



Las bacterias lácticas en la vinificación de Tannat. Estudio del aroma del vino

Q. F. Mariela Medina

Facultad de Química
Universidad de la República

2018

Montevideo, Uruguay



Las bacterias lácticas en la vinificación de Tannat. Estudio del aroma del vino

Q. F. Mariela Medina

Tesis entregada como parte de los requerimientos para la obtención del título de Doctor en
Química.

Directores de Tesis

Dr. Q.F. Eduardo Dellacassa

Dr. I.Q. Eduardo Boido

Biotechnología de las fermentaciones - CYTAL

Química Analítica – DEC

Facultad de Química

Universidad de la República

2018

Montevideo, Uruguay

Agradecimientos

A mis directores de tesis, Dr. Q.F. Eduardo Dellacassa y Dr. I.Q. Eduardo Boido por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, por su orientación, confianza, dedicación y paciencia.

Al Lic. Gabriel Pérez del Área de Biotecnología de las Fermentaciones, por sus consejos, recomendaciones y por dedicar su tiempo a discutir aspectos microbiológicos fundamentales en el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Laura Fariña quien me ayudó a desarrollar los procedimientos extractivos, en el entrenamiento y manejo del instrumental para realizar las determinaciones en el laboratorio de Biotecnología de Aromas, así como en la coordinación del uso de los equipos para que los tuviera disponibles cuando los necesité.

A la Dra. Valentina Martín, por su apoyo en aspectos informáticos que le consulté.

A la Dra. Karina Medina, que en los inicio de esta tesis me guió por el laboratorio de Enología.

A todos los integrantes del Área de Biotecnología de las fermentaciones por brindarme todos los recursos para que pudiera realizar mi trabajo.

Al Dr. Moisés Knochen, Prof. Titular de Química Analítica, por permitirme trabajar libremente durante el desarrollo de esta tesis.

A la Q.F. Alicia Mollo y Q.F. Alexandra Sixto por ser mis compañeras de ruta en la analítica de los metales, por las ideas, los emprendimientos, las recomendaciones, y el sostén en el día a día.

A mis compañeros de Química Analítica, los de hoy por el apoyo que me han brindado y los que estuvieron al inicio de este proceso de ejecución de tesis porque me alentaron a llevarlo a cabo.

A los integrantes del área de Farmacognosia y Productos Naturales, quienes siempre me permitieron la utilización del equipamiento para todas las separaciones que tuve que realizar.

A la Dra. Zulema Coppes por poner a mi entera disposición el espectrofotómetro que utilicé.

Al Enol. Andrés Zecchi y a la empresa Abastecimientos, por donarme las enzimas utilizadas en las determinaciones de compuestos ligados.

A las empresas Establecimiento Juanicó S.A., Bodega Bouza, Bodega Carrau por proporcionar las muestras de vino con las que se trabajó.

Al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) por su colaboración en la financiación de las actividades realizadas.

A mis compañeros y directivos de Establecimiento Juanicó S.A. con los que he compartido con entusiasmo muchos de los hallazgos durante la realización de esta tesis y que me apoyaron cuando tomé la decisión de hacerla.

A mis compañeros y alumnos de la Escuela de Vitivinicultura, que con interés participaban en comentarios que intercambiábamos sobre este trabajo.

A Pierino pilar fundamental de mi vida, a mis hijos Andrés y Valentín por ser la alegría y luz en el camino, a mis padres Carlos y Teresa porque les debo lo que soy y que con mucho amor nos inculcaron la importancia de la perseverancia y responsabilidad para lograr nuestras metas, a mis hermanos, cuñadas, sobrinos por estar siempre.

A los amigos que en diferentes momentos han sabido escuchar y dar consejos desde mis orígenes en el pago de La Cadena hasta hoy en el pueblo de Juanicó.

A todos, ¡muchas gracias!

Índice general

Agradecimientos.....	1
Índice general	3
Índice de tablas.....	7
Índice de figuras	9
Listado de abreviaturas.....	11
Resumen	12
Abstract	14
Capítulo 1	16
1 Introducción general.....	16
1.1 Objetivos.....	19
1.1.1 Objetivo general	19
1.1.2 Objetivos específicos.....	19
1.2 El Tannat en Uruguay.....	20
1.3 El proceso de vinificación	22
1.3.1 El grano de uva madura, sus principales compuestos	24
1.3.2 Composición del vino.....	26
1.4 Aromas del vino.....	27
1.4.1 Aromas varietales	28
1.4.2 Aromas prefermentativos	38
1.4.3 Aromas fermentativos	39
1.4.4 Aromas postfermentativos.....	45
1.5 Los compuestos fenólicos y el color de los vinos	45
1.6 Bacterias lácticas en el vino.....	52
1.6.1 Características de las bacterias lácticas en el vino	53
1.6.2 Requerimientos nutricionales y metabolismo de las bacterias lácticas.....	55
1.6.3 Rol de las glicosidasas y otras enzimas en las propiedades sensoriales.....	63
1.6.4 Evolución de la población de bacterias lácticas durante la vinificación	68

1.6.5	Contribución de la FML a las propiedades sensoriales del vino.....	71
1.6.6	Factores que influyen en el crecimiento de las BAL y en la FML.....	72
1.7	Metales: interacciones con bacterias lácticas en el vino.....	75
1.7.1	Rol de los metales en los organismos vivos.....	75
1.7.2	Interacción entre metales y bacterias lácticas	77
Capítulo 2	81
2	Aislamiento, caracterización y selección de cepas de bacterias lácticas autóctonas partir del vino.....	81
2.1	Introducción.....	81
2.1.1	Medios de aislamiento, cultivo y conservación de BAL.....	82
2.1.2	Evaluación de la actividad β -glucosidasa.....	82
2.1.3	Justificación.....	84
2.2	Objetivos.....	85
2.3	Materiales y métodos.....	85
2.3.1	Cultivo, aislamiento y conservación de bacterias lácticas	85
2.3.2	Cultivo de bacterias lácticas comerciales.....	86
2.3.3	Aislamiento de bacterias lácticas a partir de vino	86
2.3.4	Medida de la actividad β -glucosidasa método EGA	88
2.3.5	Determinación de la actividad β -glucosidasa método del <i>p</i> -nitrofenol β -D-glucopiranosido (<i>p</i> -NPG).	88
2.4	Resultados y discusión.....	88
2.4.1	Cultivo de bacterias comerciales.....	88
2.4.2	Evaluación de la actividad β -glucosidasa método EGA, en cepas comerciales	90
2.4.3	Comparación de los métodos de determinación de la actividad β -glucosidasa .	91
2.4.4	Aislamiento, selección y caracterización de bacterias lácticas a partir de vino .	92
2.5	Conclusiones.....	96
Capítulo 3	98

3	Condiciones de fermentación de las bacterias lácticas para la liberación de compuestos aromáticos en un medio similar vino	98
3.1	Introducción.....	98
3.1.1	Justificación.....	100
3.2	Objetivos.....	102
3.3	Materiales y métodos.....	102
3.3.1	Cepas e inóculo de siembra.....	102
3.3.2	Medio similar vino	103
3.3.3	Evaluación de BAL en el MSV: aptitud de crecimiento y realización de la fermentación maloláctica.	104
3.3.4	Condiciones de crecimiento en el MSV	106
3.4	Resultados y discusión.....	106
3.4.1	Condiciones de fermentación	106
3.4.2	Caracterización de los glicósidos de Tannat	114
3.5	Conclusiones.....	116
Capítulo 4	117
4	Liberación de compuestos aromáticos a partir de precursores glicosidados de vinos Tannat con cepas de bacterias lácticas autóctonas	117
4.1	Introducción.....	117
4.1.1	Composición aromática de los vinos Tannat.....	117
4.1.2	Técnicas analíticas de cuantificación de los compuestos libres y ligados en vino	122
4.1.3	Justificación.....	124
4.2	Objetivos.....	124
4.3	Materiales y métodos.....	124
4.3.1	Extracción de compuestos libres y ligados	124
4.3.2	Identificación de los compuestos aromáticos y cuantificación	125
4.3.3	Cepas, condiciones y monitoreo de fermentación.....	126

4.3.4	Tratamiento de datos	126
4.4	Resultados y discusión.....	127
4.5	Conclusiones.....	138
Capítulo 5	140
5	Evaluación del color durante la fermentación maloláctica realizada con cepas de bacterias lácticas autóctonas.....	140
5.1	Introducción.....	140
5.1.1	Justificación.....	143
5.2	Objetivos.....	143
5.3	Materiales y métodos.....	143
5.4	Resultados y discusión.....	144
5.5	Conclusiones.....	147
Capítulo 6	148
6	Caracterización del contenido metálico de vinos Tannat y correlación con la dinámica de la FML.....	148
6.1	Introducción.....	148
6.1.1	Justificación.....	151
6.2	Objetivos.....	152
6.3	Materiales y métodos.....	152
6.4	Resultados y discusión.....	154
6.5	Conclusiones.....	159
Capítulo 7	161
7	Conclusiones generales y perspectivas	161
Referencias bibliográficas	165
8	Anexo	184
8.1	Publicaciones	184
8.2	Trabajos presentados	184

Índice de tablas

Tabla 2.1: Crecimiento de bacterias lácticas comerciales en medio MRS.....	89
Tabla 2.2: Medida de actividad de enzima β -glucosidasa en agar esculina muestras de bacterias comerciales.....	90
Tabla 2.3: Medida de la actividad β -glucosidasa utilizando <i>p</i> -NPG para cepas comerciales y autóctonas.....	91
Tabla 2.4: Actividad β -glucosidasa por el método EGA de bacterias lácticas aisladas a partir de vinificaciones.....	93
Tabla 2.5: Cantidad de cepas y nivel de actividad β -glucosidasa por el método EGA a pH 6 y 4.....	94
Tabla 3.1: Escala para comparar presencia o ausencia de ácido málico y láctico al realizar la cromatografía en capa fina	105
Tabla 3.2: Escala numérica utilizada para la evaluación de la presencia de turbidez en el MSV.....	105
Tabla 3.3: Ensayo 1- Fermentación en MSV, en TCV a pH 3,5.....	107
Tabla 3.4: Ensayo 2- Fermentación en MSV sin glicósidos en TCV a pH 3,5.....	108
Tabla 3.5: Ensayo 3-Fermentación en MSV sin glicósidos, TC y CCV a pH 3,5 y 5,5.	109
Tabla 3.6: Ensayo 4 - Fermentación en MSV sin glicósidos, en JA, a pH 3,5 y pH 5,5.	111
Tabla 3.7: Fermentación en MSV de las cuatro cepas seleccionadas.	113
Tabla 3.8: Principales agliconas identificadas de acuerdo al cromatograma de los glicósidos extraídos de vino Tannat.	115
Tabla 4.1: Compuestos del aroma en uvas y vinos Tannat en forma libre y en forma glicosidada.....	119
Tabla 4.2: Valores medios y desviación estándar de VARLIBRES en $\mu\text{g L}^{-1}$ para cada compuesto por cepa.....	128
Tabla 4.3: Valores medios y desviación estándar de VARLIGADOS en $\mu\text{g L}^{-1}$, para cada compuesto por cepa.....	130
Tabla 4.4: Descriptores y umbrales de percepción para compuestos identificados en uvas/vinos Tannat.....	134
Tabla 4.5: Valores medios y desviación estándar para la sumatoria de las VARLIBRES y VARLIGADOS para terpenos y norisoprenoides.....	137
Tabla 5.1: IC e IPT para los ensayos de FML en medio similar vino y las diferentes cepas....	145
Tabla 5.2: Variación de pH durante el transcurso de la FML en el MSV.....	145
Tabla 5.3: Variación de la IC, del IPT y del matiz en el MSV en función de las cepas.	146

Tabla 6.1: Esquema de condiciones para la determinación de metales por FAAS.....	153
Tabla 6.2: Concentraciones promedios para los metales analizados en vinos Tannat.	155
Tabla 6.3: Concentración de elementos en medios de cultivo y en estudios de tolerancia e inhibición.....	157
Tabla 6.4: Parámetros de vinos y duración de FML.	158

Índice de figuras

Figura 1.1: <i>Vitis vinifera</i> L. cv. Tannat, racimo en día de la cosecha.	21
Figura 1.2: Proceso de vinificación.	23
Figura 1.3: Partes del grano de uva.	24
Figura 1.4: Aromas en el proceso de vinificación.	27
Figura 1.5: Principales compuestos terpénicos reportados en uvas y vinos.	29
Figura 1.6: Carotenoides.	30
Figura 1.7: Degradación de los carotenoides.	31
Figura 1.8: Derivados norisoprenoides no megastigmanos.	31
Figura 1.9: Derivados norisoprenoides megastigmanos.	32
Figura 1.10: Origen de compuestos fenólicos en uva.	33
Figura 1.11: Precursores y compuestos azufrados en uva y vino.	35
Figura 1.12: Principales pirazinas en uvas y vinos.	36
Figura 1.13: Compuestos glicosidados en uvas y vinos.	37
Figura 1.14: Biosíntesis de compuestos C6 en la etapa prefermentativa.	39
Figura 1.15: Compuestos derivados del metabolismo de la levadura en el vino.	43
Figura 1.16: Compuestos derivados del metabolismo de <i>Oenococcus oeni</i>	44
Figura 1.17: Estructura de flavonoides.	47
Figura 1.18: Antocianidinas en uva y vino.	48
Figura 1.19: Monoglucósido de antocianina acilada con ácido p-cumárico	48
Figura 1.20: Formas de antocianinas.	49
Figura 1.21: Unidades 3-flavanoles en taninos de uva.	50
Figura 1.22: Reacción de ciclo adición entre glucósido de malvidina y 4-vinil-fenol.	51
Figura 1.23: Carácter homofermentativo y heterofermentativo de las BAL del vino.	56
Figura 1.24: Metabolismo de la glucosa por las bacterias lácticas, vía homofermentativa.	57
Figura 1.25: Metabolismo de la glucosa por las bacterias lácticas, vía heterofermentativa.	58
Figura 1.26: Metabolismo de las pentosas por las bacterias lácticas.	58
Figura 1.27: Transformación del ácido málico durante la fermentación maloláctica.	59
Figura 1.28: Formación de diacetilo, acetoina y 2,3 butanodiol por BAL a partir de ácido cítrico.	61
Figura 1.29: Esquema de la degradación de glicerol por <i>Lactobacillus</i>	62
Figura 1.30: Metabolización de aminoácidos por bacterias lácticas.	63
Figura 1.31: Panorama general de los microorganismos predominantes durante las etapas de la vinificación.	69

Figura 1.32: Diagrama dosis-respuesta para un elemento esencial.....	76
Figura 2.1: Reacción de liberación de esculetina a partir de su glicósido esculina.	83
Figura 2.2: Esquema de trabajo para evaluación de la actividad glucosidasa (método EGA) de cepas comerciales.	86
Figura 2.3: Esquema para aislamiento y caracterización de BAL autóctonas.	87
Figura 2.4: Ensayo de producción de enzima β -glucosidasa en agar esculina.	90
Figura 2.5: Porcentaje de cepas para cada nivel de actividad evaluada a pH 6.	95
Figura 2.6: Porcentaje de cepas para cada nivel de actividad evaluada a pH 4.	95
Figura 3.1: Pasos para realizar la siembra de la cepa en el MSV	103
Figura 3.2: Esquema de las diferentes disposiciones de atmósfera de incubación.	106
Figura 3.3: Esquema de trabajo para la extracción de glicósidos para preparar el MSV.....	114
Figura 3.4: Cromatograma de los glicósidos del extracto obtenido de vino Tannat.....	115
Figura 4.1: Trompeta de Horwitz	136
Figura 4.2: Sumatoria de las VARLIBRES y VARLIGADOS por grupo de compuestos en función de la cepa de bacterias lácticas.....	137
Figura 5.1: Antocianidinas de uvas y vinos.	140
Figura 6.1: Interacción entre los parámetros alcohol, pH, Mn y la duración de la FML.....	159

Listado de abreviaturas

APHA: American Public Health Association

BAL: Bacterias lácticas

CIE (Commission Internationale de L'Eclairage): Comisión Internacional de Iluminación.

CMI: Concentración mínima inhibitoria.

ENTAV (Etablissement National Technique pour l' Amelioration de la Viticulture): Establecimiento Técnico Nacional para la Mejora de la viticultura.

FA: Fermentación alcohólica.

FAAS (Flame Atomic Absorption Spectrometry): Espectrometría de Absorción Atómica de llama

FML: Fermentación maloláctica

FTIR (Fourier-transform infrared spectroscopy): espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier

GC-MS (Gas Chromatography Mass Spectrometry): Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas

HPLC (High Performance Liquid Chromatography): Cromatografía líquida de alta eficacia

IC: Intensidad Colorante

IFV (Institut Francais de la Vigne et du Vin): Instituto Francés de la Viña y el Vino.

INAVI: Instituto Nacional de Vitivinicultura

INRA (Institut National de la Recherche Agronomique): Instituto Nacional de Investigación Agronómica

IPT: Índice de Polifenoles Totales

MRS: Man Rogosa y Sharp

MS (Mass spectrometry): Espectrometría de masas.

MSV: Medio Símil Vino

OIV: Organización Internacional de la Viña y el Vino

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

TLC (Thin Layer Chromatography): Cromatografía en capa fina

VCP: Vinos de Calidad Preferente

VMP: Valor máximo permitido

Resumen

Durante el proceso de vinificación existen etapas fundamentales para la obtención de vinos de calidad, entre ellas: la fermentación alcohólica, la fermentación maloláctica y la crianza y conservación. En cada una de estas etapas se pretende potenciar la composición aromático-gustativa y cromática del producto final, el vino.

En particular, se busca extraer compuestos responsables del color tales como las antocianinas y compuestos volátiles importantes por su impacto aromático como los terpenos, C₁₃-norisoprenoides y compuestos derivados del ácido shikímico, que se encuentran presentes en los jugos de uva y otras frutas en forma glicosidada unidos a glucosa como β -D-glucopiranosídeos o disacáridos.

La hidrólisis de las antocianinas glicosidadas (antocianos) da como resultado una disminución en la estabilidad de estas moléculas, provocando una pérdida de la intensidad colorante del producto. Los compuestos volátiles glicosidados no poseen expresión aromática, sin embargo son capaces de contribuir en forma significativa al aroma varietal ya que durante los procesos de vinificación estos precursores dan origen a compuestos volátiles.

En este marco de referencia, la actividad β -glucosidasa de bacterias lácticas y en particular de *Oenococcus oeni* ha sido demostrada para distintas condiciones en medio sintético. Sin embargo, el uso de bacterias lácticas autóctonas, con actividad β -glucosidasa es un recurso que no ha sido estudiado en profundidad en condiciones de vinificación. Es así que en este trabajo se propone seleccionar cepas de bacterias lácticas autóctonas utilizando como criterio la expresión de la mayor actividad frente a los glicósidos de compuestos aromáticos provenientes de la cepa *Vitis vinífera* Tannat. A su vez, se buscará complementar la selección restringiendo el número de microorganismos seleccionados a aquellos que provoquen la menor pérdida de antocianos.

Se aislaron cepas de bacterias lácticas, presumiblemente del género *Oenococcus*, durante la fermentación maloláctica a partir de vinificaciones realizadas en bodegas del Uruguay, adaptadas a las condiciones de vinificación locales y con diferente grado de actividad β -glucosidasa evaluada con un método rápido y sencillo de screening, el método de agar esculina.

En un medio similar vino, en condiciones de fermentación optimizadas para las bacterias lácticas autóctonas, se evaluó el consumo de ácido málico y la liberación de compuestos aromáticos y el cambio en el color. Se logró la conservación mediante congelación y el mantenimiento a posteriori de la viabilidad, y se corroboró la resistencia a valores característicos de pH y alcohol del vino.

Las cepas autóctonas ensayadas presentaron actividad β -glucosidasa produciendo liberación de agliconas correspondientes a los grupos de terpenos, norisoprenoides, compuestos fenólicos y compuestos de C6. La metodología aplicada, permitió establecer diferencias de comportamiento entre ellas y los resultados son coincidentes con los ensayos previos realizados mediante el método agar esculina. Para todas las cepas de bacterias lácticas se verificó una pérdida de color vinculada con la correspondiente pérdida de antocianos.

Tomando en consideración los antecedentes disponibles acerca de las limitaciones que impone la presencia de metales al desarrollo eficiente de *O. oeni*, se evaluó el contenido de potasio, magnesio, calcio, sodio, hierro, zinc, cobre y manganeso en vinos Tannat del Uruguay. Para todos los elementos los valores de concentración hallados se encuentran dentro del rango de concentraciones reportadas para vinos de la región y del resto del mundo. Todos los elementos analizados, excepto el manganeso, están presentes en niveles de concentración adecuados para el desarrollo de las bacterias lácticas. La concentración de manganeso se encuentra por debajo de los requerimientos de las bacterias lácticas, sin embargo la fermentación maloláctica transcurrió hasta completitud en los vinos analizados.

Abstract

During the vinification process there are fundamental stages for obtaining quality wines, among them: alcoholic fermentation, malolactic fermentation and aging and conservation. In each of these stages, the aim is to enhance the aromatic-gustatory and chromatic composition of the final product, wine.

In particular, it seeks to extract compounds responsible for color such as anthocyanins and volatile compounds important for their aromatic impact such as terpenes, C₁₃-norisoprenoids and compounds derived from shikimic acid, which are present in grape juices and other fruits in the form glycosidates bound to glucose such as β -D-glucopyranosides or disaccharides.

The hydrolysis of the glycosidated anthocyanins (anthocyanins) results in a decrease in the stability of these molecules, causing a loss of the coloring intensity of the product. The glycosidated volatile compounds do not have aromatic expression, however they are able to contribute significantly to the varietal aroma since during the vinification processes these precursors give rise to volatile compounds.

In this frame of reference, the β -glucosidase activity of lactic acid bacteria and in particular of *Oenococcus oeni* has been demonstrated for different conditions in synthetic medium. However, the use of autochthonous lactic acid bacteria with β -glucosidase activity is a resource that has not been studied in depth under vinification conditions. Thus, in this work it is proposed to select strains of autochthonous lactic bacteria using the expression of the highest activity against the glycosides of aromatic compounds coming from the *Vitis vinifera* Tannat strain. In turn, we will seek to complement the selection by restricting the number of microorganisms selected to those that cause the least loss of anthocyanins.

Strains of lactic acid bacteria, presumably of the genus *Oenococcus*, were isolated during malolactic fermentation from vinifications made in Uruguayan wineries, adapted to local vinification conditions and with a different degree of β -glucosidase activity evaluated with a quick and easy method screening, the esculin agar method.

In a wine-like medium, under fermentation conditions optimized for autochthonous lactic acid bacteria, the malic acid consumption and the release of aromatic compounds and the change in color were evaluated. Conservation was achieved by freezing and post-viability maintenance, and the resistance to characteristic pH and alcohol values of the wine was corroborated.

The tested autochthonous strains showed β -glucosidase activity producing release of corresponding aglycones to the terpenes, norisoprenoids, phenolic compounds and C6 compounds. The methodology applied, allowed to establish differences of behavior between them and the results are coincident with the previous tests carried out by the agar sculine method. For all strains of lactic acid bacteria, a loss of anthocyanins was verified, linked with the corresponding loss of color.

Taking into account the available information about the limitations imposed by the presence of metals in the efficient development of *O. oeni*, the content of potassium, magnesium, calcium, sodium, iron, zinc, copper and manganese was evaluated in Tannat wines from Uruguay. For all the elements, the concentration values found are within the range of concentrations reported for wines from the region and the rest of the world. All the elements analyzed, except the manganese, are present in concentration levels suitable for the development of lactic acid bacteria. The concentration of manganese is below the requirements of the lactic bacteria, however the malolactic fermentation went on to completion in the wines analyzed.

Capítulo 1

1 Introducción general

Las bacterias lácticas, responsables de la fermentación maloláctica, juegan un rol preponderante en las características sensoriales desarrolladas en el vino, ya sea por la desacidificación, y por las modificaciones del aroma, así como por la estabilidad microbiana generada.

Durante el proceso de elaboración del vino el uso de cultivos de bacterias comerciales es una práctica que está difundida, sin embargo el costo asociado o las dificultades de adaptación a puesto de manifiesto la necesidad de buscar otras alternativas. Por otro lado la fermentación maloláctica espontánea también suele ocurrir, con cepas no caracterizadas pero que logran imponerse y desarrollarse.

En este sentido, el desarrollo de cultivos iniciadores obtenidos a partir de cepas autóctonas para la fermentación maloláctica es una alternativa que no ha sido estudiada en profundidad en la industria vitivinícola nacional.

Abordar el desarrollo de cultivos iniciadores autóctonos requiere un trabajo multidisciplinario que tenga en cuenta no sólo un estudio ecológico del ecosistema del alimento en particular (Vogel et al., 2002), sino además la caracterización de las propiedades tecnológicas y fisiológicas más adecuadas para la aplicación industrial de interés.

Dentro de las propiedades tecnológicas deseables de las bacterias lácticas a ser utilizadas como inóculo para el desarrollo de la fermentación maloláctica se citan: resistencia al estrés, resistencia a la congelación y liofilización, resistencia a pH bajo, alta tolerancia al alcohol, alta tolerancia al SO₂, buen rendimiento a bajas temperaturas, fase de iniciación corta, degradación rápida del ácido málico, tolerancia al oxígeno, tolerancia a los pesticidas, elevada resistencia a la lisozima, reducción de bacteriocinas (Krieger-Weber, 2009).

En este trabajo nos centramos particularmente en las características de las BAL de resistencia a la congelación, al pH y alcohol del vino, degradación rápida del ácido málico y tolerancia al

oxígeno. Dentro de las propiedades fisiológicas de las bacterias lácticas consideradas como deseables se citan su actividad glicosidasa, aumento de la complejidad aromática, baja pérdida de color, producción de cantidades moderadas de diacetilo, alta producción de compuestos con descriptores aromáticos positivos, reducción de las notas vegetales, reducción de la astringencia y sabor amargo, baja producción de aminas biógenas, baja producción de compuestos con descriptores aromáticos negativos (Krieger-Weber, 2009).

En este sentido, en las actividades experimentales desarrolladas en este trabajo de tesis se realizó la evaluación de la actividad β -glucosidasa, la determinación del tipo y cantidad de compuestos aromáticos generados y la determinación del color.

La evaluación de la actividad β -glucosidasa en cepas de bacterias lácticas resulta particularmente relevante ya que muchos compuestos volátiles importantes por su impacto aromático como los terpenos, C_{13} -norisoprenoides y compuestos derivados del ácido shikímico, se encuentran presentes en los jugos de uva en forma glicosidada unidos a glucosa como β -D-glucopiranosidos o disacáridos y facilitar su liberación durante la fermentación maloláctica contribuye significativamente a la calidad sensorial del vino.

Por esta razón disponer de un método rápido y sencillo que permita caracterizar y evaluar la actividad β -glucosidasa en cepas de bacterias lácticas autóctonas es de interés en el desarrollo de este trabajo. Además, si esta primera evaluación puede ser correlacionada con la liberación de compuestos aromáticos en el vino, estaríamos frente a una herramienta muy potente a la hora de la caracterización de los cultivos iniciadores.

Para poder llevar adelante la evaluación de la liberación de compuestos aromáticos a partir de los precursores glicosidados, en este trabajo se debió de disponer de la matriz de ensayo en todo momento.

Para la preparación de esta matriz se tuvieron en cuenta:

- los requerimientos nutricionales de las bacterias lácticas,
- la composición del vino,
- que la matriz tuviera los glicósidos de la cepa emblemática de nuestro país (Tannat) y las condiciones ambientales apropiadas para el desarrollo exitoso de la fermentación.

En la preparación de los medios de aislamiento, cultivo y en la matriz de ensayo utilizados para el crecimiento de bacterias lácticas, se realizó especialmente el agregado de algunas sales

de metales, en particular de manganeso y magnesio, como parte de los requerimientos nutricionales de las bacterias lácticas.

Sin embargo, la caracterización del perfil de metales de los vinos Tannat y en particular su correlación con la dinámica de la fermentación maloláctica no está suficientemente estudiada. Por lo tanto, conocer el contenido en metales de vinos Tannat vinificados en Uruguay, y en particular el de aquellos metales que pueden tener influencia en el desarrollo de las bacterias lácticas, resultó ser un aspecto del trabajo experimental a ser desarrollado en esta tesis.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

El objetivo de este trabajo de tesis fue seleccionar cepas de bacterias lácticas que presentaran elevada actividad β -glucosidasa frente a los glicósidos de compuestos aromáticos provenientes de la cepa Tannat, pero produciendo la menor pérdida posible de antocianos en condiciones similares a la vinificación.

1.1.2 Objetivos específicos

En consonancia con el objetivo general, los objetivos específicos propuestos fueron

- aislamiento de bacterias lácticas autóctonas a partir de vinos elaborados en condiciones convencionales de industrialización,
- determinación de las condiciones para el desarrollo y la conservación de bacterias lácticas comerciales y autóctonas,
- caracterización de las cepas de bacterias lácticas autóctonas en función de su potencial actividad β -glucosidasa mediante un método sencillo (método EGA),
- selección de las cepas con mejor potencial de actividad β -glucosidasa para realizar la fermentación maloláctica en un medio similar vino,
- diseño de un medio similar vino con glicósidos de Tannat y caracterización de los mismos,
- determinación de las condiciones de fermentación de las bacterias lácticas, en un medio similar vino que permita: su desarrollo, la completitud de la fermentación maloláctica, la evaluación de la capacidad de liberación de compuestos aromáticos a partir de precursores glicosidados.
- determinación de cambios en la composición de las fracciones libres y ligadas en un medio similar vino.
- determinación de la capacidad de remoción de color de las cepas y selección de aquellas con mínima capacidad de remoción de color durante la fermentación maloláctica,
- caracterización de los vinos Tannat por su contenido de metales mediante la determinación de la concentración de potasio, magnesio, calcio, sodio, hierro, zinc, cobre y manganeso en vinos. Correlacionar la concentración de estos metales en vino

Tannat con los requerimientos de las bacterias lácticas o alteración en la dinámica de la fermentación maloláctica.

1.2 El Tannat en Uruguay

La variedad *Vitis vinífera* Tannat tiene su origen en Europa, en la zona de los Pirineos, y ha sido cultivada desde la antigüedad en el suroeste de Francia (Blanchard, 1999).

En la actualidad la mayoría de los viñedos de esta variedad se ubican en: Madiran, Francia con 2946 hectáreas, Uruguay con 1731 hectáreas, Argentina con 832 hectáreas seguidos por Brasil, Sudáfrica y Estados Unidos que en conjunto suman 655 hectáreas (OIV, 2015).

La historia de la viticultura en la región que hoy forma parte del Uruguay, está asociada a la llegada de los españoles en la época de la conquista en el siglo XVI, pero es sólo a fines del siglo XIX, con la inmigración de catalanes y vascos, que se comienza a desarrollar a mayor escala la viticultura.

Tiempo después las familias provenientes principalmente del sur de Francia y norte de Italia se establecen al sur del Uruguay y en las cercanías de Montevideo. Las dos principales variedades de uva establecidas por estas corrientes migratorias fueron *Vitis vinífera* Tannat y Folle Noir, ambos originarios de Francia (de Frutos et al., 1999).

En particular, la variedad Tannat es introducida por Pascual Harriague, un francés del País Vasco, que planta sus viñedos de esta variedad en 1870, a 400 km al norte de Montevideo, en las afueras de la ciudad de Salto (Carrau et al., 2011).

Durante el siglo XX la viticultura en el Uruguay pasó de ser una industria cuyo objetivo principal se centraba en términos de rendimiento por hectárea de uva, a pensarse en términos de la calidad vinificable de la misma. Es a partir de la década de 1990 que el Uruguay enfocó su viticultura a través de desarrollar la variedad Tannat como emblemática del país, potencializando el ingreso al mercado internacional. Para lograr este objetivo se trabajó en investigación y desarrollo tanto a nivel vitícola como vinícola, en la introducción de mejoras tecnológicas y estrategias de promoción (INAVI, 2017a).

La producción mundial de uva destinada a la producción de vino se estima en 32.000 millones de kilogramos (OIV, 2018). La producción mundial de vinos en el 2017 alcanzó alrededor de 25.000 millones de litros, en América del Sur en el entorno de los 2.500 millones de litros (OIV, 2017).

En Uruguay la producción total de uva, para la cosecha 2017, fue de 96 millones de kilogramos extraídos de una superficie total de viñedos de 6.500 hectáreas. La variedad

Tannat ocupa el 26 % del total de la superficie y en la vendimia 2017 se cosecharon alrededor de 25 millones de kilogramos de esta variedad (INAVI, 2017b).

Dentro de las características ampelográficas, agronómicas y tecnológicas de la variedad Tannat se puede reseñar:

Características ampelográficas: sumidades con importante densidad de pelos tumbados; hojas jóvenes de color rojizo con zonas bronceadas; hojas adultas de color verde oscuro, grandes, de forma pentagonal, con tres a cinco lóbulos, el lóbulo central es alargado; senos foliares poco abiertos e incluso cerrados; pigmentación mediana en los nervios; envés con densidad mediana de pelos tumbados; racimos cilíndricos con dos alas, compactos y de tamaño medio, granos de forma redondeada, de tamaño medio, y de color rojo violáceo muy fuerte a negro azulado (Figura 1.1).



Figura 1.1: *Vitis vinífera* L. cv. Tannat, racimo en día de la cosecha.

