctica la concentración permanece estable tanto si es espontánea como inducida con una cepa comercial.

PALABRAS CLAVE: carbamato de etilo, bacterias lácticas, fermentación maloláctica, vinificación, maceración, vino.

INTRODUCCIÓN

Hace ya más de una década se describió la presencia de una sustancia cancerígena, el carbamato de etilo (CE), en algunas bebidas alcohólicas en cantidades significativas (5).

El CE ha sido utilizado como anestésico en animales pequeños y a dosis elevadas ha producido lesiones en pulmón, hígado y timo. Se forma a partir de diversos compuestos carbamílicos, como la urea producida por las levaduras, o la citrulina o el carbamil fosfato (procedentes del metabolismo de la arginina), producidas por bacterias lácticas, en presencia de etanol y pHs ácidos. Según se describe en la bibliografía la temperatura que se alcanza durante la fermentación alcohólica (FA) y acciones como las prácticas manuales, el almacenamiento y transporte del vino, favorecen la producción del CE (4).

Es por ello que en 1988 la Food and Drug Administration (FDA) limitó el máximo para carbamato de etilo en vinos de mesa (14% de etanol) en 15 ppb (4), y en 1997 el Center for Food Safety and Applied Nutrition de la FDA recomendó usar cepas comerciales de bacterias lácticas para la inducción de la fermentación maloláctica (FML) que no produjeran altos niveles de citrulina o monitorear el contenido de citrulina del mosto en la post-fermentación (1).

En el estudio que estamos llevando a cabo se pretende determinar la influencia de distintas condiciones de vinificación sobre la aparición de CE y sus precursores. También se pretende comprobar los niveles de estos compuestos presentes en vinos de distintas Denominaciones de Origen de Cataluña.

MATERIALES Y MÉTODOS

Vinificaciones: se utilizó uva tinta de la variedad Tempranillo procedente de la viña de la Facultad de Enología de la URV (Mas dels Frares).

Las condiciones de vinificación estudiadas fueron:

- tiempo de maceración con los hollejos durante la fermentación alcohólica (FA)
- FML inducida/espontánea
- FML sobre lías
- conservación

La uva despallada, estrujada y sulfitada se inoculó una levadura comercial. Aproximadamente a mitad de FA (densidad 1030) se paró la maceración de la mitad del volumen, y el resto se dejó macerando hasta el final de la FA. Una vez finalizada la FA el volumen de cada depósito se fraccionó nuevamente para realizar la FML en distintas condiciones:

- FML espontánea/inducida
- FML espontánea sobre lías

El vino se mantuvo a 20-22°C y al finalizar de la FML el vino fue trasegado, sulfitado y embotellado. La experiencia se llevó a cabo por duplicado.

Controles analíticos: La FA se controló mediante densidad y temperatura diariamente. A lo largo de la FML se determinaron ác. málico y población viable periódicamente. En el mosto, final de FA, mitad y final de FML se determinaron CE por cromatografía de gases con detección selectiva de masas, citrulina, arginina (3), urea y nitrógeno (2) por métodos colorimétricos o enzimáticos. En los vinos de final de FA y final de FML se determinaron además grado alcohólico, acidez total, acidez volátil, pH, concentración de anhídrido sulfuroso total y libre, según los métodos tradicionales, y otros compuestos por métodos enzimáticos (ácidos orgánicos y azúcares).

El seguimiento de la población de bacterias lácticas se realizó por recuento de unidades formadoras de colonias (u.f.c.) y por el recuento de viables por microscopía de epifluorescencia.

RESULTADOS

La FA evolucionó paralelamente para el tratamiento con maceración parcial (P) y el tratamiento con maceración total (T). Sin embargo, la FML fue más rápida para el tratamiento con FML inducida (TN') debido a que el desarrollo de la población viable de las bacterias lácticas comerciales fue más rápido que para las autóctonas. No se observaron diferencias entre los tratamientos con FML sobre lías (PL, TL) respecto a los demás (PN, TN).

En cuanto a los resultados analíticos, se observa que la máxima producción de CE se produce durante la FA, período en el que también se observa la máxima disminución de urea y citrulina, corroborando los resultados obtenidos por otros autores (5). Durante la FML los valores se mantienen estables para todos los tratamientos, y sólo se observa un lige-

ro aumento después de 3 meses de conservación en botella del vino obtenido con mace-
ración parcial y FML espontánea. En cualquier caso los valores de CE son inferiores a
2ppb, muy por debajo del límite autorizado (15ppb). Creemos interesante destacar que
la concentración de citrulina se mantiene estable a partir del final de la FA pero ligera-
mente superior en los vinos obtenidos en los tratamientos con maceración total.

BIBLIOGRAFÍA

Butzke, C.E. and L.F. Bisson. Ethyl Carbamate Preventative Action Manual.
<http://vm.cfsan.fda.gov/~frf/ecaction.html>

Dukes, B. C. and C. E. Butzke. Rapid Determination of Primary Amino Acid in Must
Using an OPA/NAC Spectrophotometric Assay. *Am. J. Enol. Vitic.* 49(2):125-133 (1998)

Gilboe, D. D., and J. N. Williams Jr. Evaluation of the Sakaguchi reaction for the quan-
titative determination of arginine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 91:535-6 (1956).

Segal M. Too Many Drinks Spiked with Urethane. vm.cfsan.fda.gov/~frf/fc0488ur.html

Trioli, G. y Colagrande, O. El carbamato de etilo en el vino. *Vitivinicultura.* 1991-2.45-
50

10. ANEXO C

Original article

Potential formation of ethyl carbamate in simulated wine inoculated with *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum*

Silvana V. Romero,¹ Cristina Reguant,² Albert Bordons^{2*} & M. Carme Masqué¹

¹ Estació de Viticultura i Enologia, Institut Català de la Vinya i el Vi (INCAVI), Passeig Sunyer, 2-4, 43202 Reus, Catalonia, Spain

² Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Marcel·lí Domingo, s/n, 43007 Tarragona, Catalonia, Spain

(Received 27 November 2008; Accepted in revised form 25 February 2009)

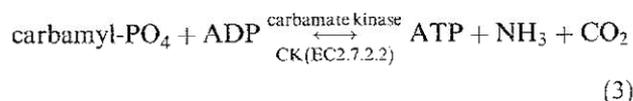
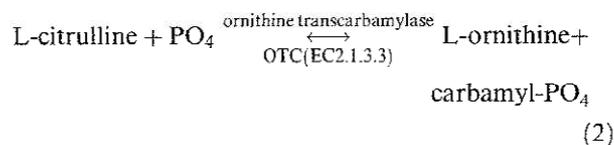
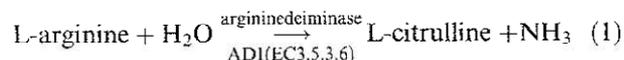
Summary The production of ethyl carbamate (EC) and its precursor citrulline by two strains of *Oenococcus oeni* and one of *Lactobacillus plantarum* during malolactic fermentation (MLF) was studied in different conditions of pH, temperature, and ethanol and L-malic acid concentrations. The potential EC, defined as the concentration of EC after wine is heated at 80 °C for 48 h, was also investigated. The *O. oeni* strains were able to degrade arginine in the conditions studied and to excrete some citrulline. In these strains, the conditions that led to a slight increase in EC were a high ethanol concentration, low pH and a high L-malic acid concentration. However, the potential EC increased with higher pH. In the case of *L. plantarum*, arginine was not degraded and citrulline was not produced, although the potential EC was comparable with that of the *O. oeni* strains studied.

Keywords Arginine, citrulline, ethyl carbamate, *Lactobacillus plantarum*, malolactic fermentation, *Oenococcus oeni*.

Introduction

Ethyl carbamate (EC), also known as urethane, is a well-known animal carcinogen (Mirvish, 1968). The major precursor involved in EC formation in wine is urea, produced by the metabolism of arginine by yeast (Ough *et al.*, 1988b; Monteiro *et al.*, 1989), but there is also evidence that EC levels could increase after malolactic fermentation (MLF) Uthurry *et al.*, 2004, 2006). It has been shown that EC precursors in wine are produced by the metabolic activity of wine lactic acid bacteria (LAB) (Liu *et al.*, 1994). During MLF in grape must and wine, heterofermentative LAB may degrade arginine.

In most bacteria arginine is degraded via the arginine deiminase (ADI) pathway (Liu *et al.*, 1995b, 1996; Arena & Manca de Nadra, 2002). This pathway involves three enzymatic reactions:



Ethyl carbamate can be formed by two of the intermediates on this pathway, citrulline and carbamyl phosphate, reacting with ethanol. L-Arginine is one of the major amino acids in grape musts and wine (Lehtonen, 1996). Although arginine in grape must is mostly metabolised by yeast during vinification, it is still present in wine at the end of alcoholic fermentation in amounts that range from below 0.1 to 2.3 g L⁻¹ (Liu & Pilon, 1998). Therefore, arginine is generally available for metabolism by wine LAB during MLF.

In a study of major commercial LAB for inducing MLF in wine, it was shown that all tested strains, and in particular the heterofermentative *O. oeni*, degraded arginine and excreted citrulline in a resting cell system (Mira de Orduña *et al.*, 2000). Heterofermentative lactobacilli, as *Lactobacillus hilgardii*, have been also shown to degrade arginine (Tonon & Lonvaud-Funel,

*Correspondent: Fax: 034 977558232;
e-mail: albert.bordons@urv.cat

2002) and it has been observed that homofermentative LAB, such as a *L. plantarum* strain isolated from a red wine, were also able to degrade arginine (Spano *et al.*, 2004).

Previous studies have demonstrated that there is a correlation between citrulline production and both EC increase and arginine degradation in model wine and wine inoculated with *O. oeni* and *Lactobacillus buchneri* (Liu *et al.*, 1994). It has been shown that citrulline produced in experiments with a model wine system with 15% v/v ethanol correlates linearly with potential EC. The linear correlation obtained can be used to anticipate potential EC levels based on the citrulline produced during bacterial metabolism in fortified wines (Azevedo *et al.*, 2002). Nevertheless, in a recent work (Suárez Lepe & Uthurry, 2007) wines with higher residual arginine content have not shown a clear tendency to higher EC concentrations after incubation with LAB strains.

Potential EC is considered to be the quantity of EC which is formed when wine is heated at 80 °C for 48 h (Azevedo *et al.*, 2002; Arena & Manca de Nadra, 2005). Heat treatment is a standard procedure by which slow ethanol-reacting precursors are rapidly converted to EC (Ough *et al.*, 1988b). It has been shown that this reaction also occurs during prolonged periods at normal wine storage temperatures (Tegmo-Larsson & Spittler, 1990; Stevens & Ough, 1993).

The use of wine as the culture medium may be complicated by its variable nature (Davis *et al.*, 1986; Liu *et al.*, 1995a). To study the metabolism of wine LAB under wine conditions, in this study, we used a simulated wine so that the changes in different metabolites could be related only to the activity from wine LAB.

Our aim was to investigate the potential capacity of *O. oeni* and *L. plantarum* to produce EC and EC precursors during MLF in simulated wine in different conditions of pH, temperature, and ethanol and L-malic acid concentrations. We also wanted to know more about arginine metabolism by two LAB strains isolated from Catalan wines, one *O. oeni* strain and one *L. plantarum* strain.

Materials and methods

Microorganisms used

Oenococcus oeni Colección Española de Cultivos Tipos (CECT) 217^T (ATCC 23279^T) and *L. plantarum* CECT 5671 were from the CECT, University of Valencia, Burjassot, Spain. *Lactobacillus plantarum* CECT 5671 was originally isolated from a Tempranillo grape must from Tarragona, Catalonia (Masqué & Bordons, 1996). *Oenococcus oeni* strain A was isolated by the authors from a Tempranillo wine in 2002 in Tarragona.

Assays in simulated wine with arginine

Simulated wine with arginine was prepared by modifying Masqué and Bordons' M1 medium (Masqué & Bordons, 1996). Per liter it contained 5 g of concentrated white grape must (65.2 Brix), 5 g of yeast extract, 3 or 6 g of L-malic acid, 10% or 15% v/v of ethanol and 200 mg L-arginine-HCl, and it was adjusted to the desired pH value with 10 N NaOH. Ethanol was sterilised by 0.45 µm membrane filtration. Six different conditions were assayed: A, B, C, D, E and F (for further details see Table 1).

Growth conditions

Cells were first pre-cultured in MRS (De Man *et al.*, 1960) broth at pH 4.5 with 10 g L⁻¹ fructose, 4 g L⁻¹ DL-malic acid and 3% v/v tomato juice at 30 °C until maximal growth. This culture was used as the inoculum. MLF were induced by inoculating simulated wines with 1% v/v of pre-cultured LAB. The initial populations of bacteria were 6.0·10⁷, 2.8·10⁷, and 9.6·10⁷ colony forming units (CFU) mL⁻¹ for strains A, CECT 217^T and CECT 5671 respectively.

Samples were taken every 2–3 days for growth, L-malic acid and arginine measurements, and were stored frozen for further chemical analysis.

Growth measurement

Growth during MLF was measured by determining the optical density of the bacterial suspensions at 600 nm using a Perkin Elmer, Lambda 25 spectrophotometer (Perkin Elmer, Boston, MA, USA).

