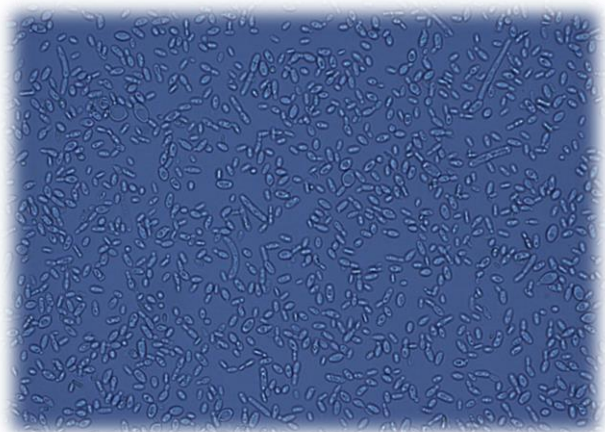

GUIA DE BONES PRÀCTIQUES

CONTROL I ELIMINACIÓ DEL DEFECTE BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS I DEL CARACTER FENOLAT DEL VI NEGRE

Projecte finançat a través de l'Operació 01.02.01 del PDR de Catalunya 2014-2020



Índex

1. INTRODUCCIÓ	1
2. COM CONTROLAR LA DESVIACIÓ ORGANOLÈPTICA	3
2.1 Accions preventives	3
2.2 Accions correctives	4
3. ANÀLISIS PER MONITORITZACIÓ LA POBLACIÓ DE <i>B. BRUXELLENSIS</i> I EL AROMA	
FENOLAT DELS VINS	5
4. NETEJA I DESINFECCIÓ DE BARRIQUES	5
5. FACTORS DE RISC PEL DESENVOLUPAMENT DE <i>B. BRUXELLENSIS</i>	6
6. CONCLUSIONS	7

1. INTRODUCCIÓ

Aquesta guia de bones pràctiques s'emmarca dins del projecte Demostratiu "Control i eliminació del defecte *Brettanomyces Bruxellensis* i del caràcter fenolat del vi negre" finançat a través de l'Operació 01.02.01 del PDR de Catalunya 2014-2020.

Brettanomyces bruxellensis es considera un dels principals microorganismes alteradors del vi, ja que és el responsable de la producció de compostos que confereixen olors desagradables i que originen la pèrdua de qualitat sensorial del vi. Aquest microorganisme presenta una baixa capacitat fermentativa i un creixement lent. Es caracteritza per tenir una tolerància excepcional a l'estrès osmòtic, l'etanol, i diferents conservants com pot ser el sulfurós. També resisteix molt bé la falta de nutrients i tolera graus alcohòlics elevats. En presència de sulfurós (a concentracions inferiors a 0.5 mg/l de sulfurós molecular) el microorganisme pot sobreviure però no ser cultivable, entrant així en un estat viable però no cultivable (VBNC).

Els principals metabòlits de *B. bruxellensis* amb impacte negatiu en el vi són els fenols volàtils; els més importants són el 4-vinil fenol, 4-vinil guaiacol, 4-etil fenol i 4-etil guaiacol. El 4-etil fenol i el 4-etil guaiacol en vins negres s'associen a aromes desagradables que recorden a l'olor de cuir, de la suor de cavall, d'estable o de vernís. Aquest aroma és anomenat per la majoria d'enòlegs com aroma a *Brett*, responsable de la majoria de vins defectuosos comercialitzats mundialment. Per això, el control d'aquest microorganisme es considera essencial per a la producció d'un vi de qualitat.

A part dels fenols volàtils, *B. bruxellensis* també és capaç de produir altres productes metabòlics amb greus repercussions en les propietats organolèptiques del vi com la formació d'àcid acètic a partir del sucre residual, acetat d'etil, àcids grassos volàtils, èsters o àcids grassos de cadena mitjana.

Com a substrat pot utilitzar diferents sucres residuals, com pot ser la sacarosa, la trealosa, i la maltosa, entre d'altres. També pot consumir la cel·lobiosa present a les barriques de fusta, sent aquestes el nínxol perfecte per al microorganisme. I finalment, també pot consumir etanol, glicerol i diferents àcids, com poden ser l'àcid succínic, màlic, làctic entre d'altres.

Finalment, s'ha descrit que *B. bruxellensis* pot modificar el color del vi. Els pigments antocianics, com els adductes dels vinil fenols, són els principals responsables del color del vi. Per tant, *B. bruxellensis* pot convertir aquests vinil fenols en derivats etílics, alterant el color resultant.