Aptitudes agronómicas: cepa vigorosa, que se adapta a la poda larga, baja resistencia a los ácaros y a la podredumbre gris (producida por *Botrytis cinérea*), sensibles a los hongos de los géneros *Peronospera* y *Oidium*.

Desde el punto de vista tecnológico: produce vinos coloreados, tánicos, de acidez elevada, permitiendo producir vinos tintos de calidad con mucho cuerpo y aptitudes para el envejecimiento (INRA, 2018).

En viticultura, el manejo y la propagación del material vegetal a partir de una misma planta conducen a identificar clones. Un clon es una descendencia vegetativa de una cepa elegida por su identidad, características fenotípicas y su estado sanitario (Roubelakis-Angelakis, 2009). Estos clones son seleccionados y registrados en Francia por el *Etablissement National*

Technique pour l' Amélioration de la Viticulture (ENTAV) del *Institut Français de la Vigne et du Vin* (IFV) a través de su marca registrada ENTAV-INRA[®], que tiene registrados 12 clones para la variedad Tannat identificados con los números 398, 399, 472, 473, 474, 475, 717, 794, 944, 1048, 1154 y 1175 (ENTAV, 2017).

Existe también un registro y conservación de clones para la variedad Tannat realizado por *Foundation Plant Service*, California, Estados Unidos, con la colaboración de la *University of California* donde en la actualizada tiene en su registro los clones 474,794, 717 (con permiso de ENTAV), 03, 01.1, 04, 04.1 (FPS UC Davis, 2017).

Dada la susceptibilidad de *Vitis vinífera* L. a ser atacada por el insecto *Dactylosphaera vitifoliae*, que produce la enfermedad en la vid conocida como filoxera, el cultivo se realiza sobre un pie resistente al que se le llama portainjerto.

El diseño de los protainjertos tiene su origen en vides americanas resistente a la filoxera y en Uruguay se han estudiado varios portainjertos diferentes: Rupestris du Lot, Riparia Glorie, SO4, R99, 1103P y 3309 (Disegna et al., 2001).

Según el último relevamiento realizado en Uruguay, los clones en producción de la variedad Tannat provienen de material vegetal importado, siendo el clon 398 el más utilizado e injertado mayoritariamente sobre el pie SO4 (INAVI, 2017a).

1.3 El proceso de vinificación

“La fermentación es una ebullición causada por espíritus que, buscando escapar de algunos cuerpos y al encontrarse con partes ásperas y terrenales que se oponen a su paso, hacen que la materia se hinche y se vuelva rara hasta que se desarraigan. Ahora, en esta separación, los espíritus dividen, diluyen y separan los componentes, lo que hace que la materia sea de una naturaleza diferente de la anterior” (*La fermentation est une ébullition causée par des esprits qui, cherchant issue pour sortir de quelques corps et rencontrant des parties terrestres et grossières qui s’opposent à leur passage, font gonfler et raréfier la matière jusqu’à ce qu’ils soient détachés. Or, dans ce détachement, les esprits divisent, subtilisent et séparent lès principes, de sorte qu’ils rendent la matière d’une autre nature qu’elle était auparavant*).

Ésta teoría formulada por Lémery en el 1684 estaba de acuerdo con el conocimiento y la química de su tiempo, posee una belleza y seducción filosófica, pero a partir de Pasteur y toda su contribución al conocimiento microbiológico es que sabemos que la transformación ocurrida del jugo de uva en vino se debe a los microorganismos (Zambonelli, 1988).

Para entender el proceso de vinificación, en la Figura 1.2 se presenta un esquema donde se muestran sus etapas, de manera tal que se comprenda mejor cada uno de las transformaciones producidas en ellas y así estudiarlas, controlarlas y manejarlas tal que se obtenga el producto con la calidad y el estilo requerido.

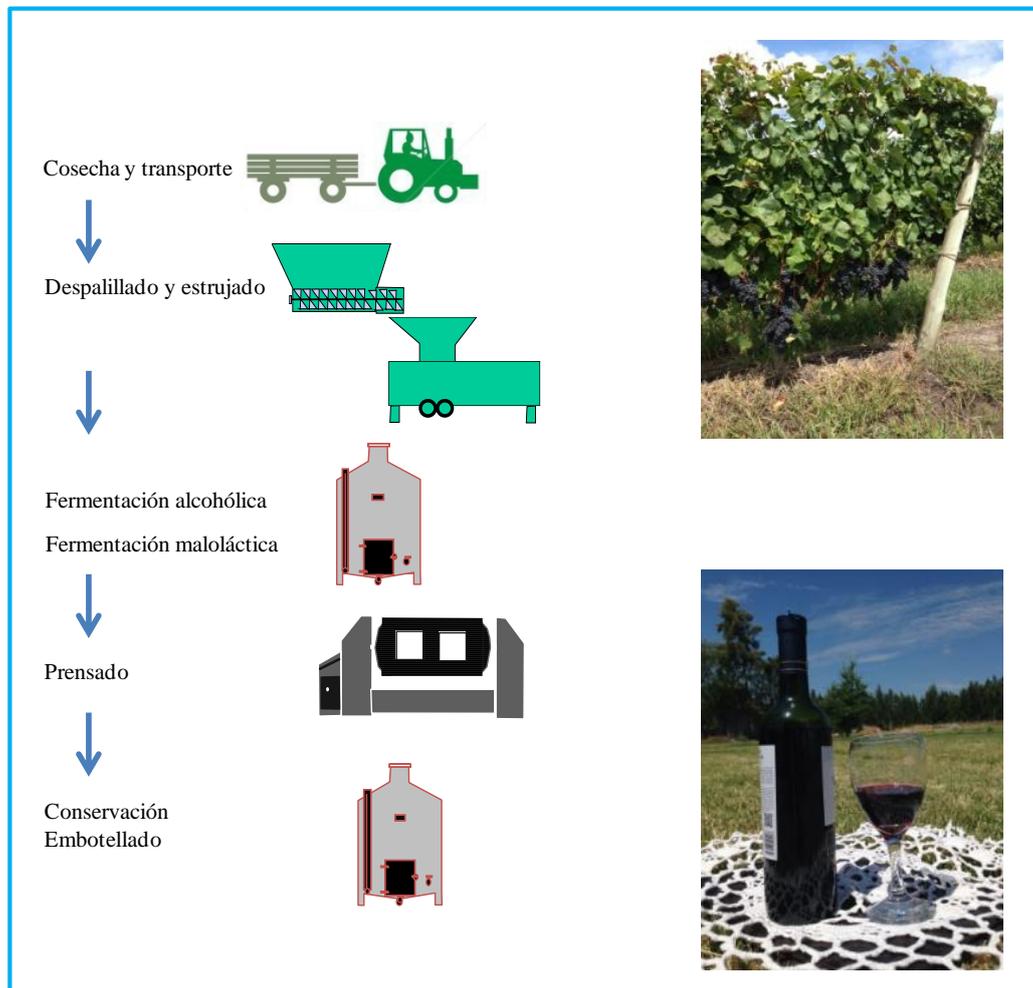


Figura 1.2: Proceso de vinificación.
Adaptado de Köning, 2009.

A continuación se describe de modo resumido el proceso para la vinificación clásica de uva Tannat:

- una vez recogidos los racimos de uva estos son transportados desde el viñedo hacia la planta de procesamiento.
- una vez en la bodega y ayudados por la despalladora y la estrujadora, los granos de uva son en primera instancia separados del raspón (escobajo), y posteriormente triturados, obteniéndose así una mezcla de líquido y partes sólidas, al que se le llama mosto, que es depositada en un recipiente
- en un corto período de tiempo comienza la fermentación alcohólica (FA), llevada a cabo por las levaduras

- en el transcurso de una semana aproximadamente prácticamente todos los azúcares del mosto se han transformado en alcohol. En este momento se realiza la separación de las partes sólidas del líquido, que ya es el vino, y se realiza el prensado de los sólidos.
- en los días sucesivos, la flora predominante es de bacterias lácticas y se desarrollará la fermentación maloláctica (FML).
- las tareas de conservación implican trasiegos, desborres y agregados enológicos para garantizar la adecuada estabilidad del vino para su envasado y posterior comercialización.

1.3.1 El grano de uva madura, sus principales compuestos

En la Figura 1.3 se muestran los componentes del grano de uva. Se puede identificar la pulpa, la cáscara y las semillas. Los tres tejidos varían considerablemente en la composición, y por lo tanto contribuyen de manera diferente a la composición general del vino.

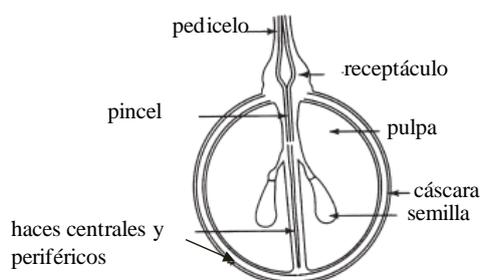


Figura 1.3: Partes del grano de uva.
Adaptado de Clarke et al., 2004.

La cáscara representa alrededor del 15% del peso del grano y es la principal fuente de compuestos aromáticos y precursores de sabor. También contiene compuestos fenólicos (flavonoles, antocianinas y taninos) que representan 30 % del total de compuestos fenólicos del grano de uva.

Las semillas representan el 4% del peso del grano, los compuestos fenólicos (flavonoides y taninos) de la semilla representan el 60% del total de los compuestos fenólicos del grano. También contiene minerales y ácidos grasos (oleico y linoleico principalmente).

La pulpa representa el 80 % del peso total del grano, los constituyentes principales son azúcares (glucosa y fructosa); ácidos orgánicos (tartárico y málico); compuestos inorgánicos, cationes (potasio principalmente, magnesio, calcio) y aniones (nitrato y fosfato), compuestos nitrogenados (proteínas solubles, aminoácidos), pectinas, compuestos fenólicos (derivados del ácido benzoico y cinámico) (Hornsey, 2007).

La composición media en porcentaje en peso del grano de uva es: 74 % de agua, 24 % de azúcares, 0,6% de ácidos orgánicos, 0,5 % de sales inorgánicas, 0,2 % compuestos nitrogenados, 0,2% lípidos, 0,2% compuestos fenólicos, 0,02% compuestos del aroma.

Los azúcares o carbohidratos presentes en mayor proporción son glucosa y fructosa, en menor medida ramnosa, arabinosa. La glucosa y la fructosa constituyen la mayor parte de los sólidos solubles del jugo y por lo tanto puede estimarse su cantidad por medida de la densidad. También existen polisacáridos como pectinas en muy baja proporción y suelen precipitar durante la fermentación (Jacobson, 2006).

Los niveles de ácido afectan directamente a la fermentación, extracción de color, estabilidad microbiana, y la estabilidad de tartratos y proteínas en el vino. Los ácidos presentes en la uva en mayor proporción son el ácido tartárico, ácido málico y ácido cítrico. Los ácidos tartárico y málico representan el 90% de todos los ácidos en la uva. El ácido L-tartárico se encuentra en concentraciones de 1 a 7 gL⁻¹, mientras que el ácido L-málico está en concentraciones de 1 a 4 gL⁻¹. La concentración de ácido cítrico ronda los 150-300 mgL⁻¹. Este contenido de ácidos orgánicos origina que el pH del mosto ronde entre 3,1 a 3,5 (Jacobson, 2006).

Las uvas contienen variedad de compuestos inorgánicos entre cationes y aniones. Los cationes incluyen potasio, magnesio, calcio, sodio y en menor medida, hierro cobre, manganeso. El potasio es el más abundante y tiene mayor efecto sobre el pH y la estabilidad del tartrato por la precipitación de sus sales. Los aniones presentes en mayor concentración son nitratos y fosfatos, seguidos por sulfatos, cloruro, bromuro, ioduro, fluoruro (Ribéreau-Gayon et al., 2006b).

Los compuestos nitrogenados en la uva están constituidos por sales de amonio, aminoácidos (y péptidos), proteínas y derivados de ácidos nucleicos y son nutrientes esenciales para la levadura durante la fermentación. El nitrógeno total se compone de todas las fuentes de nitrógeno disponibles y varía mucho entre variedades y viñedos. En general, el nitrógeno total varía de 150 a 650 mgL⁻¹. Las mayores concentraciones de nitrógeno disponible se derivan de sales de amonio y aminoácidos principalmente prolina y arginina, seguidos de ácido glutámico, alanina, ácido aspártico (Flanzy, 2000).

Los compuestos fenólicos poseen un rol muy importante en enología, siendo responsables del color, amargor y astringencia de los vinos. En este grupo se encuentran ácidos fenólicos y sus derivados, flavonoides, antocianinas y taninos. Los ácidos cinámicos más importantes de las uvas son el ácido cafeico, el cumárico y el ferúlico; los ácidos benzoicos más importantes son el ácido hidroxibenzoico, el protocatéquico, el vainillico y el gálico. Los flavonoides,

antocianos responsables de la pigmentación roja, y taninos que dan el amargo y la astringencia serán tratados con mayor detalle en el párrafo 1.5.

Dentro del grupo de los compuestos aromáticos responsables de la tipicidad aromática del vino, se incluyen sustancias volátiles y sus precursores, aldehídos, cetonas, ésteres y terpenos, pirazinas; serán tratados en mayor detalle en el párrafo 1.4.

1.3.2 Composición del vino

El proceso de fermentación del mosto da como resultado el vino, que es básicamente una solución hidroalcohólica que en términos de composición media (en porcentaje en volumen) está constituida por 87 % de agua, 12 % de alcohol etílico, 0,1% azúcares, 0,4% de ácidos orgánicos, 0,2 % de sales inorgánicas, 0,05% compuestos nitrogenados, 0,2% compuestos fenólicos, 0,02 % compuestos del aroma (Hornsey, 2007).

El etanol es formado paulatinamente durante la fermentación de los azúcares por la levadura originándose aproximadamente 1 % p/v de alcohol cada 18 gL^{-1} de azúcares.

Las propiedades solventes del etanol propician sobre las partes sólidas del mosto, la extracción de compuestos fenólicos y compuestos aromáticos.

Un remanente de azúcares en el entorno de 1 gL^{-1} puede permanecer después de la fermentación alcohólica.

Además de los ácidos tartárico, málico y cítrico originarios de la uva, se han formado como consecuencia del metabolismo de las levaduras y de las bacterias lácticas los ácidos acético, láctico y succínico, entre otros. Con estos ácidos reacciona el etanol y se forman los correspondientes ésteres de los ácidos orgánicos presentes, en particular, se da la esterificación con ácido tartárico, málico, láctico y acético.

En el vino se encuentran los mismos compuestos inorgánicos que en la uva, estos compuestos pueden variar su concentración en función de los agregados realizados durante la vinificación como por ejemplo uso de fosfato de amonio como nutriente o por la precipitación de sales de potasio y calcio con tartrato entre otros.

Los compuestos nitrogenados son consumidos por las levaduras y las bacterias. El contenido de nitrógeno en forma de amonio es de unos pocos mg por litro en el vino, y el resto lo constituyen aminoácidos, péptidos, proteínas, aminas, ácidos nucleicos, pirazinas (Hornsey, 2007).

Los compuestos fenólicos, ácidos fenólicos y sus derivados, flavonoides, antocianinas y taninos como ya se ha mencionado juegan un rol muy importante en las características sensoriales tanto del aroma como del color.

1.4 Aromas del vino

El aroma es uno de los parámetros más importante de calidad del vino, y es determinante a la hora de la preferencia del consumidor por el producto (Lockshin et al., 2012). Cientos de compuestos volátiles pueden participar en el aroma del vino, que incluye alcoholes, ésteres, ácidos, aldehídos y cetonas, terpenos, compuestos nitrogenados y sulfurados, que se encuentran en un amplio rango de concentración (Clarke et al., 2004). La contribución de los compuestos volátiles al aroma del vino va a depender de la concentración y el umbral de percepción de cada uno de ellos (Ferreira et al., 2000a).

La percepción del aroma está influenciada por la complejidad del vino, donde juegan un rol determinante los componentes volátiles (incluido el etanol) y los componentes no volátiles (compuestos polifenólicos, proteínas, carbohidratos) que pueden interactuar entre sí afectando la volatilidad (Villamor et al., 2013). El aroma del vino está directamente asociado con la química de todo el proceso de elaboración del vino, por lo que es habitual estudiar los aromas del vino en función de su origen a lo largo del proceso de vinificación, evaluando el origen de nuevos compuestos y las transformaciones que los compuestos originales sufren a lo largo del mismo y los compuestos con relevancia en el perfil aromático que se originan (Figura 1.4).

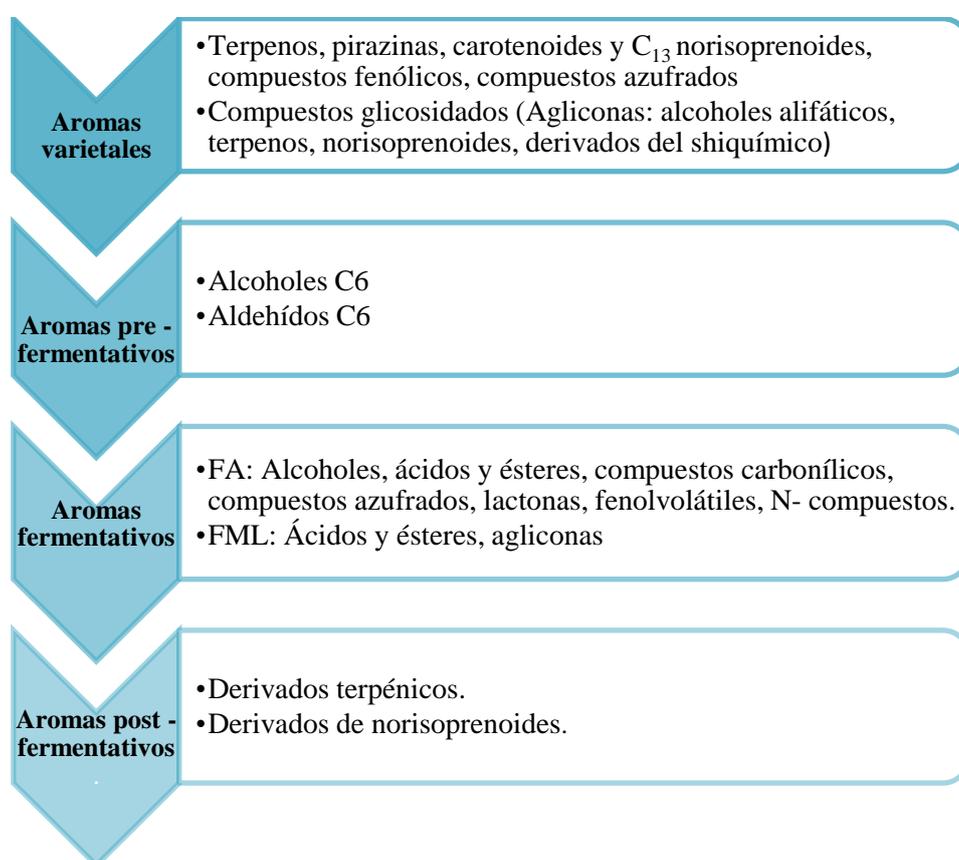


Figura 1.4: Aromas en el proceso de vinificación.

Es así que se tienen:

- aromas varietales (provenientes de la uva),
- aromas prefermentativos (formados desde la cosecha hasta el inicio de la fermentación),
- aromas fermentativos (formados por las levaduras durante la fermentación alcohólica, y las bacterias lácticas durante la fermentación maloláctica),
- aromas postfermentativos (componentes formados durante la conservación del vino, en un período que puede ir de unos pocos meses hasta decenas de años) (Flanzy, 2000).

1.4.1 Aromas varietales

Los compuestos provenientes de la uva contribuyen a la tipicidad aromática del vino y tienen un rol determinante en la calidad de los vinos. Estos compuestos son característicos de la variedad considerada y su expresión varía según las condiciones climáticas, zona de cultivo y prácticas en el manejo del viñedo. La uva es un fruto poco aromático y los compuestos relacionados con el aroma varietal se pueden agrupar en: sustancias olorosas específicas de la variedad que conforman el aroma varietal libre, precursores no volátiles y no olorosos (glicósidos, ácidos fenólicos, ácidos grasos) y otros volátiles o no que se transforman en compuestos olorosos (terpenoles, C13 norisoprenoides, dioles terpénicos) (Flanzy, 2000).

1.4.1.1 Terpenos y compuestos relacionados

Los terpenos son compuestos importantes en la tipicidad de variedades aromáticas de uva (Moscatel de Alejandría, Muscat Ottonel, Moscatel de Hamburgo, Gewürztraminer, Viognier y Albariño). Más de 50 terpenos han sido identificados en uvas, pero seis compuestos (linalol, α -terpineol, citronelol, nerol, geraniol y ho-trienol) son los más frecuentes y poseen más impacto en el sabor y aroma de los vinos (Ribéreau-Gayon et al., 2006b).

En la Figura 1.5 se muestran los principales compuestos terpénicos. Por su estructura los terpenos son agrupados en

- hidrocarburos monoterpénicos (C10), como el limoneno, α -terpineno, γ -terpineno, *p*-cimeno, mirceno o sesquiterpenos farneseno, γ -cadineno.
- alcoholes monoterpénicos como linalol, α -terpineol, nerol, geraniol, citronelol, 3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol (HO-trienol), alcoholes sesquiterpénicos farnesol y γ -cadinol.

- óxidos: óxido *trans*-furánico del linalol (óxido A), óxido *cis*-furánico del linalol (óxido B), óxido *trans*-piránico del linalol (óxido C), óxido *cis*-piránico del linalol (óxido D), óxido de nerol, oxido de rosa.
- aldehídos: geranial, neral, citronelal.
- ácidos transgeránicos: éster *trans*-geraniato de metilo.
- dioles y trioles terpénicos: *trans*- 3,7-dimetil- 1,5-octadien-3,7-diol (HO-diol I), *trans*- 3,7-dimetil- 1,7-octadien-3,6-diol (HO-diol II), 3,7-dimetil- 1-octen-3,7-diol (endiol), 2,6-dimetil- 7-octen-1,6-diol (8-hidroxi-6,7-hidrolinalol), *trans*-2,6-dimetil-2,7-octadien-1,6-diol, *cis*-2,6-dimetil-2,7-octadien-1,6-diol, *trans*- y *cis*-8-hidroxilinalol, 3,7-dimetil-2-octen-1,7-diol (7-hidroxisgeraniol), 3,7-dimetil-1-octen-3,6,7-triol.
- terpenos complejos: rotundona que contribuye a los aromas de Shiraz, Mourvèdre, Durif y posiblemente algunos vinos de Cabernet Sauvignon, percibido como pimienta (Wood et al., 2008).

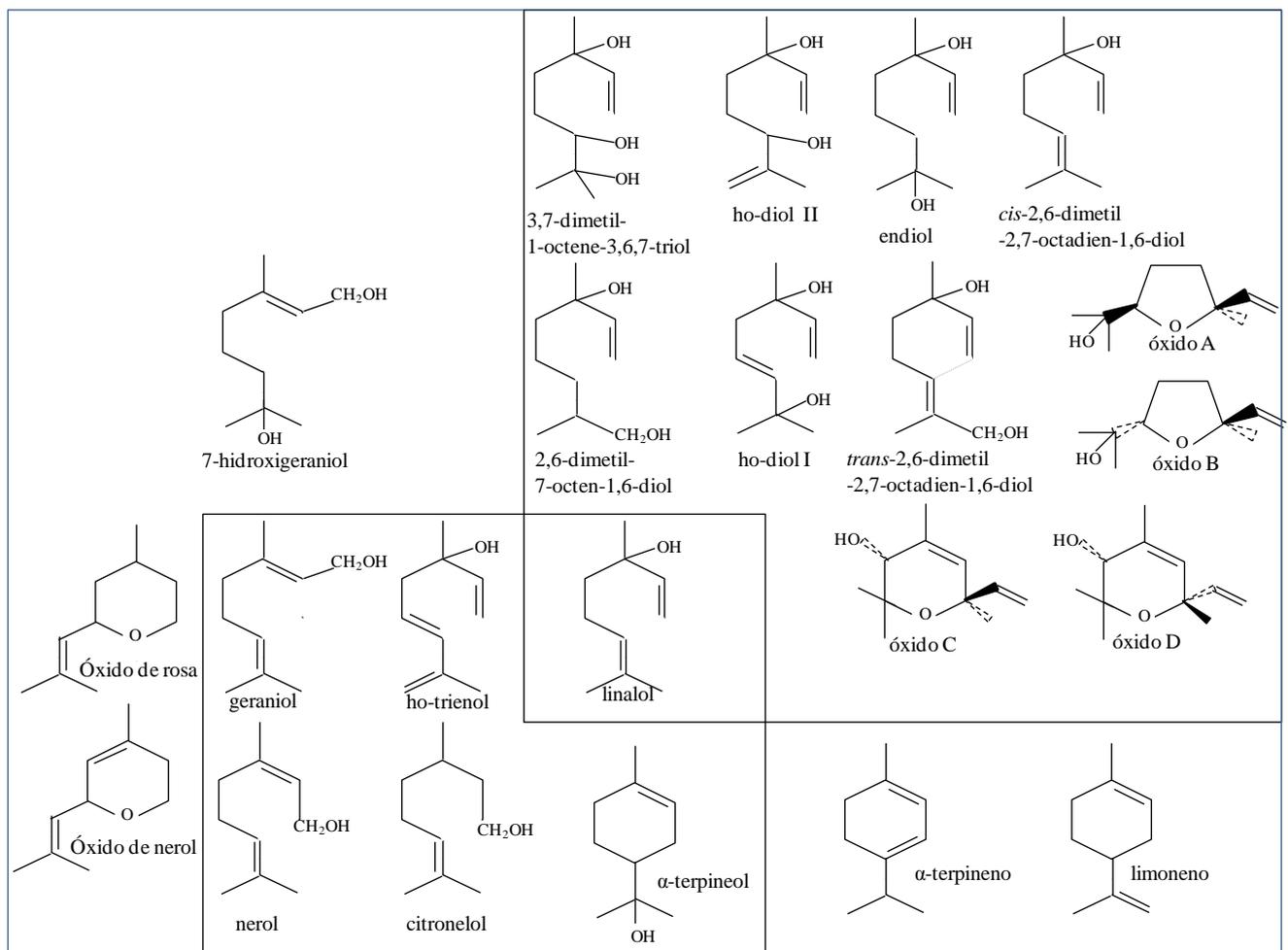


Figura 1.5: Principales compuestos terpénicos reportados en uvas y vinos.

1.4.1.2 Carotenoides y derivados C₁₃-norisoprenoides

Los carotenoides son constituyentes no aromáticos en la uva, pero revisten particular importancia por ser precursores de compuestos aromáticos, los C₁₃-norisoprenoides (Figura 1.6).

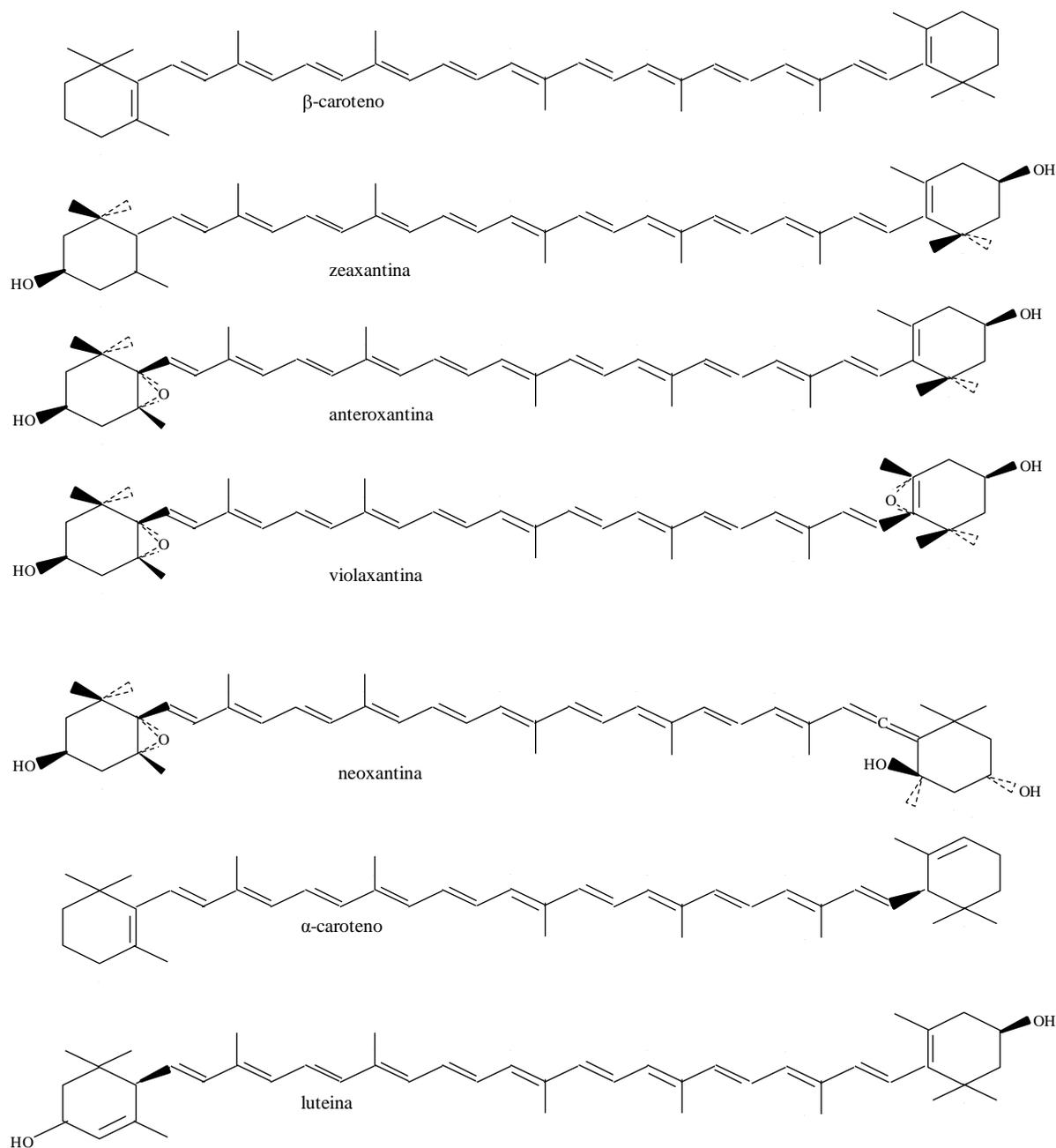


Figura 1.6: Carotenoides.

La biosíntesis de carotenoides en la planta tiene el mismo origen que la de los terpenos, pero un grado de polimerización más elevado. Por su carácter lipofílico se encuentran localizados en los plastos de las células de la planta, en la pulpa y en la piel del grano y también en las hojas. El β-caroteno y la luteína son los carotenoides más abundantes identificados en uvas y

vinos, encontrándose en menor concentración neoxantina, flavoxantina, violaxantina, 5,6-epoxiluteína y luteoxantina (Ribéreau-Gayon et al., 2006b; Baumes et al., 2002).

La degradación oxidativa de los carotenoides terpénicos con 40 átomos de carbono produce derivados con 9, 10, 11 o 13 átomos de carbono. Entre estos compuestos, están los derivados con 13 átomos de carbono, C₁₃-norisoprenoides que tienen propiedades odoríferas (Ribéreau-Gayon et al., 2006b).

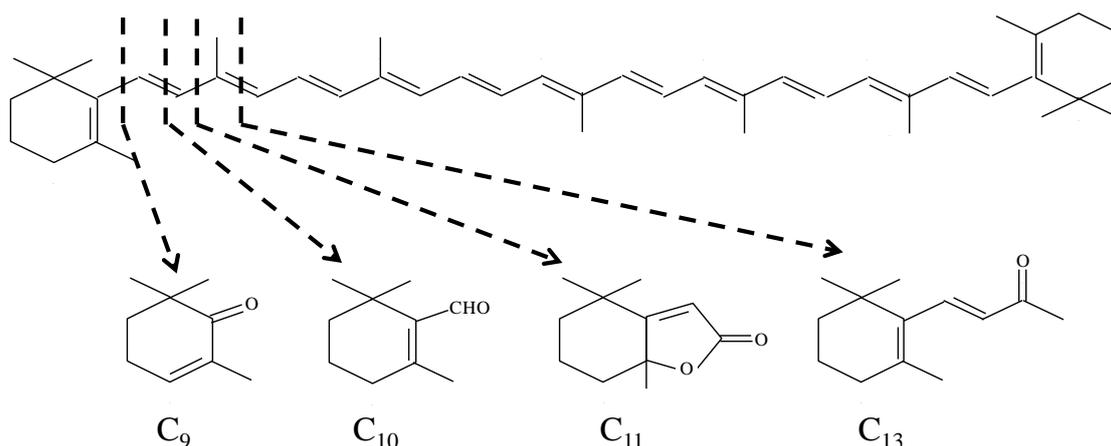


Figura 1.7: Degradación de los carotenoides.

La fragmentación en compuestos C₁₃ origina compuestos con grupos cetona (β - ionona, 3-hidroxi- β -ionona, 3-hidroxi-5,6-epoxi- β -ionona, grasshopper cetona) y posteriormente compuestos con estructura análoga, muchos de los cuales se encuentran en forma glicosidada. Los derivados norisoprenoides conforman dos grupos: los megastigmanos y los no megastigmanos (Figura 1.7).