Analysis of ethyl carbamate and potential ethyl carbamate

As mentioned above, the values of potential EC were obtained by heating wine at 80 °C for 48 h (Azevedo *et al.*, 2002; Arena & Manca de Nadra, 2005) and analyzing EC using gas chromatography (GC) with a selective mass spectrometer (MS). The analytical method of EC by GC/MS was adapted from the recommended by the Commission Regulation of the European Communities (1999). All samples were extracted by solid-phase extraction by pouring 10 mL of sample onto

Table 1 Assays in simulated wine under different conditions

Assay codes	A	B	C	D	E	F
Ethanol (% v/v)	10	15	10	10	10	10
pH	3.7	3.7	3.4	4.0	3.7	3.7
Temperature (°C)	25	25	25	25	25	22
L-Malic acid (g L ⁻¹)	3	3	3	3	6	3

The different conditions for each assay are in bold.

an Extrelut NT 20 column (Merck, Darmstadt, Germany). After the sample had kept for 10 min to allow for complete adsorption, the adsorbed EC was eluted with three 30-mL fractions of dichloromethane and collected in a graduated flask. The eluted volume was concentrated to 1 mL in a stream of N₂. The sample was transferred to GC vials for instrumental analysis. The samples were analysed by an HP5890 SERIES II gas chromatograph coupled to an HP 5971 MS. The chromatography column used was a TRB-WAX capillary column (60 m long, internal diameter 0.25 mm, 0.25 µm film thickness). The helium carrier gas flow rate was 1 mL min⁻¹. The initial oven temperature of 60 °C was held for 1 min, after direct on-column injection, raised to 200 °C at 5 °C min⁻¹, and held for 15 min. Spike recovery was 87–120%.

Other analytical methods

Arginine was determined colorimetrically by the reaction described by Sakaguchi and using Gilboe & Williams' Method (1956). Citrulline was also determined colorimetrically using Archibald's Method (1944). L-Malic acid, glucose, fructose and acetic acid were determined with enzymatic test kits from Novakit S.L. (St. Celoni, Spain).

Results

Growth, L-malic acid degradation, and arginine degradation

As shown in Fig. 1, strain A of *O. oeni* depleted L-malic acid in 5 days or less in all but condition B. Because of the greater alcohol content, it needed 16 days to complete total degradation. Arginine was consumed

almost completely in all but condition B. It was seen that higher pH favours the metabolism of arginine, as it was consumed more quickly at pH 4.0 (condition D) than the other assays at pH 3.7. Arginine metabolism was delayed in those assays with lower temperature (F), lower pH (C), and with more L-malic acid (E) (Fig. 1). The arginine-to-citrulline conversion ratio (wt/wt) was around 16% for conditions A and C, about 20% for conditions D and E, and just 7% for condition F.

The results for the *O. oeni* type strain (CECT 217^T) were similar to those for strain A (Fig. 2), although it needed more time to complete L-malic acid degradation than strain A, and did not complete degradation with ethanol 15% v/v (condition B). Arginine was not consumed in condition B and took 120 days to be degraded completely when more L-malic acid was present (E). The arginine-to-citrulline conversion ratios were similar to those of strain A, being 18% for condition A, 15% for condition C, 19% for condition D, about 23% for condition E and just 10% for condition F.

Lactobacillus plantarum CECT 5671 did not complete L-malic acid degradation at higher alcoholic concentration (B) and higher acidity (C) (Fig. 3). This was expected as this species is not very resistant to high alcohol contents and is more sensitive to pH than *O. oeni*. The arginine degradation and citrulline production in this strain were virtually nil in almost all the conditions studied. A slight arginine degradation was observed in condition F, *id est*, at lower temperature (22 °C instead of 25 °C).

Ethyl carbamate formation

As shown in Table 2, the EC concentrations at the end of MLF carried out by *O. oeni* A were very low. They

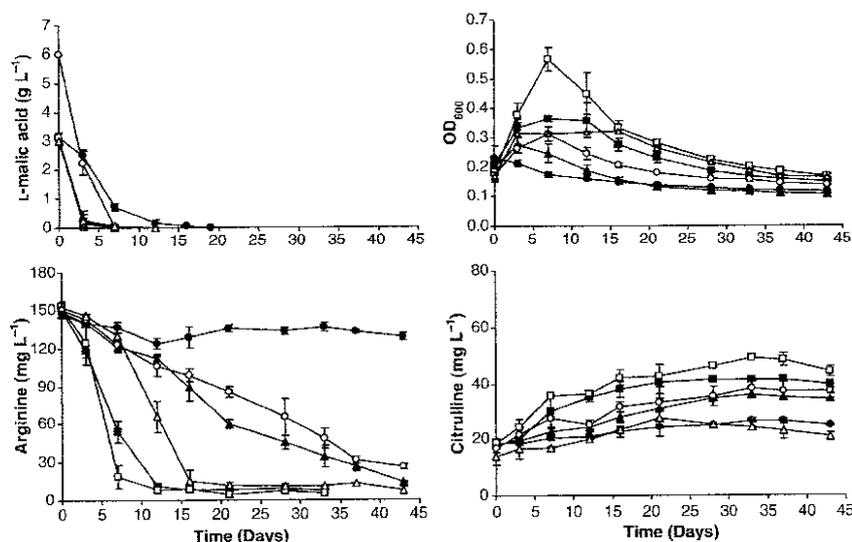


Figure 1 Time course of L-malic acid and arginine degradation and citrulline formation by *Oenococcus oeni* A in different conditions in simulated wine: ■, A; ●, B; ▲, C; □, D; ○, E; △, F. Data shown are the average and SD of two replicates.

Figure 2 Time course of L-malic acid and arginine degradation and citrulline formation by *Oenococcus oeni* CECT 217^T in different conditions in simulated wine: ■, A; ●, B; ▲, C; □, D; ○, E; △, F. Data shown are the average and SD of two replicates.

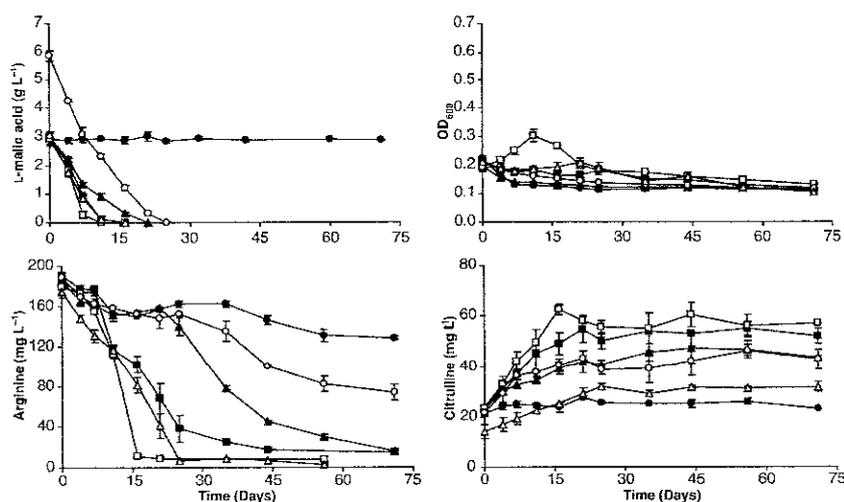
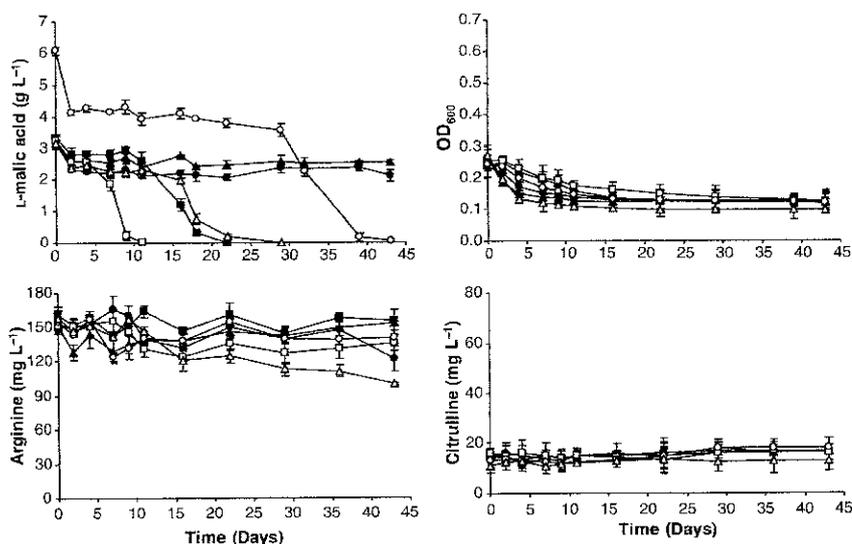


Figure 3 Time course of L-malic acid and arginine degradation and citrulline formation by *Lactobacillus plantarum* CECT 5671 in different conditions in simulated wine: ■, A; ●, B; ▲, C; □, D; ○, E; △, F. Data shown are the average and SD of two replicates.



did not exceed $5 \mu\text{g L}^{-1}$ at the end of arginine degradation. In experiment B the levels of EC were mostly higher than the other conditions. This was expected, as this condition had 50% more ethanol than the other conditions. Ough *et al.* (1988a) demonstrated that there is a direct relation between ethanol concentration and EC formed. The potential EC content was found to be directly related to the increase in citrulline at the end of L-malic acid degradation. A linear correlation ($r = 0.90$) was observed between levels of potential EC and citrulline concentrations at the end of L-malic acid degradation from most experiments in simulated wine at 10% v/v ethanol (experiments A, C, D and F).

In the experiments carried out with *O. oeni* CECT 217^T, EC levels were lower than $7 \mu\text{g L}^{-1}$ at the end of

arginine degradation (Table 2). In the experiments conducted at 10% ethanol a good linear correlation ($r = 0.95$) was observed between levels of potential EC and citrulline at the end of L-malic acid degradation, with the exception of the experiment at lower temperature (F).

The good correlation obtained between potential EC and citrulline for both the strains of *O. oeni* in the experiments with 10% v/v ethanol makes it possible to predict the potential EC that could be formed from the citrulline produced, using the regression line equation for each strain. That avoids determining potential EC, as described previously by Liu *et al.* (1994) for *L. buchneri* in wine systems and Azevedo *et al.* (2002) for *L. hilgardii* in fortified wine.

1210 Formation of ethyl carbamate by wine bacteria S. V. Romero et al.

Table 2 Concentration of EC ($\mu\text{g L}^{-1}$) and potential EC ($\mu\text{g L}^{-1}$) at the end of L-malic acid and L-arginine depletions by the strains *Oenococcus oeni* A, *O. oeni* CECT 217^T and *Lactobacillus plantarum* CECT 5671 in different conditions (see Table 1)

Strain	End of L-malic acid depletion						End of L-arginine depletion ^a					
	EC			Potential EC			EC			Potential EC		
	A	217 ^T	5671	A	217 ^{Tb}	5671	A	217 ^T	5671	A	217 ^T	5671
Condition												
A	1.4 ± 0.6	2.9 ± 1.6	4.3 ± 1.5	119 ± 7	165 ± 13	124 ± 12	2.4 ± 1.7	2.6 ± 1.8	3.5 ± 1.5	257 ± 10	227 ± 12	183 ± 8
B	3.6 ± 1.7	^b	^c	157 ± 1	^b	^c	4.7 ± 2.1	5.6 ^b ± 0.9	3.5 ± 0.7	163 ± 9	172 ^b ± 4	301 ± 14
C	1.8 ± 0.8	6.4 ± 2.8	^c	78 ± 8	82 ± 8	^c	4.0 ± 2.2	4.7 ± 1.7	2.0 ± 0.9	132 ± 9	165 ± 8	131 ± 4
D	1.7 ± 1.0	1.8 ± 1.0	2.9 ± 1.3	153 ± 1	98 ± 9	167 ± 5	1.7 ± 0.6	1.9 ± 0.7	2.4 ± 1.4	177 ± 7	267 ± 5	177 ± 8
E	1.8 ± 0.8	4.2 ± 1.2	5.4 ± 1.9	202 ± 14	88 ± 5	200 ± 8	1.9 ± 1.1	6.9 ± 1.0	5.4 ± 1.2	145 ± 8	207 ± 11	200 ± 7
F	ND	2.3 ± 0.8	ND	108 ± 12	142 ± 9	141 ± 7	4.1 ± 1.7	1.9 ± 1.3	ND	251 ± 12	400 ± 73	141 ± 11

Values are the average and SD of two replicates.

ND, not detected.

^aEnd of incubation in the case of *Lactobacillus plantarum* CECT 5671.

^bL-Malic acid and arginine depletions were not completed.

^cL-Malic acid depletion was not completed.

In the case of *L. plantarum* CECT 5671, the levels of EC obtained were similar to those obtained for the strains of *O. oeni*, and were lower than $6 \mu\text{g L}^{-1}$ at the end of arginine degradation (Table 2). Although virtually no citrulline was produced, potential EC was comparable with that of the other strains studied (Table 2).

Sugar consumption and acetic acid production

Table 3 shows sugar consumption during L-malic acid degradation in all the strains tested. *Oenococcus oeni* A degraded more sugars in those conditions in which L-malic acid was more quickly consumed, which is also reflected in greater rates of growth. In *O. oeni* CECT 217^T sugar consumptions were more similar. Acetic acid production was well correlated with sugar consumption, mainly in this strain, where the correlation *r*-value was 0.88. The levels of acetic acid for the *O. oeni* strains were lower than 0.25 g L^{-1} , levels normally reached during

MLF. *Lactobacillus plantarum* CECT 5671 generally consumed more sugars, but produced less acetic acid than *O. oeni* strains. This has oenological importance because beyond a certain limit acetic acid has a detrimental organoleptic effect on wine quality (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

As shown in Table 4, the final pH of *O. oeni* strains (strains A and CECT 217^T) were higher than those of *L. plantarum* (strain CECT 5671). This may be as a result of the ability of *O. oeni* strains to degrade arginine effectively, which increased ammonia levels (data not shown), and thus increased pH levels in the medium. Another reason to this higher pH should be the more effective malic acid degradation in *O. oeni* strains.

Discussion

Arginine metabolism and EC production by three LAB strains were investigated with a simulated wine. The use of this medium precluded the presence of unknown

Strain	Sugars consumption (glucose plus fructose) (g L^{-1}) ^a			Acetic acid production (g L^{-1})		
	A	217 ^T	5671	A	217 ^T	5671
Condition						
A	0.71 ± 0.07	1.80 ± 0.10	1.78 ± 0.04	0.20 ± 0.01	0.14 ± 0.00	0.11 ± 0.01
B	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.03	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01
C	0.00 ± 0.00	1.60 ± 0.08	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.01	0.18 ± 0.03	0.00 ± 0.00
D	1.95 ± 0.08	1.18 ± 0.10	2.12 ± 0.08	0.25 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.04 ± 0.01
E	0.41 ± 0.04	1.48 ± 0.03	2.74 ± 0.07	0.13 ± 0.01	0.24 ± 0.04	0.08 ± 0.01
F	1.20 ± 0.06	1.30 ± 0.07	1.23 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.16 ± 0.01	0.03 ± 0.01

Values are the average and SD of two replicates.