L'origen d'aquest microorganisme pot ser tant la vinya com el celler, encara que, la seva detecció en raïm i en most és poc freqüent degut principalment a la gran competència que existeix entre altres microorganismes més actius. No obstant això, en algunes anyades i finques s'han trobat focus. Respecte a la seva morfologia, presenta una forma polimorfa; des de més ovalada a més allargada. Les seves dimensions varien de 2 a 6,5 micres.

B. bruxellensis pot afectar a les característiques organolèptiques de totes les tipologies de vins, tant blancs com negres, tot i que en els vins negres el contingut en àcids hidroxicinàmics és major (que és el precursor a partir del qual formarà l'aroma) i, per tant, els etil fenols produïts poden ser superiors també.

Actualment no existeixen estadístiques fiables sobre la freqüència del caràcter *Brett* en vins, però s'estima que almenys una tercera part de les ampolles de vi negre comercialitzades contenen una concentració potencialment detectable (per sobre del llindar de percepció) d'etil fenol. Hi ha controvèrsia sobre el límit de percepció de l'aroma en funció de l'autor que ho descriu; alguns científics descriuen que el límit de percepció és de 0,60-0,62 ppm per al 4-etil fenol i 0,11-0,14 ppm per al 4-etil guaiacol. Tanmateix, altres autors accepten el límit de percepció per al 4-etil fenol en 0,44 ppm. Encara que, en la determinació sensorial dels vins afectats per *Brett*, afecta molt la matriu intrínseca del vi. En els vins amb més cos i estructura es detecta el caràcter fenolat a concentracions més altes de 4-etil fenol que en els vins de menys consistència.

Finalment, s'ha de tenir en compte que les poblacions de *B. bruxellensis* varien en el temps, i en canvi la concentració de fenols volàtils s'acumula. Per tant, hi pot haver un vi jove que presenti una població elevada de *B. bruxellensis* (major a 10^4 - 10^5 cèl/ml) i en canvi que la concentració de fenols volàtils sigui inferior al límit de percepció sensorial. En canvi, un vi criança que presenti una concentració de *B. bruxellensis* baixa (10^3 cèl/ml) i una concentració elevada de fenols volàtils (superior a 1000 µg/l). Degut a que el vi criança ja ha presentat poblacions superiors del microorganisme que han generat l'aroma i en canvi el vi jove té un gran risc de desenvolupar l'aroma en el futur. Com major es la població de *B. bruxellensis* menys temps necessita per generar els fenols volàtils i acabar deteriorant el vi. Una concentració de cèl·lules cultivables de *B. bruxellensis* properes a un milió poden deteriorar el vi en poques setmanes gràcies a la producció de 4-etil fenol i 4-etil guaiacol.

Actualment, el mercat prefereix vins de gran estructura, densitat i matèria colorant que conservin la tipicitat del raïm, així com l'adopció per part de les bodegues de mètodes d'elaboració on s'intenta minimitzar l'ús d'additius. Les noves pràctiques enològiques dirigides a l'elaboració de vins de qualitat, a vegades comporten factors de risc, per això, la seva aplicació s'ha d'acompanyar de l'adopció de mesures de control per evitar el desenvolupament de *B. bruxellensis*. Les maceracions llargues, filtracions poc agressives, pH alts i les baixes dosis de sulfurós proporcionen un medi perfecte per al creixement del microorganisme, de manera que trobar mètodes de control i eliminació d'aquesta afectació s'ha convertit en una prioritat per al sector enològic.

L'ús de barriques de roure en l'elaboració i criança dels vins és una pràctica que es considera com un element favorable en l'evolució organolèptica d'aquests. Durant la criança en barriques els intercanvis vi/fusta enriqueixen en aromes i sensacions gustatives el producte, a més d'afavorir una microoxigenació que aporta estabilitat física i química al vi conferint-li així la delicadesa, l'equilibri i la complexitat aromàtica tan apreciats pel consumidor. Tot i que s'ha de tenir en compte, que les barriques de fusta son el principal punt crític de contaminació.

2. COM CONTROLAR LA DESVIACIÓ ORGANOLÈPTICA

Per evitar l'aparició i propagació de *B. bruxellesnis*, així com el caràcter fenolat dels vins, es poden aplicar unes accions preventives i correctives, minimitzant d'aquesta manera l'afectació al vi una vegada s'ha detectat el microorganisme o bé l'aroma.