Entre los derivados no megastigmanos (Figura 1.8) se encuentra el 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TDN), con aroma a petróleo o kerosene; los actinidoles y los vitispiranos.

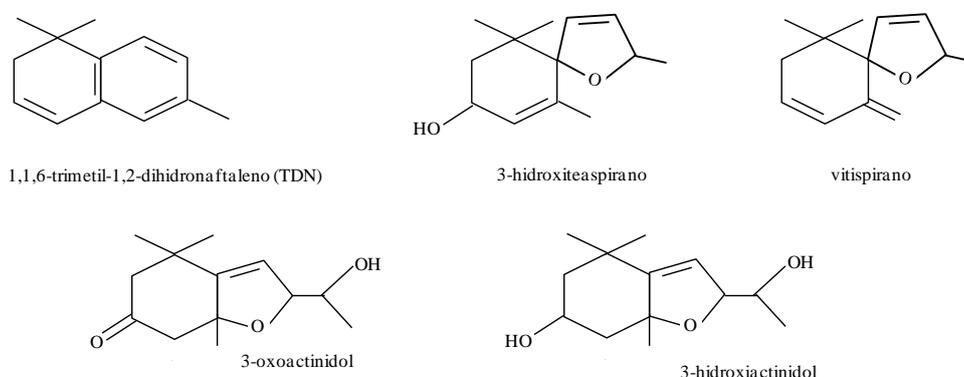


Figura 1.8: Derivados norisoprenoides no megastigmanos.

El esqueleto megastigmano se caracteriza por un ciclo de 6 átomos de carbono sustituido en los carbonos 1, 5 y 6 y por presentar una cadena alifática de cuatro átomos de carbono unida al carbono 6, pueden estar oxigenados en el carbono 7 (serie de la damascona) o en el carbono 9 (serie de la ionona). Algunos de estos compuestos se muestran en la Figura 1.9.

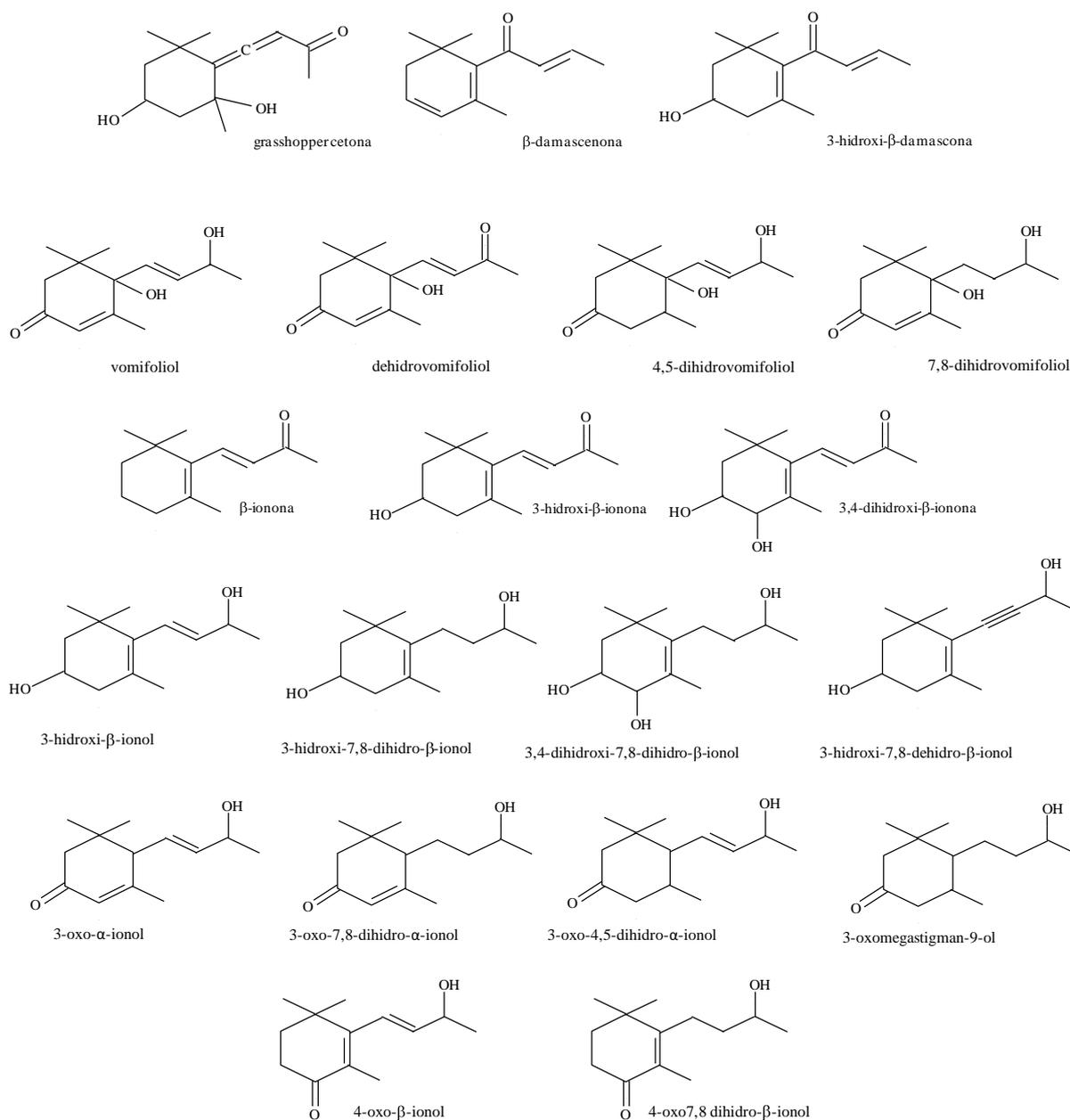


Figura 1.9: Derivados norisoprenoides megastigmanos.

1.4.1.3 Precursores de origen fenólico y sus derivados

Los ácidos fenólicos se encuentran en la uva en forma esterificada (ésteres tartáricos). Son compuestos abundantes pero su contenido es muy variable dependiendo del ácido considerado, la variedad, la zona de cultivo y el año, constituyendo de esta forma un factor de diferenciación útil para trabajos taxonómicos (Flanzy, 2000).

La formación de los ácidos fenólicos, se da por la vía biosintética del ácido shiquímico, la cual es común en la mayoría de los vegetales y conduce a la formación de los aminoácidos fenilalanina y tirosina y posteriormente la formación del ácido cinámico. Los ácidos fenólicos generados, cafeico, *p*-cumárico y ferúlico, no poseen olor por sí mismos, pero pueden sufrir diversas reacciones enzimáticas de conversión (isomerización, oxidación, reducción, hidrólisis) que los transforman en otros compuestos fenólicos volátiles Figura 1.10.

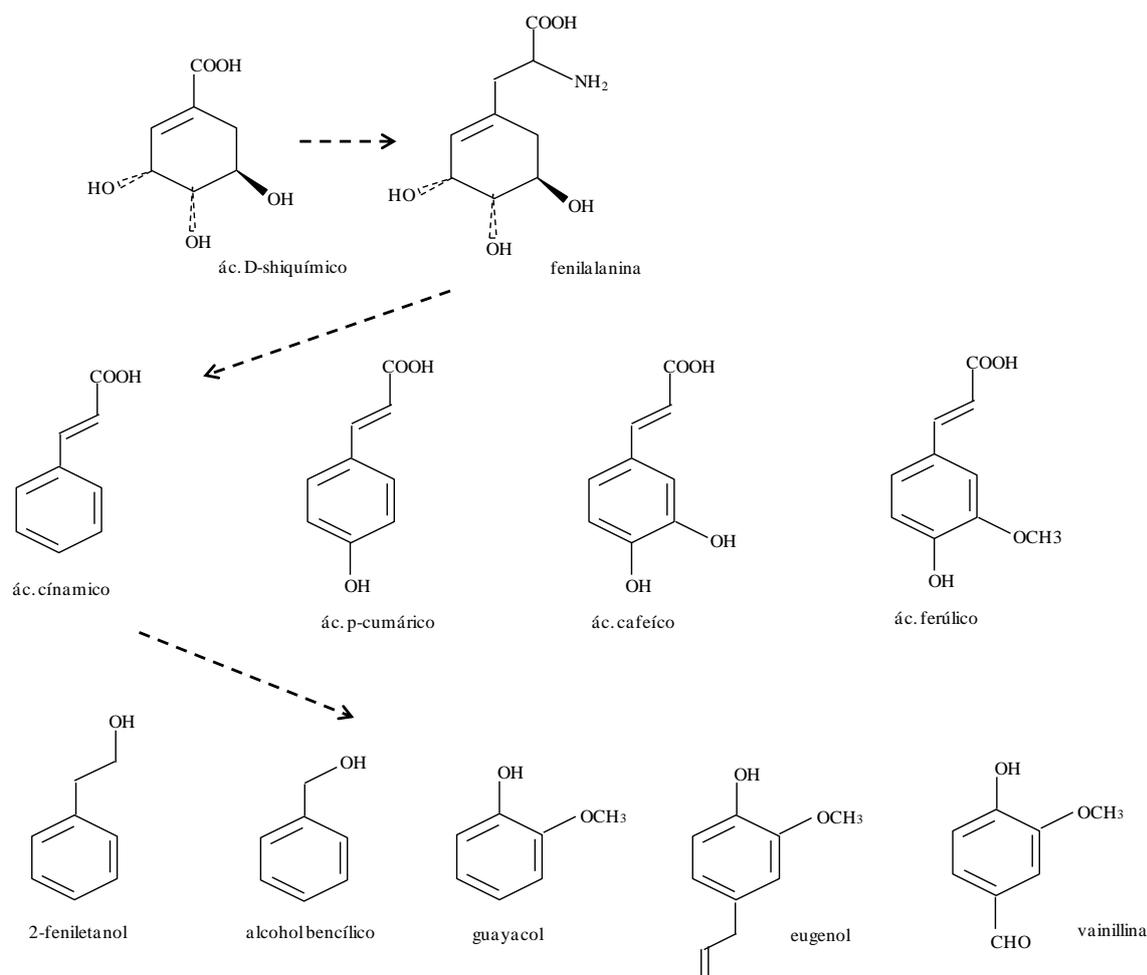


Figura 1.10: Origen de compuestos fenólicos en uva.

En el curso de la fermentación, gracias a la actividad descarboxilasa de las levaduras, o por la intervención de otros microorganismos como las bacterias lácticas, se producen cantidades

relativamente importantes de fenoles volátiles como el 4-vinilfenol y 4-etilfenol, 4-vinilguayacol y 4-etilguayacol, que aportan notas fenólicas al aroma del vino, o el vainillato de etilo con aroma a humo, madera (Clarke et al., 2004).

Los vinilfenoles pueden encontrarse además en forma de precursores glicosidados en la uva, los cuales son liberados en la vinificación.

Existen otros fenoles volátiles provenientes de la uva, como el eugenol que posee una nota especiada de tipo clavo de olor, característica que puede encontrarse en ciertos vinos, así como fenoles que están presentes en forma glicosidada como la vainillina, propiovainillina o la zingerona. Estos últimos compuestos poseen un impacto aromático interesante por sus notas características de quemado y vainillado, y sus bajos umbrales de percepción. El benzaldehído se ha reportado en forma ligada. Los ácidos fenólicos vía esterificación dan también compuestos aromáticamente interesantes como vainillato de etilo y de metilo, cinamato de etilo. El vainillato de metilo y salicilato de metilo, también se encuentran en forma glicosidada en uvas (Flanzy, 2000).

Para el caso de uvas de la variedad Tannat se han identificado los siguientes compuestos fenólicos: salicilato de metilo, guayacol, alcohol bencílico, β -feniletanol, *o*-cresol, *p*-cresol, 4-vinilguayacol, 2,6-dimeilfenol, zingerone y etil- β -(4-hidroxi-3-metoxifenol) (Boido et al., 2013).

1.4.1.4 Compuestos azufrados y sus precursores

Los compuestos azufrados generalmente se han asociado a defectos sensoriales en los vinos. Sin embargo, se ha demostrado que existen determinados compuestos que poseen una función tiol, y que aportan positivamente a la calidad aromática de ciertos frutos, alimentos, plantas aromáticas (Berger, 2007).

Los tioles varietales, se han identificado principalmente en variedades de uvas blancas, entre los compuestos reportados se encuentran la 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona (4-MMP), 4-mercapto-4-metilpentan-1-ol (4-MMPOH), 3-mercapto-3-metilbutan-1-ol (3MMB), el 3-mercaptohexan-1-ol (3-MH), el acetato de 3-mercaptohexilo (A3-MH). Los descriptores asociados a estos compuestos pertenecen a notas herbáceas, espárrago, cítricas como el pomelo, fruta de la pasión.

Entre las variedades de uva en la que se ha reportado mayor concentración de estos compuestos se encuentran Sauvignon Blanc, Semillon, Petit Manseng, Colombard Gewürztraminer y también en uvas tintas como Cabernet Sauvignon y Merlot.

Estando como precursores en la uva, la imposibilidad de liberarlos por hidrólisis ácida o utilizando β -glucosidasa, dio la pauta de que no podían estar como glucósidos. La liberación se da por acción de β -liasas específicas para compuestos conjugados con cisteína, para el caso de precursores de los compuestos 4-MMP, 4-MMPOH y 3-MH. Las enzimas en la boca probablemente tienen actividad β -liasa capaz de liberar tioles volátiles de sus precursores cisteinilados en solo unos segundos. Además de los precursores cisteínicos existen precursores glutatiónicos, que dan origen a los compuestos azufrados (Tominaga et al., 2000; Coetzee et al., 2012).

En la Figura 1.11 se muestra esquemáticamente la relación entre los compuestos cisteinilados 3-mercaptohexan-1-ol cisteína (Cys-3MH) y glutatiónados 3-mercaptohexan-1-ol glutatión (G3MH), en la uva con los compuestos formados y presentes en el vino.

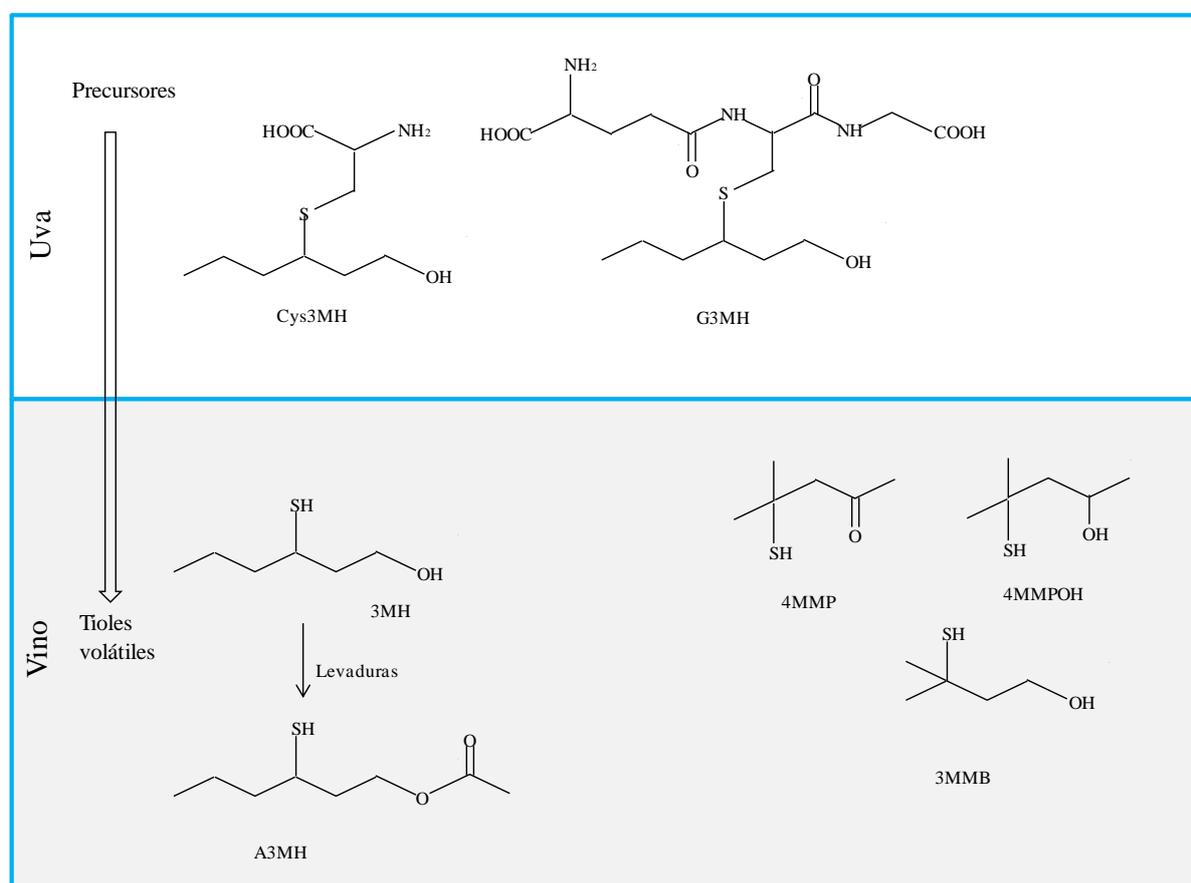


Figura 1.11: Precursores y compuestos azufrados en uva y vino.

Los tioles son compuestos muy reactivos, durante la vinificación pueden combinarse con algunos compuestos fenólicos y con el cobre, disminuyendo su concentración y por lo tanto la percepción de los mismos (Darriet et al., 2001).

1.4.1.5 Pirazinas, compuestos con nitrógeno

La presencia de pirazinas se ha reportado tanto en uvas como en vinos. La variedad Cabernet Sauvignon es la que se relaciona con este tipo de compuestos, pero también aparecen en Merlot, Cabernet Franc, Sauvignon Blanc, Pinot Noir, Gewürztraminer, Chardonnay, Riesling. Generalmente disminuyen la concentración durante el proceso de maduración de la uva. Cuando la concentración supera el umbral de percepción se las asocia a olores a morrón. La 2-metoxi-3-isobutil-pirazina fue el primer compuesto del grupo de las pirazinas identificado en uvas de Cabernet Sauvignon (Clarke et al., 2004) y también en el vino. También ha sido reportada la presencia de 2-metoxi-3-sec-butil pirazina y 2-metoxi-3-isopropilpirazina (Figura 1.12).

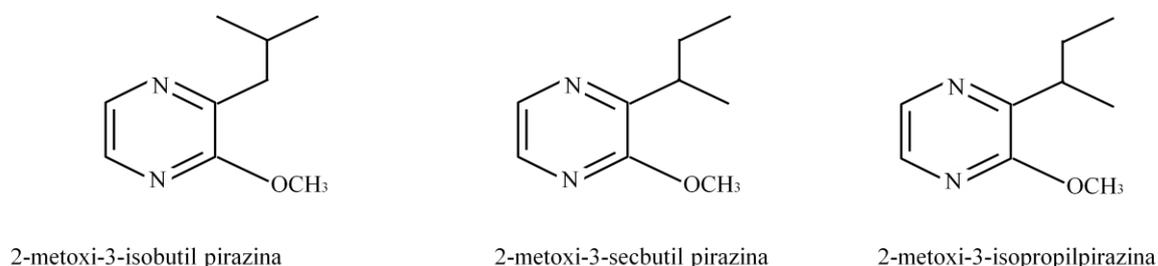
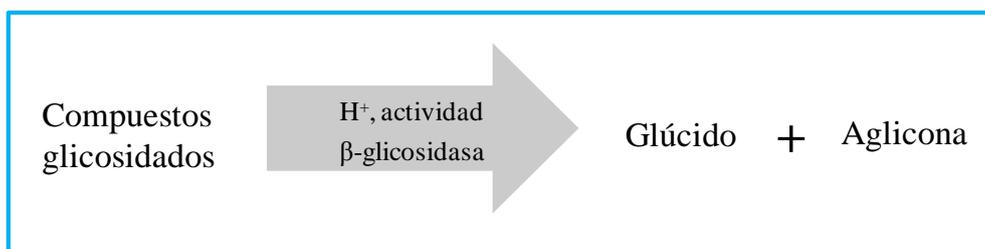


Figura 1.12: Principales pirazinas en uvas y vinos.

1.4.1.6 Formas glicosidadas

En la naturaleza es frecuente que diversos grupos de metabolitos secundarios se encuentren como formas glicosidadas. Los glicósidos no presentan olor, pero son una fuente potencial de aroma al liberar la aglicona que puede ser una molécula volátil o que puede transformarse en otra molécula volátil.



En las uvas y vinos se ha identificado la unión de la aglicona con una molécula de glucosa dando β -D-glucósidos, o la unión con disacáridos formando el 6-O-(α -L-arabinofuranosil)- β -D-glucopiranosido, 6-O-(α -L-rhamnopiranosil)- β -D-glucopiranosido (β -rutinosido), y 6-O-(β -D-apiofuranosil)- β -D-glucopiranosido (Günata et al., 1988), Figura 1.13.

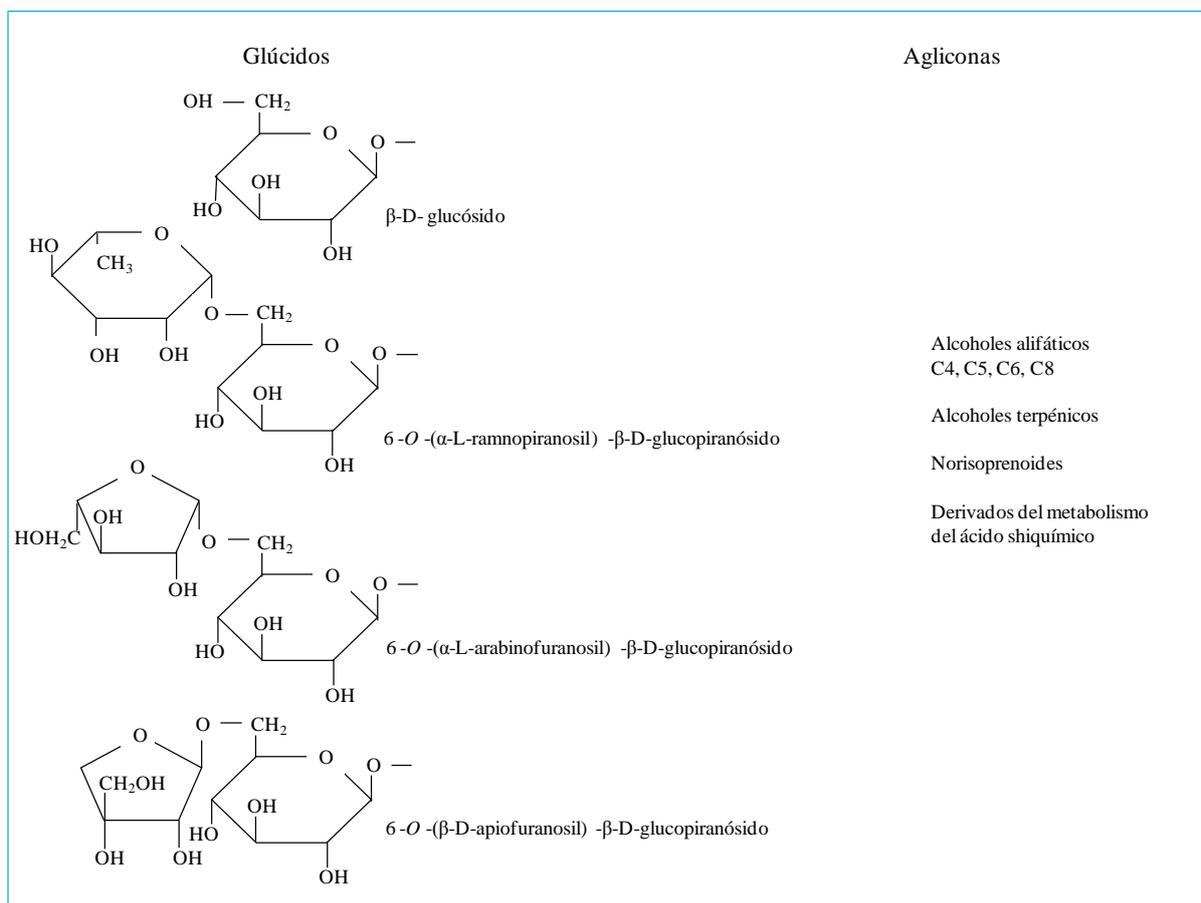


Figura 1.13: Compuestos glicosidados en uvas y vinos.

Las agliconas deben poseer al menos un grupo -OH por el que se unen a una molécula de glucosa mediante un enlace O-glicosídico. Los precursores glicosídicos fueron identificados inicialmente por Cordonnier (1974).

Teniendo en cuenta la diversidad de agliconas posibles, se puede obtener un número enorme de compuestos libres con impacto en el perfil aromático de los vinos. Por otra parte la liberación de las agliconas y la posterior transformación de las mismas en compuestos nuevos puede dar lugar a una mayor diversidad (potencial aromático de las uvas y vinos) (Carrau et al., 2008).

Se ha demostrado la presencia de glucósidos de alcoholes alifáticos y aromáticos (Günata et al., 1985), terpenos, norisprenoides (Günata et al., 1988; Maicas et al., 2005).

Por ejemplo los compuestos 3-oxo- α -ionol, 4-oxo- β -ionol, 3-hidroxi- β -ionol, 3-oxo-7,8-dihidro- α -ionol, 3-hidroxi- β -damascona fueron determinadas en la fracción glicosidada al analizar uvas maduras de Riesling, Sauvignon Blanc, Semillon, Syrah, Chardonnay, Cabernet Sauvignon (Razungles et al., 1993). Las formas glicosidadas terpénicas están en mayor concentración que las formas libres de los respectivos terpenos (Günata et al., 1985).

Para el caso de β -damascona, vitispirano, TDN, se ha visto que están presentes como moléculas libres a niveles bajos o incluso nulos en uvas, mientras que se pueden encontrar en concentraciones mayores en vinos envejecidos (William et al., 1982; Winterhalter et al., 1990). Algunos monoterpenos importantes, tales como α -terpineol, linalol, y geraniol, también se forman a partir de precursores de glicósidos durante la fermentación (Ugliano et al., 2003; Ugliano et al., 2006). Aunque también se ha visto que pueden coexistir otras fuentes de generación de monoterpenos como la síntesis *de novo* (Carrau et al., 2005).

1.4.2 Aromas prefermentativos

Estos aromas se desarrollan durante los tratamientos realizados a la uva desde el momento de su cosecha hasta que comienza la fermentación (cosecha, transporte, despallado, estrujado, prensado).

Los efectos mecánicos de estos tratamientos producen una ruptura a nivel celular que posibilita que los sistemas enzimáticos entren en contacto con los sustratos presentes en el grano. Por otra parte, la mayoría de estos tratamientos incorporan oxígeno en el medio, facilitando la disponibilidad del mismo y las reacciones de oxidación enzimática.

La mayor parte de los lípidos se encuentran en las semillas (75%), en menor medida en el hollejo (15%) y la pulpa (9%). El grano maduro contiene, sin contar la semilla, alrededor de 400 mg de lípidos por Kg de peso fresco. Se encuentran como lípidos neutros, fosfolípidos y glicolípidos. Los ácidos grasos más importantes en la composición lipídica son el ácido linoleico y el ácido α -linolénico (Blouin et al., 2012).

Las enzimas acil hidrolasa, lipooxigenasa, hidroperóxido liasa y alcohol deshidrogenasa son responsables de producir a partir de los ácidos linoleico y linolénico, sustancias que van a participar en el aroma prefermentativo como es el caso de los alcoholes y aldehídos con átomos de 6 átomos de carbono, responsables de los aromas y sabores verdes, herbáceos y en algunos casos amargos. En la Figura 1.14 se muestra la biosíntesis del 1-hexanol, *cis*-3-hexen-1-ol, *trans*-3-hexen-1-ol y *trans*-2-hexen-1-ol (Berger, 2007).

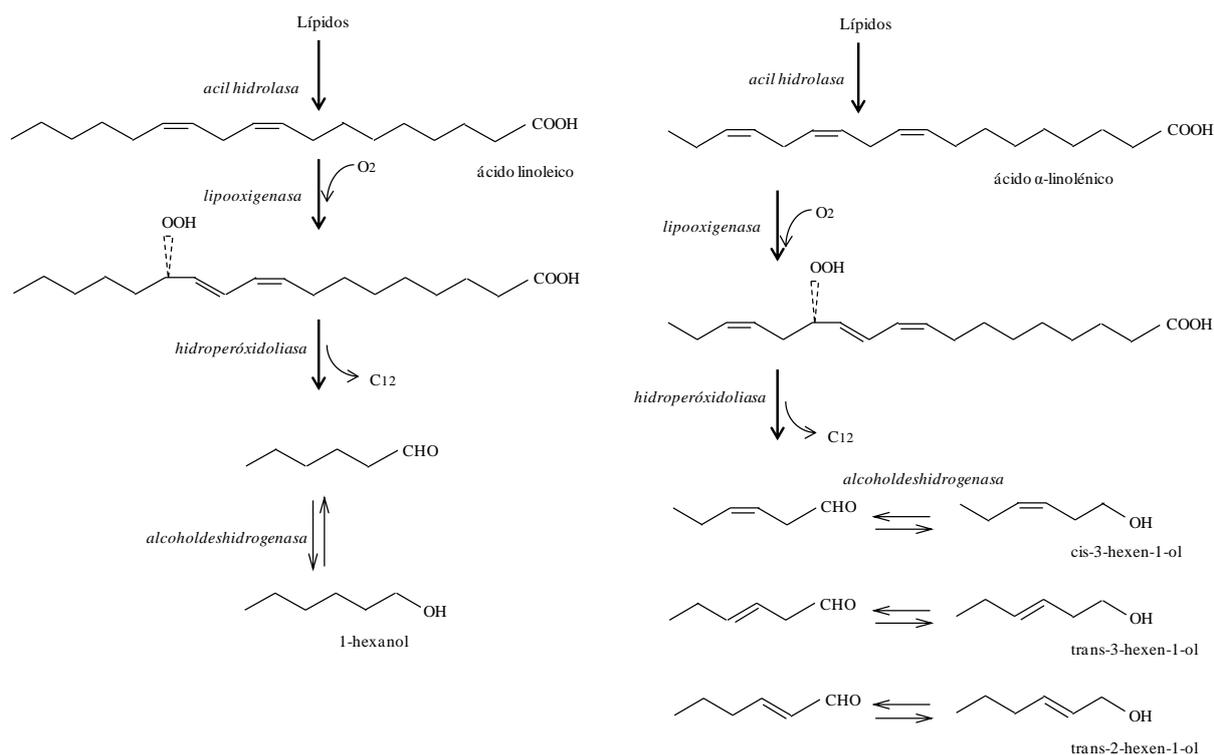


Figura 1.14: Biosíntesis de compuestos C6 en la etapa prefermentativa.

Entre los factores que afectan la formación de los compuestos C6 se citan: el estado de madurez de la uva, obteniéndose una mayor producción en cosechas realizadas antes de la madurez, y el manejo de la fruta en las etapas de transporte y recepción, siendo la ruptura mecánica un factor de aumento de su concentración (Ribéreau-Gayon et al., 2006b).

1.4.3 Aromas fermentativos

El proceso de fermentación es una etapa esencial de la transformación de la uva o el mosto en vino. Esta etapa implica dos transformaciones biológicas, la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica. La primera, común a todos a los vinos provoca básicamente la transformación de los azúcares en alcohol y productos secundarios por la levadura. La segunda implica la degradación del ácido málico de la uva en ácido láctico por las bacterias lácticas, y generalmente es una etapa deseada en el caso de los vinos tintos (Flanzy, 2000).

La fermentación alcohólica es llevada a cabo por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la reacción metabólica principal implica la transformación de los azúcares del mosto (glucosa y fructosa) en etanol y dióxido de carbono. La totalidad del etanol producido es retenido en el vino, solo una fracción residual del dióxido de carbono permanece en el vino.

El etanol interviene en el aroma del vino en forma directa, ya que las cantidades producidas superan el umbral de percepción, por otra parte al afectar la polaridad del medio se ven afectados los coeficientes de reparto aire/vino para los aromas constituyentes del vino (Clarke et al., 2004).

La levadura, en menor medida, utiliza los azúcares para producir glicerol. Por otra parte cuando el ácido pirúvico no es utilizado para producir alcohol, es transformado en una serie de metabolitos que, junto con los compuestos generados por el metabolismo de los compuestos nitrogenados y el resto del metabolismo secundario de la levadura, constituyen los aromas fermentativos en el vino.

En función del tipo de levadura, la composición del medio y las condiciones de fermentación se forman una serie de compuestos entre los se encuentran alcoholes superiores, ácidos y ésteres, carbonilos y lactonas, compuestos azufrados, compuestos nitrogenados, fenolvolátiles, y se liberan compuestos conjugados que hacen al aroma y al sabor del vino (Figura 1.15) (Bartowsky et al., 2009; Carrau et al.; 2010).

Los alcoholes superiores reportados en mayor concentración en vinos son 2-metilbutanol (alcohol isobutílico), 3-metilbutanol (alcohol isoamílico), propanol, 2-metilpropanol, butanol, pentanol, 2-feniletanol, 3-metiltio-1-propanol, con valores medios totales de 400 a 500 mgL⁻¹, pudiendo producir defectos en el aroma a concentraciones más elevadas (Swiegers et al., 2005). Una carencia de nitrógeno asimilable en el mosto produce una acumulación de α -cetoácidos y cantidades importantes de alcoholes superiores (Ugliano et al., 2009).