^aInitial concentration (g L^{-1}) of sugars (glucose plus fructose) was 4.07 ± 0.14 .

Table 3 Sugars consumption and acetic acid production for strains *Oenococcus oeni* A, *O. oeni* CECT 217^T and *Lactobacillus plantarum* CECT 5671 in different conditions (see Table 1) at the end of L-malic acid degradation

Table 4 Wine pH values at the end of assays in all the conditions studied (see Table 1)

Condition	A	B	C	D	E	F
pH prior to MLF	3.70 ± 0.00	3.74 ± 0.07	3.41 ± 0.01	4.01 ± 0.03	3.72 ± 0.04	3.73 ± 0.01
<i>Oenococcus oeni</i> A (43 days)	4.06 ± 0.04	3.93 ± 0.01	3.82 ± 0.08	4.24 ± 0.08	4.01 ± 0.04	4.20 ± 0.06
<i>O. oeni</i> CECT 217 ^T (74 days) ^a	4.15 ± 0.01	3.80 ± 0.03	3.85 ± 0.01	4.32 ± 0.03	4.08 ± 0.08	4.10 ± 0.06
<i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 5671 (43 days)	3.58 ± 0.06	3.83 ± 0.03	3.44 ± 0.06	3.69 ± 0.08	3.72 ± 0.03	3.65 ± 0.03

Values are the average and SD of two replicates.

MLF, malolactic fermentation.

^aHundred and twenty days in condition E.

metabolites produced by the yeast that can vary the composition of the medium. In the simulated wine *O. oeni* strains reached cell populations of about 10⁷ CFU mL⁻¹, which are similar to the cell population found with LAB growing in wine (Davis *et al.*, 1986).

Both *O. oeni* strains fully depleted the L-malic acid present in all experiments, except in the case of *O. oeni* CECT 217^T at higher ethanol concentration (condition B) (Table 3; Fig. 2). This depletion correlated with the increase in biomass, but does not fully explain this increase, as in some cases after degradation of L-malic acid the bacterial population is greater and well correlated with arginine degradation. This is particularly the case in conditions A, D and F, in which arginine degradation was most advanced (Figs 1 and 2). It has been shown that wine LAB with a complete ADI pathway may be more competitive in growth, as they can gain extra energy (ATP) from arginine degradation (Reaction 3) (Liu *et al.*, 1994; Mira de Orduña *et al.*, 2001). Some authors have observed that arginine degradation increases the growth of *L. buchneri* CUC-3 but not the *Oenococcus* examined (Mira de Orduña *et al.*, 2001). From the results obtained we can conclude that arginine degradation favours the growth of *O. oeni* in some conditions.

These strains were able to degrade arginine in the conditions studied and to excrete some citrulline. It has already been demonstrated that arginine metabolism is affected by pH. Several authors have observed that *O. oeni* can degrade arginine at high wine pH levels (3.9–4.0) but not at low pH levels (3.2–3.3) (Liu *et al.*, 1995a; Mira de Orduña *et al.*, 2001). In this study both *O. oeni* strains degraded arginine completely at all the pH levels studied (3.4, 3.7 and 4.0), in the cases that MLF occurred, but the arginine-to-citrulline conversion ratios were slightly higher (19–20%) at pH 4 than at lower pH values (15–18%).

The lowest arginine–citrulline conversion ratio by the two strains of *O. oeni* has been found when cells have been incubated at 22 °C instead of 25 °C: 7% for strain A and 10% for strain 217. These lower ratios are because of less citrulline excreted, so we can assume that at 22 °C the citrulline is being metabolically more consumed by the other two reactions of ADI pathway, as explained in Introduction.

Growth and the metabolic activity of LAB are known to be inhibited by high concentration of ethanol (Rodríguez & Manca de Nadra, 1998). In this study, growth and arginine metabolism were affected by ethanol content, as neither of the two *O. oeni* strains tested degraded arginine in condition B (15% v/v ethanol; Figs 1 and 2). The use of arginine decreased with increasing ethanol concentrations, as was also observed by Arena & Manca de Nadra (2005). Nevertheless, malolactic activity of strain A was not inhibited by 15% ethanol, suggesting that malolactic enzyme has a stronger resistance to ethanol than the other metabolic activities.

We observed that the condition that mainly favours EC production after MLF carried out by *O. oeni* strain A was 15% ethanol content, and the conditions for *O. oeni* strain 217^T were lower wine pH and higher ethanol content. It is known that ethanolysis (reaction of ethanol with EC precursors) is favoured at low pH (Ough *et al.*, 1988a; Monteiro *et al.*, 1989). However, the potential formation of EC in some assays was greater at higher wine pH, a condition that favours LAB growth and metabolism.

The yield of chemical conversion of citrulline into EC in molar terms was about 3.5% and 2.6% for strains A and CECT 217^T, respectively, which is slightly higher than that observed by Liu *et al.* (1994). The yield was higher in condition B, with higher content of ethanol (15%). The low molar conversion of citrulline to EC is in agreement with the kinetic studies made by Ough *et al.* (1988a).

Arena & Manca de Nadra (2005) reported an increase of 23% in EC when ethanol increases from 10% to 15%. In the present study, for the same change of ethanol concentration, EC levels increased by 123% of average (Table 2). For instance, experiments with *O. oeni* strain A gave 1.4 µg L⁻¹ EC at the end of L-malic acid depletion in presence of 10% ethanol, but the value of EC was 3.6 µg L⁻¹ with 15% ethanol. Having in mind that citrulline produced was lower (c. 25 mg L⁻¹) for 15% ethanol than for 10% ethanol (c. 40 mg), the higher content of ethanol should compensate this in the chemical reaction with citrulline, contributing to the higher EC level.

The good correlation obtained with strains A and CECT 217^T between citrulline and potential EC in the experiments conducted at 10% ethanol v/v is in accordance with Liu *et al.* (1994) and Azevedo *et al.* (2002). This correlation allows us to use the citrulline produced during the bacterial metabolism of arginine during MLF to predict the levels of potential EC at the end of L-malic acid degradation. This is important because these levels of EC can be formed during prolonged storage periods at normal wine storage temperatures (Stevens & Ough, 1993; Uthurry *et al.*, 2004).

In those cases in which L-malic acid was degraded completely, arginine degradation was delayed in comparison to L-malic acid degradation in all strains tested. This has oenological importance because it means that the winemaker can prevent arginine degradation by removing cells or inhibiting cell activity after the L-malic acid degradation in wine is over. This also prevents a considerable increase in pH, which could change the organoleptic characteristics of wine, favour the propagation of spoilage organisms and prevent the formation of citrulline. It is also important to consider that citric acid degradation begins once malic acid degradation is completed (Radler, 1963). As it is known, citric acid metabolism can produce diacetyl, which imparts a buttery aroma to wine (Bartowsky & Henschke, 2004). This is influenced by the bacterial strain and wine parameters such as pH and temperature, similarly to arginine degradation. If the winemaker tries to cause citrate degradation to obtain the organoleptic benefits of diacetyl production, there is also the risk of arginine degradation.

We should point out that we observed no (or very little) arginine degradation when MLF did not occur. Cells probably could not carry out MLF because the entire metabolism is very affected by the hard conditions, and in this situation, also arginine catabolism would be affected. Other authors (Uthurry *et al.*, 2006) have also found a relationship between completed MLF and degradation of arginine, and a consequent build-up of EC, especially when *O. oeni* is used.

The study has also provided new information about *L. plantarum* CECT 5671 and the potential formation of EC. This strain is currently being studied by some of the authors (Romero and Masqué) as starter for initiating MLF. It is an interesting strain because it produces very low quantities of acetic acid (Table 3) and it does not degrade arginine. Moreover, this strain retains malolactic activity in conditions where there is no detectable cells growth. Because this strain is a facultative heterofermentative, it does not degrade hexoses and so does not increase volatile acidity in wine. The potential EC obtained in assays with this strain of *L. plantarum* was comparable to that of *Oenococcus* strains studied.

Conclusions

The two studied strains of *O. oeni* were able to degrade arginine and excrete some citrulline in simulated wine, being the assays at higher pH (4.0) those more favourable, and the lower arginine–citrulline conversion ratio was found at lower temperature (22 °C), specially for strain A. On the other hand, the studied strain of *L. plantarum* was not able to degrade arginine and did not excrete citrulline at the different studied conditions. The potential formation of EC was well correlated with citrulline production in studied *O. oeni* strains and was higher in those conditions where a faster growth and metabolism were observed. So, citrulline is a good indicator of the EC concentrations that we could find in wine after prolonged storage periods.

Acknowledgments

This work has been supported by grant AGL2000-0827-C02-02 from the Spanish Ministry of Science and Technology. Silvana Romero is grateful to the Catalan government (DURSI) for a doctoral fellowship.

References

- Archibald, R.M. (1944). Determination of citrulline and allantoin and demonstration of citrulline in blood plasma. *Journal of Biological Chemistry*, **156**, 121–142.
- Arena, M.E. & Manca de Nadra, M.C. (2002). Comparative survey in *Lactobacillus plantarum* of the growth and metabolism of arginine and citrulline in different media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 6497–6500.
- Arena, M.E. & Manca de Nadra, M.C. (2005). Influence of ethanol and low pH on arginine and citrulline metabolism in lactic acid bacteria from wine. *Research in Microbiology*, **156**, 1858–1864.
- Azevedo, Z., Couto, J.A. & Hogg, T. (2002). Citrulline as the main precursor of ethyl carbamate in model fortified wines inoculated with *Lactobacillus hilgardii*: a marker of the levels in a spoiled fortified wine. *Letters in Applied Microbiology*, **34**, 32–36.
- Bartowsky, E.J. & Henschke, P.A. (2004). The 'buttery' attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, **96**, 235–252.
- Commission Regulation of the European Communities (1999). Regulation (EC) no 761/1999 of 12th April 1999 amending Regulation (ECC) No 2676/90 determining community methods for the analysis of wines Annex III. Determination of ethyl carbamate in wine: selective detection method using gas chromatography/mass spectrometry. *Official Journal of European Communities*, **L99**, 12–14.
- Davis, C.R., Wibowo, D., Lee, T.H. & Fleet, G.H. (1986). Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentation of wines at different pH. *Applied Environmental Microbiology*, **51**, 539–545.
- De Man, J.C., Rogosa, M. & Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, **23**, 130–135.
- Gilboc, D.D. & Williams, J.N. Jr (1956). Evaluation of the Sakaguchi reaction for quantitative determination of arginine. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **91**, 535–536.
- Lehtonen, P. (1996). Determination of amines and amino acids in wine – a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, **47**, 127–133.

- Liu, S.-Q. & Pilone, G.J. (1998). A review: arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance. *Journal of Applied Microbiology*, **84**, 315–327.
- Liu, S.-Q., Pritchard, G.G., Hardman, M.J. & Pilone, G.J. (1994). Citrulline production and ethyl carbamate (urethane) precursor formation from arginine degradation by wine lactic acid bacteria *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus buchneri*. *American Journal of Enology and Viticulture*, **45**, 235–242.
- Liu, S.-Q., Davis, C.R. & Brooks, J.D. (1995a). Growth and metabolism of selected lactic acid bacteria in synthetic wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **46**, 166–174.
- Liu, S.-Q., Pritchard, G.G., Hardman, M.J. & Pilone, G.J. (1995b). Occurrence of arginine decarboxylase pathway enzymes in arginine catabolism by wine lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**, 310–316.
- Liu, S.-Q., Pritchard, G.G., Hardman, M.J. & Pilone, G.J. (1996). Arginine catabolism in wine lactic acid bacteria: is it via the arginine decarboxylase pathway or the arginase-urease pathway? *Journal of Applied Bacteriology*, **81**, 486–492.
- Masqué, M.C. & Bordons, A. (1996). Isolation and selection of malolactic bacteria from southern Catalan wines. *Journal of Wine Research*, **7**, 91–101.
- Mira de Orduña, R., Liu, S.-Q., Patchett, M.L. & Pilone, G.J. (2000). Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, **183**, 31–35.
- Mira de Orduña, R., Patchett, M.L., Liu, S.-Q. & Pilone, G.J. (2001). Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* and *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**, 1657–1662.
- Mirvish, S.S. (1968). The carcinogenic action and metabolism of urethane and N-hydroxyl urethane. *Advanced in Cancer Research*, **11**, 1–42.
- Monteiro, F.F., Trousdale, E.K. & Bisson, L.F. (1989). Ethyl carbamate formation in wine: use of radioactively labeled precursors to demonstrate the involvement of urea. *American Journal of Enology and Viticulture*, **40**, 1–8.
- Ough, C.S., Crowell, E.A. & Gutlovc, B.R. (1988a). Carbamyl compound reactions with ethanol. *American Journal of Enology and Viticulture*, **39**, 239–242.
- Ough, C.S., Crowell, E.A. & Mooney, L.A. (1988b). Formation of ethyl carbamate precursors during grape juice (chardonnay) fermentation. I. Addition of amino acids, urea, and ammonia: effects of fortification on intracellular and extracellular precursors. *American Journal of Enology and Viticulture*, **39**, 243–249.
- Radler, F. (1963). Über die Milchsäurebakterien des Weines und den biologischen Säureabbau. Übersicht. II. Physiologie und Ökologie der Bakterien. *Vitis*, **3**, 207–236.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdicu, D., Donèche, B. & Lonvaud, A. (2000). *Handbook of Enology: Vol. 1. The Microbiology of Wine and Vinifications*. England: John Wiley & Sons, Ltd.
- Rodríguez, A.V. & Manca de Nadra, M.C. (1998). Mixed culture of *Pediococcus pentosaceus* and *Leuconostoc oenos*: effect of ethanol on microbial interaction. *Microbiologie Aliments Nutrition*, **16**, 9–16.
- Spano, G., Chieppa, G., Beneduce, L. & Massa, S. (2004). Expression analysis of putative *arcA*, *arcB* and *arcC* genes partially cloned from *Lactobacillus plantarum* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology*, **96**, 185–193.
- Stevens, D.F. & Ough, C.S. (1993). Ethyl carbamate formation: reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, **44**, 309–312.
- Suárez Lepe, J.A. & Uthurry, C.A. (2007). Incidence of nitrogenous compounds of must on ethyl carbamate formation induced by lactic acid bacteria. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, **41**, 215–223.
- Tegmo-Larsson, I.-M. & Spittler, T.D. (1990). Temperature and light effects on ethyl carbamate formation in wine during storage. *Journal of Food Sciences*, **55**, 1166–1169.
- Tonon, T. & Lonvaud-Funel, A. (2002). Arginine metabolism by wine *Lactobacilli* isolated from wine. *Food Microbiology*, **19**, 451–461.
- Uthurry, C.A., Varela, F., Colomo, B., Suárez Lepe, J.A., Lombardero, J. & Garcia del Hierro, J.R. (2004). Ethyl carbamate concentrations of typical Spanish red wines. *Food Chemistry*, **88**, 329–336.
- Uthurry, C.A., Suárez Lepe, J.A., Lombardero, J. & Garcia del Hierro, J.R. (2006). Ethyl carbamate production induced by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine. *Food Chemistry*, **94**, 262–270.