2.1 Accions preventives

Inicialment es detallen les accions preventives, aquelles actuacions que s'han de tenir en compte i valorar per evitar que aparegui el microorganisme tant en el most/vi com en el celler. Els diferents punts a tenir en compte són:

- Avaluar la sanitat del raïm. És important tenir una bona higiene en la verema, ja que hi ha un elevat contingut de sucres, humitat, aire, calor i absència de sulfurós, qualsevol microorganisme pot créixer. És convenient limitar l'excés de raïm podrit o bé, diferenciar línies de producció segons l'estat sanitari del raïm, ja que un raïm en mal estat presenta una major concentració de microorganismes. Per tal de cuidar la higiene en la verema és convenient reduir el temps de transport del raïm, limitar l'apilament del raïm, així com mantenir higiènic els mitjans de transport amb sulfurós o bé amb la utilització de gasos inerts, com el nitrogen, diòxid de carboni, etc.
- Evitar tenir el most/vi desprotegit. Sempre que es pugui s'ha de controlar el vi principalment amb sulfurós i mantenir dosis superiors a 0.5 mg/l de sulfurós molecular. Dosis inferiors a aquesta concentració pot induir al microorganisme a entrar en un estat de viable però no cultivable, permetent al microorganisme desenvolupar-se i acabar deteriorant el vi.
- Monitorització de la població de *B. bruxellensis* durant tot el procés d'elaboració. Mitjançant una bona monitorització de la població del microorganisme, es pot detectar la presència del microorganisme abans que hagi produït l'aroma, així es pot tractar per reduir la seva població abans que arribi a poblacions elevades i evitar així la generació dels fenols volàtils. Monitoritzant i reduint la població abans que arribi a poblacions altes evita que es generin els fenols volàtils.
- Protocol d'higienització efectiu dels diferents equipaments del celler, eliminar les possibles poblacions residuals del microorganisme i verificar la higienització. *B. bruxellensis* s'ha descrit que es troba freqüentment en materials de celler com manegues, dipòsits i al terra del celler. Sempre associat a una higiene insuficient. Però on és més habitual la seva presència és a les barriques i tines de fusta. S'ha de prestar especial atenció a la seva neteja i desinfecció, assumint que és molt difícil la seva esterilització total. Aquest és el principal punt crític de contaminació d'aquest microorganisme.
- Elaboració d'un protocol de vinificació on es minimitzi la proliferació del microorganisme en aquelles finques o anyades més delicades. Per exemple, s'ha descrit que la coinoculació de

llevats i bacteris làctics pot evitar el desenvolupament de *B. bruxellensis*, ja que s'evita tenir el vi desprotegit entre la fermentació alcohòlica i malolàctica.

És molt important remarcar que amb un bon control de la població de *B. bruxellensis* es pot detectar el problema abans de que l'alteració sensorial sigui perceptible.

2.2 Accions correctives

Posteriorment es detallen les accions correctives, totes aquelles actuacions que es poden realitzar per minimitzar l'afectació una vegada s'ha detectat el microorganisme o bé l'aroma fenolat dels vins. Aquestes accions engloben totes les actuacions que es poden fer una vegada s'ha detectat el defecte. En funció de si s'ha detectat el microorganisme o l'aroma es podran fer unes actuacions o bé unes altres.

- Detecció de *B. bruxellensis*. Si s'ha detectat el microorganisme però no s'ha detectat l'aroma fenolat, el que es pot fer és eliminar el microorganisme o bé si la població és molt baixa controlar-ho perquè no es desenvolupi. El microorganisme es pot eliminar mitjançant mètodes físics i/o químics.
 - Mètodes físics per eliminar el microorganisme. Existeixen diferents tractaments, el més comú és la filtració per membranes, encara que es precisin de mides de porus inferiors a 1 mica per eliminar el microorganisme, en alguns casos s'ha de filtrar fins a 0.2 micres per assegurar-se la eliminació total de les cèl·lules. Altres metodologies són l'alta pressió hidrostàtica (HHP), ultrahomogenització a alta pressió (UHPH), camps elèctrics polsats (PEF). Aquestes darreres metodologies asseguren l'alta qualitat del producte. Finalment, hi ha altres metodologies com la llum ultravioleta, però la seva eficàcia depèn de la terbolesa, color i càrrega inicial del vi entre altres.
 - Additius químics per eliminar el microorganisme. Destaquem el diòxid de sofre, que és el antimicrobià per excel·lència utilitzat en la indústria vínica. És important remarcar que la concentració ha de ser entre 0.5-0.8 mg/l de diòxid de sofre molecular. El seu efecte depèn del pH i és variable en el temps. Un altre additiu molt utilitzat és el quitosà, s'ha verificat la seva efectivitat amb una dosi de 10 g/hl amb diferents tipologies de vins i diferents concentracions del microorganisme, fins a concentracions elevades de 1 milió de cèl·lules/ml. Altres additius són el dimetildicarbonat (DMDC), encara que no és específic per *B. bruxellensis*.
- Detecció de l'aroma fenolat dels vins. Si es nota sensorialment el defecte, s'ha d'eliminar els fenols volàtils i també el microorganisme, ja que si només s'elimina el aroma a *Brett*, amb el temps el microorganisme tornarà a produir fenols volàtils. Els etil fenols poden ser eliminats amb diferents absorbents com pot ser el carbó actiu, encara que aquests productes també absorbeixen aromes i pigments desitjats del vi. Una altra opció és la nanofiltració per la reducció dels fenols volàtils o bé la realització de cupatges per emmascarar el aroma a *Brett*.