El vino contiene una mezcla de ácidos grasos de cadena lineal, generalmente denominados de cadena corta (C2-C4), cadena media (C6-C10), cadena larga (C12-C18), y un grupo de ácidos grasos de cadena ramificada que incluyen 2-metilpropanoico, 2-metilbutanoico, y ácidos 3-metilbutanoicos. Del contenido total de ácidos del vino, la mayoría no son volátiles. Dentro de la fracción de ácidos volátiles, el ácido acético es cuantitativa y sensorialmente el más importante, producido durante la fermentación alcohólica, constituye el 90% de la acidez volátil del vino (Ugliano et al., 2009).

Los ácidos grasos y sus ésteres, derivan de la acción de la acil-S-coenzima A que genera los ácidos grasos por hidrólisis y los ésteres etílicos de ácidos grasos o acetatos de alcoholes superiores por alcoholisis. Los ésteres son responsables de los aromas afrutados en el vino joven, que se van perdiendo durante la conservación ya que en el medio ácido del vino una parte son hidrolizados. Los principales compuestos que contribuyen al aroma del vino son ésteres de acetato: acetato de etilo, acetato de 2-metilpropilo (acetato de isobutilo), acetato de 2- y 3-metilbutilo (amilo e isoamilo, respectivamente), acetato de hexilo y acetato 2-feniletilo

y ésteres etílicos de ácidos grasos. También juegan un rol importante en las notas de frutos rojos los ésteres de ácidos de cadena ramificada como 2-metilpropanoato de etilo, 2-metilbutanoato de etilo y 3-metilbutanoato de etilo. La concentración final de ésteres en el vino producto del metabolismo de las levaduras es el resultado del equilibrio entre las enzimas alcohol acetiltransferasa que promueve su síntesis y esterasas que promueven su hidrólisis (Ugliano et al., 2009).

Un gran número de compuestos carbonílicos se forman por el metabolismo de las levaduras, por descarboxilación de los ácidos α -cetónicos formados en la biosíntesis de alcoholes superiores, aldehídos, cetonas y cetoácidos, pero solo permanecen en los vinos en cantidades muy pequeñas. Esta disminución es debida a la fuerte actividad reductora de las levaduras, y por la presencia de anhídrido sulfuroso y etanol, que reaccionan con los compuestos carbonílicos para formar compuestos azufrados y acetales. El acetaldehído es cuantitativamente el aldehído saturado más importante, en vinos da notas de "manzana oxidada" y "nuez" cuando está presente en concentraciones sensorialmente detectables.

Los aldehídos de mayor número de carbono (C3-C9) contribuyen a notas herbáceas, afrutadas y sabores picantes (Clarke et al., 2004). Hexanal, *cis*-3-hexenal y *trans*-2-hexenal aportan un carácter verde evidente en el mosto de uva. El diacetilo y sus productos de reducción, acetoína y 2,3-butanodiol, se derivan del acetaldehído. El diacetilo (2,3-butanodiona) y acetoína dan olores a manteca, tostado pero generalmente se encuentran en muy baja concentración (Ugliano et al., 2009). El contenido de aldehídos luego de la fermentación alcohólica es bajo, ya que se reducen fácilmente a los alcoholes correspondientes.

El acetaldehído juega un papel importante durante la fermentación del vino tinto, puede reaccionar directamente con antocianinas para formar aductos y participar en la condensación de proantocianidinas (taninos) y antocianinas, para formar pigmentos químicamente más estables que las antocianinas y contribuir al mantenimiento del color de los vinos (Ribéreau-Gayon et al., 2006b).

Los compuestos azufrados producidos por las levaduras en la fermentación poseen los siguientes grupos funcionales: tiol (mercaptanos), tioléster, mono- y polisulfuros, comunicando todas estas funciones olores intensos y generalmente negativos. Los fenoles volátiles se forman a partir de los precursores de ácido hidroxicinámico presentes en mosto de uva predominantemente por acción de las levaduras durante la fermentación y contribuye a los sabores extraños tales como "curita", "establo" (Ribéreau-Gayon et al., 2006b).

Las levaduras tienen la posibilidad de producir la descarboxilación de los ácidos cumárico y ferúlico, para formar los correspondientes vinilfenoles; los aromas percibidos caucho, goma en el caso del 4-vinilfenol y especiado, clavo de olor para el 4-vinilguaiacol. Posteriormente, y si está presente la levadura *Brettanomyces / Dekkera* (Blomqvist et al., 2012), que posee actividad vinilreductasa se originan los etilfenoles y se pueden percibir aromas desagradables asociados a la presencia de 4-etilfenol y 4 etilguaiacol.

Las levaduras son capaces de generar compuestos volátiles que se liberan a partir de precursores glicosídicos (monoterpenos y C13-norisoprenoides) y de conjugados cisteínicos (Ugliano et al., 2006).

Los metabolitos de interés generados por las bacterias lácticas durante la FML, se muestran esquemáticamente en la Figura 1.16.

Luego de la FML, el nivel de ácido acético puede verse incrementado preferentemente por el metabolismo del ácido cítrico (Bartowsky et al., 2009), el perfil de ésteres se modifica con aumentos de la concentración de éster etílico, el acetato de etilo, el hexanoato de etilo, lactato de etilo y octanoato de etilo (Matthews et al., 2004; de Revel et al., 1999; Gámbaro et al., 2001). El metabolismo de los compuestos carbonílicos durante la fermentación maloláctica implica tanto un consumo o formación de acetaldehído y producción variable de diacetilo dependiendo de las condiciones de fermentación (Bartowsky et al., 2009). Las bacterias lácticas son capaces de generar compuestos volátiles a partir de precursores glicosídicos. La generación de estos compuestos durante la FML es explicada en la sección 1.6.

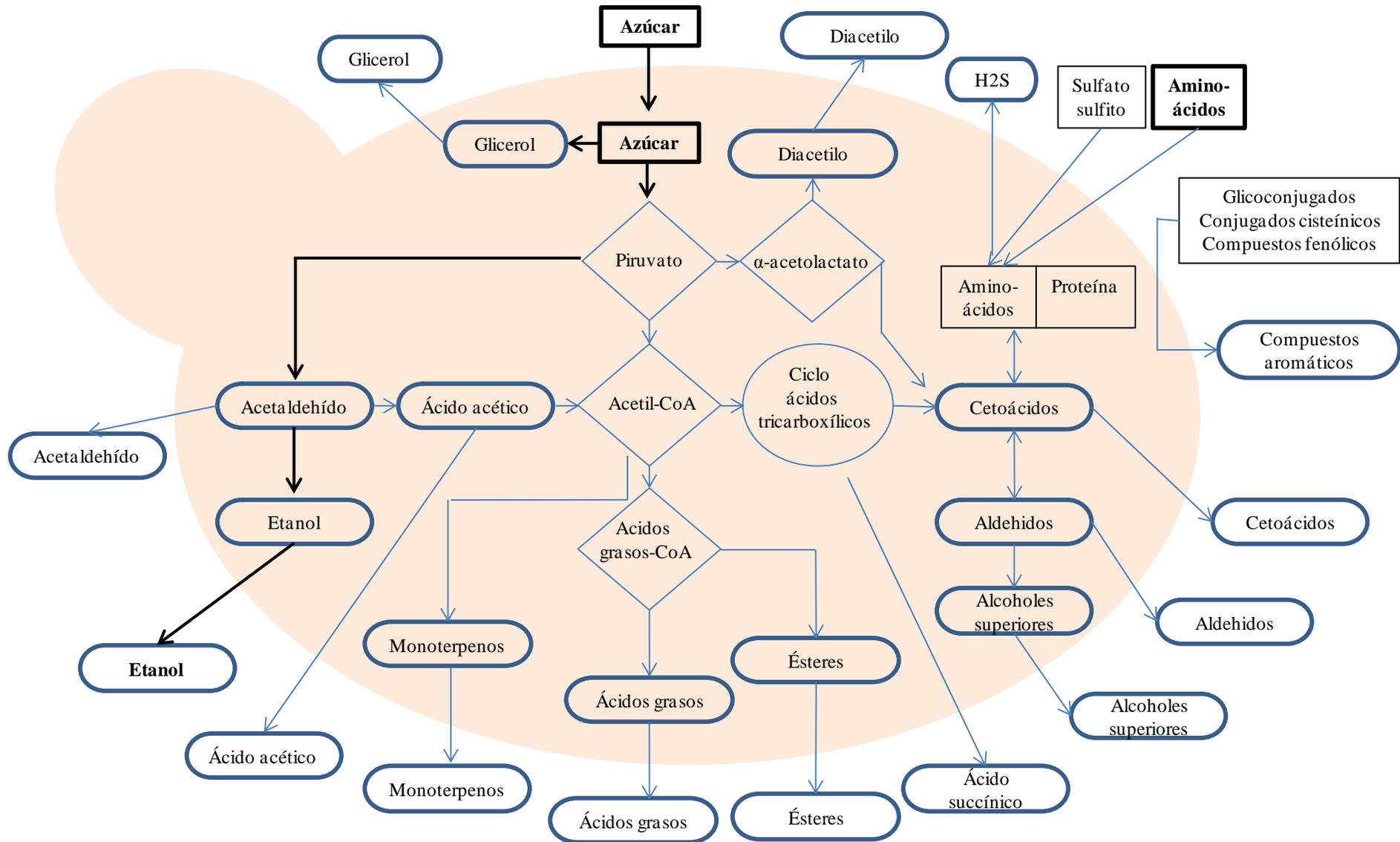


Figura 1.15: Compuestos derivados del metabolismo de la levadura en el vino.

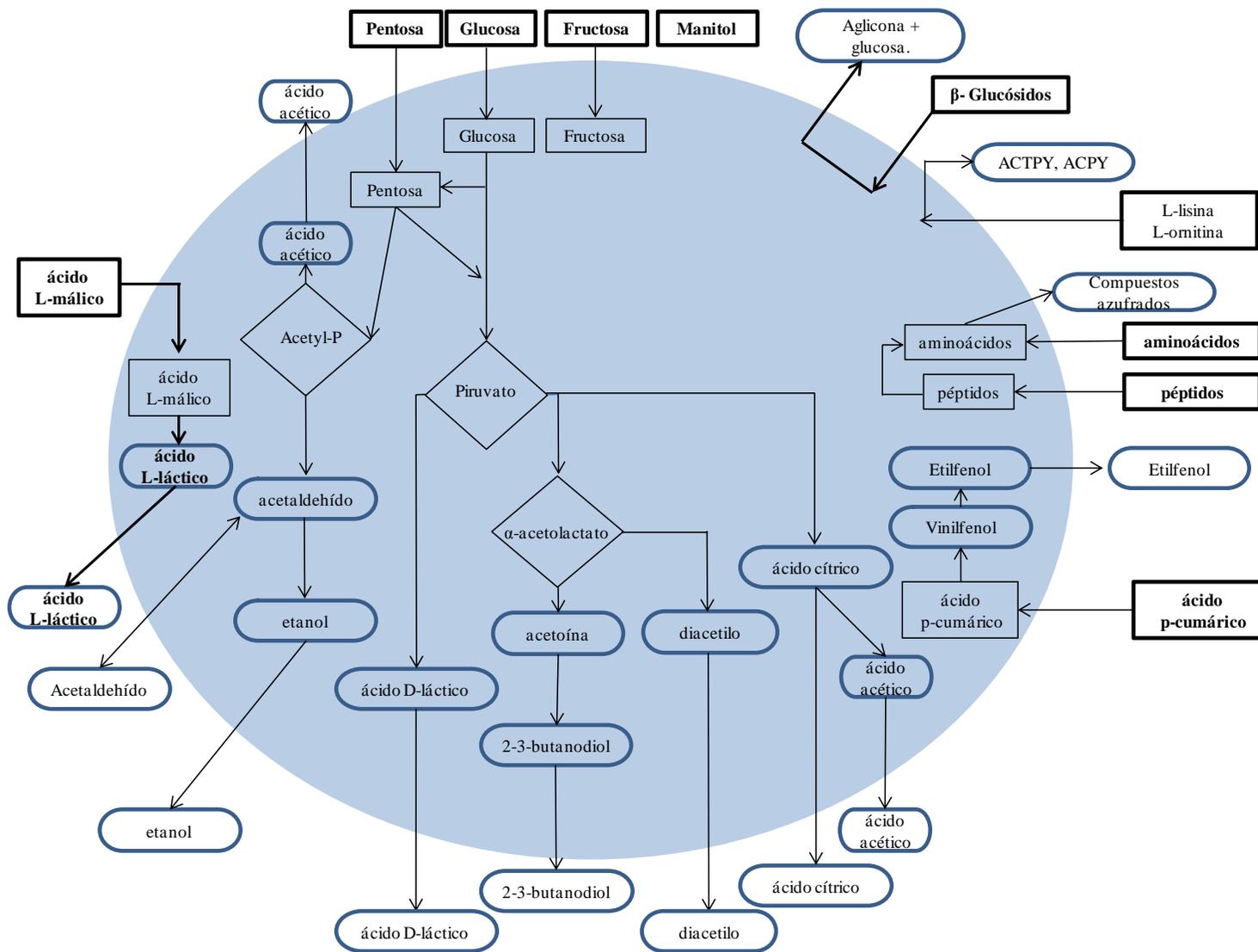


Figura 1.16: Compuestos derivados del metabolismo de *Oenococcus oeni*

1.4.4 Aromas postfermentativos

Durante la conservación del vino, los compuestos volátiles sufren modificaciones. La transformación aromática producida en la etapa postfermentativa es diferente si el vino es conservado en tanque o en botella, bajo la premisa que los cambios producidos en botella se producen en un ambiente en condiciones no oxidativas mientras que en el tanque ocurren transformaciones de tipo oxidativo y si la conservación se lleva a cabo en barriles de madera también ocurrirán proceso extractivos (Clarke et al., 2004; García-Carpintero et al., 2012; García-Carpintero et al., 2014).

Tanto los ésteres, terpenos, norisoprenoides, fenoles volátiles, compuestos azufrados y derivados del furfural sufren transformaciones.

Los ésteres y alcoholes superiores sufren reacciones lentas de hidrólisis/esterificación. En general los ésteres etílicos y los acetatos disminuyen su concentración.

Los terpenos glicosidados liberan las correspondientes agliconas y los terpenos libres sufren diversas reacciones de isomerización, ciclación, hidratación, oxidación, dando origen a nuevos compuestos, por ejemplo a partir del geraniol se forma el α -terpineol y citronelol.

Los norisoprenoides también son liberados de sus correspondientes glicósidos y posteriores rearrreglos moleculares dan origen a nuevos compuestos con propiedades aromáticas, como es el caso de la formación de la 3-hidroxi- β -damascona y β -damascona a partir de grasshopper cetona.

En el caso de los fenoles volátiles, luego de la fermentación alcohólica se encuentran cantidades más o menos importantes de vinilfenoles, su concentración puede verse disminuida por la adición de etanol y la correspondiente formación de 4-(1-etoxietil) fenol y 4-(etoxietil) guaiacol (Dugelay et al., 1995; Moreno-Arribas et al., 2009) o por la transformación microbiológica hacia los etilfenoles correspondientes (Ugliano et al., 2006; Bartowsky, 2005).

1.5 Los compuestos fenólicos y el color de los vinos

El color en los vinos es un atributo sensorial muy importante, a partir del mismo se realiza la primera gran clasificación en tipos: blancos y tintos. Durante el proceso de elaboración del vino el análisis del color, determina junto con otros parámetros, decisiones en las prácticas enológicas a llevar adelante.

El color percibido es el resultado de la interacción de luz-vino-individuo. En el vino los componentes que aportan significativamente al color son compuestos fenólicos de diversa estructura química.

Los constituyentes fenólicos tienen relevancia en enología debido al rol que poseen sobre la calidad del vino: son el origen del color y de la astringencia y según su naturaleza pueden poseer un interés nutricional y farmacológico (Flanzy, 2000).

El color del vino está directamente relacionado con la variedad de la uva, estado de sanidad, condiciones climáticas, condiciones del suelo y rendimiento por hectárea, y el estado de madurez en el momento de la cosecha. Por otra parte en la vinificación y durante el proceso extractivo desde las partes sólidas del grano hacia el mosto (líquido) el color se ve influido por las condiciones de la maceración (tiempo, temperatura, sistemas destinados a descompactar el sombrero, dimensiones de la cuba), condiciones del medio (pH, dióxido de azufre, enzimas, alcohol), cepas de levaduras y de bacterias lácticas utilizadas. La estabilidad de los antocianos durante la conservación está directamente relacionada con la estructura química, el pH, contenido de dióxido de azufre, temperatura, potencial de oxidación-reducción (Ribéreau-Gayon et al., 2006b).

Los vinos Tannat poseen un contenido elevado de antocianinas y de pigmentos derivados, lo que les confiere un color rubí intenso característico y propio de la variedad. En la uva Tannat se encuentran los glicósidos de malvidina, cianidina, petunidina, peonidina y delphinidina, los derivados acetilados y cumáricos (González-Neves et al., 2004), en el vino también predomina el glicósido de malvidina y se encuentran los mismos antocianinas que en las uvas así como derivados de éstos (González-Neves et al., 2010). Teniendo en cuenta que existe potencialmente una interacción entre las bacterias lácticas y los compuestos fenólicos a ser evaluada en este trabajo, y como consecuencia el cambio de color durante la FML, a continuación se describen los diferentes compuestos fenólicos responsables del color, las reacciones que provocarían modificaciones al color y la forma de evaluación del color.

Clasificación de compuestos fenólicos

Ácidos fenólicos y sus derivados: Los ácidos fenólicos son incoloros en una solución de alcohol diluido, pero pueden adquirir una leve tonalidad amarilla debido a la oxidación. Desde un punto de vista sensorial estos compuestos no tienen sabor u olor particular. Sin embargo, son precursores de los fenoles volátiles tema que fue tratado en la sección 1.4.1.3.

Flavonoides: Los flavonoides poseen una estructura caracterizada por dos ciclos aromáticos unidos por un heterociclo oxigenado. Son derivados del núcleo de 2-fenil cromona (flavonas y flavonoles) o la 2-fenil cromanona (flavanonas y flavanonoles) (Figura 1.17).

Los compuestos más extendidos son los flavonoides, pigmentos amarillos en las cáscaras de uvas tintas y blancas; en menor medida, flavanonoles que son mucho más pálidos en color. El flavanonol identificado con mayor frecuencia en las uvas y el vino es la dihidroquercetina (taxifolin).

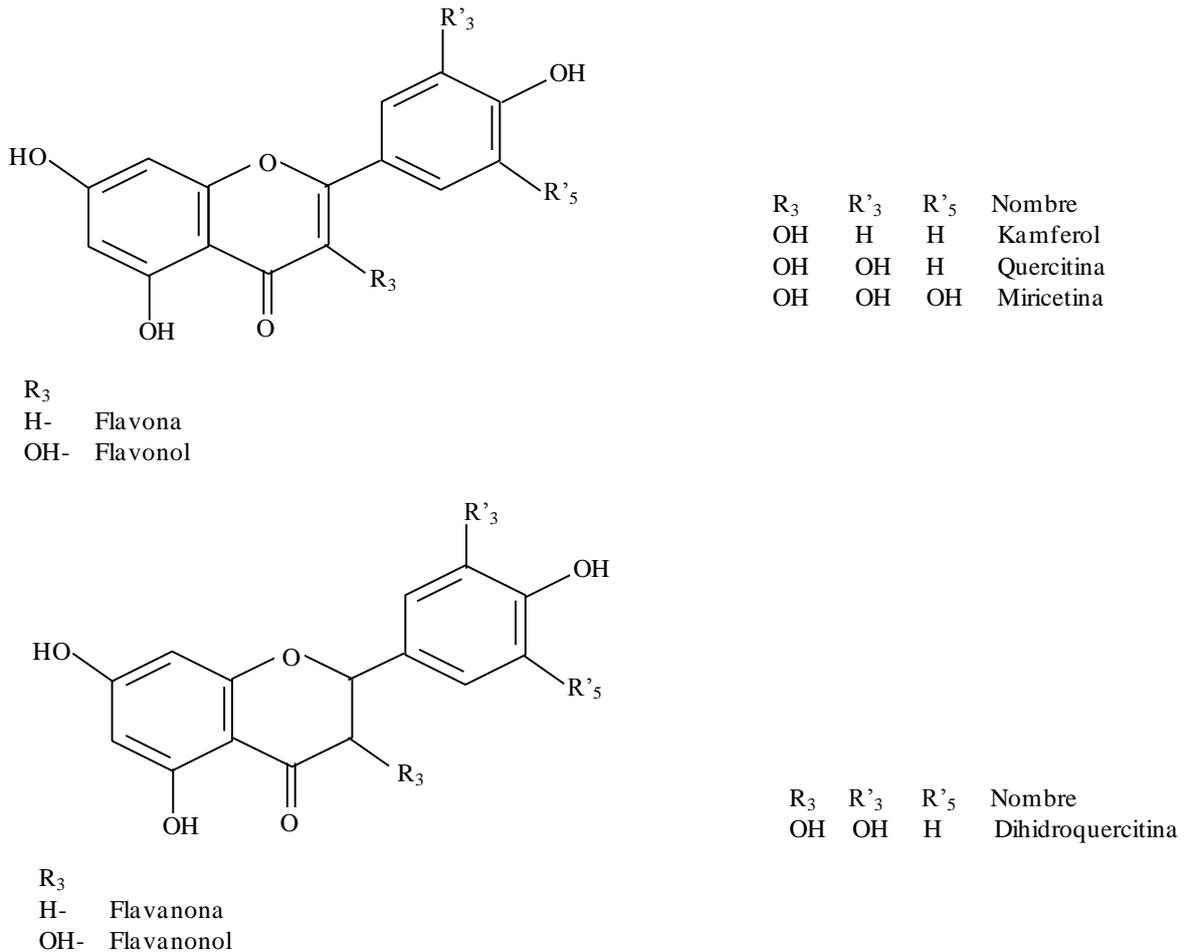


Figura 1.17: Estructura de flavonoides.

Antocianidinas: Las antocianidinas en su forma glicosidada son los pigmentos rojos en las uvas, están ubicados principalmente en la piel y en menor concentración en la pulpa.

La estructura base es el catión flavilo (Figura 1.18).

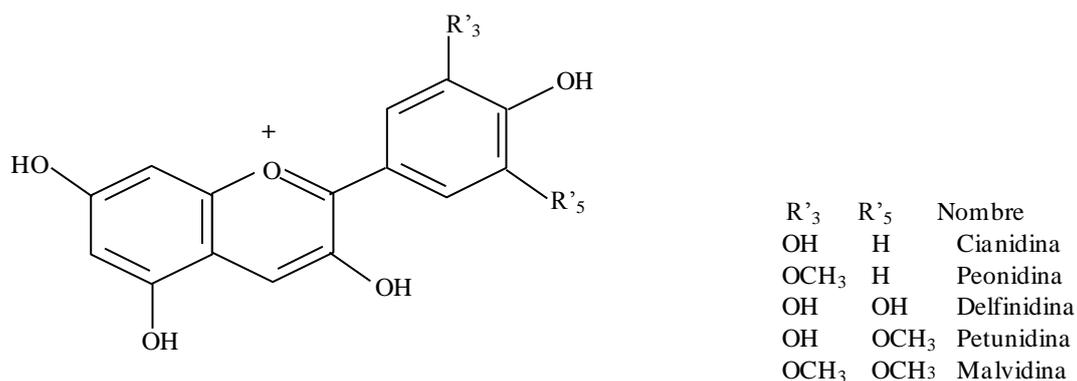


Figura 1.18: Antocianidinas en uva y vino.

Estas moléculas son mucho más estables en la forma de glicósidos (antocianina o antociano) que como la correspondiente aglicona (antocianidina). Se han identificado en uvas y vinos de *Vitis vinífera* antocianinas de monoglucósidos y antocianinas de monoglucósido aciladas con ácido *p*-cumárico, cafeico o acético (Figura 1.19). La presencia de diglucósidos de antocianinas se presenta en especie de *V. riparia* y *V. rupestris*.

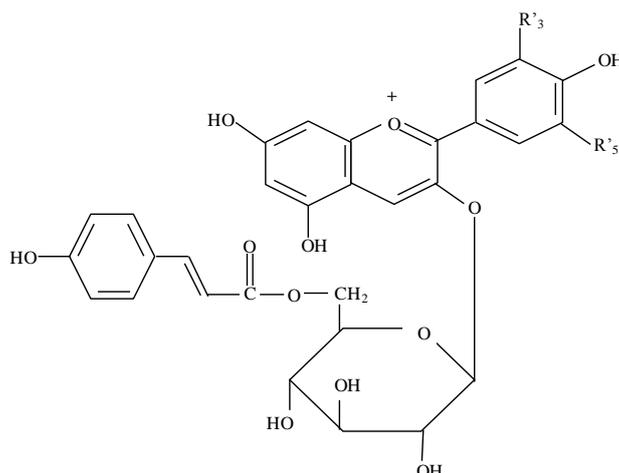


Figura 1.19: Monoglucósido de antocianina acilada con ácido *p*-cumárico

Los colores de las soluciones de antocianinas están directamente relacionados al pH y a los sucesivos equilibrios en los que puede participar (Figura 1.20), a la presencia de dióxido de azufre y a fenómenos de copigmentación mediados por metales Al^{+3} , Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mg^{+2} (Ribéreau-Gayon et al., 2006b) y también por interacciones antocianina-antocianina, antocianina con otros compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoles, flavanoles, taninos) (Flanzy, 2000).

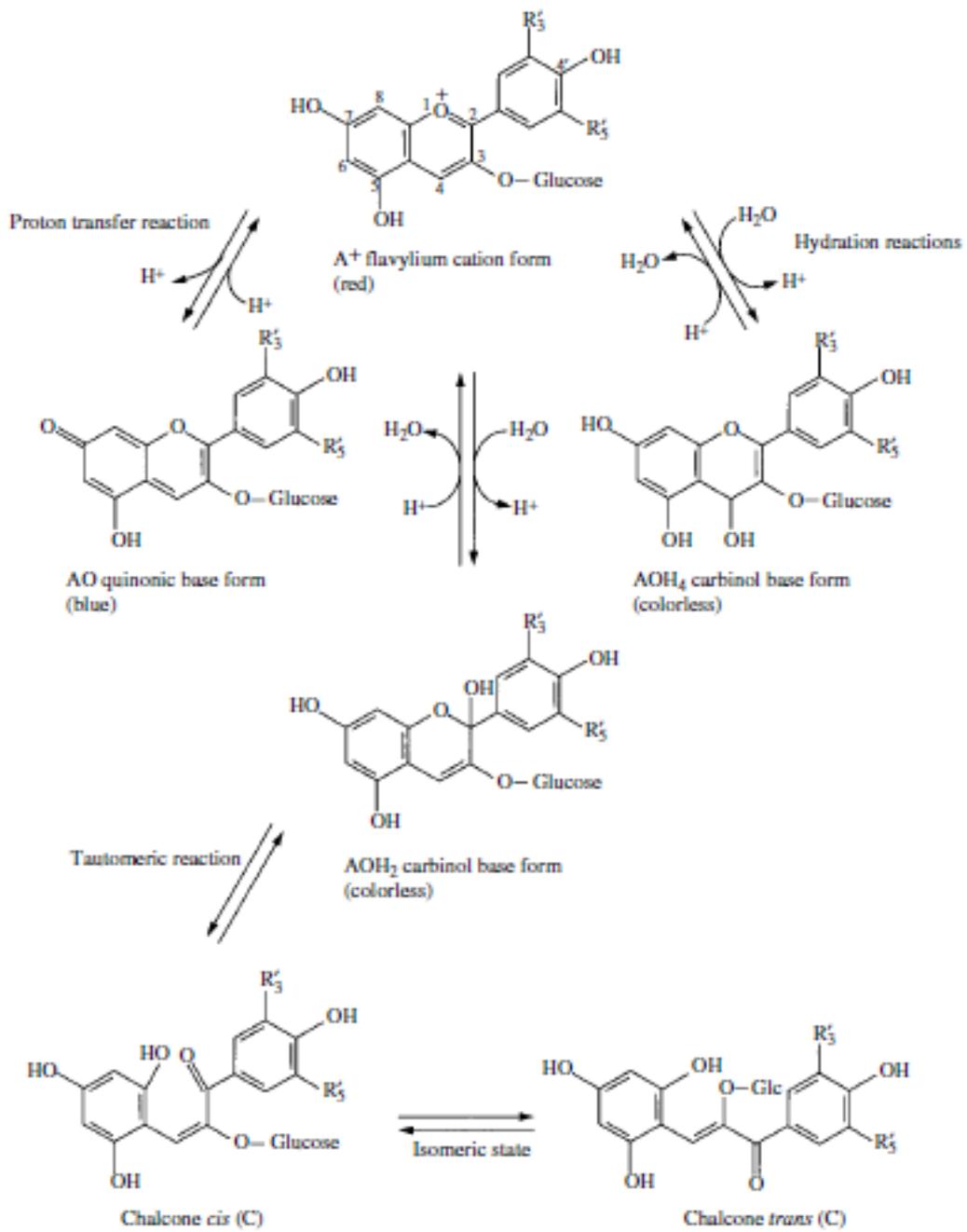


Figura 1.20: Formas de antocianinas.

Tomado de Ribéreau-Gayon, 2006b

Taninos: Los taninos presentes en uva están constituidos por unidades de 3-flavanoles de la serie de la catequina y la serie de la epicatequina (Figura 1.21).

Los taninos son compuestos capaces de producir combinaciones estables con proteínas y polisacáridos. La sensación de astringencia percibida cuando el vino tiene taninos se debe justamente a la reacción entre los taninos y las glicoproteínas en la saliva. Los taninos deben ser lo suficientemente voluminosos para producir combinaciones estables con proteínas, pero no tanto que estén demasiado lejos de los sitios activos de la proteína. Los pesos moleculares de los taninos activos se encuentran en un rango aproximado de 600 a 3500.

Las soluciones de taninos pueden ser amarillas a diferentes tonalidades de marrón. La mayor influencia de los taninos en el color del vino se debe a que originan las unidades de las cuales están compuestos y estas a su vez ocasionan fenómenos de copigmentación y condensación con otros compuestos presentes en el medio.

El calentamiento de los polímeros en medio ácido da como resultado antocianidina (por esa razón se los suele llamar proantocianidinas).

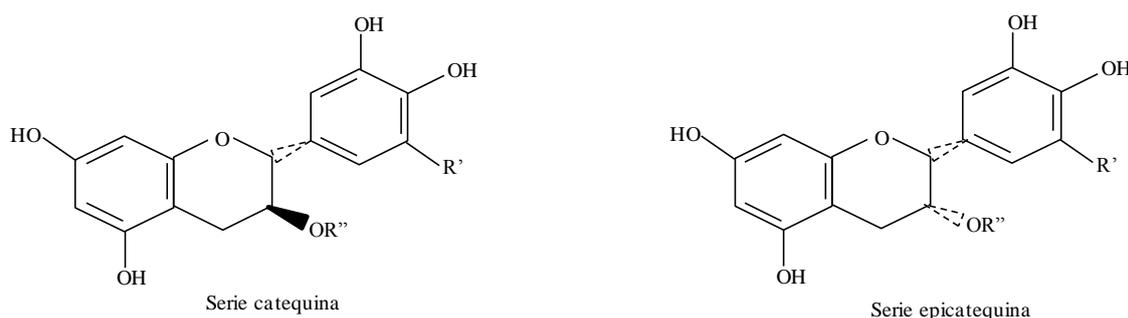


Figura 1.21: Unidades 3-flavanoles en taninos de uva

A su vez las unidades producto de la hidrólisis son altamente reactivas, sufriendo reacciones de condensación originando compuestos con una diversidad estructural elevada (diferentes vínculos, posición, estereoquímica). A diferencia de los flavonoides y las antocianidinas no están presentes como glucósidos (Flanzy, 2000).

Modificaciones del color

Como consecuencia de la fermentación maloláctica el color en el vino se puede modificar por:

- la acción glicosidasa que transforma a la antocianina en su correspondiente antocianidina menos estable.

- las reacciones de condensación antociano-antociano, antociano-tanino y la correspondiente formación de diferentes compuestos, que también modifican el color, pueden ser mediadas por etanal y el color de los productos de reacción también depende del pH del medio, del

potencial de óxido reducción, y estos nuevos compuestos pueden ser incoloros, anaranjados o rojos.

-la reacción de las antocianinas con compuestos que contiene grupo α -dicarbonílico, como el diacetilo, da lugar a castavinoles, que son incoloros (Castagnino et al., 1996), aunque posteriormente en forma gradual, los castavinoles, dan origen a nuevamente a las antocianinas (mediante la reacción de Bate-Smith) y por esta razón se los puede considerar como una reserva de antocianinas (Ribéreau-Gayon et al., 2006b).

-el catión flavilio reacciona con compuestos con dobles enlaces polarizados, dándose un mecanismo de cicloadición con antocianina. Los nuevos pigmentos formados son generalmente anaranjados, estables e insensibles a las variaciones de pH y dióxido de azufre (Cameira-dos-Santos et al., 1996). Un ejemplo de esta cicloadición es la reacción entre 4-vinil fenol y el monoglucósido de malvidina (Figura 1.22), se obtiene como resultado un compuesto incoloro que por oxidación da origen nuevamente al compuesto coloreado (Ribéreau-Gayon et al., 2006b).