11. ANEXO D

Efecto de diferentes condiciones en vino simulado sobre la formación de carbamato de etilo por *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum*

SILVANA V. ROMERO ¹, ALBERT BORDONS ², ROSÓ FRANQUET ³, M. CARME MASQUÉ ¹

1 Estació de Viticultura i Enologia. INCAVI. Passeig Sunyer, 2-4. 43202. Reus. Spain. Tel: (34)687050062.

Email: incavi.reus@gencat.net ; silvanaveronica.romero@estudiants.urv.cat

2 Facultat d'Enologia de Tarragona. Universitat Rovira i Virgili. Campus Sescelades. Marcel·lí Domingo, s/n. 43007. Tarragona. Spain.

Email: albert.bordons@urv.cat

3 Estació de Viticultura i Enologia. INCAVI. Amàlia Soler, 29. 08720. Vilafranca del Penedès. Barcelona. Spain. Email: incavi.vilafranca@gencat.net

PALABRAS CLAVE: carbamato de etilo (CE), fermentación maloláctica (FML)

KEYWORDS: ethyl carbamate (EC), malolactic fermentation (MLF)

RESUMEN - SUMMARY

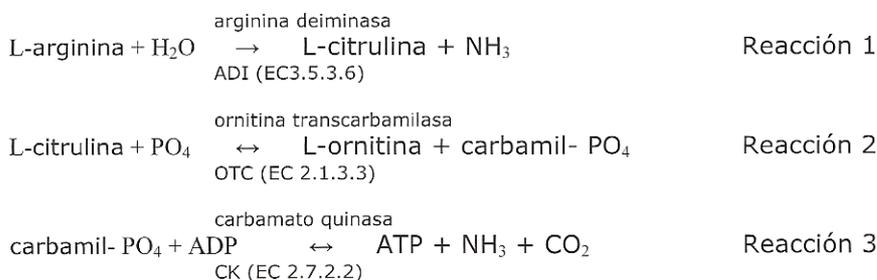
El objetivo de este trabajo fue investigar la capacidad potencial de producción de carbamato de etilo (CE) y de sus precursores por dos cepas de *O. oeni* y una de *L. plantarum* durante la fermentación maloláctica (FML). Se utilizó vino simulado a diferentes condiciones de pH, temperatura y concentraciones de etanol y ácido L-málico inicial. Es conocida la buena correlación entre la producción de citrulina y el aumento de CE y la degradación de arginina en vino modelo y vino inoculados con bacterias lácticas (BL) heterofermentativas. Recientemente se ha observado que cepas de *L. plantarum* aisladas de vino fueron capaces de degradar arginina. En nuestras condiciones de trabajo las dos cepas de *O. oeni* degradaron la arginina y excretaron cantidades considerables de citrulina, en aquellos casos que hubo FML. En general, la degradación de arginina comenzó después del inicio de la degradación de ácido L-málico, o al finalizar ésta. Esto tiene interés enológico, ya que permite al enólogo evitar la degradación de arginina extrayendo las células de BL o inhibiendo su actividad celular una vez completada la degradación de ácido L-málico en el vino. En estas cepas se ha obtenido una buena correlación entre la citrulina y el CE potencial, determinado mediante el tratamiento térmico de las muestras, para favorecer la rápida etanolisis de la citrulina. Hemos observado que las condiciones que principalmente favorecen la producción de CE durante la FML realizada por *O. oeni* son un pH bajo del vino y las concentraciones de etanol y de ácido L-málico inicial más altas. En cambio, la formación potencial de CE es mayor a pHs vínicos más altos, condición que favorece el crecimiento de las BL y acelera su metabolismo. En el caso de *L. plantarum*, la degradación de arginina y producción de citrulina han sido mínimas o incluso nulas en alguno de los casos, aunque el CE potencial es comparable al de las otras cepas. (Bulletin OIV, 2007, vol. 80, n°917-919, p. 437-444)

The aim of this work was to investigate the potential capacity of ethyl carbamate (EC) production and its precursors by two *O. oeni* and one *L. plantarum* strains during malolactic fermentation (MLF). It was used simulated wine at different conditions of pH, temperature, and ethanol and L-malic acid concentrations. It is known the good correlation between citrulline production and both EC increase and arginine degradation in model wine and wine inoculated with heterofermentative wine lactic acid bacteria (LAB). Recently, it has been observed that some *L. plantarum* strains, isolated from wine, were able to degrade arginine. Studied *O. oeni* strains were able to degrade arginine under studied conditions and to excrete considerable amounts of citrulline, in those cases in that MLF happened. In general, arginine degradation started after the beginning or at the end of L-malic acid degradation. This has oenological importance, since it allows the winemaker to avoid arginine degradation removing cells or inhibiting cell activity after completion of L-malic acid degradation in wine. In these strain a good correlation between citrulline and potential EC has been obtained, determined by heat treatment of the samples, to favour the fast ethanolysis of citrulline. We have observed that conditions that mainly favour EC production during MLF carried out by *O. oeni* are ethanol concentration, lower wine pH and a greater L-malic acid concentration. However, potential formation of EC is greater to higher wine pHs, condition that favours LAB growth and accelerates its metabolism. In the case of *L. plantarum*, arginine degradation and citrulline production have been minimum or even null in some of the cases, although potential EC is comparable to the one of the other studied strains.

1. INTRODUCCIÓN

El carbamato de etilo (CE), también conocido como uretano, es un conocido carcinógeno animal (Mirvish, 1968). El principal precursor involucrado en la formación de CE en el vino es la urea, un producto del metabolismo de la arginina por las levaduras (Monteiro et al., 1989; Ough et al., 1988b). No obstante, se ha demostrado que la actividad metabólica de las bacterias lácticas (BL) lleva a la producción de precursores de CE en el vino (Liu et al. 1994). Durante la fermentación maloláctica (FML) en mosto y vino, BL heterofermentativas pueden degradar la arginina.

La degradación de la arginina ocurre en la mayoría de las bacterias por la vía de la arginina deiminasa (ADI). (Liu et al., 1995b; Liu et al., 1996; Arena y Manca de Nadra, 2002). Esta vía implica tres reacciones enzimáticas:



Dos de los intermediarios de esta vía, citrulina y carbamil-fosfato, pueden reaccionar con el etanol para formar CE.

(2007, 917-919)

CARBAMATO DE ETILO

439

En un estudio de las principales BL comerciales para inducir la FML en el vino, se vio que todas las cepas examinadas, principalmente *O. oeni* heterofermentativas, degradaron arginina y excretaron citrulina en un sistema de resting cells (Mira de Orduña et al., 2000). Recientemente se ha observado que BL homofermentativas, como cepas de *L. plantarum* aisladas de vino tinto, fueron capaces de degradar la arginina (Spano et al., 2004).

Estudios previos muestran una correlación entre la producción de citrulina y el aumento de CE y la degradación de arginina en vino modelo y vino inoculados con *O. oeni* y *L. buchneri* (Liu et al., 1994). Estudios recientes muestran que los niveles de arginina consumidos o de citrulina producidos en experiencias en vino modelo con 15% (v/v) de etanol se correlacionan linealmente con el CE potencial. La correlación lineal obtenida se puede utilizar para anticipar los niveles de CE potencial, basándose en la citrulina producida durante el metabolismo bacteriano en vinos fortificados (Azevedo et al., 2002).

Aquí se considera que el CE potencial es la cantidad de CE formada durante el calentamiento del vino a 80 °C durante 48 horas (Azevedo et al. 2002; Arena y Manca de Nadra 2005). El tratamiento con calor es un procedimiento estandarizado para convertir rápidamente precursores que reaccionan lentamente con el etanol a CE (Ough et al. 1988b). Se ha demostrado que esta reacción también ocurre durante periodos de almacenamiento prolongado a temperaturas normales de almacenamiento (Tegmo-Larsson y Spittler 1990; Stevens y Ough 1993).

El objetivo de este trabajo fue investigar la capacidad potencial de producción de CE y de precursores de CE por cepas de *O. oeni* and *L. plantarum* durante la FML en vino simulado a diferentes condiciones de pH, temperatura, y concentraciones de etanol y ácido L-málico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Microorganismos utilizados

O. oeni CECT 4100^T y *L. plantarum* CECT 5671 provenían de la Colección Española de Cultivos Tipos (CECT), Universitat de València, Burjassot, España. *L. plantarum* CECT 5671 fue aislado originalmente de un mosto de la variedad Ull-de-llebre (Tempranillo) de Tarragona, Cataluña (Masqué, 1992). *O. oeni* A fue originalmente aislado de un vino Ull-de-llebre (Tempranillo) en 2002 en Tarragona, Cataluña.

2.2. Ensayos en vino simulado con arginina

Se preparó un vino simulado modificando el medio basal de Masqué (1992). Contenía por litro: 5 g de mosto concentrado (65,2 °Brix); 5 g de extracto de levadura, 3 ó 6 g de ácido L-málico, 10 o 15% (v/v) de etanol y 200 mg de L-arginina·HCl, y el pH se ajustó con NaOH 10N para obtener el valor deseado. El etanol se esterilizó a través de membranas de filtración de 0.45 µm. Las diferentes condiciones ensayadas se muestran en la Tabla 1.

Código	A	B	C	D	E	F
Etanol (v/v)	10 %	15 %	10 %	10 %	10 %	10 %
pH	3.6	3.6	3.3	3.9	3.6	3.6
Temperatura	25 °C	22 °C				
Ácido L- málico	3 g L ⁻¹	6 g L⁻¹	3 g L ⁻¹			

Tabla 1. Las diferentes condiciones ensayadas en vino simulado y los códigos con los que se referencian. Las condiciones significativamente diferentes se encuentran en negrita.

2.3. Condiciones de crecimiento

Las células fueron pre-cultivadas en medio MRS con 10 g L⁻¹ de fructosa, 4 g L⁻¹ de ácido DL- málico y 3% de zumo de tomate a 30°C hasta crecimiento máximo. Este cultivo fue utilizado como inóculo. La FML fue inducida por inoculación de los vinos simulados con 1% (v/v) de las BL pre-cultivadas. Se tomaron muestras cada 2 ó 3 días para determinar crecimiento, ácido L-málico y arginina, y se almacenaron congeladas para otros análisis químicos.

2.4. Métodos analíticos

La concentración de arginina se determinó colorimétricamente usando el método de Gilboe y Williams (1956) basado en la reacción descrita por Sakaguchi (1950). La concentración de citrulina se determinó colorimétricamente usando el método de Archibald (1944). La concentración de ácido L-málico se determinó con un kit enzimático de TDI (St. Celoni, Spain).

El CE y el CE potencial fueron determinados por gas-cromatografía con un detector selectivo de masas (CG-EM) en un gas-cromatógrafo HP5890 SERIES II acoplado a un espectrómetro de masas HP 5971 SERIES después de extraer las muestras en fase sólida. Se obtuvieron recuperaciones entre 87% a 120%.

(2007, 917-919)

CARBAMATO DE ETILO

441

3. RESULTADOS

3.1. Crecimiento, degradación de ácido L-málico y degradación de arginina.

Como muestra la figura 1a, la cepa A de *O. oeni* agotó el ácido L-málico en 5 días o menos en todas las condiciones estudiadas, excepto en la condición B en la que necesitó 16 días para completar la degradación. La arginina fue consumida en todas las condiciones, excepto en la B. Se observó que un pH mas alto favorece el metabolismo de la arginina, que se vio acelerado en la condición con pH 3.9 (condición D) respecto a los ensayos con pH 3.6. En general, se degradó un 84% de la arginina presente en todas las condiciones estudiadas, exceptuando la B, y la proporción de conversión arginina a citrulina fue de 31.2%.

Los datos observados con la cepa A son confirmados por la cepa tipo de *O. oeni* (CECT 4100^T) (figura 1b), que completó la degradación de ácido L-málico en todas las condiciones estudiadas, excepto en la condición B, aunque esta cepa necesitó mas tiempo para completar esta degradación en comparación con la cepa A. En este caso la arginina tampoco fue consumida en la condición B. Los rangos de degradación de arginina y los correspondientes rangos de excreción de citrulina se correlacionan bien. La proporción de conversión arginina a citrulina fue de 15.0%. Exceptuando la condición B, esta cepa degradó un 93% de la arginina inicial en todas las condiciones estudiadas como media.