3. ANÀLISIS PER MONITORITZACIÓ LA POBLACIÓ DE *B. BRUXELLENSIS* I EL AROMA FENOLAT DELS VINS

La caracterització microbiana del vi és realment poc utilitzada en la producció de vi en comparació amb altres processos alimentaris. No obstant això, hi ha una necessitat creixent de mètodes analítics capaços de detectar les cèl·lules dels llevats *B. bruxellensis* o els seus metabòlits, especialment per als vins negres envellits en barriques de fusta.

Brettanomyces bruxellensis ha estat objecte de dècades d'investigacions, la majoria de les quals han tingut com a objectiu desenvolupar mètodes per detectar la seva presència durant tota la cadena vitivinícola, des de la vinya fins a l'ampolla. La necessitat d'eines més eficients per detectar-ne l'aparició i l'activitat biològica està relacionada amb diversos aspectes de la seva fisiologia, cosa que dificulta molt el seu cultiu en medis de cultiu tradicionals, a causa del seu ritme de creixement molt lent. A més, pot entrar en un estat viable però no cultivable, mantenint-se viable i potencialment capaç de provocar el deteriorament.

S'han desenvolupat medis de cultiu selectius per a l'aïllament de *B. bruxellensis*, com el medi de cultiu *Diferencial Brettanomyces Dekkera Medium* (DBDM). A part, en els darrers anys s'han ideat nous mètodes de detecció dirigits a àcids nucleics, ARN i ADN. La tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) ha estat l'opció més freqüent per detectar *B. bruxellensis*. Posteriorment s'ha utilitzat la tècnica de la PCR quantitativa (qPCR) per detectar i quantificar *B. bruxellensis*. A més dels mètodes de PCR i qPCR, altres metodologies s'han desenvolupat per detectar *B. bruxellensis* en mostres de vi, com la fluorescència d'hibridació in situ (FISH), la citometria de flux i l'ús de biosensors.

S'ha de tenir en compte que amb les tècniques dependents de cultiu, com per exemple el creixement en el medi de cultiu DBDM, els resultats s'obtenen després de deu dies d'incubació del microorganisme. Aquesta metodologia es econòmica, lenta i no es poden detectar les cèl·lules Viables però no cultivables (VBNC). Amb les tècniques independents de cultiu basades en l'ADN es detecten totes les cèl·lules (vives, mortes i VBNC), amb les tècniques basades en l'ARN es detecten les cèl·lules vives i les VBNC, aquestes són tècniques més ràpides i cares.

Els fenols volàtils es quantifiquen mitjançant una extracció en fase sòlida (SPME) i posterior quantificació amb GC-MS.

4. NETEJA I DESINFECCIÓ DE BARRIQUES

La contaminació per *B. bruxellensis* és perjudicial per tots els vins però especialment per als vins d'alta qualitat envellits en costoses barriques de roure. Ja que les barriques de roure són el nínxol perfecte per aquest microorganisme, com s'ha comentat anteriorment *B. bruxellensis* pot utilitzar la cel·lobiosa de les barriques com a substrat i també presenta la capacitat de penetrar profundament a la fusta fins a una profunditat de 8 mm per sota de la superfície de les barres. El sanejament de les barriques juga un paper fonamental per evitar la contaminació