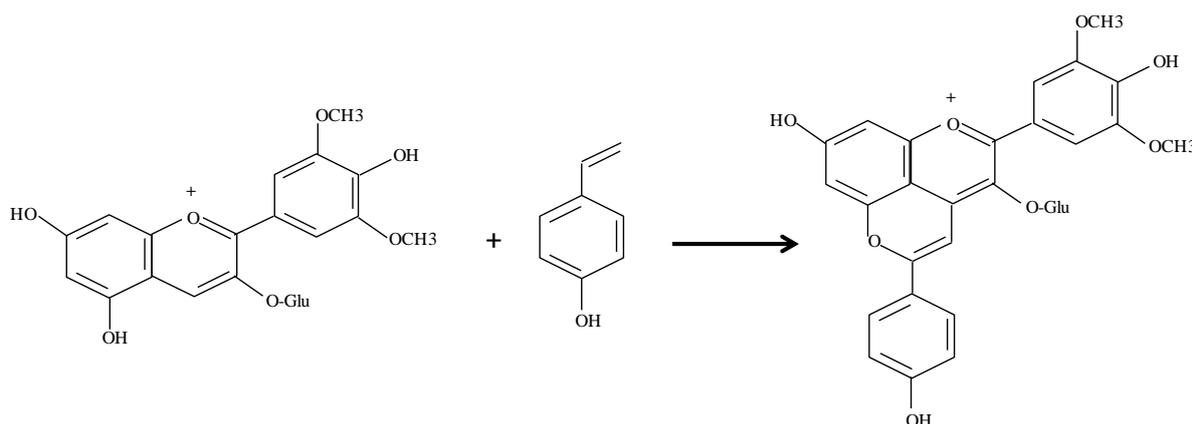


Figura 1.22: Reacción de ciclo adición entre glucósido de malvidina y 4-vinil-fenol.

Evaluación del color de los vinos

La diversidad de antocianos y taninos, y de los compuestos derivados, que pueden tener influencia en el color es extremadamente variada. Si bien existen procedimientos de análisis químico (HPLC, MS, RMN), que permiten identificar y cuantificar muchos de estos compuestos, ya sean las unidades o los polímeros, generalmente en los vinos se determinan índices de taninos, de antocianos, que resultan una aproximación al contenido total. En el mismo sentido está definido intensidad colorante (IC) y el índice de polifenoles totales (IPT) como parámetros relacionados con el color y el contenido de compuestos fenólicos respectivamente, que pueden ser determinados durante todo el proceso de elaboración y que constituyen una herramienta de diagnóstico rápida y asequible.

El espectro de vinos tintos tiene un máximo en 520 nm, debido a las antocianinas y la combinación con flavilio, y un mínimo en 420. La medida de la absorbancia a estas dos longitudes de onda toma en cuenta la contribución de rojo y amarillo al color general. El enfoque actual del análisis del color en la elaboración del vino requiere mediciones de absorbancia a 420 y 520 nm, con una medición adicional a 620 nm para incluir el componente azul en vinos tintos jóvenes. La IC es la sumatoria de las absorbancia a estas tres longitudes de onda, se asume que la intensidad del color representa la cantidad de color. La relación entre la absorbancia a 420 y 520, llamada matiz, proporciona información respecto a la evolución del color hacia la tonalidad anaranjada (Jacobson, 2006).

1.6 Bacterias lácticas en el vino

El efecto principal de la acción de las bacterias lácticas (BAL) en el vino es llevar adelante la fermentación maloláctica (FML), que tiene como resultado la descarboxilación del ácido L-málico para formar ácido L-láctico y dióxido de carbono, y provoca como consecuencia la desacidificación, además de las modificaciones del sabor y la estabilidad microbiana del vino. Si bien Pasteur describió por primera vez la presencia de "bacterias" en el vino a mediados del siglo XIX, no fue hasta principios del siglo XX que se describió la reacción maloláctica impulsadas por bacterias.

En los años siguientes, la aparición de FML se hizo evidente en los vinos de todo el mundo y, finalmente, *Oenococcus oeni* fue identificado como el principal organismo involucrado en el proceso. *O. oeni* es notable en su capacidad para tolerar el entorno vitivinícola nutricionalmente pobre y desafiante; sin embargo, no siempre está sólo, lo acompañan otras especies de bacterias lácticas (Bartowsky, 2005).

Las investigaciones sobre la genética y la bioquímica de las especies involucradas en la fermentación maloláctica, como *O. oeni* y de *Lactobacillus* han permitido mejorar su papel en la modificación del aroma y la estabilidad microbiana del vino. En particular, el uso de técnicas moleculares han proporcionado evidencia sobre la alta diversidad en especies, así como mejorando el conocimiento en la taxonomía y la ecología de las BAL del vino. Estas herramientas también demostraron que pueden ser útiles para detectar cepas con rasgos deseables o no deseables para fines de elaboración de vino. Al mismo tiempo, también se ha avanzado en el estudio de las propiedades enzimáticas que presentan las distintas cepas de BAL, se ha destacado la alta variabilidad intraespecífica de enzimas con actividad glucosidasa, esterasa, proteasa y las relacionadas con el metabolismo del citrato. Esta

diversidad genética y bioquímica que caracteriza a las poblaciones de las BAL da como resultado variabilidad sensorial del vino.

En particular, la diversidad intra-especies y los rasgos metabólicos bacterianos que afectan las propiedades organolépticas de los vinos son indicadores para la selección de cultivos iniciadores de la FML (Cappello et al., 2017).

1.6.1 Características de las bacterias lácticas en el vino

Las BAL tienen entre sus principales características las de presentar reacción positiva a la coloración de Gram, dar resultado negativo al test de catalasa, no presentar movilidad, no formar esporas, tener forma de cocos o bastones y transformar el ácido málico en ácido láctico (Ribéreau-Gayon et al., 2006a).

La combinación de diferentes métodos de análisis filogenético y diferentes modelos de filogenética permitió el reconocimiento de una serie de géneros asociados al vino (Makarova et al., 2007).

La disponibilidad más reciente de secuencias completas del genoma para las ramas principales de Lactobacillales ha permitido un análisis más definitivo de sus relaciones evolutivas (Borneman et al., 2012). Los desafíos radican en poder vincular la diversidad de las BAL del vino con la expresión del aroma y el sabor del mismo (Cappello et al., 2017).

La distribución de los microorganismos a lo largo del proceso de vinificación está asociado al viñedo, la cosecha y al sistema de procesamiento en la bodega. A pesar de la importancia de las poblaciones de BAL en la caracterización de la calidad del vino, el conocimiento de la distribución espacio-temporal de las poblaciones de BAL en uvas y en los mostos durante la fermentación maloláctica es aún motivo de estudio. Típicamente, la diversidad de especies de BAL asociada con la superficie de la uva es bastante limitada, debido principalmente a sus requerimientos nutricionales (Makarova et al., 2007; Bae et al., 2006; Ribéreau-Gayon et al., 2006a; Dicks et al., 2009).

Las especies de BAL recuperadas en la uva y el mosto desaparecen progresivamente durante la fermentación alcohólica. Durante la FML espontánea, *O. oeni* es la principal especie bacteriana encontrada, sin embargo, varias especies se pueden detectar ocasionalmente, principalmente *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Dicks et al., 2009; du Toit et al., 2011).

Entre los géneros que son capaces de producir la FML, *O. oeni* es la especie cuyo desempeño está acorde a la calidad requerida; las especies de *Lactobacillus* y *Pediococcus* tienden a producir características sensoriales indeseables.

La especie *O. oeni* fue hasta mediados de los años 2000, la única conocida del género *Oenococcus*, sin embargo en el 2006 se identificó a *O. kitaharae* en compostaje de residuos de shōchū destilado (Endo et al., 2006).

Recientemente se ha identificado una tercera especie, *O. alcoholitolerans*, aislados de la cachaça brasileña (Badotti et al., 2014).

Lactobacillus es un género importante y siempre presente en el proceso de vinificación, este género está representado aproximadamente por 30 especies (Dicks et al., 2009). *L. oeni* es la especie más recientemente reconocida (Mañes-Lazano et al., 2009). Entre las especies de lactobacilos aislados del vino se pueden nombrar a *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. hilgardii* y *L. fructivorans*, y otras en menor ocurrencia (*L. kunkeei*, *L. fermentum*, *L. mali*, *L. vini*). Su presencia es muy variable en diferentes variedades de uva y tipologías de los vinos (du Toit et al., 2011). De todas las especies, *L. plantarum* es sin duda la más importante en el vino porque se encuentra con frecuencia en uvas y en el vino, y está a menudo involucrada en la FML espontánea, esta bacteria tolera etanol hasta un 14% v/v y tiene una tolerancia similar al SO₂ que *O. oeni*. Además, *L. plantarum* tiene una gama más diversa de enzimas y potencialmente pueden ejercer efectos positivos sobre las propiedades organolépticas de vino (du Toit et al., 2011; Matthews et al., 2006). Debido a estas características, cepas seleccionadas de *L. plantarum* están siendo comercializado para inducir la FML en el vino (Bartowsky et al., 2015). *L. hilgardii* ha sido asociada a defectos sensoriales como consecuencia de la producción de compuestos heterocíclicos de nitrógeno tales como 2-etiltetrahidropiridina, 2-acetil-1-pirrolina y 2-acetiltetrahidropiridina (Costello et al., 2002).

El género *Pediococcus* está representado por cuatro especies (*P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* y *P. inopinatus*) asociadas con uva y vino (Dicks et al., 2009). Generalmente su presencia se asocia a potenciales defectos en el vino, provocados principalmente por las especies *P. parvulus* y *P. damnosus*, y a sus efectos perjudiciales en la calidad del vino por la producción de aminas biogénicas (Lonvaud-Fonel, 1999; Walling et al., 2005). En pocas ocasiones, se ha reportado que la FML realizada por *P. damnosus* se haya realizado sin defectos (Juega et al., 2013).

Existen especies encontradas con menor frecuencia: *Leuconostoc mesenteroides*, *Weissella paramesenteroides*, *W. uvarum* (Nisiotou et al., 2014), *L. Lactis* (Nisiotou et al., 2015), *Enterococcus faecium* (Capozzi et al., 2011). La presencia de *Enterococcus faecium* no es común en el vino y debe tenerse en cuenta debido a su potencial para producir aminas biógenas.

1.6.2 Requerimientos nutricionales y metabolismo de las bacterias lácticas

Con la finalidad de establecer las pautas a seguir para la selección del medio para el aislamiento y crecimiento de las bacterias lácticas a partir de vinificaciones industriales, se presentan las características relevantes respecto a los requerimientos nutricionales, además de tener en cuenta que las bacterias lácticas se desarrollan en forma inmediatamente posterior a la fermentación alcohólica y el medio contendrá los metabolitos producidos por las levaduras. Por otro lado se presenta, además, el resultado del metabolismo de las bacterias lácticas a fin de identificar aquellos compuestos que se producirán durante el transcurso del FML en los ensayos a realizarse este trabajo

1.6.2.1 Requerimientos nutricionales

Las bacterias del ácido láctico tienen capacidades biosintéticas muy limitadas y necesidades nutricionales exigentes, es así que para su crecimiento requieren ácido nicotínico, riboflavina, ácido pantoténico y tiamina o piridoxina. En el caso de las especies de *Pediococcus* requieren ácido nicotínico, ácido pantoténico y biotina, mientras que ninguno requiere tiamina, ácido *p*-aminobenzoico o cobalamina. Varios aminoácidos (ácido glutámico, valina, arginina, leucina e isoleucina) parecen ser esenciales para el crecimiento. Para el caso de *Oenococcus* además se incluye cisteína, tirosina. Además, purinas (guanina, adenina, xantina, y uracilo) y ácido fólico también son requeridos por muchas especies. Finalmente, debe tenerse en cuenta que las bacterias del ácido láctico no pueden utilizar fosfato de amonio como fuente de nitrógeno, y por lo tanto, deben obtenerlo a partir de los aminoácidos (Fugelsang et al., 2007).

Otro nutriente importante, es el llamado factor de jugo de tomate, el crecimiento en medios suplementados con jugos de frutas o verduras como el tomate o la manzana se ve favorecido, en su ausencia el crecimiento es más lento. El nutriente asociado a este factor jugo de tomate es un derivado del ácido D-pantoténico (ácido 4'-O-(β -D-glucopiranosil)-D-pantoténico) (Fugelsang et al., 2007). *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus bucheri* y *L. hilgardii* no fueron capaces de desarrollarse en ausencia de ácido D-pantoténico (Terrade et al., 2009a).

En cuanto a la atmósfera para su crecimiento, las BAL del género *Lactobacillus* son microaerofílicas, las del género *Oenococcus* anaerobias facultativas y las del género *Pediococcus* aerobias y microaerofílicas (Fugelsang et al., 2007).

1.6.2.2 Metabolismo de azúcares

Una vez finalizada la fermentación alcohólica, la concentración remanente de azúcares en el vino es de apenas unos 2 a 3 g/L, que incluyen hexosas (glucosa y fructosa, en menor proporción manosa y galactosa) y pentosas (arabinosa, ribosa y xilosa). Aunque el vino se considere “seco”, estas cantidades de azúcares son suficientes para promover el crecimiento de las BAL.

En función de la capacidad de transformar la glucosa las BAL pueden tener carácter homofermentativo: transforman la glucosa en ácido láctico o carácter heterofermentativo: transforman la glucosa además, en anhídrido carbónico, etanol y ácido acético. Si nos referimos a los géneros más frecuentemente encontrados en uva y vino (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Oenococcus* y *Leuconostoc*), el carácter homo o heterofermentativo de estos géneros, se muestra en la Figura 1.23.

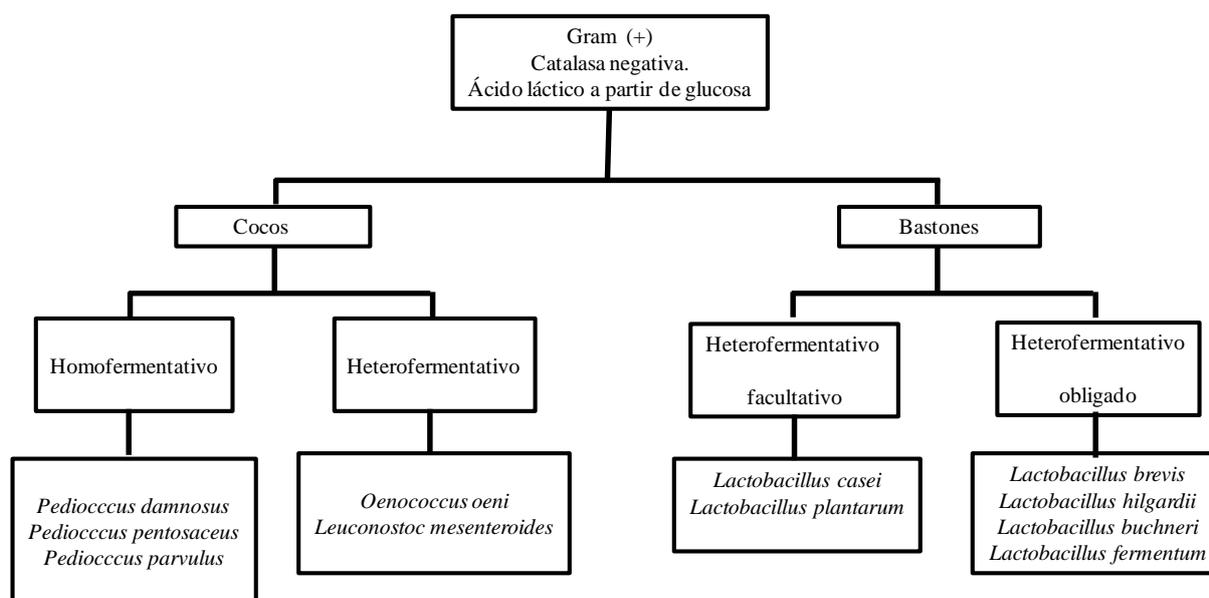


Figura 1.23: Carácter homofermentativo y heterofermentativo de las BAL del vino.

La vía metabólica que representa el carácter homofermentativo de las BAL se muestra en la Figura 1.24, la glucosa se transforma en piruvato y luego por acción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), el piruvato se transforma ácido láctico.

Debido a la variación de la esteroespecificidad de la enzima LDH puede formarse ácido D- o L-láctico. Energéticamente, la glucólisis produce 2 moles de ATP por mol de glucosa.

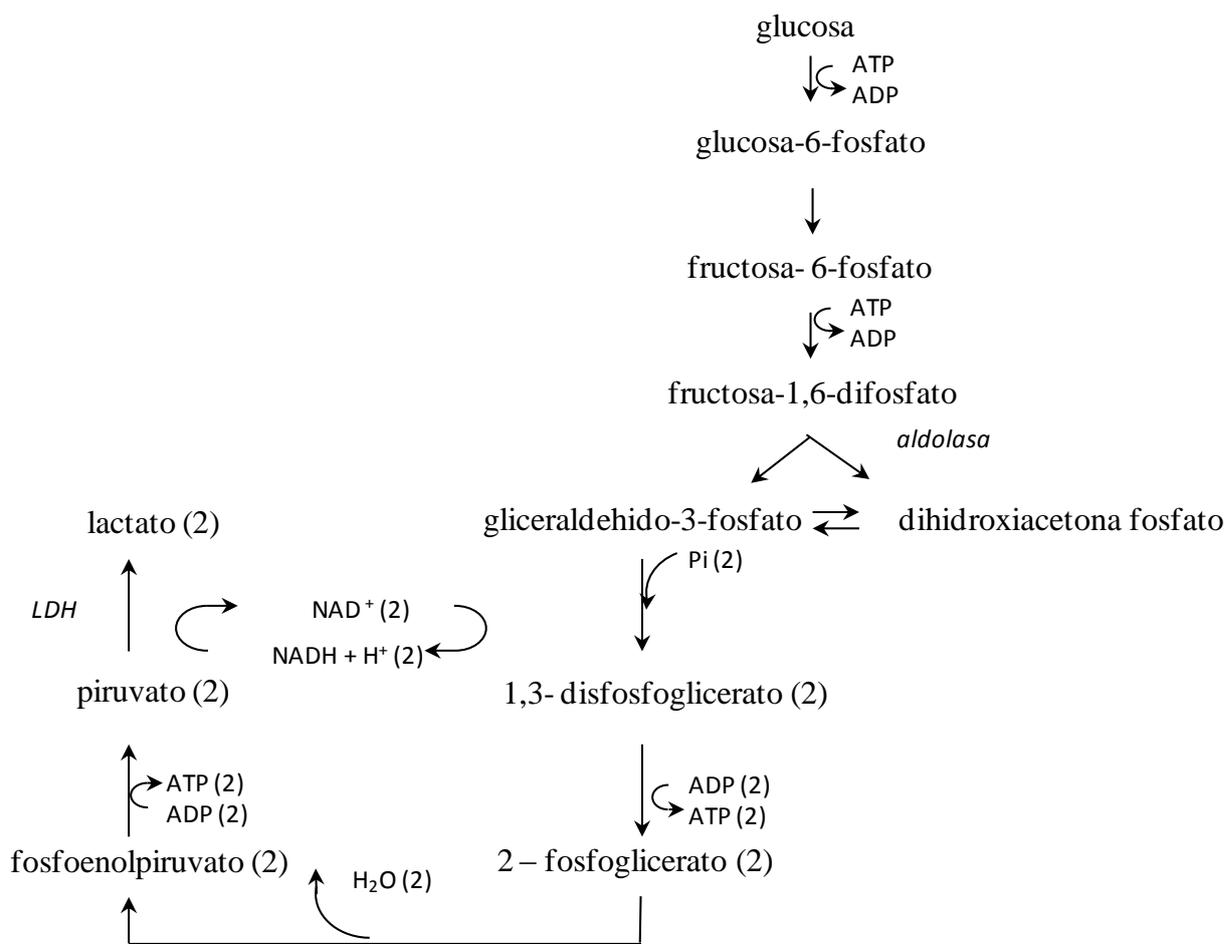


Figura 1.24: Metabolismo de la glucosa por las bacterias lácticas, vía homofermentativa.

En el caso de la vía metabólica heterofermentativa de la glucosa, se produce un mol de ácido láctico, dióxido de carbono y ácido acético, tal como se muestra en la Figura 1.25.

A diferencia de los microorganismos homofermentativos, estas bacterias no tienen aldolasa pero poseen fosfoacetolasa, la enzima responsable de la rotura de xilulosa-5-fosfato para formar gliceraldehído-3-fosfato y acetilfosfato.

Energéticamente, se forma un mol de ATP por mol de glucosa, sin embargo pueden obtener energía adicional mediante la conversión de acetil-fosfato a acetato. Desde la perspectiva de la elaboración del vino en bodega es importante el manejo exitoso de estas bacterias ya que en condiciones oxidativas se promueve la formación de ácido acético, en cambio en condiciones reductoras el acetilfosfato se convierte en etanol (Fugelsang et al., 2007).

Ciertas especies de *Lactobacillus*, *Pediococcus* o *Leuconostoc* pueden utilizar las pentosas presentes en el vino tales como ribosa, xilosa y arabinosa para formar acetato y lactato (Figura 1.26) (Ribéreau-Gayon et al., 2006a).

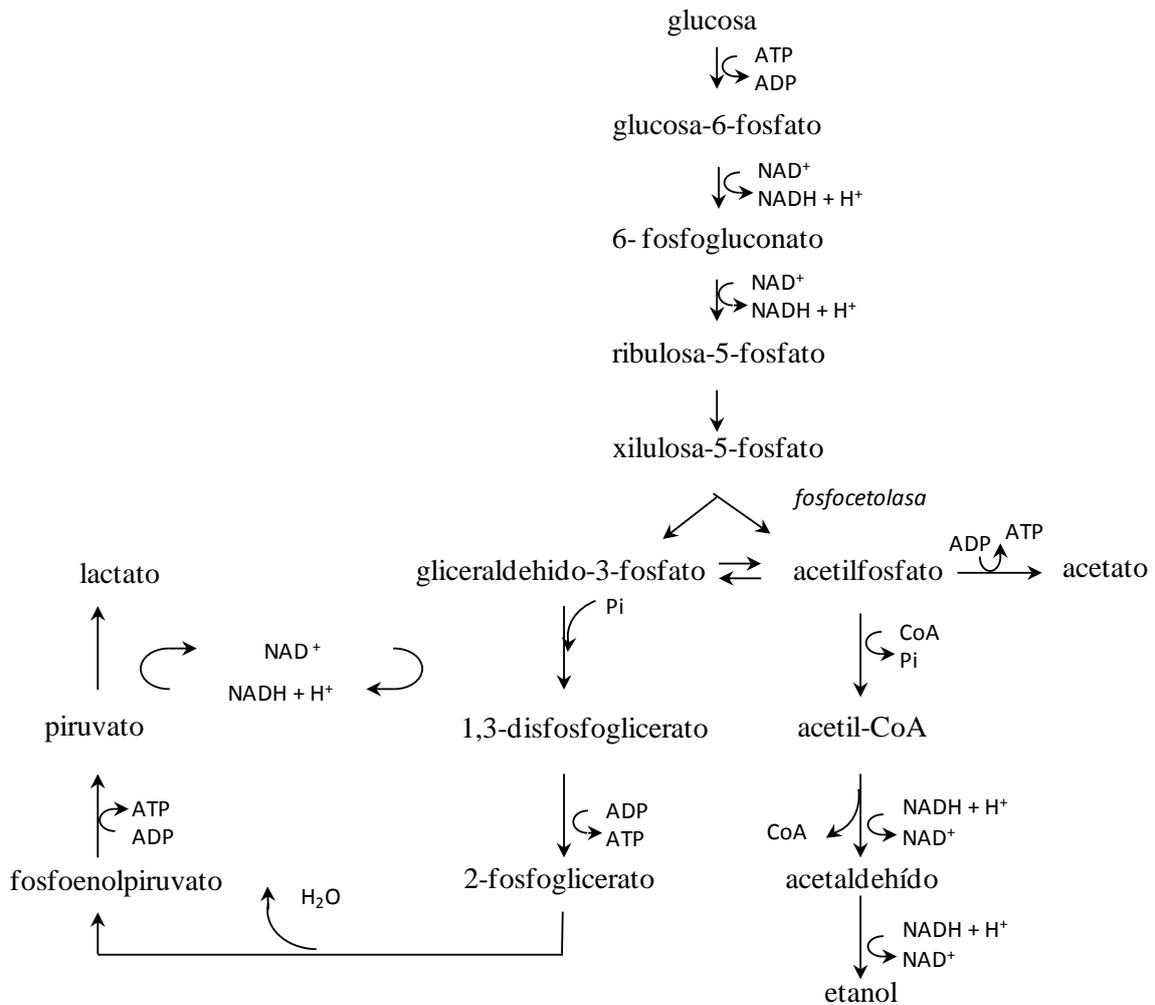


Figura 1.25: Metabolismo de la glucosa por las bacterias lácticas, vía heterofermentativa.

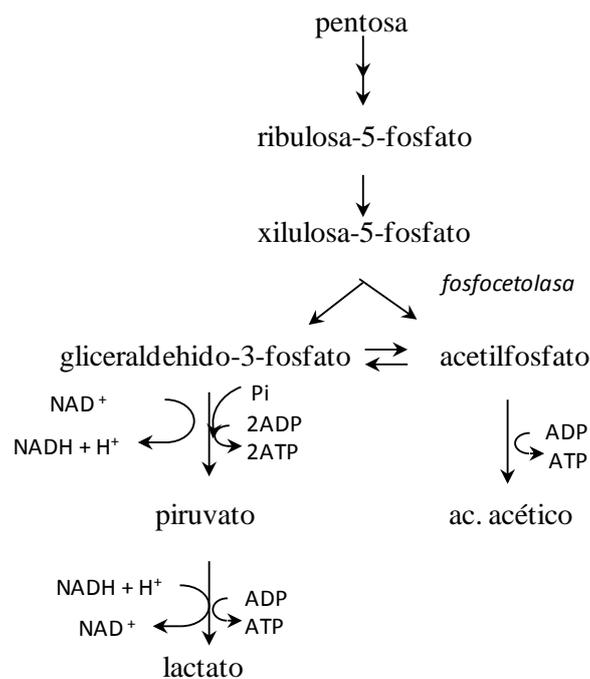


Figura 1.26: Metabolismo de las pentosas por las bacterias lácticas.

1.6.2.3 Metabolismo de ácidos

El ácido L-málico, junto con el ácido L-tartárico y el ácido cítrico conforman los principales ácidos presentes en la uva, y siguen presentes en el vino. Las bacterias lácticas poseen la habilidad de degradar el ácido málico y el ácido cítrico y en menor medida el ácido tartárico. Esta degradación es evidentemente la fuente de muchos cambios organolépticos, por lo cual la investigación de este proceso tiene un fuerte interés.

Metabolismo de ácido málico

Las bacterias lácticas transforman el ácido L-málico exclusivamente en ácido L-láctico y dióxido de carbono (Figura 1.27).

Esta reacción se confirmó cuando los estereoisómeros podían determinarse por separado para cada uno de los dos ácidos (Köning et al., 2009).

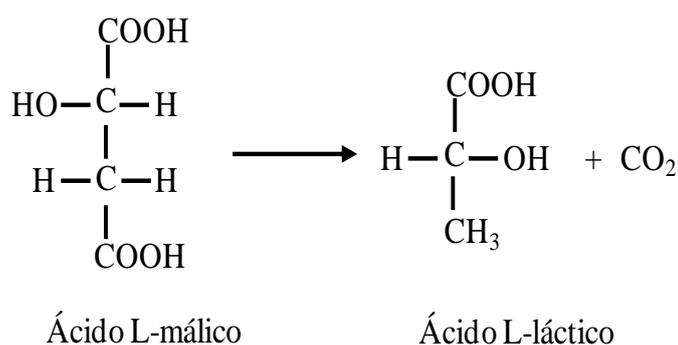


Figura 1.27: Transformación del ácido málico durante la fermentación maloláctica.

Los cocos heterofermentativos, *Oenococcus*, abundantes durante la vinificación, forman exclusivamente ácido D-láctico a partir de glucosa y exclusivamente ácido L-láctico del ácido L-málico (Ribéreau-Gayon et al., 2006a). Esta observación sugiere que la transformación de ácido málico no pasa por el intermediario de ácido pirúvico, la enzima que cataliza la descarboxilación directa de ácido L-málico en ácido L-láctico es la enzima maloláctica, se aisló por primera vez en *Lactobacillus plantarum* (Fugelsang et al., 2007). El pH afecta la actividad de la enzima maloláctica. El pH óptimo de la enzima purificada es 5.9, sin embargo la actividad maloláctica de *Oenococcus oeni* en el vino se da en el entorno de pH 3,2 y teniendo un 60 % de la actividad a pH 3,8 (corresponde a los valores habituales del pH del vino) (Ribéreau-Gayon et al., 2006a).

Metabolismo de citrato

Algunas especies de cocos heterofermentativos y bacilos homofermentativos son capaces de metabolizar el ácido cítrico. *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*, *L. casei* y *L. mesenteroides* usan al ácido cítrico. Cepas del género *Pediococcus* y de la especie *L. hilgardii* y *L. brevis* no pueden usarlo.

En la Figura 1.28, se muestran las rutas metabólicas que surgen a partir del ácido cítrico. El ácido cítrico se transforma en oxaloacetato y acetato por la liasa, el oxaloacetato se descarboxila en piruvato en *Oenococcus*, en algunos *Lactobacillus*, también puede conducir a una formación parcial de succinato y formiato.

El piruvato puede tomar la vía de formación α -acetolactato, dependiente de la condensación con tiamina pirofosfato (TPP) y a partir de allí formar los compuestos acetoínicos: diacetilo, acetoína y 2,3-butanodiol. El primero da un olor característico de manteca. La intensidad aromática de la acetoína y el 2,3-butanodiol, es bastante más baja.

La sintetasa produce α -acetolactato que luego se descarboxila en acetoína, el diacetilo deriva de él por oxidación. Esto es una vía aeróbica.

Si hay disponibilidad de la coenzima NADH, el piruvato conduce a la formación de lactato o a la descarboxilación y posterior reducción a etanol. También el piruvato derivado de citrato participa en la síntesis de ácidos grasos y lípidos a través de acetyl CoA o puede derivar en generar acetato (Ribéreau-Gayon et al., 2006a).

Los productos del metabolismo del ácido cítrico son por lo tanto muy diversos. Cualesquiera que sean las condiciones, más de una molécula de ácido acético seguramente se forma a partir de ácido cítrico.

En concentración limitada de glucosa, un pH bajo y la presencia de inhibidores del crecimiento, el ácido cítrico conduce preferentemente a la formación de sustancias acetoínicas. Por el contrario, cuando el crecimiento es fácil, el piruvato es utilizado para la síntesis de ácidos grasos.

Durante el crecimiento, la utilización de ácido málico y cítrico por parte de las BAL puede ocurrir en forma simultánea, sin embargo la utilización de ácido cítrico procede a tasa mucho más lenta. Por lo tanto, completar la conversión del ácido cítrico no coincide necesariamente con la finalización de la FML, y los niveles de ácido cítrico que permanecen en el vino después de la FML pueden ser suficientes para estimular la formación bacteriana de diacetilo y ácido acético (Fugelsang et al. 2007).

En general, los niveles de diacetilo producidos por *Oenococcus oeni* son relativamente más bajos en comparación con los producidos por *Lactobacillus*.

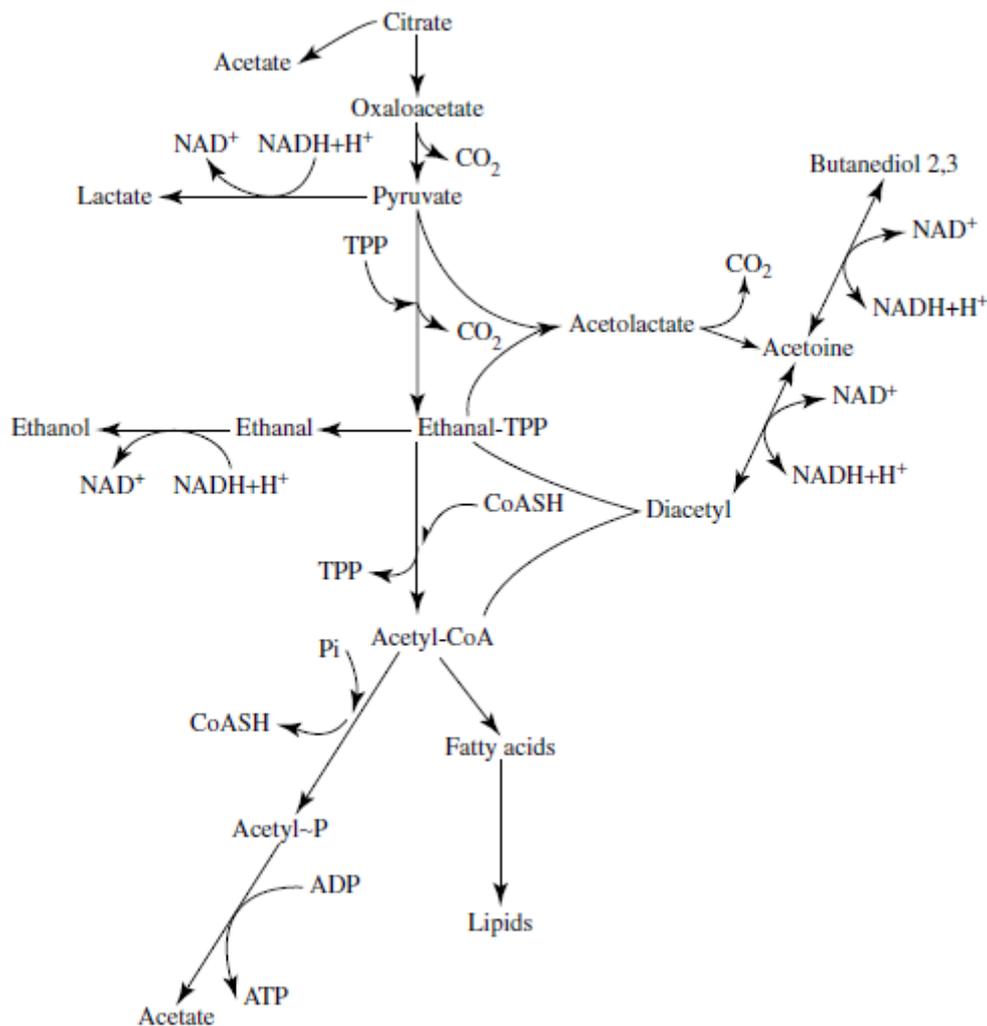


Figura 1.28: Formación de diacetilo, acetoina y 2,3 butanodiol por BAL a partir de ácido cítrico.
Tomado de Ribéreau-Gayon, 2006a.