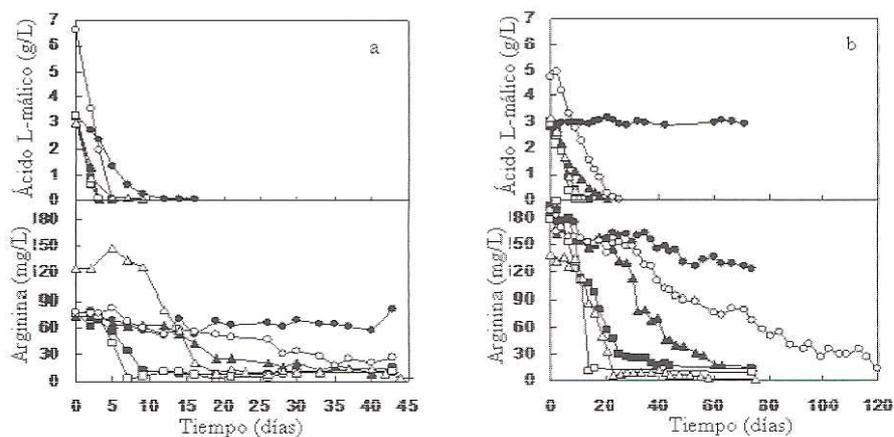


Figura 1. Degradación de ácido L-málico y arginina por las cepas A (a) y CECT 4100^T de *O. oeni* (b) en todas las condiciones estudiadas en vino simulado. ■, A ; ●, B ; ▲, C; □, D; ○, E; △, F. Los datos representan un promedio de experiencias duplicadas.

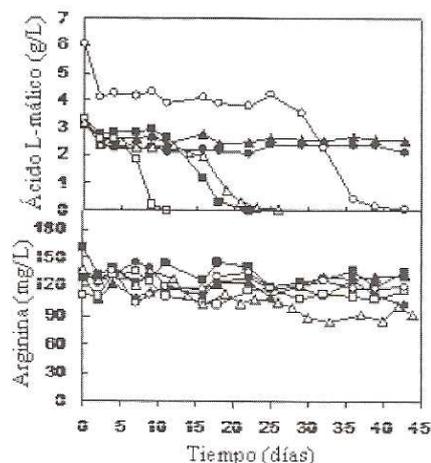


Figure 2. Degradación de ácido L-málico y arginina por *L. plantarum* CECT 5671 en todas las condiciones estudiadas en vino simulado. ■, A ; ●, B ; ▲, C; □, D; ○, E; △, F. Los datos representan un promedio de experiencias duplicadas.

L. plantarum CECT 5671 no fue capaz de completar la degradación del ácido L-málico en las condiciones de mayor concentración alcohólica (B) y mayor acidez (C) (figura 2). Esto era de esperar, ya que esta cepa no es muy resistente a altas graduaciones alcohólicas y es más sensible al pH que *O. oeni*, como se ha observado en resultados de otros estudios (Masqué, 1992). Se observó una infima degradación de arginina en algunas de las condiciones estudiadas.

En aquellos casos en los que el ácido L-málico fue completamente degradado, la degradación de la arginina se vio retrasada en comparación a la degradación del ácido L-málico por todas las cepas ensayadas. Esto tiene importancia enológica, ya que permite al enólogo evitar la degradación de la arginina removiendo las células bacterianas o inhibiendo la actividad celular después de la culminación de la degradación del ácido L-málico en el vino.

3.2. Formación de carbamato de etilo

Como se muestra en la tabla 2, los niveles de CE al final de la FML conducida con las cepas de *O. oeni* son bajos.

Hemos observado una correlación lineal ($R > 0,90$) entre los niveles de CE potencial y las concentraciones de citrulina al final de la degradación del ácido L-málico para estas cepas a partir de las experiencias a 10% (v/v) de etanol.

La producción de citrulina por *L. plantarum* CECT 5671 ha sido mínima o nula. Los niveles de CE y CE potencial encontrados son similares a los obtenidos con las cepas estudiadas de *O. oeni* (tabla 2).

(2007, 917-919)

CARBAMATO DE ETILO

443

Condición	CE (ppb)			CE potencial (ppb)		
	<i>O. oeni</i> A	<i>O. oeni</i> CECT 4100 ^T	<i>L. plantarum</i> CECT 5671	<i>O. oeni</i> A	<i>O. oeni</i> CECT 4100 ^T	<i>L. plantarum</i> CECT 5671
A	1.4	2.9	4.3	119	165	127
B*	3.6	-	-	157	-	-
C*	1.8	6.4	-	78	82	-
D	1.7	1.8	2.9	153	98	167
E	1.8	4.2	5.4	202	88	207
F	ND	2.3	1.1	108	142	149

ND: no detectado

*El consumo de ácido L-málico no se completó.

Tabla 2. CE y CE potencial al final de la degradación del ácido L-málico por las cepas A y CECT 4100^T de *O. oeni* y *L. plantarum* CECT 5671 en todas las condiciones estudiadas.

CONCLUSIONES

Hemos observado que las condiciones que principalmente favorecen la producción de CE durante la FML conducida por *O. oeni* son la concentración de etanol (un precursor), un bajo pH del vino y una concentración de ácido L-málico mas elevada. Se sabe que la etanólisis de precursores de CE se ve favorecida a pH bajo. No obstante, la formación potencial de CE es mayor a un pH vínico mas elevado, condición que favorece el crecimiento de las BL y acelera su metabolismo. En el caso de *L. plantarum*, la degradación de arginina y la producción de citrulina han sido mínimas o nulas. A pesar de esto, se encontraron niveles de CE y de CE potencial comparables a los obtenidos con las cepas estudiadas de *O. oeni*.

12. ANEXO E

Tabla E.1 Parámetros enológicos de los mostos de las vinificaciones estudiadas durante la vendimia de 2003.

Vinifi- cación (Case)	Variedad	Proce- dencia	Presencia de podre- dumbre*	Tipo	°Brix	Grado alcohólico probable (% vol)	Acidez total (g/L)	pH	Ácido málico (g/L)	Ácido tartárico (g/L)	Ácido glucó- nico (mg/L)	Glicerol (g/L)
28	Tempranillo	Nulles	No	Tinto	20,10	11,47	4,50	3,67	1,96	5,75	189	0,10
29	Tempranillo	Nulles	No	Tinto	20,20	11,54	4,20	3,74	1,89	5,89	276	0,13
30	Tempranillo	Nulles	No	Tinto	20,30	11,60	4,00	3,77	1,80	5,91	125	0,01
31	Tempranillo	Nulles	No	Tinto	20,30	11,60	4,10	3,70	1,75	5,75	202	0,07
32	Tempranillo	Nulles	No	Tinto	20,50	11,75	4,20	3,73	1,91	5,77	236	0,13
33	Malvasia	Valencia	No	Blanco	18,00	10,06	4,30	3,53	0,54	6,11	431	0,37
34	Malvasia	Valencia	No	Blanco	18,40	10,32	4,20	3,50	0,64	6,14	359	0,27
35	Malvasia	Valencia	No	Blanco	19,60	11,13	4,70	3,43	0,27	6,79	266	0,35
36	Malvasia	Valencia	No	Blanco	18,00	10,06	4,40	3,48	0,37	6,00	576	0,56
37	Malvasia	Valencia	No	Blanco	18,30	10,25	4,10	3,51	0,42	6,36	151	0,24
38	Malvasia	Valencia	No	Blanco	18,70	10,53	4,80	3,45	0,31	6,72	212	0,27
39	Malvasia	Valencia	No	Blanco	17,20	9,53	4,60	3,45	0,52	6,34	142	0,23
40	Malvasia	Valencia	No	Blanco	19,30	10,93	4,70	3,48	0,49	6,14	291	0,41
41	Malvasia	Valencia	No	Blanco	18,80	10,59	4,30	3,49	0,40	6,05	257	0,28
42	Malvasia	Valencia	No	Blanco	18,80	10,59	4,70	3,43	0,37	5,93	476	0,53
43	MoscateLL	Valencia	No	Blanco	19,60	11,13	4,40	3,52	0,92	6,29	87	0,16
44	MoscateLL	Valencia	No	Blanco	19,30	10,93	4,50	3,50	0,73	6,90	40	0,11
45	MoscateLL	Valencia	No	Blanco	18,60	10,46	4,50	3,50	0,75	6,81	38	0,11
46	MoscateLL	Valencia	No	Blanco	19,60	11,13	4,10	3,52	0,90	6,09	33	0,13
47	MoscateLL	Valencia	No	Blanco	19,10	10,80	4,30	3,47	0,84	6,59	63	0,09
48	MoscateLL	Valencia	No	Blanco	19,10	10,80	4,30	3,52	0,82	6,41	59	0,09
49	MoscateLL	Valencia	No	Blanco	18,20	10,19	4,50	3,48	0,88	6,59	40	0,16
50	MoscateLL	Valencia	No	Blanco	17,70	9,86	4,60	3,45	0,89	7,12	16	0,11
51	Tempranillo	Valencia	No	Tinto	17,90	9,99	4,60	3,68	1,73	5,89	67	0,12
52	Tempranillo	Valencia	No	Tinto	18,20	10,19	4,20	3,74	1,59	6,07	108	0,12
53	Tempranillo	Valencia	No	Tinto	18,50	10,39	4,80	3,77	1,99	5,84	398	0,19
54	Tempranillo	Valencia	No	Tinto	18,10	10,12	4,70	3,83	2,13	6,09	127	0,15
55	Tempranillo	Valencia	No	Tinto	17,60	9,79	4,40	3,72	1,57	5,95	70	0,11
56	Tempranillo	Valencia	No	Tinto	17,50	9,73	4,50	3,79	1,93	5,59	229	0,09
57	Tempranillo	Valencia	No	Tinto	18,40	10,32	4,30	3,77	1,47	5,79	251	0,19
58	Tempranillo	Valencia	No	Tinto	18,80	10,59	4,10	3,76	1,49	5,63	150	0,09
59	Tempranillo	Valencia	No	Tinto	19,30	10,93	3,80	3,64	1,11	5,56	166	0,22
60	Tempranillo	Valencia	No	Tinto	20,60	11,81	3,60	3,75	1,41	5,31	336	0,34
61	Tempranillo	Valencia	No	Tinto	19,80	11,27	3,80	3,75	1,35	5,42	272	0,26
62	Tempranillo	Valencia	No	Tinto	20,40	11,67	3,70	3,73	1,34	5,42	278	0,31
63	Tempranillo	Valencia	No	Tinto	20,10	11,47	3,80	3,66	1,15	5,61	308	0,30

Vinifi- cación (Case)	Variedad	Proce- dencia	Presencia de podre- dumbre*	Tipo	°Brix	Grado alcohólico probable (% vol)	Acidez total (g/L)	pH	Ácido málico (g/L)	Ácido tartárico (g/L)	Ácido glucó- nico (mg/L)	Glicerol (g/L)
64	Tempranillo	Valencia	No	Tinto	19,80	11,27	4,00	3,66	1,35	5,61	502	0,39
65	Tempranillo	Valencia	No	Tinto	19,70	11,21	3,90	3,63	1,05	5,52	240	0,26
66	Tempranillo	Valencia	No	Tinto	20,50	11,75	3,80	3,60	0,93	5,66	146	0,26
67	Sauvignon Blanc	Sarral	No	Blanco	22,40	13,04	5,50	3,47	1,67	5,38	287	0,54
68	Gewürs- traminer	Sarral	No	Blanco	20,80	11,96	4,40	3,76	1,32	4,78	242	0,45
69	Chenin	Sarral	No	Blanco	23,20	13,59	8,70	3,48	4,72	4,97	414	1,44
70	Riesling	Sarral	No	Blanco	23,90	14,08	8,10	3,27	2,30	7,12	297	0,97
71	Garnacha	Batea	No	Tinto	24,00	14,15	5,90	3,34	1,06	5,95	574	1,08
72	Garnacha	Batea	No	Tinto	23,30	13,66	5,30	3,42	1,26	6,05	151	0,31
73	Garnacha	Batea	No	Tinto	20,70	11,88	5,80	3,34	0,96	7,05	174	0,42
74	Garnacha	Batea	No	Tinto	21,80	12,63	5,90	3,36	0,75	6,63	221	0,54
75	Garnacha	Batea	No	Tinto	23,10	13,52	5,70	3,41	1,04	6,09	334,00	0,63
76	Garnacha blanca	Batea	No	Blanco	21,50	12,42	4,60	3,51	0,29	7,34	116	0,93
77	Garnacha blanca	Batea	No	Blanco	22,70	13,24	4,60	3,49	0,42	7,05	129	0,51
78	Garnacha blanca	Batea	No	Blanco	21,40	12,35	4,50	3,46	0,32	6,81	104	0,43
79	Garnacha blanca	Batea	No	Blanco	21,80	12,63	4,50	3,52	0,37	6,36	99	0,37
80	Tempranillo	Barberà de la Conca	No	Tinto	22,60	13,17	4,60	3,59	2,51	6,05	38	0,09
81	Tempranillo	Barberà de la Conca	No	Tinto	22,70	13,24	4,70	3,55	2,34	6,52	57	0,17
82	Tempranillo	Barberà de la Conca	No	Tinto	21,90	12,69	4,70	3,48	1,97	6,54	23	0,03
83	Tempranillo	Barberà de la Conca	No	Tinto	21,60	12,49	4,80	3,49	2,41	6,99	29	0,06
84	Tempranillo	Barberà de la Conca	No	Tinto	22,40	13,04	4,60	3,54	2,35	6,70	44	0,14
85	Tempranillo	Barberà de la Conca	No	Tinto	22,10	12,83	4,70	3,54	2,25	7,03	44	0,11
86	Garnacha negra	Capçanes	No	Tinto	25,10	14,90	4,70	3,57	0,77	6,79	236	0,85
87	Garnacha negra	Capçanes	No	Tinto	23,60	13,87	4,30	3,64	0,56	7,36	74	0,38
88	Garnacha negra	Capçanes	No	Tinto	25,10	14,90	4,80	3,76	0,92	6,39	259	0,96