creuada entre vins diferents i l'establiment de *Brettanomyces* a les botes. S'han avaluat diversos tractaments de sanejament, com ara vapor d'aigua, aigua calenta, la irradiació UV, els ultrasons, les microones, l'ozó en forma de gas i aquos, per controlar la viabilitat dels llevats *B. bruxellensis* a les botes. Les tecnologies més efectives són l'ozó gasos, els ultrasons de gran potència i l'aigua calenta. Encara que el tractament amb millors resultats i fàcil de realitzar és el tractament amb aigua calenta. Aquest tractament consisteix en aplicar aigua calenta a 80°C durant 20 minuts. Es va comprovar que amb barriques contaminades amb *B. bruxellensis* amb una població entre 100.000 cèl/ml i 1.000.000 cèl/ml després d'aplicar el tractament amb aigua calenta no es detectava *B. bruxellensis*. Per tant, aquest tractament és efectiu per eliminar les cèl·lules de *B. bruxellensis* de les barriques de fusta.

S'ha de tenir en compte que l'ús de barriques de fusta velles, principalment amb més de tres usos, presenta un gran risc de contaminació de *B. bruxellensis*.

5. FACTORS DE RISC PEL DESENVOLUPAMENT DE *B. BRUXELLENSIS*

Els principals factors de risc que afavoreixen el desenvolupament de *B. bruxellensis* es poden desglossar en factors intrínsecs i extrínsecs del vi i pràctiques d'elaboració.

Els factors intrínsecs del vi són que aquest presenti sucres residuals, un pH elevat (3.7-3.8), un grau alcohòlic inferior a 14% vol. entre d'altres. Tots aquests factors afectaran l'estabilitat microbiològica del vi, com també el grau de maduresa del raïm, la sanitat d'aquest, així com la concentració i soques de *B. bruxellensis* presents i les seves interaccions amb altres microorganismes.

Els factors extrínsecs que afecten el desenvolupament de *B. bruxellensis* són la concentració de diòxid de sofre, la temperatura del vi, si aquesta està a una temperatura superior a 15°C, etc. Tots aquests factors afectaran la susceptibilitat del vi a presentar el desenvolupament de *B. bruxellensis* i el defecte de l'aroma a Brett.

Finalment, com a pràctiques d'elaboració destaquem que una higiene insuficient, la falta de tractaments d'estabilització com la clarificació i la filtració, unes males condicions d'emmagatzematge com la disponibilitat d'oxigen, elevades temperatures, tipus de container unes males condicions de vinificació poden acabar facilitant el desenvolupament del microorganisme.

Per tant, s'observa que hi ha un gran conjunt de variables que afecten el desenvolupament de *B. bruxellensis*, però tot i que no es presentin aquests condicionants de factors de risc mai es pot estar totalment segur que no es pot produir el creixement del microorganisme i per tant la seva alteració organolèptica.

6. CONCLUSIONS

Com a conclusions per a un bon control de l'alteració de l'aparició de *B. bruxellensis* i del caràcter fenolat dels vins és molt important realitzar una bona monitorització per tal de controlar les poblacions microbianes en totes les etapes del procés de vinificació. Ja que és molt més senzill i amb menys conseqüències haver de reduir i/o eliminar el microorganisme que l'aroma generat. Per aquest mateix motiu, s'han de controlar els nivells de sulfits, ja que tenir el vi desprotegit té un gran risc de desenvolupament del microorganisme. En qualsevol moment des de l'entrada de raïm fins a la copa de vi que pren el consumidor es pot desenvolupar el microorganisme i generar el defecte a *Brett*.

S'ha demostrat que el problema del desenvolupament de *B. bruxellensis* va associat a qualsevol tipologia de vi, varietat, Denominació d'Origen, etc. Hi ha condicions més o menys favorables perquè es desenvolupi el microorganisme, però en cap condició es pot estar segurs que no es desenvoluparà el microorganisme.

D'altra banda, i no menys important és mantenir una bona higiene en el celler, això implicarà una bona elaboració de vi. S'han de disposar d'eines per validar la higiene i el control microbiològic, és aconsellable realitzar un control microbiològic dels diferents processos de neteja ja que no hi ha cap altra forma d'assegurar-se que la neteja i desinfecció s'ha realitzat correctament. S'ha demostrat que el tractament de la neteja amb aigua calenta a 80°C durant 20 minuts es efectiu per la desinfecció de barriques i material de bodega.

És molt important remarcar que amb un bon control de la població de *Brettanomyces* es pot detectar el problema abans que l'alteració sensorial sigui perceptible.