La citrato liasa es una enzima clave del metabolismo del citrato ya que fragmenta citrato en acetato y oxaloacetato, y este último se descarboxila a piruvato por una oxaloacetato descarboxilasa, que conduce a la formación de diacetilo, que puede metabolizarse aún más a 2,3- butanodiol. El gen que codifica la enzima citrato liasa (*citE*) está presente en muchas especies de BAL, pero puede ocurrir que no se exprese. Se ha informado que algunas cepas de *Lactobacillus plantarum* y *L. hilgardii* no poseen el gen *citE*. Es factible que los vinos donde la fermentación maloláctica es dominada por cepas sin citrato liasa o con bajo nivel de transcripción de este gen tendrán concentraciones muy bajas de diacetilo (Cappello et al., 2017).

Metabolismo del tartrato

Sólo unas pocas especies han sido capaces de metabolizar el tartrato del vino, entre ellas *Lactobacillus plantarum* y *L. brevis*. El metabolismo del ácido tartárico provoca una marcada

disminución de la acidez total, un incremento del pH y un aumento de la acidez volátil del vino, lo que conlleva a un deterioro del producto (Ribéreau-Gayon et al., 2006a).

1.6.2.4 Otros metabolismos

Metabolismo de glicerol.

El glicerol está presente en el vino en el orden de 5 a 8 gL⁻¹, producido durante la fermentación alcohólica llevada a cabo por las levaduras. Algunas especies de *Lactobacillus*, entre ellas *brevis*, *hilgardii*, *diolivorans*, son capaces de transformarlo en acroleína (Figura 1.29). Este compuesto marca en el producto un defecto relacionado con la sensación de amargor, que se acentúa con la presencia de taninos.

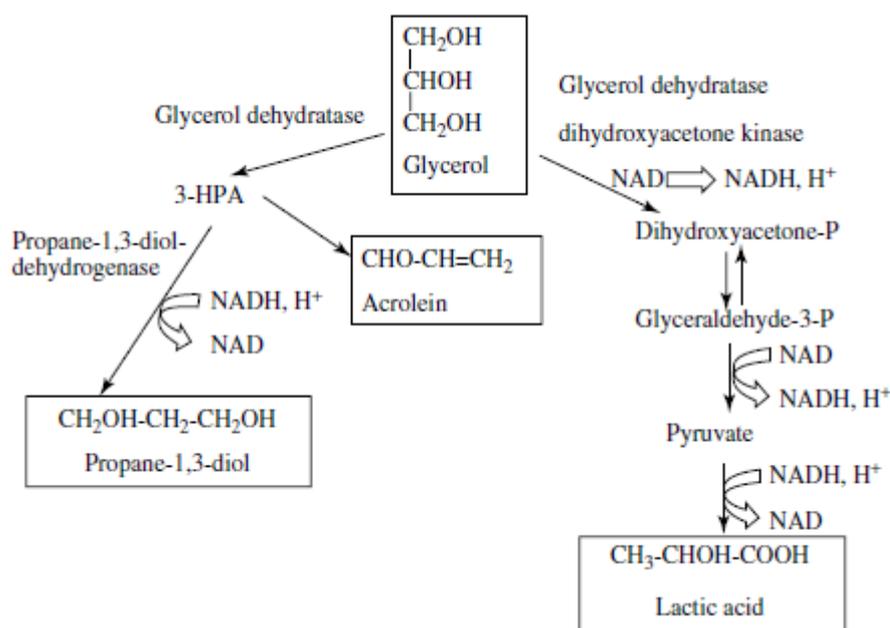


Figura 1.29: Esquema de la degradación de glicerol por *Lactobacillus*. Tomado de Ribéreau-Gayon, 2006a.

Metabolismo de aminoácidos.

La histidina, uno de los aminoácidos presente en el vino, se descarboxila en histamina, una amina biógena cuya toxicidad aunque baja, es de consideración al igual que otras aminas biógenas como la tiramina, feniletilamina, putrescina y cadaverina.

La histamina aumenta su concentración después de la FML, el esquema metabólico se muestra en la Figura 1.30. La tirosina se descarboxila a tiramina por una reacción similar.

Cepas del género *Pediococcus* fueron las primeras en ser descubiertas con esta capacidad, posteriormente también se detectó esta capacidad en cepas de *Oenococcus* y *Lactobacillus*.

La posibilidad de realizar la descarboxilación del aminoácido está asociada a la presencia de una enzima, la histidina descarboxilasa. Mediante el uso de herramientas moleculares, se ha

podido detectar el gen que codifica para esta enzima y por lo tanto realizarse el estudio de la posible capacidad de formar histamina para cualquier cepa que se quiera estudiar.

La formación de histamina por estas cepas aumenta a medida que las condiciones de crecimiento se vuelven menos favorables: la ausencia de otros sustratos (en particular, azúcar), pH bajo, presencia de etanol, y por supuesto por la presencia de histidina. La adición de borras con levaduras libera aminoácidos y péptidos al medio, lo que aumenta la concentración de histidina y por lo tanto la de histamina.

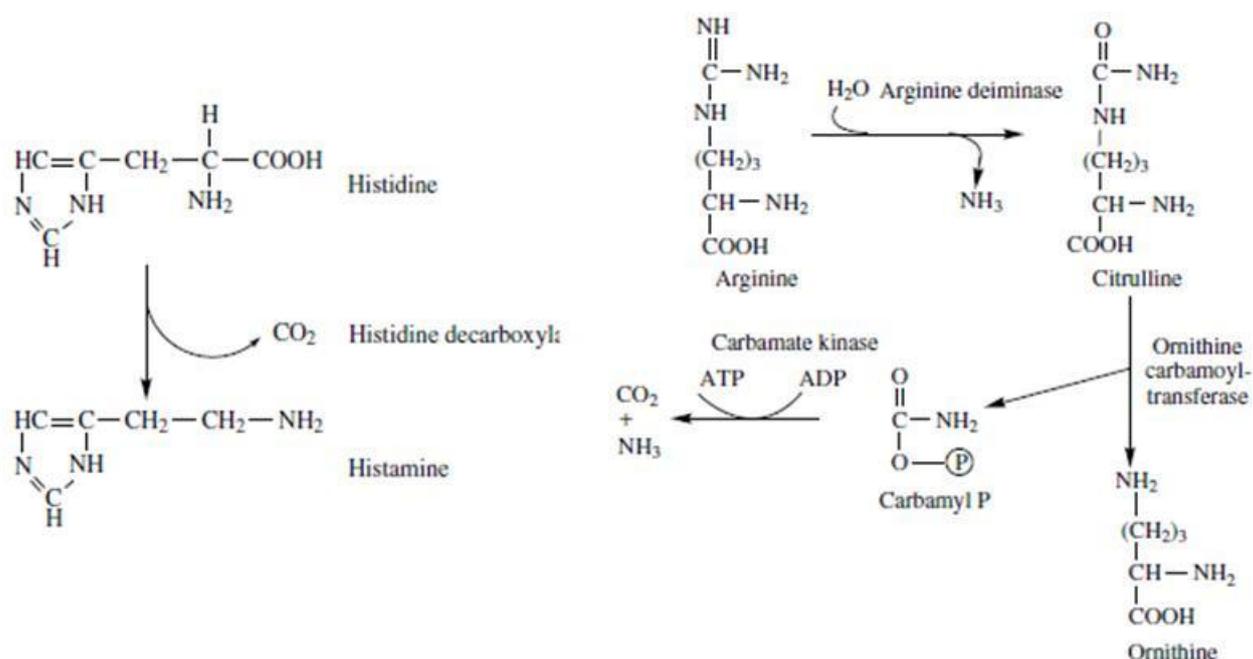


Figura 1.30: Metabolización de aminoácidos por bacterias lácticas.

Tomado de Ribéreau-Gayon, 2006a.

1.6.3 Rol de las glicosidasas y otras enzimas en las propiedades sensoriales

Las funciones metabólicas que desarrollan las BAL están asociadas a la presencia de muchas enzimas, al igual que en otros organismos. Especialmente son de interés los sistemas enzimáticos que tienen el potencial de influir en la composición química relacionada con las propiedades sensoriales del vino y por tanto en la calidad del mismo (Palmeri et al., 2007; Bartowsky et al., 2011; Strickland et al., 2016; Cappello et al., 2017).

Algunas de las enzimas que están relacionadas con el desarrollo del aroma del vino incluyen glicosidasas, β -glucosidasas, esterasas, decarboxilasas de ácido fenólico y liasas de citrato (Grimaldi et al., 2005a; Grimaldi et al., 2005b; Liu, 2002; Matthews et al., 2004).

Se ha demostrado que el aroma del vino ha aumentado su complejidad y expresión por la acción de enzimas glicosidasas presentes en cepas de *Oenococcus* (Grimaldi et al., 2000; Grimaldi et al., 2005b; Ugliano et al., 2003).

Promover la liberación de los compuestos aromáticos ligados, ya sea por hidrólisis en medio ácido o por acción de β -glicosidasas fúngicas, son estrategias que han sido reportadas (Günata et al., 1990). Sin embargo, este proceso de hidrólisis puede producir también cambios en las agliconas como consecuencia de rearrreglos químicos sobre estas moléculas, con resultados que pueden ser favorables o desfavorables. Por otro lado el uso de enzimas fúngicas - mezclas impuras de glicosidasas, esterasas y oxidasas - pueden causar transformaciones indeseables en las agliconas libres produciendo compuestos no aromáticos o modificaciones no buscadas ni deseadas.

Las BAL presentan esterasas que mediante dos vías pueden aumentar el contenido de éster etílico modulando así el carácter frutal del vino tinto (Costello et al., 2013).

El uso de las BAL del vino como fuentes potenciales de estas enzimas para potenciar la calidad aromática del vino es de interés, ya que podrían actuar eficientemente en las condiciones de alta concentración de etanol y ácido presentes en el vino.

1.6.3.1 Glicosidasas

Como se ha mencionado, los glicósidos, que pueden contribuir al aroma del vino se encuentran en las uvas y en el vino en una forma química inodora y están formados por una aglicona, volátil unida a una molécula de glucosa, dando β -D-glucósidos o a la unión con disacáridos formando 6-O-(α -L-arabinofuranosil)- β -D-glucopiranosido, 6-O-(α -L-ramnopiranosil)- β -D-glucopiranosido, 6-O-(β -D-xilopiranosil)- β -D-glucopiranosido, 6-O-(β -D-apiofuranosil)- β -D-glucopiranosido (Günata et al., 1988).

La hidrólisis de monoglucósidos sólo requiere la acción de una β -glucosidasa, mientras que la hidrólisis del disacáridos requiere dos enzimas que actúan secuencialmente, donde una exoglicosidasa elimina la molécula de azúcar más externa seguido por una β -glucosidasa que elimina la glucosa restante. Por lo tanto, se necesitan glicosidasas específicas para liberar los compuestos aromáticos de los azúcares y se ha demostrado que *Oenococcus oeni* posee estas actividades (Bartowsky et al., 2011; D'Incecco et al., 2004).

Muchos microorganismos poseen glicosidasas, incluyendo hongos filamentosos, levaduras y bacterias. *Saccharomyces cerevisiae*, la levadura principal implicada en la FA, no expresa muchas glicosidasas, por lo tanto la mayor parte de los glicósidos permanecen intactos en el vino una vez finalizada la FA (Matthews et al., 2004). Las BAL presentan actividad glicosidasa, la misma se ha encontrado en cepas de *Oenococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* (Grimaldi et al., 2000; Grimaldi et al., 2005a; Grimaldi et al., 2005b).

El análisis genético de las BAL ha podido identificar secuencias en el genoma que codifican para enzimas potenciales glicosidasas (Spano et al., 2005; Borneman et al., 2010).

Los primeros estudios que confirmaron la actividad β -glicosidasa se realizaron sobre cepas comerciales de BAL de uso enológico, usando como sustrato *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (Guilloux-Benatier et al., 1993; Grimaldi et al., 2000). Otros sustratos además del *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosido han sido ensayados (*p*-nitrofenil xilopiranosido, *p*-nitrofenil α -L-ramnopiranosido y *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosido) resultando que no todas las cepas de *Oenococcus* han confirmado actividad. Además parámetros tales como pH, temperatura, contenido alcohólico, concentración de glucosa y fructosa, ejercen influencia inhibitoria (Grimaldi et al., 2005b). La variabilidad de la actividad glicosidasa en sustratos sintéticos dentro de las especies *O. oeni* también ha sido reportado por otros grupos de investigación (Bloem et al., 2008; Cappello et al., 2010; Gagné et al., 2011; Hernandez-Orte et al., 2009).

Cepas comerciales de *O. oeni* ensayadas sobre compuestos glicosidados extraídos de vino Muscat, provocan la liberación de los compuestos aromáticos, tales como linalol, α -terpineol, nerol y geraniol (Ugliano et al., 2003). Cepas aisladas de vino, ensayadas sobre un vino enriquecido con compuestos glicosidados extraídos de uva de las variedades Verdejo, Chardonnay, Garnacha y Tempranillo provocan la liberación de terpenos, norisoprenoides, fenoles y vainillina (Hernandez-Orte et al., 2009).

En vinificaciones de uva Tannat, la FML llevada a cabo con cepas comerciales de *O. oeni* tuvo como consecuencia el aumento de 2-etilfenol, C13-norisoprenoides y terpenos entre otros. Por otra parte los polisacáridos derivados de *O. oeni* demostraron tener la capacidad de unirse a compuestos del aroma que influyen así en el perfil sensorial del vino (Dufour, 1999; Boido et al., 2002a).

La limitación de la liberación de C13-norisoprenoides por la absorción y los fenómenos de oclusión de los polisacáridos producidos por *O. oeni* también ha sido sugerido en otros estudios realizados sobre vinos tintos después de la FML (Antalick et al., 2012).

Los efectos de la actividad glicosidasa, no se limita sólo a las especies del género *Oenococcus*, también especies de *Lactobacillus* y *Pediococcus* la presentan, siendo el comportamiento dependiendo de los componentes analizados como sustrato. Las cepas de *Oenococcus* liberan más de cuatro veces de linalol, citronelol y nerol que una cepa de *L. brevis* (Hernandez-Orte et al., 2009) y para el caso de butirólactona fue mucho menos de la mitad una FML llevada a cabo por *L. plantarum* que una conducida por *O. oeni* (Pozo-Bayon et al., 2005).

Las BAL también demuestran una acción glicosidasa sobre precursores de vainillina originados a partir de los depósitos de roble (Bloem et al. 2008) y se ha reportado la liberación de aromas tales como whisky-lactona, vainillina y fenilcetonas (Gagne et al., 2011).

La modulación del nivel de glucósidos en el vino a través de la gestión de la FML parece ser posible. Sin embargo, debido a la gran variabilidad de los factores vitícolas y vinícolas que afectan la liberación de los aromas finales, es necesario seguir investigando para clarificar cuanto es la contribución efectiva de BAL durante la elaboración en la formación de aroma relacionada con la presencia de los precursores glicosidados (Cappello et al., 2017).

Además de la acción β -glucosidasa sobre los compuestos relacionados con el aroma también se puede dar la acción β -glucosidasa sobre compuestos relacionados con el color del vino como las antocianinas glicosidadas. En el caso de las antocianinas, la unión a la glucosa se realiza como β -D-glucopiranosidos. La hidrólisis de las antocianinas glicosidadas da como resultado una disminución en la estabilidad de las agliconas, las vuelve más sensibles frente a diversas reacciones químicas de degradación y provoca como consecuencia una pérdida de la intensidad colorante de los vinos (Ribéreau-Gayon et al., 2006a).

1.6.3.2 Otras enzimas

Las esterasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres de ácidos orgánicos, regulando el equilibrio entre ésteres y ácido libres. La contribución de los ésteres al perfil aromático depende del tipo de compuesto y de su concentración (Swiegers et al., 2005). Se relacionan con el aroma a fruta de vinos jóvenes, el tipo y cantidad presente durante y al fin de la FA es el resultado de la síntesis e hidrólisis por *Saccharomyces cerevisiae*.

Las esterasas de las BAL y su contribución al aroma del vino se han estudiado más recientemente y también se ha verificado tanto la síntesis como la hidrólisis de los ésteres (Matthews et al., 2004).

Una vez concluida la FML se ha corroborado un aumento de la concentración de acetato de etilo, acetato de isoamilo y lactato de etilo (Maicas et al., 1999; Gámbaro et al., 2001).

Estudios realizados con cepas de *Oenococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* sobre sustratos sintéticos ponen de manifiesto mayor actividad estearasa sobre ésteres de cadena corta (C2-C8) en comparación con ésteres de cadena larga (C10-C18) (Matthews et al., 2007).

La actividad estearasa sobre un sustrato *p*-nitrofeniloctanoato en una colección de 243 cepas de *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Enterococcus*, aisladas de vinos tintos ha mostrado ser dependiente de la cepa, el pH y el contenido de alcohol. La disminución del pH

y el aumento de alcohol ponen de manifiesto un decaimiento de la actividad estearasa. Las cepas de *Oenococcus*, siguen manteniendo un buen nivel de actividad en comparación con la de *Lactobacillus* y *Pediococcus* aún a pH 3, a concentraciones de alcohol de 13% (Pérez-Martín et al., 2013).

En general, los ésteres de ácidos grasos de etilo tienden a aumentar después de la FML. (Ugliano et al., 2005). La formación de butanoato de etilo, hexanoato de etilo y 2-metilbutanoato de etilo, se ha visto que es dependiente de la cepa de *Oenococcus* (Costello et al., 2012).

La síntesis de ésteres a través de una alcohol aciltransferasa para aumentar la concentración y su impacto en los aromas afrutados ha sido demostrada en *O. oeni* y *Lactobacillus* (Costello et al., 2013).

Se ha demostrado la presencia de una alcohol deshidrogenasa (*adh3*) que cataliza la interconversión de etanol al aldehído correspondiente y también es capaz de usar otros compuestos alcohólicos como sustratos, tales como 1,3-propanodiol, 1,2-propanodiol y 1-propanol (Elleuche et al., 2013).

La actividad proteolítica de BAL del vino ha sido reconocida en algunas cepas de *O. oeni*, inducida por privación de nutrientes (Rollan et al., 1995). Las proteínas proteolíticas se ha descubierto en especies de *Lactobacillus plantarum*, *L. paraplantarum* y *L. hilgardii* (Mtshali et al., 2010).

La presencia de bacterias con actividad proteolítica en el vino tiene implicaciones en la capacidad de estas cepas para liberar aminoácidos de péptidos que pueden a su vez favorecer el crecimiento de bacterias, provocar la metabolización de los aminoácidos liberados y la transformación en compuestos que puedan impactar en el aroma del vino.

La acción de peptidasas que liberen aminoácidos que contienen azufre, como la metionina, pueden producir compuestos volátiles de azufre como metanotiol, disulfuro de dimetilo, 3-metiltio-1-propanol (metionol), ácido-3-metiltio propanoico (Pripis-Nicolau et al., 2004). En general se asocian a aromas indeseables y reductivo, aunque en muy bajas concentraciones el ácido-3-metiltio propanoico puede aportar complejidad.

Las BAL provocan el aumento del 3-mercaptohexanol y del sulfuro de dimetilo, conjuntamente con el aumento de ésteres de ácido grasos (Antalick et al., 2012). El 3-mercaptohexanol se supone derivado de un precursor cisteinilado y la acción de una cisteína liasa. Para el origen del dimetilsulfóxido se propone dos vías, el catabolismo de aminoácidos o la acción de una sulfóxido reductasa (Pripis-Nicolau et al., 2004).

Los ácidos fenólicos (ácidos cinámicos sustituidos) son compuestos aromáticos importantes, constituyentes de las paredes celulares de las plantas. Estos ácidos (particularmente ferúlico, *p*-cumárico y cafeico) generalmente están esterificados con ácido tartárico y pueden liberarse por acción de la enzima cinamilestearasa durante la vinificación (Flanzy, 2000). Los ácidos fenólicos son metabolizados por diferentes microorganismos en los derivados 4-vinilfenol y posteriormente 4-etilfenol. Sensorialmente 4-vinilguaiacol y 4- etilguaiacol pueden aportar complejidad al aroma del vino pero en la mayoría de los casos su presencia se asocia a un defecto. La producción de fenoles volátiles en el vino generalmente se asocia con *Brettanomyces* (Ribéreau-Gayon et al., 2006a; Gerbaux et al., 2009), sin embargo, se ha demostrado que algunas especies de *Lactobacillus* pueden producir estos compuestos, aunque en cantidades menores (Couto et al., 2006).

Las BAL pueden convertir los compuestos fenólicos en vainillina (Bloem et al., 2007). La presencia de vainillina es considerada un aporte positivo al aroma del vino. *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* son capaces de producir vainillina, que podría asociarse a la presencia de un gen que codifica para una proteína ácido fenólico descarboxilasa (*pad*) identificado en estas cepas (Mtshali et al., 2010; Mtshali, 2011).

1.6.4 Evolución de la población de bacterias lácticas durante la vinificación

La presencia y la prevalencia de una especie microbiana sobre otra en cualquier etapa de la vinificación depende de muchos factores, condiciones de la uva antes de la cosecha (humedad, daño físico debido a pájaros o cosechadores, uso de fungicidas y grado de madurez), composición química y física del jugo/mosto/vino, programas de limpieza y desinfección de las instalaciones, así como las interacciones intra-especies. El estudio de la dinámica poblacional durante el proceso de vinificación, tiene una complicación adicional ya que bajo condiciones de estrés (presión osmótica elevada, baja o alta temperatura, concentración de oxígeno) los microorganismos pueden existir en un estado conocido como "viable pero no cultivable" (VBNC), este estado puede llevar a una falla para detectar microorganismos durante la vinificación (Oliver, 2005).

Un panorama general de la población predominante durante la vinificación se muestra en la Figura 1.31. La población de microorganismos está representada por diferentes especies de levaduras y bacterias.

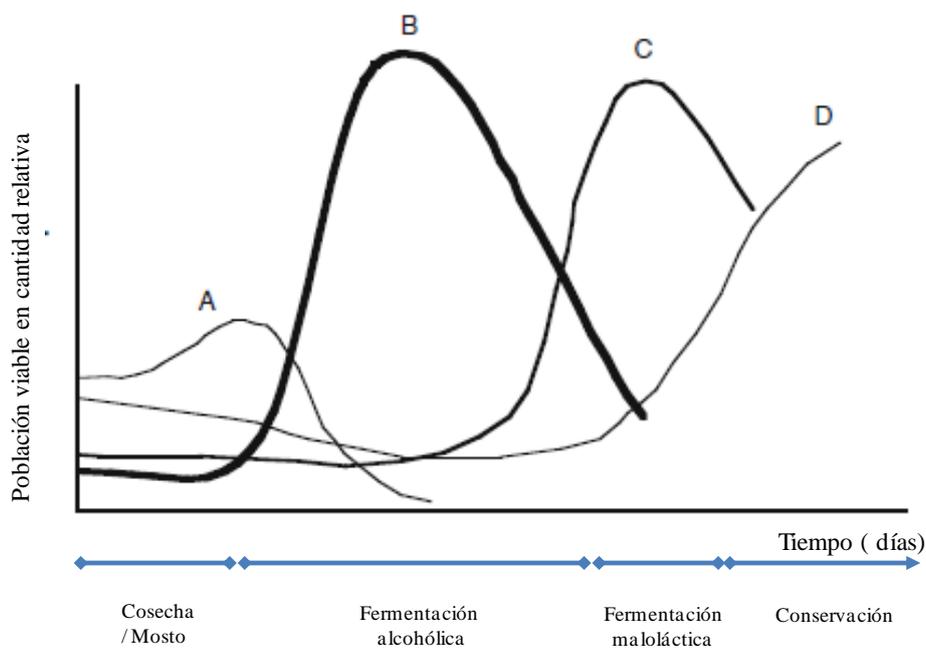


Figura 1.31: Panorama general de los microorganismos predominantes durante las etapas de la vinificación.

(A) no *Saccharomyces*, (B) *Saccharomyces*, (C) *Oenococcus oeni* (D) levaduras y bacterias deteriorantes.

Adaptado de Fugelsang, (2007).

Para el caso de las levaduras las especies predominantes podemos clasificarlas en *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*.

Durante la cosecha en uvas sanas y sin daños la población de levaduras está en el orden de 10^3 - 10^5 ufc/mL, la especie de no-*Saccharomyces* más frecuente es *Kloeckera apiculata*, le siguen especies de los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia* y *Rhodotorula*, la población de *Saccharomyces* suele ser muy baja (50 ufc/mL). Al comenzar la fermentación alcohólica (FA), las especies no-*Saccharomyces*, aumentan levemente su cantidad pero de acuerdo a la tolerancia particular de cada una de ellas al alcohol, lentamente la viabilidad decrece, y también su número.

Durante la FA comienza a predominar las especies de *Saccharomyces*. Cuando se alcanza el estado estacionario, se alcanzan una población pico en el entorno de 10^7 - 10^8 ufc/mL de *Saccharomyces*, en ese punto la mitad del azúcar ha sido fermentado. Al ir disminuyendo el contenido de azúcar, aumentando el alcohol, la viabilidad de *Saccharomyces* va decreciendo y como resultado al fin de la FA se tiene una población de *Saccharomyces* del orden 10^3 - 10^4 ufc/mL.

Si el manejo o los niveles de dióxido de azufre no son adecuados durante la conservación, pueden originarse procesos de deterioro del vino, causados por especies de *Brettanomyces*, *Saccharomycodes*, *Zygosaccharomyces*

La población de bacterias lácticas durante la cosecha y la obtención del mosto, en fruta no dañada, suele ser bastante baja, del orden de 10^3 ufc/mL. Entre las principales especies halladas se reportan *Lactobacillus hilgardii*, *L. plantarum*, *L. casei*, *O. oeni*, *Leuconostoc mesenteroides* y *P. damnosus* (Köning et al., 2009).

Una vez que la uva es triturada, comienza a desarrollarse la fermentación alcohólica, las especies que predominan en diferentes momentos es diferente, un muestreo del mismo lote en diferente momento del avance de la fermentación alcohólica a encontrado diferentes especies, se aislaron *L. jensenii*, *L. buchneri*, *L. hilgardii*, *L. brevis*, *L. cellobiosis*, *L. plantarum*, *Leuconostoc oenos* (*O. oeni*) y *Pediococcus spp.* (Costello et al., 1983).

El crecimiento o la inhibición de cualquier especie en particular, dependen de factores como el estado nutricional, el pH y el alcohol, así como la temperatura de la bodega y el impacto de la interacción con levaduras y otras bacterias. En el caso de vinos de regiones más cálidas que suelen tener valores de pH por encima de 3.5, las condiciones son favorables para el crecimiento de lactobacilos y otras bacterias (Davis et al., 1986). Decisiones enológicas, como la selección de levadura, la temperatura de fermentación y almacenamiento, sincronización de las adiciones de anhídrido sulfuroso, trasiegos, filtraciones también influyen en el predominio de una cepa respecto a otra.

La diversidad de especies de BAL en un mosto, puede aumentar poco después de la molienda, el número de células viables normalmente permanece relativamente bajo, 10^3 a 10^4 ufc/mL (Louvaud-Funel et al., 1991). Incluso si fue inoculado antes de la fermentación alcohólica, la mayoría de las BAL experimentan muerte rápida durante la fermentación alcohólica y la población no suele superar las 100 ufc/mL, y suele darse una FML retardada (Edwards et al., 1990; Semon et al., 2001).

Algún tiempo después de la finalización de la FA, las BAL predominan, siendo la especie *Oenococcus oeni* la que se encuentra en mayor proporción, alcanzando poblaciones por encima de 10^6 ufc/mL y llevando adelante la FML.

Hay excepciones donde hay infecciones por *Lactobacillus* o *Pediococcus* originándose en estos casos mayor producción de compuestos con perfil aromático negativo como diacetilo, aumento de acidez volátil, disminución del cuerpo por metabolización del glicerol, producción de aminos biógenas (Köning et al., 2009).

Una vez que se complete la FA y la FML, las bacterias lácticas aún pueden crecer en el vino, utilizando las pequeñas cantidades de arabinosa, glucosa, fructosa y trehalosa presentes. Los problemas originados son variados: turbidez, presencia de gas carbónico, exceso de diacetilo, formación de aminos biógenas (Fugelsang et al., 2007).

1.6.5 Contribución de la FML a las propiedades sensoriales del vino

A menos que sean aplicados tratamientos inhibidores, las BAL son parte de la microflora normal de todos los vinos blancos y tintos ya desde el comienzo de la FA y hasta el envejecimiento y almacenamiento (Ribéreau-Gayon et al., 2006a).

La reducción de la acidez fija producida por la acción de la FML, es un proceso beneficioso es percibida en el vino con una sensación de más redondez, haciendo al producto más bebible. La reducción de la acidez puede ser del orden del 0,2 al 0,3 %, con un aumento de pH de 0,1 a 0,3 unidades. En zonas cálidas donde los vinos obtenidos suelen ser de menor acidez que los obtenidos en vinos de zona fría, la FML puede producir vinos insípidos y con tan poca acidez que sea proclive a la contaminación por bacterias contaminantes.

Una vez finalizada la FML, ya no existe disponibilidad de ácido málico y la concentración de azúcares residuales es baja, hay menos disponibilidad de nutrientes, por lo tanto menos probabilidad de supervivencia de BAL y de microorganismos que puedan provocar deterioro, en condiciones enológicas controladas.

Por otro lado el catabolismo de aminoácidos durante la FML por *O. oeni*, provoca una disminución de los nutrientes nitrogenados necesarios para el crecimiento de microorganismos en un futuro (Terrade et al., 2009a).

Uno de los aspectos no beneficiosos de la FML es la posible producción de aminas biógenas. La histamina es la más importante de estas aminas desde el punto de vista toxicológico. En el mismo sentido, la FML puede conducir a la formación de carbamato de etilo.

La calidad sensorial desde el punto de vista visual también se ve modificado, luego de la FML el color de los vinos tintos disminuyen, resultado del aumento de pH y por la posible ruptura de enlaces β -glicosídicos de los antocianos, con formación de las antocianinas las cuales son inestables y se degradan (Ribéreau-Gayon et al., 2006a).

La calidad sensorial del vino, desde el punto de vista aromático también cambia una vez que la FML ha transcurrido (Boido, 2002b). La contribución al aroma es dependiente de las BAL específicas que conduzcan la FML (Bartowsky et al., 2011). Las pruebas sensoriales muestran una mejora en la calidad con el cambio en la composición volátil después de la FML (Liu, 2002; Swiegers et al., 2005; Costello et al., 2012; Bartowsky et al., 2002).

El impacto sensorial producido, dependerá de la variedad de uva, la cepa bacteriana la temperatura, el pH y el contenido de etanol (Costello et al., 2012). La selección de una cepa de BAL, para llevar adelante una FML, puede condicionar el estilo del vino y por lo tanto la preferencia o no de los consumidores (Malherbe et al., 2013).

Es así que vinos Chardonnay con FML realizada se perciben con aromas de avellanas, pan fresco, frutos secos, mientras que en el mismo vino sin FML predominan los aromas de manzana y pomelo (Avedovech et al., 1992).

Para el caso de vinos tintos la variación en la percepción de los aromas antes y después de la FML, también es dependiente del tipo de vino. En elaboraciones realizadas con Pinot noire después de la FML el vino perdió parte de sus notas de baya a favor de notas animal y vegetal. Mientras que sin FML se retenían aromas específicos a fresa-frambuesa (Sauvageot et al., 1997). Por otra parte, la realización de la FML antes o después de la puesta en barricas de madera condiciona la aparición de notas aromáticas diferentes (Izquierdo-Cañas et al., 2016)

Las percepciones reportadas son variadas, para el caso de vino Frankovka se detecta un aumento la complejidad (Herjavec et al., 1998), para el Tannat una disminución del aroma de uva y notas frescas (Gámbaro et al., 2001), para Cabernet sauvignon una disminución de la fruta y la astringencia (Costello et al., 2012), para vinos Merlot un aumento de láctico, vegetal y ahumado / tostado (Antalick et al., 2012).