Vinifi- cación (Case)	Variedad	Proce- dencia	Presencia de podre- dumbre*	Tipo	°Brix	Grado alcohólico probable (% vol)	Acidez total (g/L)	pH	Ácido málico (g/L)	Ácido tartárico (g/L)	Ácido glucó- nico (mg/L)	Glicerol (g/L)
89	Garnacha negra	Capçanes	No	Tinto	23,40	13,73	5,00	3,67	0,97	6,54	155	0,57
90	Garnacha peluda	Constantí	No	Tinto	22,00	12,76	4,80	3,64	0,94	7,16	319	0,48
91	Garnacha peluda	Constantí	No	Tinto	21,40	12,35	4,30	3,68	1,49	7,16	304	0,43
92	Garnacha peluda	Constantí	No	Tinto	22,00	12,76	4,30	3,67	0,80	6,90	291	0,42
93	Tempranillo	Constantí	No	Tinto	23,30	13,66	4,80	3,84	2,40	6,76	214	0,56
94	Tempranillo	Constantí	No	Tinto	24,20	14,28	4,80	3,91	2,60	6,47	368	0,59
95	Tempranillo	Constantí	No	Tinto	23,60	13,87	4,90	3,71	2,20	6,34	206	0,40
96	Tempranillo	Constantí	No	Tinto	22,40	13,04	5,40	3,60	2,02	6,56	238	0,35
97	Merlot	Priorato	No	Tinto	24,20	14,28	6,40	3,55	0,41	6,11	19	0,03
98	Garnacha	Priorato	No	Tinto	22,80	13,31	5,20	3,40	0,51	8,99	29	0,03
99	Tempranillo	Sarral	No	Tinto	21,10	12,15	5,80	3,99	3,20	6,09	515	0,99
100	Tempranillo	Sarral	No	Tinto	20,10	11,47	5,90	3,94	3,16	6,39	442	1,72
101	Parellada	Sarral	No	Blanco	16,90	9,33	3,80	3,75	1,87	4,64	374	0,09
102	Syrah	Priorato	No	Tinto	22,80	13,31	5,00	3,52	1,00	6,07	97	0,40
103	Cabernet Franc	Priorato	No	Tinto	23,00	13,45	5,20	3,49	0,51	6,45	21	0,07
104	Cabernet Sauvignon	Priorato	No	Tinto	22,90	13,38	6,50	3,47	1,19	4,69	38	0,00
105	Trepat	Sarral	Si	Tinto	20,50	11,75	5,50	3,56	1,58	4,44	2514	1,34
106	Trepat	Sarral	Si	Tinto	19,80	11,27	5,90	3,53	1,64	4,61	2024	2,32
107	Trepat	Sarral	Si	Tinto	21,70	12,56	5,60	3,53	1,37	4,95	1684	2,58
108	Trepat	Sarral	Si	Tinto	19,60	11,13	6,10	3,45	1,43	4,51	1911	1,70

* Evaluación visual

Tabla E.2 Parámetros enológicos de los vinos al final de la fermentación alcohólica de las vinificaciones estudiadas durante la vendimia de 2003.

Vinifi- cación (Case)	Masa volúmica (g/mL)	Grado alcohólico (% vol)	G/F (g/L)	Acidez total	Acidez volátil (g AcOH/L)	SO ₂ libre (mg/L)	SO ₂ total (mg/L)	pH	Ácido tartárico (g/L)	Ácido málico (g/L)	Glicerol (g/L)	Ácido glucónico (mg/L)
28	0,9934	10,85	0,00	4,90	0,21	8	17	3,84	3,20	1,42	6,97	112
29	0,9932	11,45	0,00	5,40	0,13	8	19	3,81	2,98	2,37	7,43	91
30	0,9937	10,95	0,00	5,20	0,16	8	19	3,83	3,03	2,23	7,02	57
31	0,9932	11,25	0,00	5,50	0,12	8	17	3,75	3,17	2,23	6,85	99
32	0,9939	11,10	0,00	5,50	0,15	8	16	3,80	3,00	2,33	6,89	127
33	0,9930	10,60	0,00	4,90	0,12	5	13	3,59	4,70	0,83	7,56	557
34	0,9928	10,45	0,00	5,00	0,12	4	10	3,53	4,64	0,73	7,60	304
35	0,9921	10,85	0,00	5,10	0,10	5	12	3,40	4,52	0,55	6,29	244
36	0,9934	10,55	0,00	5,20	0,08	5	13	3,44	4,66	0,64	7,43	662
37	0,9924	10,20	0,00	5,30	0,09	5	11	3,39	4,93	0,79	7,05	168
38	0,9925	10,65	0,00	4,90	0,06	5	12	3,43	4,86	0,54	6,06	140
39	0,9918	10,60	0,00	4,50	0,07	6	17	3,47	4,89	0,54	5,71	119
40	0,9928	10,80	0,00	5,80	0,07	6	12	3,55	4,95	0,86	7,54	244
41	0,9922	10,35	0,00	4,70	0,08	5	15	3,50	4,58	0,47	5,33	210
42	0,9924	10,80	0,00	4,80	0,05	7	17	3,46	4,99	0,42	5,75	291
43	0,9920	10,80	0,00	6,00	0,13	5	13	3,45	4,86	0,78	6,04	414
44	0,9914	11,35	0,00	5,30	0,10	5	13	3,47	4,93	0,78	5,67	159
45	0,9922	10,65	0,00	5,50	0,12	5	16	3,43	5,45	0,59	5,82	306
46	0,9913	11,30	0,00	5,60	0,14	4	14	3,41	5,21	0,59	6,29	297
47	0,9918	10,90	0,00	5,60	0,09	5	15	3,37	5,68	0,74	5,54	319
48	0,9914	10,95	0,00	5,50	0,13	5	13	3,43	5,33	0,71	5,70	172
49	0,9920	10,55	0,00	5,60	0,11	5	13	3,39	6,25	0,74	5,37	161
50	0,9925	10,05	0,00	5,90	0,19	5	13	3,38	6,07	0,67	5,30	248
51	0,9948	9,60	0,00	4,60	0,08	7	29	3,81	3,80	0,84	7,31	72
52	0,9961	9,55	0,00	4,60	0,12	9	30	3,90	3,50	0,94	6,92	353
53	0,9952	9,70	0,00	4,30	0,07	8	28	3,92	3,46	0,65	6,92	134
54	0,9950	9,70	0,00	4,30	0,07	7	27	3,92	3,23	0,72	7,12	121
55	0,9953	9,45	0,00	4,60	0,09	8	28	3,84	3,48	0,75	7,26	129
56	0,9954	9,40	0,00	4,60	0,09	8	29	3,83	3,70	0,74	6,95	74
57	0,9946	10,05	0,00	4,50	0,06	8	26	3,86	3,59	0,74	7,40	200
58	0,9941	10,45	0,00	4,70	0,04	7	32	3,80	3,35	0,87	7,54	253
59	0,9936	10,90	0,00	5,50	0,14	9	27	3,64	3,58	1,33	7,29	104
60	0,9934	11,75	0,00	5,00	0,14	11	34	3,76	3,30	1,00	8,09	166
61	0,9942	11,30	0,00	5,40	0,07	11	29	3,74	3,60	0,98	8,74	219
62	0,9934	11,45	0,00	4,80	0,15	10	32	3,86	3,46	0,81	7,87	170
63	0,9930	11,85	0,00	5,10	0,14	9	25	3,78	3,51	1,20	8,29	231
64	0,9940	11,00	0,00	5,60	0,11	9	56	3,63	4,36	1,33	7,98	244
65	0,9933	11,30	0,00	5,10	0,13	8	32	3,73	3,90	0,92	7,73	212
66	0,9925	11,80	0,00	5,40	0,15	7	35	3,66	3,81	0,86	7,93	104
67	0,9897	12,75	0,00	6,20	0,27	7	42	3,45	4,34	1,58	7,12	253
68	0,9918	10,35	0,00	3,90	0,14	4	25	3,83	3,11	0,25	7,05	8
69	0,9914	12,40	0,07	8,30	0,26	9	55	3,40	4,02	3,75	7,31	346

Vinifi- cación (Case)	Masa volúmica (g/mL)	Grado alcohólico (% vol)	G/F (g/L)	Acidez total	Acidez volátil (g AcOH/L)	SO ₂ libre (mg/L)	SO ₂ total (mg/L)	pH	Ácido tartárico (g/L)	Ácido málico (g/L)	Glicerol (g/L)	Ácido glucónico (mg/L)
70	0,9908	13,20	0,12	8,20	0,42	10	60	3,30	4,47	2,08	7,78	278
71	0,9910	13,45	0,00	6,50	0,21	7	23	3,49	3,47	1,27	8,53	368
72	0,9914	13,00	0,00	6,30	0,16	7,00	24	3,55	3,51	1,51	7,90	195
73	0,9923	12,05	0,00	6,40	0,15	8	21	3,48	3,67	1,30	7,28	146
74	0,9915	13,05	0,00	6,30	0,17	7	25	3,49	3,49	1,25	7,87	195
75	0,9926	13,00	0,00	6,20	0,20	17	29	3,63	3,15	1,40	8,21	330
76	0,9905	12,05	0,00	5,70	0,05	5	36	3,37	4,62	0,49	6,74	97
77	0,9893	13,20	0,00	6,00	0,09	8	41	3,41	4,57	0,64	7,03	116
78	0,9900	12,20	0,00	5,90	0,06	8	30	3,38	4,47	0,64	6,94	95
79	0,9899	12,15	0,00	5,40	0,05	7	35	3,41	4,78	0,58	6,95	85
80	0,9922	12,50	0,00	5,70	0,16	16	47	3,74	2,85	2,35	7,67	74
81	0,9920	12,55	0,00	6,00	0,17	12	28	3,73	3,16	2,32	7,29	61
82	0,9922	12,50	0,00	6,10	0,20	15	39	3,73	3,02	2,24	7,42	53
83	0,9925	12,10	0,00	6,40	0,17	13	25	3,69	3,12	2,39	6,99	50
84	0,9919	12,75	0,00	6,20	0,2	13	29	3,74	2,82	2,36	7,81	61
85	0,9921	12,75	0,00	6,00	0,22	13	31	3,73	2,97	2,24	7,99	65
86	0,9914	14,80	0,00	6,00	0,35	8	47	3,57	3,16	0,78	9,11	72
87	0,9919	13,60	0,00	5,30	0,22	8	33	3,63	3,15	0,77	9,83	255
88	0,9921	14,41	0,00	5,40	0,35	9	43	3,75	2,75	0,93	10,40	221
89	0,9930	12,70	0,00	5,20	0,19	7	33	3,70	2,86	1,09	9,17	153
90	0,9944	14,25	0,00	5,10	0,23	24	19	3,83	2,68	1,27	8,41	300
91	0,9935	12,60	0,00	5,10	0,21	8	21	3,82	2,62	1,42	8,97	8
92	0,9934	12,05	0,00	4,80	0,26	9	23	3,83	2,58	1,40	8,58	229
93	0,9940	13,10	0,00	5,20	0,19	12	40	4,13	1,62	3,19	9,31	257
94	0,9958	12,05	0,00	5,40	0,19	11	35	4,13	1,54	3,44	9,06	383
95	0,9949	12,20	0,00	5,50	0,16	10	32	4,06	1,72	3,39	8,84	3
96	0,9943	12,40	0,00	5,50	0,17	10	28	4,00	1,77	3,20	8,89	332
97	0,9946	11,65	0,00	6,80	0,26	10	23	3,42	3,93	1,04	8,40	29
98	0,9943	11,25	0,00	6,40	0,20	9	17	3,33	5,49	0,73	8,70	31
99	0,9989	9,80	0,00	6,00	0,28	10	33	3,83	1,72	3,27	8,72	412
100	0,9983	9,80	0,00	6,00	0,30	8	23	3,77	1,91	2,89	8,07	349
101	0,9932	8,85	0,00	5,50	0,09	6	57	3,44	3,45	1,63	5,56	319
102	0,9965	10,25	0,01	7,10	0,28	11	29	3,47	2,80	1,30	8,63	85
103	0,9951	11,25	0,00	7,70	0,30	10	21	3,44	2,91	1,29	7,79	27
104	0,9958	11,10	0,01	7,60	0,26	11	20	3,44	2,72	1,45	7,95	27
105	0,9940	11,65	0,00	6,20	0,33	5	36	3,57	2,28	1,63	8,54	1665
106	0,9946	11,40	0,00	6,60	0,35	5	27	3,54	2,31	1,78	7,83	1571
107	0,9955	11,10	0,00	6,50	0,36	6	37	3,54	2,59	1,68	9,79	1835
108	0,9940	12,00	0,00	6,80	0,41	6	29	3,52	2,20	1,65	8,44	1477

G/F: glucosa + fructosa.

Tabla E.3 Parámetros enológicos de los vinos al final de la fermentación maloláctica de las vinificaciones estudiadas durante la vendimia de 2003.

Vinifi- cación (Case)	Grado alcohólico (% vol)	G/F (g/L)	pH	Acidez total (g/L)	Acidez volátil (g AcOH/L)	SO ₂ libre (mg/L)	SO ₂ total (mg/L)	Ácido tartárico (g/L)	Ácido málico (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Glicerol (g/L)	A280
30	11,00	0,08	3,89	3,80	0,43	24	45	1,54	0,06	1,30	6,82	44,150
31	11,40	0,08	3,83	3,90	0,28	24	39	1,62	0,04	1,34	6,79	46,400
32	11,10	0,09	3,88	4,00	0,34	25	41	1,47	0,03	1,42	6,71	50,550
34	10,45	0,10	3,41	3,60	0,23	23	50	1,43	0,01	0,65	7,01	4,070
35	11,05	0,13	3,25	3,80	0,14	10	7	2,12	0,06	0,38	5,58	4,540
36	10,60	0,13	3,33	3,80	0,25	20	59	1,58	0,01	0,46	7,22	5,690
37	10,25	0,08	3,25	3,80	0,16	17	60	1,76	0,03	0,52	6,12	4,640
38	10,80	0,06	3,32	3,50	0,15	26	68	1,84	0,01	0,37	5,61	4,790
39	10,70	0,07	3,36	3,10	0,14	26	67	1,73	0,01	0,34	5,47	4,890
40	10,85	0,10	3,27	4,30	0,16	15	59	2,07	0,02	0,65	6,55	4,980
41	10,55	0,05	3,45	3,00	0,16	33	84	1,48	0,01	0,35	4,96	4,850
42	10,90	0,08	3,38	3,30	0,15	21	65	1,90	0,01	0,27	5,78	5,520
45	10,80	0,06	3,33	3,80	0,26	19	49	2,23	0,01	0,54	5,32	4,020
47	11,00	0,05	3,32	4,20	0,18	14	57	2,57	0,01	0,61	5,44	4,150
48	11,00	0,07	3,39	4,00	0,22	32	82	2,12	0,00	0,69	5,63	3,870
49	10,70	0,08	3,31	4,20	0,15	40	102	2,39	0,02	0,62	5,28	3,930
50	10,10	0,05	3,25	4,40	0,27	30	79	2,55	0,01	0,60	5,17	3,560
51	9,50	0,40	3,91	3,30	0,26	23	45	1,73	0,06	1,48	6,65	19,650
52	9,60	0,05	4,06	3,40	0,42	25	47	1,46	0,06	1,78	6,56	19,050
53	9,80	0,03	4,08	3,30	0,36	25	47	1,53	0,05	1,85	7,12	21,400
54	9,80	0,05	4,08	3,20	0,33	28	62	1,40	0,06	1,60	7,73	22,850
55	9,50	0,05	3,95	3,80	0,76	9	57	1,62	0,05	1,47	6,69	23,750
56	9,40	0,03	4,13	3,89	0,21	28	61	1,58	0,06	1,85	6,20	23,750
57	10,20	0,05	4,04	3,30	0,33	30	58	1,42	0,07	1,75	6,96	22,850
58	10,60	0,05	3,98	3,50	0,27	30	69	1,51	0,06	1,54	6,86	20,450
59	11,05	0,02	3,77	3,80	0,29	40	63	1,58	0,05	1,25	7,07	22,500
60	11,90	0,05	3,96	3,60	0,28	62	94	1,47	0,08	1,52	8,33	24,400
61	11,40	0,05	3,77	4,10	0,25	46	69	1,63	0,07	1,48	8,03	28,350
62	11,50	0,03	3,90	3,50	0,29	29	51	1,29	0,07	1,48	7,73	26,500
63	12,05	0,02	3,85	3,80	0,29	31	50	1,39	0,08	1,30	8,17	24,150
64	11,20	0,04	3,63	4,10	0,20	32	74	1,73	0,04	1,17	8,03	21,850
65	11,40	0,03	3,74	3,80	0,30	26	52	1,16	0,07	1,29	7,85	23,350
67	11,90	0,24	3,26	4,90	0,16	6	136	1,69	1,49	0,01	6,89	4,080
68	10,40	0,25	3,75	3,00	0,30	8	90	1,01	0,01	0,95	6,94	4,020
69	12,50	0,44	3,22	6,70	0,18	17	135	1,25	3,47	0,03	7,33	4,200
70	13,35	0,63	3,04	6,60	0,27	24	172	2,44	2,04	0,00	7,92	5,510
71	13,60	0,18	3,39	4,80	0,23	47	108	1,86	0,02	0,85	8,67	19,600
72	12,95	0,12	3,49	4,50	0,20	19,00	58	1,81	0,02	0,97	8,24	18,550
73	12,00	0,09	3,42	4,80	0,19	16	55	2,30	0,02	0,85	7,53	23,150
74	13,15	0,10	3,41	4,90	0,25	18	49	2,00	0,04	0,83	8,49	21,500
75	13,20	0,13	3,43	5,00	0,31	76	148	1,96	0,03	0,93	8,91	22,950
76	12,20	0,21	3,13	4,10	0,12	8	76	2,54	0,00	0,35	7,00	47,800

Vinifi- cación (Case)	Grado alcohólico (% vol)	G/F (g/L)	pH	Acidez total (g/L)	Acidez volátil (g AcOH/L)	SO ₂ libre (mg/L)	SO ₂ total (mg/L)	Ácido tartárico (g/L)	Ácido málico (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Glicerol (g/L)	A280
77	13,35	0,42	3,17	4,70	0,07	5	52	2,19	0,61	0,00	7,83	5,460
78	12,55	0,21	3,12	4,70	0,04	5	58	2,45	0,59	0,00	6,71	5,250
79	12,30	0,25	3,20	4,00	0,08	5	62	2,16	0,21	0,24	7,36	4,400
80	12,70	0,11	3,82	3,70	0,19	39	72	1,14	0,05	1,41	7,86	50,817
81	12,70	0,13	3,76	4,00	0,22	39	62	1,39	0,05	1,44	7,55	48,767
82	12,50	0,13	3,74	4,20	0,33	103	165	1,51	0,07	1,37	7,50	51,600
83	12,40	0,14	3,74	4,20	0,26	46	79	1,24	0,07	1,47	6,91	55,100
84	12,95	0,20	3,77	3,90	0,22	45	79	1,92	0,09	1,40	7,32	39,750
85	12,85	0,19	3,71	4,00	0,23	30	51	1,71	0,09	1,35	7,40	39,750
86	14,75	0,35	3,43	4,70	0,31	22	101	2,20	0,05	0,47	7,55	43,700
87	13,75	0,21	3,52	3,90	0,33	22	58	1,90	0,04	0,49	7,55	44,150
88	14,60	0,32	3,74	4,10	0,46	16	83	1,51	0,06	0,64	10,70	42,680
89	12,90	0,24	3,76	3,80	0,47	22	62	1,54	0,05	0,81	8,92	38,040
90	11,90	0,18	3,85	3,60	0,55	15	46	1,48	0,05	0,90	8,35	30,420
91	12,70	0,23	3,91	3,60	0,71	12	41	1,27	0,05	0,99	9,60	33,430
92	12,00	0,19	3,94	3,40	0,61	32	44	1,39	0,04	0,98	8,54	12,071
93	13,00	0,15	4,31	3,30	0,64	29	49	1,16	0,10	2,26	9,19	45,660
94	11,95	0,14	4,31	3,50	0,70	51	79	0,97	0,10	2,42	8,98	46,970
95	12,25	0,12	4,24	3,60	0,63	30	49	1,00	0,09	2,26	8,84	49,140
96	12,60	0,14	4,15	3,70	0,63	23	37	0,97	0,06	2,12	9,09	54,190
97	11,65	0,20	3,36	5,40	0,55	26	47	1,64	0,09	0,73	8,90	55,650
98	11,15	0,20	3,23	5,50	0,34	35	74	3,12	0,06	0,56	9,22	44,500
99	10,20	0,09	4,02	4,10	0,64	18	47	1,23	0,09	1,91	7,58	51,100
100	9,85	0,09	3,91	4,20	0,63	25	60	1,29	0,08	1,70	7,13	43,850
101	8,95	0,00	3,40	3,50	0,10	12	146	1,14	0,03	0,97	5,34	2,660
102	10,45	0,19	3,42	5,50	0,36	37	112	1,64	0,11	1,01	8,94	55,370
103	11,45	0,18	3,35	5,70	0,37	50	116	1,63	0,09	0,95	8,60	56,880
104	11,30	0,13	3,37	5,80	0,36	25	56	1,34	0,10	1,09	8,63	55,380
105	11,85	0,11	3,73	4,40	0,48	12	68	1,01	0,04	1,19	8,10	18,150
106	11,50	0,08	3,67	4,60	0,46	22	89	1,00	0,07	1,20	7,74	19,950
107	11,00	0,15	3,64	4,60	0,49	12	56	1,13	0,05	1,17	8,52	17,100
108	11,95	0,00	3,59	4,80	0,43	13	48	0,83	0,06	1,12	7,76	22,650

G/F: glucosa + fructosa.

13. ANEXO F

Tabla F1. Contenido nitrogenado y precursores de CE de los mostos de las vinificaciones estudiadas durante la vendimia de 2003.

Vinificación (Case)	Arginina (mg/L)	Citrulina (mg/L)	Urea (mg/L)	Amonio (mg/L)	Nitrógeno Total (mg/L)
28	65	0	46	63,5	182,2
29	71	0	82	71,2	221
30	57	0	137	106	281,1
31	53	0	46	61,1	178,4
32	66	0	9	70,6	208,4
33	128	0	137	127	206,1
37	144	0	156	133	217,7
41	159	0	174	134	216,6
45	196	0	82	74,1	159,5
49	198	0	82	72,3	154,1
53	120	0	82	74,6	224,8
57	130	0	28	64,1	183,7
61	167	0	64	61,2	187,9
65	114	0	28	52,2	144,4
67	112	0	9	75	227
68	151	0	101	129	327
69	113	0	105	77	296
70	87	0	105	107	243
71	163	0	28	74	189
72	159	0	64	111	237
73	205	0	82	118	247
74	178	0	119	135	269
75	163	0	101	129	268
76	210	0	156	152	345
77	174	0	82	124	253
78	83	0	82	131	256
79	102	0	64	123	237
80	80	0	137	166	284
81	80	0	156	177	295
82	88	0	137	152	275
83	98	0	137	168	271
84	126	0	156	171	284
85	86	0	210	187	379
86	137	0	119	155	310
87	207	0	156	184	366
88	193	0	137	158	379
89	245	0	156	136	348

Vinificación (Case)	Arginina (mg/L)	Citrulina (mg/L)	Urea (mg/L)	Amonio (mg/L)	Nitrógeno Total (mg/L)
90	233	0	137	109	351
91	206	0	119	127	403
92	136	0	6	104	321
93	196	0	174	147	407
94	194	0	192	140	423
95	70	0	64	88	243
96	109	0	119	119	292
97	15	0	0	47	117
98	182	0	82	136	246
99	151	0	281	142	374
100	100	0	233	128	348
101	81	0	0	42	150
102	75	0	0	46	168
103	35	0	0	33	120
104	18	0	0	58	145
105	50	0	89	41	147
106	33	0	8	25	126
107	23	0	41	21	105
108	11	0	0	9	86

Tabla F2. Contenido nitrogenado, precursores de CE, consumo de arginina y producción de citrulina de los vinos al final de la fermentación alcohólica de las vinificaciones estudiadas durante la vendimia de 2003.

Vinificación (Case)	Amonio (mg/L)	Nitrógeno Total (mg/L)	Arginina (mg/L)	Citrulina (mg/L)	Consumo de Arginina FFA (%)	Producción de Citrulina FFA (%)
28	6	16	23	0	-65	0
29	8	22	37	0	-49	0
30	8	28	34	0	-40	0
31	9	18	14	0	-74	0
32	9	21	35	26	-47	82
33	0	29	10	40	-92	34
37	2	29	9	52	-94	38
41	1	44	19	53	-88	38
45	0	22	16	16	-92	9
49	0	24	16	34	-92	19
53	8	18	32	0	-73	0
57	9	17	29	0	-78	0
61	10	21	37	94	-78	72
65	9	23	36	4	-68	5
67	0	22	11	17	-90	17
68	0	26	22	13	-85	10
69	0	32	16	21	-86	22
70	0	25	8	27	-91	34
71	8	31	32	0	-80	0
72	7	32	23	0	-86	0
73	8	30	27	0	-87	0
74	8	35	34	4	-81	3
75	7	41	57	0	-65	0
76	2	31	17	23	-92	12
77	2	28	9	45	-95	27
78	0	25	11	30	-87	41
79	0	30	21	30	-79	37
80	6	30	33	0	-59	0
81	5	16	35	0	-56	0
82	6	24	31	0	-66	0
83	8	23	31	0	-68	0
84	6	21	28	0	-78	0
85	6	21	37	0	-58	0
86	10	58	59	0	-57	0
87	10	58	56	0	-73	0

Vinificación (Case)	Amonio (mg/L)	Nitrógeno Total (mg/L)	Arginina (mg/L)	Citrulina (mg/L)	Consumo de Arginina FFA (%)	Producción de Citrulina FFA (%)
88	8	56	58	0	-70	0
89	7	49	62	0	-75	0
90	7	40	60	0	-74	0
91	7	39	62	0	-70	0
92	7	43	58	0	-57	0
93	6	21	42	0	-79	0
94	6	32	49	0	-75	0
95	6	17	39	0	-44	0
96	4	18	45	0	-59	0
97	5	24	37	42	147	-188
98	7	45	35	5	-81	3
99	11	198	33	0	-78	0
100	17	285	43	0	-57	0
101	0	23	12	24	-85	35
102	4	34	38	0	-49	0
103	3	31	35	0	0	0
104	4	22	15	0	-22	0
105	9	175	20	0	-60	0
106	10	186	24	0	-27	0
107	9	171	12	0	-48	0
108	9	183	17	0	55	0

FFA: final de fermentación alcohólica.

Tabla F3. Contenido nitrogenado, precursores de CE, consumo de arginina y producción de citrulina de los vinos al final de la fermentación maloláctica de las vinificaciones estudiadas durante la vendimia de 2003.

Vinificación (Case)	Amonio (mg/L)	Nitrógeno Total (mg/L)	Arginina (mg/L)	Citrulina (mg/L)	Consumo de Arginina FFML (%)	Producción de Citrulina FFML (%)
28	9	18	23	0	0	0
29	10	31	32	0	-11	0
30	11	35	30	0	-12	0
31	10	22	14	0	0	0
32	15	32	15	42	-57	80
71	14	40	14	14	-56	77
72	13	44	22	0	-4	0
73	13	44	27	0	0	0
74	14	39	17	20	-50	94
75	14	64	40	0	-30	0
80	11	42	28	0	-15	0
81	12	39	32	0	-9	0
82	11	37	30	0	0	0
83	10	38	30	0	-3	0
84	12	38	27	0	-4	0
85	10	37	32	0	-11	0
86	13	61	44	0	-25	0
87	15	70	38	0	-32	0
88	16	76	52	0	-10	0
89	15	76	44	0	-29	0
90	15	64	33	0	-45	0
91	14	65	31	0	-50	0
92	14	59	40	0	-31	0
93	11	45	32	3	-24	30
94	12	57	39	1	-20	10
95	13	44	17	17	-56	77
96	11	45	22	20	-51	86
97	11	28	20	58	-46	94
98	12	39	22	17	-37	92
99	14	127	23	0	-30	0
100	15	139	22	4	-49	19
102	11	40	11	28	-71	103
103	11	28	18	38	-49	222
104	12	34	14	46	-7	4574
105	10	102	17	3	-15	99
106	10	100	16	0	-33	0
107	8	89	8	0	-33	0
108	9	105	17	0	0	0

FFML: final de fermentación maloláctica.