1.6.6 Factores que influyen en el crecimiento de las BAL y en la FML

Se reconocen cuatro factores como los determinantes para la realización de la FML por las BAL: pH, temperatura, contenido de etanol y de dióxido de azufre, y otros factores nutricionales que también condicionan: deficiencia de aminoácidos, vitaminas, azúcares, presencia o ausencia de metales, presencia de ácidos grasos, presencia de polifenoles. Ninguno de estos factores puede considerarse independiente de los otros, un valor desfavorable de uno puede verse compensado en parte por el valor favorable de otro. Si bien no existen rangos óptimos precisos, si se han establecido valores dentro de los cuales es más o menos factible la viabilidad de la FML (Ribéreau-Gayon et al., 2006a).

Existen otros factores como deficiencias nutricionales, presencia de polifenoles y ácidos grasos, además de factores tecnológicos y microbiológicos que pueden causar, aunque en menor medida, la inhibición del crecimiento de las BAL.

1.6.6.1 Etanol

El porcentaje de alcohol en el vino es el primer factor limitante, siendo más rápida la FML en vinos con menor contenido alcohólico. Se considera un valor máximo de alcohol de 14% v/v

para tener crecimiento bacteriano, aunque se ha informado de algunos lactobacilos que pueden resistir hasta 18-20% v/v , siendo esta una causa de alteración en vinos licorosos.

El crecimiento de cepas de *Oenococcus oeni* aisladas del vino y cultivado en el laboratorio se activan en concentraciones de etanol de alrededor de 5-6% v/v y el crecimiento se torna difícil por encima del 13-14% v/v . (G-Alegría et al., 2004).

La tolerancia al etanol de cepas cultivadas en medio artificiales es mucho menor que para las mismas cepas cultivadas en el vino (Mesas et al., 2004).

El etanol tiene un impacto importante en la fisiología de las células porque su presencia genera modificaciones importantes que son la base para la adaptación de las células a este estrés (Köning et al., 2009).

1.6.6.2 pH

Si bien la mayoría de las bacterias se desarrollan bien a pH cercanos a la neutralidad, no es el caso de las bacterias acidógenas, como lo son las BAL. Pueden tener un crecimiento adecuado, al pH habitual del vino, en el entorno de 3,5. A pH del orden de 2,9 a 3,0 el crecimiento es posible, pero mucho más lento. En los límites superiores habituales del pH del vino, entre 3,7 y 3,8, el crecimiento es mucho más rápido. Algunas especies de BAL se adaptan mejor a pH más bajos, siendo *Oenococcus oeni* una de ellas (Ribéreau-Gayon, et al., 2006a).

En medios sintéticos suplementados con ácidos málico y tartárico, para cepas de *O. oeni* se verifica que se obtienen crecimientos óptimos en una semana a pH en el entorno de 3,9, sin embargo a pH en el entorno de 3,0 no se logra crecimiento en ese lapso de tiempo (Mesas et al., 2004).

El pH también condiciona el tipo de sustrato metabolizado por las BAL, en el caso de los cocos heterofermentativos a pH más bajo tienen preferencia por la metabolización de ácido málico frente a los azúcares y para el caso de los lactobacilos heterofermentativos la preferencia es similar para la metabolización de málico o azúcares, con la consecuente generación de acidez volátil (Ribéreau-Gayon et al., 2006a).

1.6.6.3 Temperatura

La temperatura tiene un papel importante en la calidad final del vino, modifica la velocidad de crecimiento de todos los microorganismos. Las BAL son mesófilas, su crecimiento óptimo se

encuentra entre 25 y 30°C en cultivo de laboratorio. En el vino la temperatura ideal para llevar adelante la FML se encuentra en el entorno de los 20°C, aunque si el contenido alcohólico es elevado la temperatura de crecimiento óptimo se reduce. Cuando la temperatura es inferior a 18°C, la iniciación de la fermentación maloláctica se retrasa y su duración es más larga, pero una FML en marcha puede continuar incluso en un vino con una temperatura entre 10 y 15°C (Ribéreau-Gayon et al., 2006a).

La temperatura tiene un impacto importante en la FML, porque influye directamente en la velocidad de crecimiento de bacterias. Sin embargo, es un factor fácil de controlar en comparación con el pH y el contenido de etanol.

1.6.6.4 Sulfitado

El dióxido de azufre o las sales de sulfito se agregan durante el proceso de vinificación en las etapas previas a la FA, luego de la FA y de la FML y durante la conservación por su acción antimicrobiana y antioxidante.

También el SO₂ presente puede tener su origen en el metabolismo de la levadura. Durante la FA, las levaduras sintetizan y liberan naturalmente SO₂ al vino. La cantidad varía de acuerdo con la cepa de levadura y condiciones de vinificación.

Contenidos de SO₂ libre de 10 mg L⁻¹ y de SO₂ combinado de 50 a 100 mg L⁻¹ son capaces de inhibir el crecimiento de BAL.

Para un mismo valor de SO₂ libre, a pH más alto, la inhibición del crecimiento es menor. (Mesas et al., 2004).

Algunas cepas de *O. oeni* son capaces de desarrollar tolerancia al SO₂, la que es muy variable según la cepa (Köning et al., 2009).

El agregado de SO₂ y el monitoreo de su contenido son actividades de relevancia enológica, tanto para posibilitar el desarrollo de la FML como para inhibir el crecimiento de microorganismos alterantes del vino.

1.6.6.5 Otros factores que pueden inhibir el crecimiento de las BAL

Las deficiencias nutricionales, ya sea por la falta de azúcares, aminoácidos, minerales o vitaminas, implican un desarrollo inhibido o suprimido de las BAL. La disponibilidad en fuentes nitrogenadas (aminoácidos, péptidos y proteínas) que generalmente es limitada, se compensa al final de la FA por la autólisis de la levadura y además la expresión de proteasas y

amino peptidasas en *Oenococcus oeni* que en condiciones de stress le permite obtener los aminoácidos necesarios (Guzzo et al., 2009).

Los polifenoles y los antocianos, presentes en el vino, pueden inhibir las bacterias en desarrollo (Figueiredo et al., 2008). Sin embargo, el efecto de estas moléculas en la actividad maloláctica presenta resultados variables, todavía bastante desconocida (Guzzo et al., 2009).

Los ácidos grasos decanoico y dodecanoico producidos por la levadura causan la inhibición del crecimiento de BAL. Aunque a bajas concentraciones provocan un efecto estimulador. El ácido oleico también tiene un efecto importante sobre el crecimiento de *O. oeni*. La asimilación de este componente actúa como factor de supervivencia o crecimiento, según la cepa de *O. oeni* utilizada (Guzzo et al., 2009).

Los iones como Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^+ y Na^+ son necesarios. Mg^{2+} , Mn^{2+} , se usan como cofactores enzimáticos clave del metabolismo (quinasas, enzima maloláctica). Los iones Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mo^{4+} y Se^{4+} , están involucrados en la nutrición de las BAL, sin embargo, el papel de estos iones metálicos aún no está establecido claramente para las BAL (Ribéreau-Gayon et al., 2006a). Exceso de iones Cu^{2+} y Zn^{2+} provoca inhibición del crecimiento de *O. oeni* (Mesas et al., 2004).

Dentro de los factores tecnológicos que pueden frenar el desarrollo de la FML se encuentra el proceso de clarificación, este proceso realizado en forma excesiva, elimina una parte de la microflora nativa que luego es responsable del desencadenamiento espontáneo de FML. Además, reduce la cantidad de nutrientes necesario para el desarrollo tanto de la FA como de la FML. Por otra parte el proceso de decantación y posterior trasiego al final de la FA, elimina los restos de levaduras y sus productos de autólisis, privando así a las bacterias de los factores de crecimiento (proteínas, vitaminas) que pueden liberarse durante esta etapa. El uso de recipientes de acero inoxidable, frente a los de madera, también se ha considerado como un factor que puede limitar el desarrollo de BAL (Guzzo et al., 2009).

1.7 Metales: interacciones con bacterias lácticas en el vino

1.7.1 Rol de los metales en los organismos vivos

Los seres vivos habitan en un entorno esencialmente inorgánico, donde los metales (este término también se usa para referirse a los iones metálicos) como constituyentes funcionales y estructurales de organismos vivos, están asociados al propio origen de la Vida (Baran, 1995).

En este sentido, una manera de clasificar a los elementos es justamente en función del efecto que producen en el desarrollo del ser vivo con el que interacciona: elemento tóxico, impureza tolerable o elemento útil (elemento esencial).

Los elementos químicos esenciales para la vida se pueden clasificar en:

- elementos mayoritarios: H, C, N, O, Na, K, Mg, Ca, P, S y Cl
- elementos traza esenciales para microorganismos, plantas o animales: Fe, Zn, Cu, Cr, Mn, Co, Ni, V, B, Si, Se, F, I, Mo, Sn
- elementos traza posiblemente esenciales para algunas especies: Cd, Pb, Li, As

Ahora bien, esta clasificación implica conocer al elemento, su concentración, el balance y equilibrio entre los diferentes elementos.

A su vez, afirmar que un elemento es esencial implica tener en cuenta que:

- a) su incorporación insuficiente produce deficiencias funcionales, las que pueden revertirse cuando se recupera el nivel óptimo
- b) el organismo no puede crecer ni completar su ciclo vital sin ese elemento
- c) el elemento debe poseer una influencia directa sobre el organismo y estar involucrado en sus procesos metabólicos
- d) el efecto del elemento esencial no puede ser logrado totalmente por ningún otro elemento.

De acuerdo a la concentración a la que se encuentre (o dosis si nos referimos a organismos superiores), un elemento puede pasar de ser esencial a poseer una respuesta fisiológica que conlleve la muerte del organismo.

Los diagramas de Bertrand o diagramas dosis-respuesta nos permiten visualizar la respuesta del organismo en función de la dosis del elemento como se muestra en la Figura 1.32.

La forma de la curva depende de cada elemento, de variables fisiológicas y de la química del elemento en particular. En la actualidad han llegado a reconocerse como esenciales para casi todas las formas de vida, una treintena de elementos (Baran, 1995).

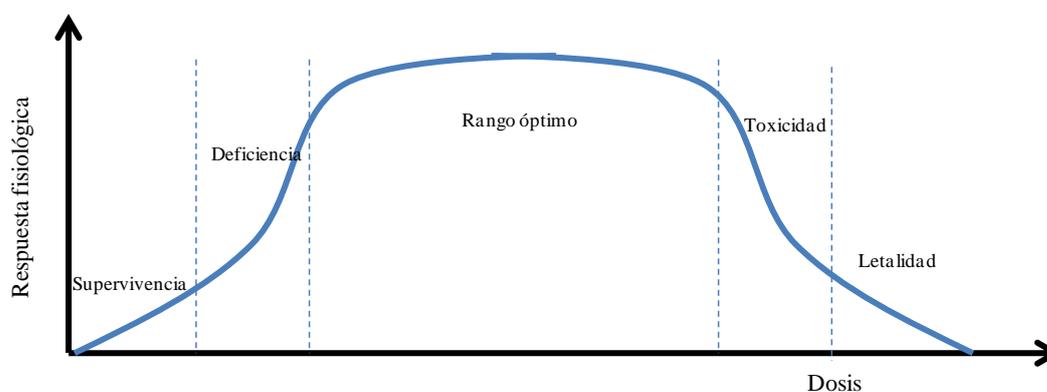


Figura 1.32: Diagrama dosis-respuesta para un elemento esencial.
Adaptado de Baran, 1995.

Para el caso de microorganismos el concepto que se maneja para referirse a la concentración que provoca la inhibición del crecimiento, es el de concentración mínima inhibitoria (CMI), que está definida como la concentración mínima del compuesto en cuestión que impide el desarrollo del microorganismo en condiciones normalizadas (Madigan et al., 2010).

Las funciones generales asociadas con los metales se refieren a:

a) Funciones estructurales (ejemplos: los fosfatos de calcio involucrados en la fase inorgánica de huesos y dientes de mamíferos, así como los carbonatos u oxalatos de calcio o la sílice que cumplen la misma función en otros organismos, o los llamados "dedos de zinc", estabilizados por este metal, y que cumplen un importante papel en la transmisión de información genética).

b) Activación y transporte de oxígeno (ejemplos: hemoglobina y mioglobina así como las hemeritrinas, conteniendo hierro; y las hemocianinas, conteniendo cobre).

c) Transporte de electrones (ejemplos: las proteínas de Fe y S llamadas ferredoxinas; las plastocianinas y azurinas, conteniendo cobre).

d) Funciones catalíticas en procesos redox (ejemplos: la catalasa y las peroxidasas dependientes de hierro; las oxidasas dependientes de cobre; la sulfito oxidasa, dependiente de molibdeno; las superóxido dismutasas dependientes de cobre, hierro o manganeso).

e) Funciones catalíticas en reacciones ácido-base (ejemplos: la anhidrasa carbónica y la fosfatasa alcalina, dependientes de zinc; la ureasa, dependiente de níquel).

Algunos otros sistemas que también contienen metales cumplen funciones diferentes como es el caso de captación, transporte y acumulación de metales, los involucrados en procesos fotoquímicos, los que participan en procesos de detoxificación, así como los sistemas aniónicos y catiónicos que participan en funciones de control, regulación y transmisión (House, 2013).

1.7.2 Interacción entre metales y bacterias lácticas

La interacción entre los metales y los microorganismos no escapa a las consideraciones anteriores. Se puede considerar que algunos metales son esenciales para el metabolismo o tóxicos, se acumulan por unión intracelular o absorción, actúan como centros catalíticos de enzimas, actúan como grupos vinculantes para llevar enzimas y sustratos juntos, mantienen el control fisiológico (antagonismo con otros metales). En la práctica, la determinación de los requerimientos de metales para el desarrollo de bacterias lácticas, está limitada por problemas

relacionados con procesos de co-precipitación o quelación en el medio, la pureza de los reactivos o de la propia agua que se utiliza.

Sin embargo, ha sido posible demostrar que diferentes enzimas proteolíticas de bacterias lácticas, a las que se les ha agregado EDTA como agente quelante, pueden ser reactivadas, agregando iones metálicos. Ejemplos de estas situaciones son (Boyaval, 1989):

-reactivación de aminopeptidasas, tripeptidasas y dipeptidasas por agregado de Co^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} ,

-reactivación de otra aminopeptidasa reactivada por agregado de Co^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} ,

-reactivación de una metalproteasa por agregado de Ca^{+2} .

En el caso del **sodio**, las bacterias expulsan el Na^+ en condiciones fisiológicas normales para mantener una relación entre el contenido interno y externo de 1/3 a 1/50, dependiendo de la presión osmótica. El transporte está estimulado o inhibido por Na^+ . En este sentido, para las bacterias lácticas la inhibición del crecimiento ocurre por encima de 5,5 % de NaCl para algunas especies, pero se han aislado bacterias lácticas de medios con 12 % NaCl (Gendy, 1983).

El **potasio** es requerido en condiciones fermentativas, un nivel elevado de K^+ citoplasmático es necesario para la síntesis de proteínas y para el control del pH citoplasmático (Harold et al., 1977), es común requerir niveles superiores a 50 mM de K^+ (1950 mg L^{-1}).

La exclusión del **calcio** del citoplasma bacteriano parece ser un atributo general de las bacterias. Existen mecanismos de exclusión de calcio, mediante un sistema de transporte secundario entre Ca^{+2} y H^+ o entre Ca^{+2} y Na^+ . En la fase logarítmica de crecimiento de *S. lactis* se ha registrado un incremento a 0,3 mg L^{-1} en la concentración intracelular de Ca^{+2} (Hurst et al., 1968).

Si bien el calcio no parece esencial para el crecimiento de bacterias lácticas, si se ha visto que la presencia de Ca^{+2} estimula el crecimiento (Eades et al., 1953), o se visualiza una transformación morfológica a cadenas más largas de microorganismos o la característica de bacilos en el caso de lactobacilos (Wright et al., 1981).

Estudios recientes muestran que el Ca^{+2} es necesario para la proliferación de los bacteriófagos (Bandara et al., 2012). La infectación de las bacterias lácticas por oenofagos genera una alteración en la dinámica del crecimiento, por lo cual se puede ver alterado el proceso de la FML (Köning et al., 2009).

El rol del calcio es importante en la pared celular, la expansión y contracción celular y la influencia en el complejo de ATPasa unido a la membrana que es estimulado por $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ (Boyaval, 1989). Un estudio en el que se compara el crecimiento de los géneros de

Oenococcus y *Lactobacillus* en un medio completo en el que el contenido de calcio es de 160 mgL^{-1} y el mismo medio omitiendo ese aporte (Terrade et al., 2009a), muestra que el crecimiento no se ve afectado, sin embargo los autores manifiestan que debido a las pequeñas cantidades de metales generalmente requeridas para el crecimiento de microorganismos (Archibald, 1983; Boyaval, 1989) es posible que simplemente el aporte desde el material de vidrio donde se realiza el ensayo puede ser suficiente para mantener el crecimiento.

El **magnesio** es el catión divalente de mayor presencia en todas las células. La deficiencia de Mg^{+2} , lleva a algunas especies de BAL a la imposibilidad de crecimiento, formas filamentosas, retardo en la división celular (Boyaval, 1989). Al comparar el crecimiento de los géneros de *Oenococcus* y *Lactobacillus* en un medio completo en el que el contenido de magnesio es de 10 mgL^{-1} y el mismo medio omitiendo ese aporte, el crecimiento de *Oenococcus* se ve afectado apenas en 2% y para el caso de *Lactobacillus* en un 45% (Terrade et al., 2009a). Los autores de este trabajo en cierta medida también explican estos resultados que han sido inconsistentes con trabajos previos (Boyaval, 1989), en que pequeñas contaminaciones de otros compuestos como el material de vidrio puede haber sido suficiente para mantener el crecimiento. Por otra parte indican que para la eliminación activa de los metales se usen agentes quelantes (Feng et al., 1997).

En el caso del **cobre**, no hay una evidencia contundente que lo asocie a un sistema de transporte en las BAL (Boyaval, 1989), y para este elemento los estudios se focalizan en el impacto que provocan al favorecer procesos oxidativos de dióxido de azufre, ácido ascórbico, polifenoles, pérdida de aromas, precipitación (Ribéreau-Gayon et al., 2006a; Pohl, 2007). Sin embargo, si se ha estudiado el efecto en el crecimiento de los géneros de *Oenococcus* y *Lactobacillus* en un medio completo en el que el contenido de cobre es de $0,004 \text{ mg L}^{-1}$ y el mismo medio omitiendo ese aporte, el crecimiento se vio afectado con una decrecimiento del 10 % respecto al control (Terrade et al., 2009a).

En el caso de la suplementación adicional al medio de cobre, por encima de 63 mg L^{-1} de Cu^{+2} el crecimiento se vio inhibido (Mesas et al., 2004).

El **hierro** es el elemento más estudiado, presenta una alta afinidad por muchas moléculas como catecoles y ácidos hidroxámicos, formando quelatos y posibilitando su transporte. Pequeñas trazas de hierro parecen estimular el crecimiento, en el caso de BAL termófilas estimula la producción de ácido láctico. Presenta implicancias en la actividad enzimática de aldolasas y reductasas. Estudios realizados en *L. plantarum* revelan que este microorganismo no requiere hierro (Archibald, 1983). En este mismo sentido si se compara el crecimiento de los género de *Oenococcus* y *Lactobacillus* en un medio completo en el que el contenido de

hierro es de 4 mg L^{-1} y el mismo medio omitiendo ese aporte el crecimiento no se ve afectado (Terrade et al., 2009a).

En el caso de la suplementación adicional hasta niveles de Fe^{+2} o de Fe^{+3} de 558 mg L^{-1} el crecimiento no se ve afectado (Mesas et al., 2004).

Para el caso de los microorganismos procariontes los requerimientos de **zinc** suelen ser unas 10 veces menor que para los microorganismos eucariotes. Una estimulación del crecimiento para especies de *Lactobacillus*, trabajando con concentraciones de zinc del orden de 1 mg L^{-1} se ha notado (Boyaval, 1989).

El crecimiento de *Oenococcus* y *Lactobacillus* en un medio con suplementación de zinc del orden de $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ y sin suplementación, no se ve afectado (Terrade et al., 2009a). En el caso de suplementación adicional hasta niveles de 65 mg L^{-1} , el crecimiento no se ve afectado, pero a niveles de 320 mg L^{-1} el crecimiento se ve inhibido (Mesas et al., 2004).

El **manganeso** es secuestrado, almacenado y transportado por las BAL. Los extractos vegetales, ricos en manganeso se utilizan para enriquecer medios en los que se cultivan BAL. La participación del manganeso en los procesos enzimáticos es conocida para diversas enzimas, como la RNA polimerasa, la enzima maloláctica, isomerasas, catalasas (Boyaval, 1989).

El crecimiento de *Oenococcus* y *Lactobacillus* en un medio con suplementación de manganeso del orden de 24 mg L^{-1} se desarrolló sin dificultades, si el medio no contiene manganeso el crecimiento no se da para ninguna de las cepas (Terrade et al., 2009a).

Capítulo 2

2 Aislamiento, caracterización y selección de cepas de bacterias lácticas autóctonas partir del vino

2.1 Introducción

La FML es una de las etapas principales en la elaboración de vino tinto. En este proceso, las BAL están presentes por ser parte de la flora autóctona o son agregadas intencionalmente después de la fermentación alcohólica.

Algunas de las actividades metabólicas de las BAL durante esta etapa son favorables, otras no tienen consecuencias, mientras que algunos son totalmente perjudiciales a la calidad del vino (Pozo-Bayon et al., 2005). En relación a la calidad sensorial del vino, desde el punto de vista aromático, cambia una vez que la FML ha transcurrido (Davis et al., 1986). La contribución al aroma es dependiente de las BAL específicas que conduzcan la FML (Bartowsky et al., 2011). Las pruebas sensoriales muestran una mejora en la calidad con el cambio en la composición volátil después de la FML (Liu, 2002; Swiegers et al., 2005; Costello et al., 2012; Bartowsky et al., 2002).

El impacto sensorial producido dependerá de la variedad de uva, la cepa bacteriana la temperatura, el pH y el contenido de etanol (Costello et al., 2012). La selección de una cepa de BAL, para llevar adelante una FML, puede condicionar el estilo del vino y por lo tanto la preferencia o no de los consumidores.

Oenococcus oeni es la principal especie identificada durante la FML debido a su mayor tolerancia a las condiciones adversas del vino. Los cultivos comerciales de diferentes marcas (LalvinVP41[®], Lalvin 31[®], Lalvin EQ54[®], Alpha[®], D11 Oenofrance[®], Viniflora[®] Oenos Chr Hansen, Viniflora[®] CH35 Chr Hansen), usados como iniciadores son de la especie *O. oeni*.

La inducción por inoculación con cepas comerciales no siempre es exitosa, dado las condiciones adversas del medio (Coucheney et al., 2005), por lo tanto el uso de un cultivo inicial autóctono bien adaptado a las condiciones del área específica de producción ha sido recomendado (Ruiz, 2010a).

2.1.1 Medios de aislamiento, cultivo y conservación de BAL

Las BAL son microorganismos anaerobios aerotolerantes nutricionalmente exigentes que crecen mejor en medios enriquecidos con jugos de frutas o vegetales y en condiciones de baja tensión de oxígeno. Aunque se han desarrollado incubadoras de alto costo capaces de mantener ambientes gaseosos controlados, en la mayoría de los casos es injustificado su uso ya que se han cultivado con éxito BAL usando frascos de vidrio con velas o una jarra con láminas generadoras de ambiente anaerobio (GasPak®). Cuando se ha incubado anaeróticamente en el entorno de los 25°C, a los 5 - 10 días son visualizadas las colonias de BAL dependiendo de la especie (Fugelsang et al., 2007), la incubación en condiciones aerobias retarda el crecimiento.

En la preparación del medio para el cultivo y aislamiento de las BAL se tiene en cuenta que son nutricionalmente exigentes. Además del aporte de carbono, de nitrógeno, fosfato y electrolitos, requieren varios aminoácidos (ácido glutámico, piridoxina, valina, arginina, leucina e isoleucina, cisteína, tirosina), vitaminas (ácido nicotínico, riboflavina, ácido pantoténico), purinas (guanina, adenina, xantina, y uracilo), ácido fólico, factor de jugo de tomate (asociado al aporte de Mn y derivado del ácido pantoténico) (Fugelsang et al., 2007). El medio de Man, Rogosa y Sharpe (MRS), se ha utilizado para el cultivo y aislamiento de bacterias lácticas (Constantini et al., 2009; Barbagallo et al., 2004).

También hay que tener en cuenta que el aislamiento a partir del vino debe hacerse sabiendo que coexisten junto con las bacterias lácticas, levaduras y bacterias acéticas principalmente. Por otra parte según lo visto en el capítulo 1 la mayor prevalencia de las BAL, se da durante el transcurso de la FML. Con la finalidad de realizar un aislamiento selectivo a partir del vino, la incorporación de cicloheximida inhibe el crecimiento de levaduras y la incubación en medio anaerobio inhibe el crecimiento de bacterias acéticas. La adición de cicloheximida a razón de 0,1 gL⁻¹ es lo habitualmente utilizado (Fugelsang et al., 2007).

2.1.2 Evaluación de la actividad β -glucosidasa

La actividad β -glucosidasa como responsable de la modificación aromática durante el proceso de vinificación es un hecho que se ha reportado y estudiado, tanto para levaduras como bacterias (Swiegers et al., 2005). Se ha visto que diferentes microorganismos utilizados en la vinificación presentan esta actividad asociada a las enzimas glicosidasas (D'Incecco et al., 2004; Barbagallo et al., 2004; Hernández et al., 2003; Pérez-Martín et al., 2012).

Para estudiar esta actividad se han planteado diferentes métodos (Fia et al., 2005; Grimaldi et al., 2000). En el método que usa *p*-nitrofenol β -D-glucopiranosido (*p*-NPG) (Grimaldi et al., 2000), la actividad β -glucosidasa se puede evaluar a través de la ruptura del enlace y la liberación del *p*-nitrofenol, compuesto que posee un máximo de absorbancia en el entorno de los 400 nm. Una mayor actividad enzimática se correlaciona con una mayor liberación del *p*-nitrofenol y por ende un mayor valor de absorbancia (absortividad *p*-nitrofenol a 400nm = 17100 M cm⁻¹). La actividad se puede encontrar tanto en el sobrenadante del cultivo como en las fracciones asociadas a la célula (Grimaldi et al., 2000).

La actividad β -glucosidasa de BAL determinada mediante el método de *p*-NPG es dependiente de las condiciones fisicoquímicas del medio, teniendo un máximo de actividad a pH 6 y decreciendo a pH 4 y a pH 8. A una temperatura de 30 °C se da mayor actividad que a 20 °C, pero si el medio contiene alcohol el resultado se invierte, y a contenidos de alcohol de 16% la actividad disminuye respecto a contenidos alcohólicos de 12, 8 y 4 % (Barbagallo et al., 2004).

Llevar a cabo el método *p*-NPG es sencillo, implica una secuencia de pasos: separación de las células del medio, incubación con los reactivos adecuados y realizar una medida espectrofotométrica, pero tiene el inconveniente que el sustrato en la actualidad es costoso (0,5g, U\$S 76,5).

Otro método reportado es el ensayo de actividad β -glucosidasa utilizando el glucósido de la esculina. Cuando este compuesto está incluido en el medio sólido, las colonias que muestran actividad β -glucosidasa se puede identificar fácilmente por un color marrón en torno al crecimiento. Si la actividad glucosidasa es producida por la cepa, el β -glucósido de la esculina se hidroliza en esculetina (6,7-dihidroxicumarina) y glucosa (Figura 2.1), y luego la esculetina libre reacciona con los iones férricos presentes en el medio dando como resultado un precipitado marrón (Strauss et al., 2001; Hernández et al., 2003).

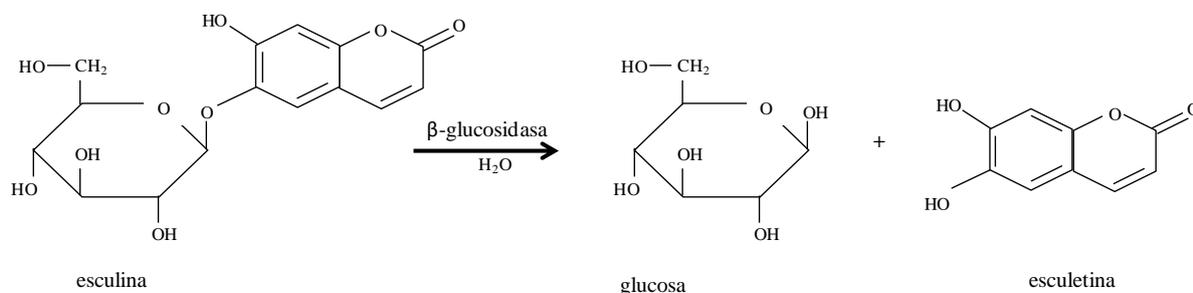


Figura 2.1: Reacción de liberación de esculetina a partir de su glicósido esculina.

La intensidad y el diámetro del halo marrón se pueden correlacionar con el grado de actividad enzimática (Pérez et al., 2011a), a mayor intensidad y diámetro del halo mayor actividad β -glucosidasa de bacterias.

Sobre esta base se ha desarrollado una aplicación para la identificación de esta actividad en cepas de levaduras (Pérez et al., 2011a) y de bacterias lácticas (Pérez et al., 2011b), denominado método EGA (Esculin Glycerol Agar). El método EGA es sencillo, sólo requiere preparar el medio sólido, sembrar las cepas a ensayar, incubar durante el tiempo estipulado y realizar la observación directa de la placa.

2.1.3 Justificación

Tanto el método *p*-NPG, como el EGA son indicadores de desempeño de la actividad β -glucosidasa, y lo que se busca es compararlos, y si se obtienen resultados similares usar el método EGA para elegir las cepas autóctonas aisladas a partir de vinos Tannat y ver si esta misma actividad se correlaciona con la liberación de las agliconas aromáticas del vino durante la FML.

El desarrollo de cultivos iniciadores para la fermentación de alimentos requiere no solo un estudio ecológico del ecosistema del alimento en particular sino además la caracterización de las propiedades tecnológicas y fisiológicas más adecuadas para la aplicación industrial de interés (Vogel et al., 2002).

En este sentido en nuestro trabajo se busca que las cepas seleccionadas presenten como principales características: la supervivencia en el vino, la capacidad de consumir totalmente el ácido málico, actividad β -glucosidasa; ya que la presencia de esta actividad tiene un impacto probado en el perfil sensorial de los vinos (Boido et al., 2002a; Grimaldi et al., 2005a).

Por otra parte también deben tener la capacidad de poder conservarse y que no pierdan la viabilidad posteriormente.

2.2 Objetivos

El objetivo general de esta etapa fue aislar cepas de bacterias lácticas adaptadas al medio vino, que fueran capaces de consumir el ácido málico y que poseyeran actividad β -glucosidasa. Los objetivos específicos propuestos fueron:

- aislamiento de bacterias lácticas autóctonas a partir de vinos elaborados en condiciones convencionales de industrialización,
- determinación de las condiciones para el desarrollo y la conservación de bacterias lácticas comerciales y autóctonas,
- caracterización de las cepas de bacterias lácticas autóctonas en función de su potencial actividad β -glucosidasa mediante un método sencillo,
- selección de las cepas con mejor potencial de actividad β -glucosidasa para realizar la fermentación maloláctica en un medio similar vino.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Cultivo, aislamiento y conservación de bacterias lácticas

El medio de cultivo utilizado para la siembra de bacterias lácticas fue el desarrollado por Man Rogosa y Sharp (MRS broth, CM0359 Oxoid[®]). El medio líquido, MRS caldo consta de: peptona 10 gL⁻¹, extracto de malta 8,0 gL⁻¹, extracto de levadura 4,0 gL⁻¹, glucosa 20 gL⁻¹, monooleato de sorbitan 1mL L⁻¹, fosfato ácido de potasio 2,0 gL⁻¹, acetato de sodio trihidrato 5,0 gL⁻¹, citrato triamónico 2,0 gL⁻¹, sulfato de magnesio heptahidrato 0,2 gL⁻¹, sulfato de manganeso tetrahidrato 0,05 gL⁻¹, una vez reconstituido el pH es de 6,2.

Para la preparación del medio sólido, MRS agar: al caldo MRS se le agregó 20 gL⁻¹ de agar.

La preparación y el reparto, ya sea en tubos o placas, se realizó siguiendo las prácticas habituales de técnica aséptica en el laboratorio de microbiología.

Para el aislamiento se utilizó el medio MRS al que se le adicionó cicloheximida en concentración 0,1g L⁻¹

Para la conservación a largo plazo se utilizó el medio Skim milk (Difco[®]).

Para la incubación en anaerobiosis se usó una jarra de anaerobiosis GasPak[®] de 2,5L de capacidad en la que se introdujo la lámina que genera el ambiente anaerobio (Oxoid AnaeroGen[®]). Para la incubación se utilizó una estufa de cultivo a 25 °C. El ajuste de pH del medio se realiza con NaOH o HCl (Costello et al., 2003) según corresponda.

2.3.2 Cultivo de bacterias lácticas comerciales

Se trabajó con cepas *Oenococcus oeni* de las marcas comerciales: LalvinVP41[®], Lalvin 31[®], Lalvin EQ54[®], Alpha[®], D11 (Oenofrance[®]), Viniflora[®] Oenos (Chr Hansen), Viniflora[®] CH35 (Chr Hansen).