14. ANEXO G

Tabla G. Concentraciones de CEP de los vinos al final de las fermentaciones alcohólica y maloláctica en las vinificaciones estudiadas durante la vendimia de 2003.

Vinificación (Case)	CEP FFA (µg/L)	CEP FFML (µg/L)
31	13	60,7
37	29,9	
70	37,4	
71	54,6	54,9
78	6,7	
80	67,5	86,2
87	137,3	191,9
91	121,4	131
96	22,3	34,6
97	7,1	25,4
98	36,1	51,1
99	32,3	34,3
105	15,8	17,1

CEP: carbamato de etilo potencial
FFA: final de fermentación alcohólica.
FFML: final de fermentación maloláctica.

15. ANEXO H

Oenococcus oeni

LALVIN 31 MBR[®]

Cultivo bacteriano de inoculación directa

Potencia la estructura tánica y los caracteres afrutados
Adaptada a bajos pH y a bajas temperaturas

APLICACIONES

Lalvin 31 fue seleccionada entre los cultivos bacterianos de la colección del ITV Francia por su capacidad a terminar de forma segura la fermentación maloláctica (FML) en vinos difíciles por sus condiciones limitantes: como es pH bajo y temperaturas bajas. Lalvin 31 es idónea para la obtención de vinos afrutados presentando una buena estructura tánica.

Se ha demostrado que la intensidad colorante final del vino depende de la duración de la FML. Gracias a su capacidad de fermentar a baja temperatura, Lalvin 31 permite al técnico obtener vinos con mayor intensidad y estabilidad de color.

El pH bajo es, de forma general, uno de los factores más limitantes para las bacterias lácticas. En estas condiciones, los vinos son a menudo desequilibrados y mejorarían con una disminución de acidez. Debido a su excelente nivel de supervivencia, Lalvin 31 permite una desacidificación natural.

Gracias a sus características Lalvin 31 se conoce como el cultivo bacteriano más eficaz para el control de la FML bajo condiciones encontradas generalmente en las regiones septentrionales.

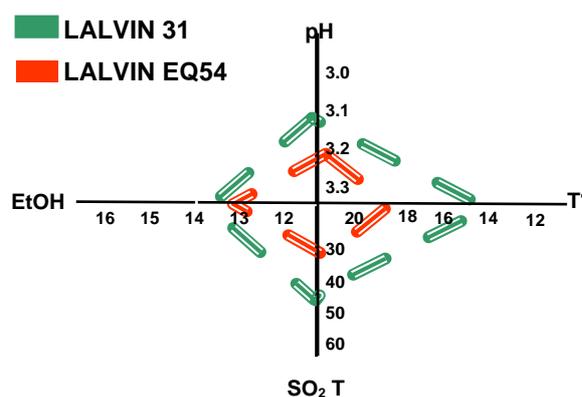
PROPIEDADES MICROBIOLÓGICAS Y ENOLÓGICAS

- Cepa pura de *Oenococcus oeni*.
- Tolerante al pH : >3,1
- Amplia franja de tolerancia a temperaturas: 13-24°C
- Cinética de FML: media (en ciertas condiciones difíciles, se observará una moderada fase de latencia)
- Tolerancia al alcohol: <13.5%
- SO₂ Total : 45 ppm
- Necesidades en nutrientes: media
- Producción baja de AV
- Disminución del acetaldehído traduciéndose por una mayor eficacia del SO₂ (menor dosis de SO₂)
- Producción de aminas biógenas: no tendencia a su producción.

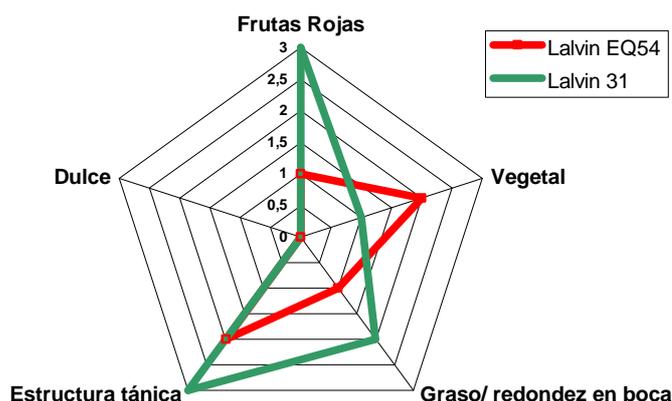
DOSIS

Disponible en sobres para la inoculación de 2.5 hl, 25 hl y 250 hl.

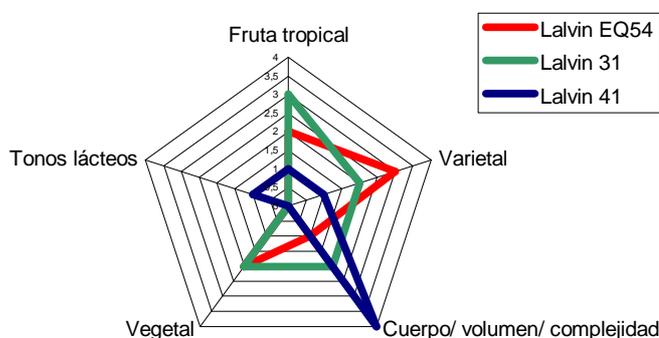
COMPARACIÓN DE LA ADAPTACIÓN A BAJO PH DE LALVIN 31 Y DE LALVIN EQ54



EFFECTO SENSORIAL DE LALVIN 31 EN EL AROMA Y LA ESTRUCTURA DE UN VINO TINTO



EFFECTO SENSORIAL DE LALVIN 31 EN VINO BLANCO



EMPLEO Y CONSERVACIÓN

Lalvin 31 es un cultivo bacteriano de inoculación directa, por lo que no necesita adaptación antes de ser inoculado en el vino.

Rehidratar el contenido de un sobre para 25 hl de vino en 500 ml de **agua mineral** a 20-30°C durante 15-20 min.

Añadir directamente al vino al final de la fermentación alcohólica y agitar suavemente o remontar al abrigo del aire para distribuir homogéneamente la bacteria y minimizar las oxigenaciones.

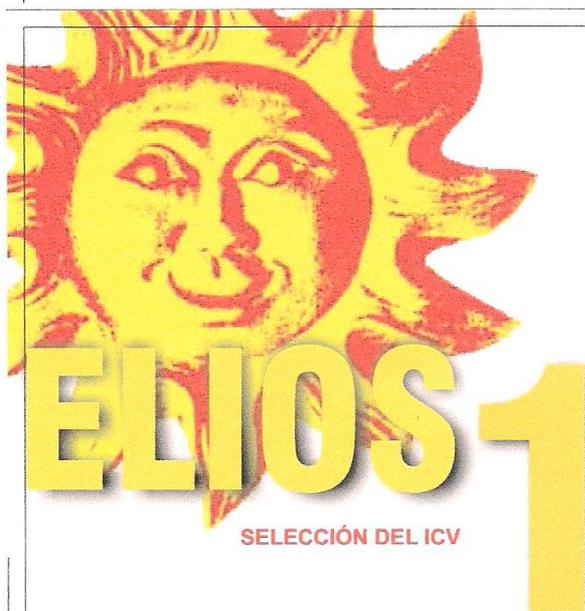
Este producto se puede almacenar durante 12 meses a 4°C y 18 meses a -18°C. Los sobres abiertos deberán ser inmediatamente y totalmente utilizados.

Lallemand garantiza la calidad de sus productos vendidos en su envase original, utilizado en conformidad con la fecha de caducidad y las condiciones de almacenaje.

Este documento contiene la información más reciente que tenemos sobre nuestros productos y ésta puede evolucionar. Esta información no constituye ningún contrato.

PARA MAYOR INFORMACIÓN

www.lallemandwine.com

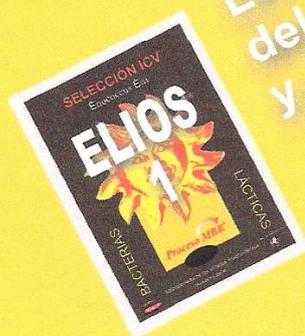


Bacterias lácticas seleccionadas de la naturaleza

Después de un largo proceso de investigación, el ICV ha aislado y seleccionado una bacteria láctica, ELIOS-1. Los ensayos a escala industrial se han realizado durante la vendimia de 2003.

- ELIOS-1 es producida, liofilizada y empaquetada por Lallemand.
- ELIOS-1 es una cepa de bacteria láctica *Oenococcus oeni* seleccionada de la naturaleza; no ha estado sometida durante su aislamiento, selección o producción a manipulación genética.
- ELIOS-1 cumple las normas redactadas en el Codex Enológico editado por la OIV y las normas de la FAO, particularmente en lo que se refiere a ausencia de metales pesados.

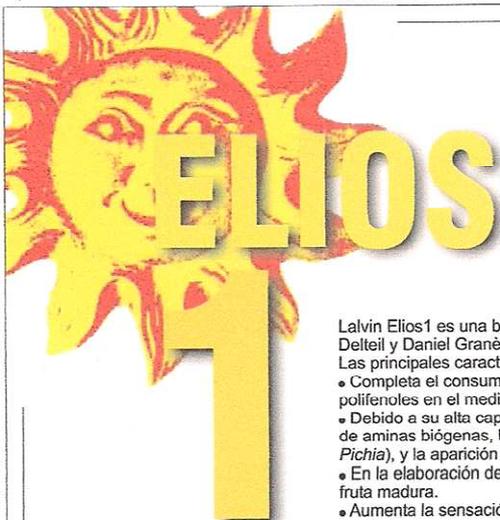
Estos certificados están a su disposición y pueden ser solicitados al ICV o a Lallemand a través de email, fax o correo postal



Lo mejor
del viñedo
y del sol



Proceso MBR



Lalvin Elios1 es una bacteria *Oenococcus oeni* seleccionada de los viñedos mediterráneos por Dominique Deltail y Daniel Granès (ICV, Francia).

Las principales características por las que fue seleccionada de ELIOS-1 fueron:

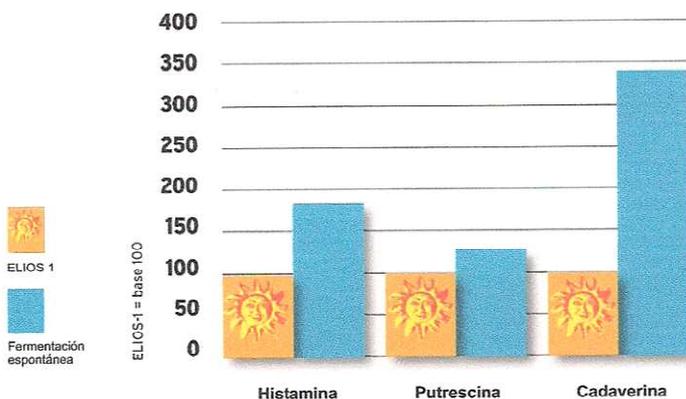
- Completa el consumo de ácido málico de los vinos tintos incluso cuando hay altas concentraciones de polifenoles en el medio y condiciones medias de temperatura y pH.
- Debido a su alta capacidad de implantación y a sus particulares propiedades metabólicas, evita la formación de aminas biógenas, la acción de organismos contaminantes (*Lactobacillus*, *Brettanomyces*, *Pediococcus* y *Pichia*), y la aparición de aromas azufrados.
- En la elaboración de vinos tintos potencia los aromas frescos varietales y aporta notas de licor, pimienta y fruta madura.
- Aumenta la sensación de volumen en boca y hace más perceptibles los taninos redondos en el paladar medio.
- Cuando se emplea para elaborar vinos blancos y rosados, desarrolla aromas a fruta madura y ayuda a mantener la estabilidad sensorial.

PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS:

- Rápida, completa y regular degradación del ácido málico en los vinos mediterráneos: con alto nivel de polifenoles.
- Resistencia elevada al etanol (Hasta 15 %v/v).
- Baja producción de acidez volátil si se realizan correctas prácticas fermentativas: ausencia de azúcar residual y control del final de la fermentación maloláctica, adicionando de forma homogénea SO₂.
- Baja producción de aminas biógenas.
- Baja producción de aromas azufrados.

CONSEJOS:

- ELIOS-1 es una bacteria heterofermentativa, por lo que puede producir acidez volátil si hay azúcar residual en el medio.
- Temperatura de empleo: de 18 °C a 25°C.
- No emplear en vinos tintos con pH ¡> 3,4.
- Tolerancia a SO₂ Total ¡> 50 mg/l.
- Tolerancia a SO₂ Libre ¡> 10 mg/l.
- No utilizar si se han empleado más de 10 g/hl en el mosto o en la uva.
- Si el grado alcohólico es mayor de 14 % v/v, pH debería ser ¡> 3,5 y SO₂ Total ¡> 35 mg/l.
- Emplear cuando la temperatura es homogénea y estable.



Efecto de ELIOS-1 sobre el contenido en aminas biógenas. Syrah, 2001. Ensayo realizado por el departamento de I+D del ICV

Histamina: Amina biógena que causa reacciones alérgicas.
En Suiza el nivel máximo es 10 mg/l.
Putrescina: amina biógena volátil asociada con olores animales ¡(Mal aliento!)
Cadaverina: amina biógena volátil asociada con olores animales ¡(Mal aliento!)

Producido y Distribuido por:



www.lallemantwine.com
fb.espana@lallemant.com