Las cepas comerciales se rehidrataron en tubos conteniendo medio MRS caldo, durante 15 minutos entre 20-30°C. Luego se sembró por estrías en placas conteniendo medio MRS agar y se incubaron durante 5 días en anaerobiosis a 25°C. A partir de las colonias desarrolladas se realizaron los ensayos de actividad enzimática.

La conservación se realizó formando una suspensión de bacterias en Skim milk (Difco[®]) y conservando a -70°C. El esquema de trabajo con cepas comerciales se muestra en la Figura 2.2.

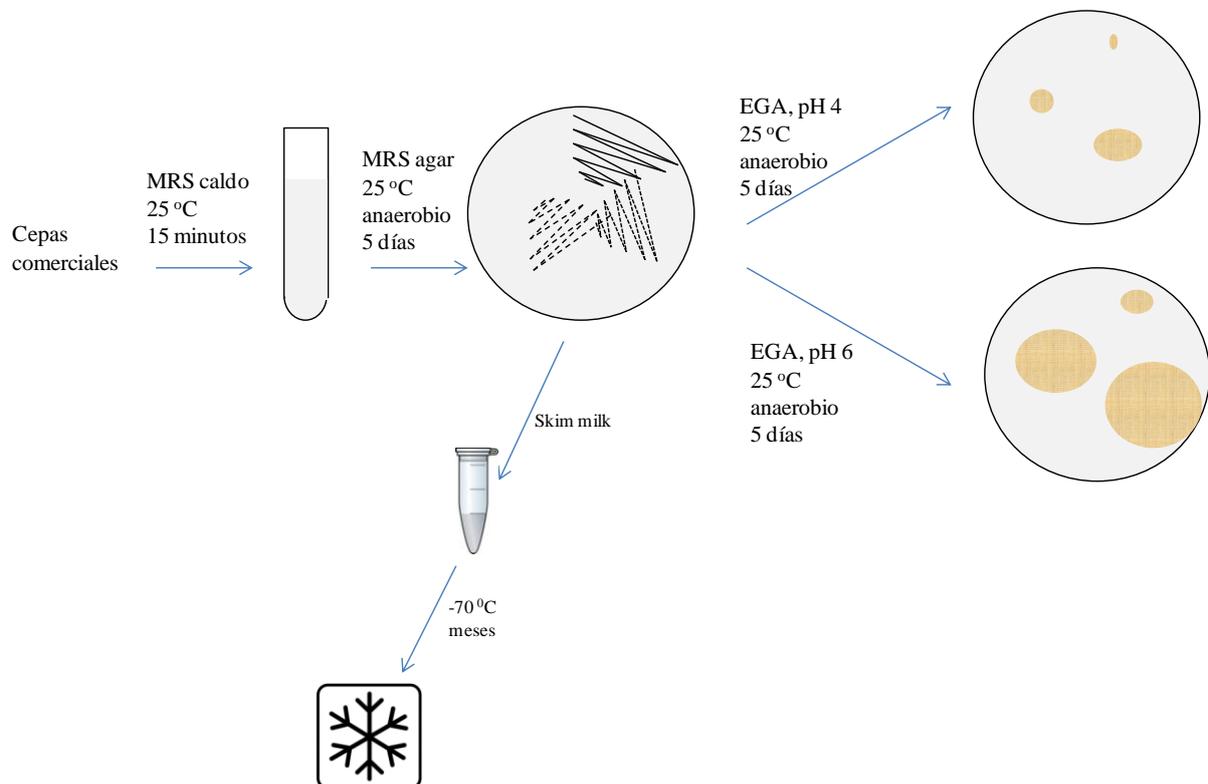


Figura 2.2: Esquema de trabajo para evaluación de la actividad glucosidasa (método EGA) de cepas comerciales.

2.3.3 Aislamiento de bacterias lácticas a partir de vino

A partir de vinificaciones industriales de diferentes bodegas del Uruguay, se realizó el aislamiento de bacterias lácticas.

El procedimiento consistió en tomar una muestra del recipiente donde se encuentra el vino en el que se detectó que la FML está en curso (momento de máxima prevalencia de BAL según lo explicado en el párrafo 1.6.4).

Las muestras de vino se sembraron en superficie en placas conteniendo medio MRS agar con cicloheximida. Se incubaron durante 5 días en anaerobiosis a 25°C.

Posteriormente a partir de esas placas se seleccionaron colonias aisladas que se subcultivaron en agar MRS sin cicloheximida y se incubaron durante 5 días en anaerobiosis a 25°C.

Se realizó observación microscópica y tinción de Gram, se presume la presencia de *Oenococcus Oeni* si se identifican cocos Gram+, no móviles formando cadenas cortas y largas, células solas o en pares. Se realizaron los ensayos de actividad enzimática o la inoculación en los ensayos de fermentación.

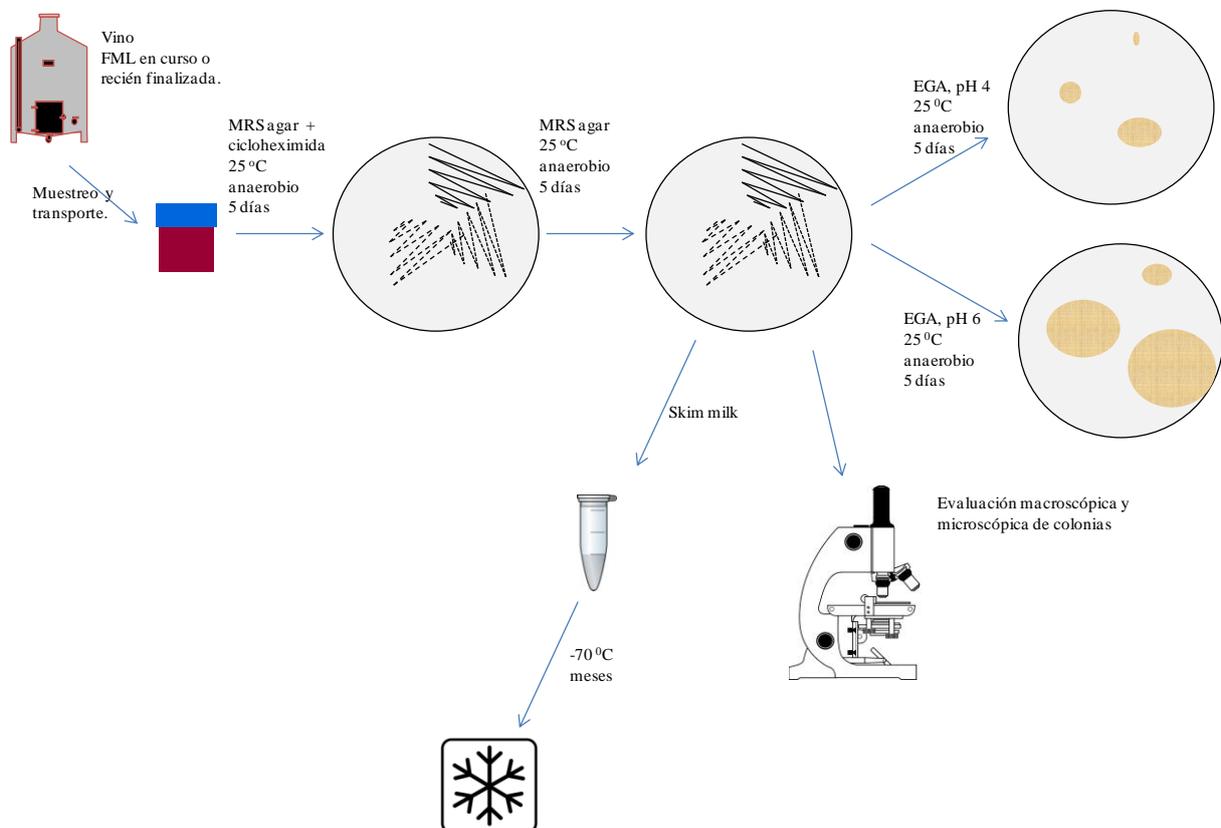


Figura 2.3: Esquema para aislamiento y caracterización de BAL autóctonas.

Se realizó posteriormente la conservación de la suspensión de células en medio Skim milk (Difco®) a -70°C. Para realizar nuevos ensayos a partir de las bacterias conservadas se pasó por una etapa de recuperación sembrando por estrías en placas conteniendo medio MRS agar e incubación durante 5 días en anaerobiosis a 25°C. El esquema de trabajo para la selección y caracterización de BAL autóctonas se muestra en la Figura 2.3.

2.3.4 Medida de la actividad β -glucosidasa método EGA

La determinación de la actividad β -glucosidasa se llevó a cabo mediante el test desarrollado por Pérez et al. (2011a) en medio EGA (Agar Esculina Glicerol).

El medio EGA está compuesto por esculina 1 g L⁻¹, cloruro férrico 0,3 g L⁻¹, hidrolizado de caseína 1 g L⁻¹, extracto de levadura 25 g L⁻¹, glicerol 8 mL L⁻¹, agar 20 g L⁻¹. El medio es autoclavado a 121°C durante 15 minutos y posteriormente fue repartido en placas de Petri. Luego de la solidificación del medio, se inocularon en estrías de 0,5 cm de las cepas a testear previamente cultivadas en MRS agar.

La actividad en agar esculina se ensayó ajustando el pH del medio, a pH=6 (óptimo de actividad β -glucosidasa) y a pH=4 (pH aproximado del vino).

La incubación se realizó a 25 °C, en anaerobiosis y fue examinada a los 2, 4, 7 días.

Una placa no inoculada se incubó como control del medio de cultivo. *Kluyveromyces fragilis* (Y1109) se utilizó como control positivo y *Saccharomyces cerevisiae* (M 522) como control negativo (Pérez et al., 2011a).

Las cepas que presentaron actividad β -glucosidasa fueron capaces de hidrolizar el sustrato y desarrollar una coloración marrón en el medio de cultivo, a mayor intensidad y diámetro del halo mayor actividad.

2.3.5 Determinación de la actividad β -glucosidasa método del *p*-nitrofenol β -D-glucopiranosido (*p*-NPG).

Un inóculo de bacterias se colocó en 5 mL de caldo MRS, se incubó por 2 días a 25 °C. Las células recolectadas de 1 mL del cultivo se lavaron con NaCl 150mM y se resuspendieron en 500 μ L de Buffer pH 5 (125 mM citrato fosfato) con 5mM de *p*-NPG. Se incubó 2 horas a 25 °C, se agregó 1 mL de buffer carbonato pH 10 (0,2 M carbonato de sodio). Se centrifugó y se midió la absorbancia a 400 nm contra un blanco de reactivos. Las cepas que presentaron un mayor valor de absorbancia son las que poseen mayor actividad β -glucosidasa.

2.4 Resultados y discusión

2.4.1 Cultivo de bacterias comerciales

Se trabajó con las 7 cepas de bacterias lácticas *Oenococcus oeni* de las marcas comerciales, siguiendo el esquema de trabajo de la Figura 2.2. Se ensayó para cada cepa el cultivo en

aerobiosis y anaerobiosis, a pH 4 y 6. Los resultados para el cultivo de bacterias lácticas comerciales, luego de 7 días de incubación se simboliza: (+) indica crecimiento y (-) indica no crecimiento y se muestran en la Tabla 2.1.

Nombre de la cepa	Aerobiosis		Anaerobiosis	
	pH 4	pH 6	pH 4	pH 6
LalvinVP41 [®]	-	+	+	+
Lalvin 31 [®]	-	+	+	+
Lalvin EQ54 [®]	-	+	+	+
Alpha [®]	+	+	+	+
D11 (Oenofrance [®])	-	+	+	+
Viniflora [®] Oenos (Chr Hansen)	-	+	+	+
Viniflora [®] CH35 (Chr Hansen)	-	+	+	+

Tabla 2.1: Crecimiento de bacterias lácticas comerciales en medio MRS.
(+) indica crecimiento (-) indica no crecimiento.

A los 7 días de incubación, a pH 6, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis se logró el desarrollo de las cepas ensayadas.

A los 7 días de incubación, a pH 4, el desarrollo de todas las cepas fue posible en condiciones de anaerobiosis.

A efectos de estandarizar las condiciones de evaluación se informó el crecimiento al cabo de 7 días de incubación.

Cabe mencionar que se continuó la incubación por más tiempo (15 días) y tanto en aerobiosis como en anaerobiosis a pH=4, se obtuvo crecimiento de todas las cepas ensayadas.

A partir de estos cultivos se realizó el proceso de conservación mediante la generación de una suspensión de bacterias en Skim milk (Difco[®]) y colocación a -70°C. A partir de la suspensión conservada, se recuperaron las siete cepas ensayadas, este hecho validó el procedimiento de conservación para su posterior uso cuando se requiera conservar cepas autóctonas a partir de las vinificaciones industriales, asumiendo un comportamiento similar para las bacterias lácticas autóctonas.

2.4.2 Evaluación de la actividad β -glucosidasa método EGA, en cepas comerciales

Como puede observarse en la Figura 2.4, la magnitud de la actividad fue un poco diferente para las distintas cepas.

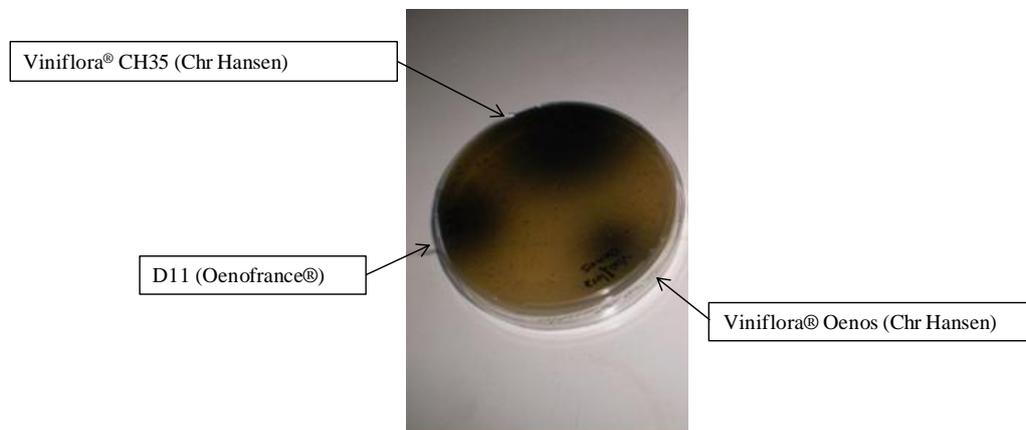


Figura 2.4: Ensayo de producción de enzima β -glucosidasa en agar esculina.

A partir de la observación de las placas se simbolizó la ausencia de actividad con el símbolo s/a, con el símbolo + la presencia, marcando la intensidad y el mayor diámetro del halo en forma numérica, donde 4+ es la máxima actividad. En forma cualitativa las actividad 4+ es muy alta, 3+ alta, 2+ media y 1+ baja. Para realizar una evaluación semicuantitativa de la actividad se tomaron los diámetros del halo y se le asignó el siguiente valor: 4+, halo mayor o igual a 23mm; 3+, halo entre 18 y 22 mm; 2+, halo entre 14 y 17 mm, 1+, halo menor de 14 mm s/a.

Utilizando ésta simbología, para las cepas comerciales estudiadas, la evaluación de la actividad en forma semicuantitativa se muestra en la Tabla 2.2.

Cepa	Actividad β -glucosidasa método EGA	
	pH 4	pH 6
LalvinVP41 [®]	+	3+
Lalvin 31 [®]	s/a	2+
Lalvin EQ54 [®]	s/a	2+
Alpha [®]	s/a	s/a
D11 (Oenofrance [®])	s/a	2+
Viniflora [®] Oenos (Chr Hansen)	s/a	2+
Viniflora [®] CH35 (Chr Hansen)	s/a	4+

Tabla 2.2: Medida de actividad de enzima β -glucosidasa en agar esculina muestras de bacterias comerciales.

De las cepas ensayadas Viniflora[®] CH35 fue la que presenta mayor actividad, le siguió en orden decreciente LalvinVP41[®] y luego las cepas D11 (Oenofrance[®]), Lalvin 31[®], Lalvin EQ54[®], Viniflora[®] Oenos (Chr Hansen).

La actividad fue significativa a pH 6, excepto para la cepa Alpha[®].

Sólo la cepa LalvinVP41[®] presentó actividad a pH 4. La determinación de la actividad β -glucosidasa por el método EGA mostró que la cepa Viniflora[®] CH35 (Chr Hansen), presentó mayor actividad que la cepa Viniflora[®] Oenos (Chr Hansen). Esta observación concuerda con el ensayo realizado por Grimaldi et al. (2000).

La cepa Alpha[®] se presentó sin actividad en las condiciones del ensayo, este resultado fue concordante con un ensayo utilizando el método de *p*-NPG realizado por Ugliano et al. (2003).

2.4.3 Comparación de los métodos de determinación de la actividad β -glucosidasa

La comparación se llevó a cabo entre la determinación de la actividad β -glucosidasa por el método EGA y la medida de la actividad β -glucosidasa utilizando *p*-NPG.

Para realizar la comparación de los métodos de determinación de la actividad β -glucosidasa, se eligió trabajar con tres cepas: dos cepas comerciales LalvinVP41[®] y Alpha[®], una cepa que presentara una actividad media y otra que presentara actividad nula y una cepa aislada P109 con actividad nula

Los valores de absorbancia que se obtuvieron una vez realizado la determinación de la actividad β -glucosidasa por el método de *p*-NPG se muestran en la Tabla 2.3.

Cepa	Absorbancia λ 400 nm
LalvinVP41 [®]	0.194
Alpha [®]	0.112
P109	0.032

Tabla 2.3: Medida de la actividad β -glucosidasa utilizando *p*-NPG para cepas comerciales y una cepa autóctona.

De las dos cepas comerciales elegidas LalvinVP41[®], fue la que presentó el mayor valor de absorbancia en la medida de la actividad β -glucosidasa utilizando *p*-NPG. Para el caso de la cepa Alpha[®], ésta no presentó prácticamente formación del halo marrón en el ensayo de agar esculina, y mostró un valor concordantemente menor de absorbancia en la medida de la actividad β -glucosidasa utilizando *p*-NPG. La cepa P109 se presentó sin actividad cuando se realizó la

determinación de la actividad β -glucosidasa por el método EGA y el valor de absorbancia fue el menor que se obtuvo para las cepas ensayadas.

A partir de estos resultados puede decirse que los resultados de determinación de la actividad β -glucosidasa por el método EGA y la medida de la actividad β -glucosidasa utilizando p-NPG, fueron coincidentes: para las cepas ensayadas un menor valor de absorbancia por el método utilizando p-NPG se correspondió con una menor formación de halo marrón.

Para las cepas comerciales Lalvin EQ54[®] y Viniflora[®] Oenos (Chr Hansen), los antecedentes de la determinación de la actividad β -glucosidasa utilizando p-NPG, indican que poseen dicha actividad (Grimaldi et al., 2000), lo que también es concordante con nuestro resultado mediante el método EGA a pH 6. En el mismo sentido para las cepas D11 (Oenofrance[®]) y Lalvin 31[®] estudios previos (Boido et al., 2002a) revelan actividad β -glucosidasa utilizando p-NPG y en la evaluación realizada en este trabajo mediante el método EGA a pH 6 también se evaluó como positiva la actividad.

La evaluación de actividad β -glucosidasa mediante el método EGA fue más simple de llevar a cabo, requirió de menos reactivos y equipamiento que el método de medida de la actividad β -glucosidasa utilizando p-NPG. Al obtener resultados comparables por uno u otro método, el método EGA resultó muy apropiado para llevar adelante la determinación de actividad β -glucosidasa en cepas autóctonas y durante la etapa de caracterización de las mismas.

2.4.4 Aislamiento, selección y caracterización de bacterias lácticas a partir de vino

Durante las vendimias de los años 2009, 2010, 2011, 2012 se realizaron los aislamientos de bacterias lácticas. Las muestras a procesar se obtuvieron a partir de las vinificaciones industriales que están cursando o han acabado de cursar FML. Se realizó el aislamiento y la determinación de la actividad β -glucosidasa mediante el método EGA. A las cepas autóctonas se les asignó un código, se realizó la observación microscópica con tinción de Gram y evaluación de la actividad β -glucosidasa.

Las bacterias autóctonas se presentaron como cocos Gram +, no móviles, formando cadenas cortas, solos o en pares, presumiblemente *Oenococcus* y también se presentaron como bastones Gram +, no móviles solos o formando cadenas más o menos largas, presumiblemente *Lactobacillus*. Mayoritariamente las bacterias lácticas autóctonas son cocos. Se aislaron 93 cepas de bacterias lácticas, a todas ellas se les realizó la determinación de la actividad β -glucosidasa por el método EGA. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.4.

Código	pH 4	pH 6	Código	pH 4	pH 6	Código	pH 4	pH 6
UYLC01	s/a	1+	UYLC38	1+	2+	UYBC01	s/a	3+
UYLC02	s/a	1+	UYLC39	1+	2+	UYBC02	3+	3+
UYLC03	s/a	1+	UYLC40	1+	1+	UYBC03	s/a	s/a
UYLC04	s/a	1+	UYLC41	1+	2+	UYBC04	s/a	1+
UYLC05	s/a	1+	UYLC42	1+	2+	UYBC05	s/a	1+
UYLC06	s/a	1+	UYLC43	1+	2+	UYBC06	s/a	1+
UYLC07	s/a	1+	UYLC44	1+	1+	UYBC07	s/a	2+
UYLC08	s/a	1+	UYLC45	1+	2+	UYBC08	s/a	2+
UYLC09	s/a	1+	UYLC46	s/a	s/a	UYBC09	s/a	1+
UYLC10	s/a	1+	UYLC47	s/a	s/a	UYBC10	s/a	3+
UYLC11	s/a	1+	UYLC48	1+	3+	UYBC11	s/a	s/a
UYLC12	s/a	1+	UYLC49	1+	3+	UYBC12	s/a	2+
UYLC13	s/a	1+	UYLC50	1+	3+	UYBC13	s/a	2+
UYLC14	s/a	1+	UYLC51	1+	3+	UYBC14	s/a	2+
UYLC15	s/a	1+	UYLC52	s/a	s/a	UYBC15	s/a	2+
UYLC16	s/a	1+	UYLC53	s/a	s/a	UYBC16	s/a	s/a
UYLC17	s/a	1+	UYLC38	1+	2+	UYBC17	s/a	2+
UYLC18	s/a	1+	UYLC39	1+	2+	UYBC18	s/a	2+
UYLC19	s/a	1+	UYLC40	1+	1+	UYBC19	s/a	2+
UYLC20	s/a	1+	UYLC41	1+	2+	UYBC20	s/a	2+
UYLC21	s/a	1+	UYLC42	1+	2+			
UYLC22	s/a	1+	UYLC43	1+	2+			
UYLC23	s/a	1+	UYLC44	1+	1+			
UYLC24	s/a	1+	UYLC45	1+	2+			
UYLC25	s/a	1+	UYLC46	s/a	s/a			
UYLC26	s/a	1+	UYLC47	s/a	s/a			
UYLC27	s/a	1+	UYLC48	1+	3+			
UYLC28	s/a	1+	UYLC49	1+	3+			
UYLC29	s/a	1+	UYLC50	1+	3+			
UYLC30	s/a	1+	UYLC51	1+	3+			
UYLC31	s/a	1+	UYLC52	s/a	s/a			
UYLC32	s/a	1+	UYLC53	s/a	s/a			
UYLC33	s/a	1+	UYLC901	s/a	s/a			
UYLC34	1+	2+	UYLC902	s/a	s/a			
UYLC35	1+	1+	UYLC903	s/a	s/a			
UYLC36	2+	4+	UYLC904	s/a	s/a			
UYLC37	3+	4+						

Tabla 2.4: Actividad β -glucosidasa por el método EGA de bacterias lácticas aisladas a partir de vinificaciones.

s/a: sin actividad, actividad baja: 1+, actividad media: 2+, actividad alta: +3, actividad muy alta: 4+

La actividad β -glucosidasa se observó mayoritariamente a pH 6 y en mucho menor medida a pH 4. Si se agrupan las cepas en función de la intensidad de la actividad, se obtuvo que a pH 6, 15 cepas de 93 no presentan actividad; mientras que a pH 4, 64 cepas de 93 no presentan actividad. El mayor nivel de actividad sólo fue alcanzado por 2 cepas a pH 6 y ninguna alcanzó el mayor nivel de actividad a pH 4. En la Tabla 2.5, se muestra el número de cepas agrupadas en función de la actividad para pH 4 y pH 6.

Actividad a pH 6	Número de cepas	Actividad a pH 4	Número de cepas
s/a	15	s/a	64
1+	40	1+	26
2+	23	2+	1
3+	11	3+	2
4+	2	4+	0

Tabla 2.5: Cantidad de cepas y nivel de actividad β -glucosidasa por el método EGA a pH 6 y 4.

Los resultados obtenidos para las bacterias lácticas autóctonas, en cuanto a un mayor desarrollo de actividad β -glucosidasa a pH 6 que a pH 4, es lo esperado teniendo en cuenta que los estudios de actividad de la enzima que han sido reportados previamente donde se ha demostrado que la actividad máxima β -glucosidasa ha sido reportada en el entorno de pH 6 (Barbagallo et al., 2004).

Gráficamente, en la Figura 2.5, se presenta el porcentaje de cepas en función de la intensidad de la actividad β -glucosidasa a pH 6. Se puede observar que el mayor porcentaje de cepas, un 44% de las mismas presentó un nivel de actividad de 1+, un 25 % presentó un nivel de actividad de 2+, el 12% presentó un nivel de 3+ de actividad y sólo el 2% presentó el máximo nivel de actividad.

En la Figura 2.6, se muestra gráficamente el porcentaje de cepas en función de la intensidad de la actividad β -glucosidasa a pH 4. En este caso el 69 % de las cepas no fue capaz de evidenciar la actividad a pH 4. El máximo valor de actividad alcanzado fue de 3+, sólo por un 2% del total de las cepas ensayadas.

En las condiciones del ensayo para el método EGA, la actividad β -glucosidasa se ha puesto de manifiesto en menos cepas a pH 4 que a pH 6, sin embargo resulta relevante que se logren diferenciar las cepas por lo cual es un método de caracterización válido y por otro lado una

actividad positiva en estas condiciones es un hecho auspicioso para que se produzca la liberación de compuestos aromáticos a partir de precursores glicosidados en condiciones de vinificación, así como lo ha sido para cepas comerciales.

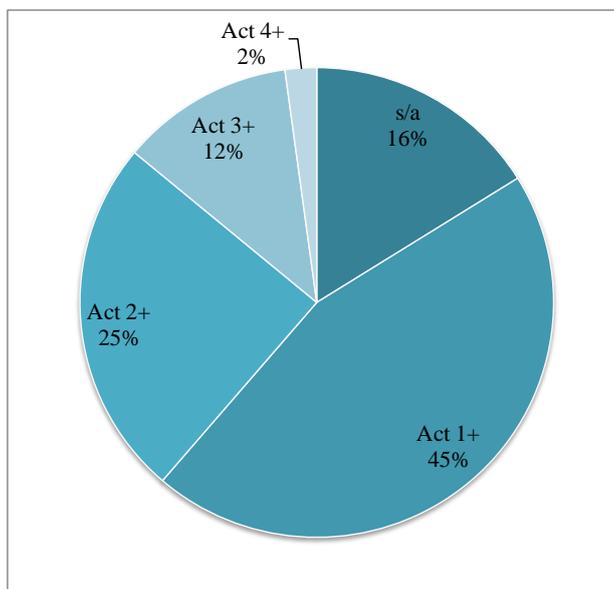


Figura 2.5: Porcentaje de cepas para cada nivel de actividad evaluada a pH 6.

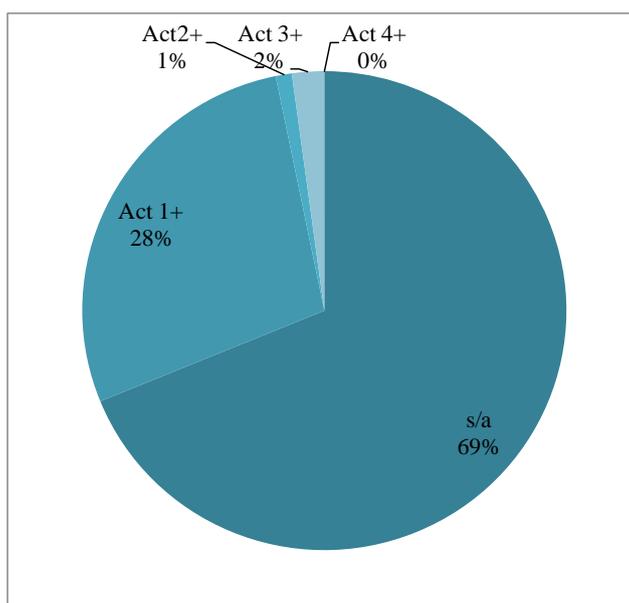


Figura 2.6: Porcentaje de cepas para cada nivel de actividad evaluada a pH 4.

Si bien las cepas autóctonas presentan bajo o nula actividad a pH 4, sí presentaron actividad a pH 6. Situación que también se ha dado para las cepas comerciales. Muchas de estas cepas comerciales han sido testeadas en cuanto a su capacidad de liberar compuestos aromáticos a partir de glicósidos (Ugliano et al., 2003; Grimaldi et al., 2000), encontrándose que han sido capaces de hacerlo, por lo que resulta promisorio que las cepas autóctonas que han presentado actividad a pH 6, también sean capaces de liberar los compuestos aromáticos.

En este sentido se seleccionarán de la lista de bacterias testeadas aquellas que sean promisorias para continuar los estudios de liberación de compuestos aromáticos a partir de sus precursores glicosidados.

2.5 Conclusiones

Se logró obtener una colección de cepas de bacterias lácticas autóctonas aisladas a partir de vinificaciones industriales locales, durante la fermentación maloláctica.

La metodología empleada para la conservación a largo plazo de las bacterias lácticas autóctonas en Skim milk (Difco®) a -70°C , permitió utilizarlas conservando la viabilidad y la pureza.

Una vez realizado el aislamiento y desarrollo de bacterias lácticas autóctonas se logró adaptar y aplicar un método rápido, sencillo y de bajo costo para la caracterización de la actividad β -glucosidasa, el método EGA.

La determinación de la actividad β -glucosidasa por el método EGA permitió obtener resultados que fueron consistentes con estudios previos y propios respecto a la valoración de una cepa con actividad β -glucosidasa positiva por el método de *p*-NPG. Por lo tanto el método EGA puede utilizarse como una herramienta sencilla y económica de determinación de actividad β -glucosidasa para la caracterización inicial en lugar del método de *p*-NPG.

La actividad β -glucosidasa de las cepas de bacterias lácticas autóctonas en el medio agar esculina a pH 6 fue más alta que a pH 4, alineándose estos resultados con lo reportado para la determinación de la actividad para la enzima aislada.

La actividad β -glucosidasa determinada por el método EGA de las cepas comerciales fue similar a la actividad β -glucosidasa de las cepas de bacterias lácticas autóctonas. Dado que las cepas comerciales ensayadas fueron utilizadas en vinificaciones industriales de variedades tintas (incluida Tannat) provocando liberación de compuestos aromáticos, fue posible suponer para la ejecución de los ensayos realizados y descritos en el capítulo 4, que las cepas autóctonas provoquen también la liberación compuestos aromáticos.

Los resultados obtenidos de la actividad β -glucosidasa por el método EGA, permitieron clasificar a las cepas en función de su potencial actividad. También permitió seleccionar aquellas cepas que hayan tenido la mayor actividad para lograr durante la fermentación maloláctica la mayor liberación de compuestos aromáticos, al realizar ensayos sobre

precursores glicosídicos del vino (particularmente en nuestro caso de Tannat seleccionada por ser la variedad emblemática del Uruguay).

Capítulo 3

3 Condiciones de fermentación de las bacterias lácticas para la liberación de compuestos aromáticos en un medio similar vino

3.1 Introducción

La liberación de compuestos aromáticos por bacterias lácticas (BAL) a partir de los precursores glicosidados en condiciones de vinificación es un hecho probado. La elevada variabilidad del comportamiento de las BAL en función de la composición del medio que las induce a preferir una vías metabólicas con respecto a otras ha sido presentado previamente (párrafo 1.6.2), así como también se ha visto las diferentes capacidades de expresar la actividad β -glucosidasa y producir liberación de diferentes compuestos aromáticos en función de la variedad de uva/vino y condiciones de vinificación (párrafo 1.6.3).

Como consecuencia de lo antedicho, para poder evaluar la capacidad de liberación de compuestos aromáticos por acción de las diferentes cepas de BAL, resulta imprescindible trabajar bajo condiciones estandarizadas y con un medio de composición química definida.

Los medios químicamente definidos similares al vino se han utilizado para estudiar el crecimiento y metabolismo de las BAL (Liu et al., 1995), así como también situaciones de inhibición de FML por productos del metabolismo de levaduras (Lonvaud-Funel et al., 1988) o los requerimientos de aminoácidos y vitaminas u otros nutrientes (Terrade et al., 2009b).

En este sentido, la interacción entre levaduras y bacterias ha sido estudiada en un medio con 68 compuestos químicos (Costello et al., 2003), y posteriormente este mismo medio ha sido tomado como base para estudiar el comportamiento de cepas de BAL comerciales frente a la liberación de glicósidos de Chardonnay (D'Incecco et al., 2004).

En otro medio usado para el estudio de la hidrólisis de precursores aromáticos por cepas comerciales de *Oenococcus oeni* se han sustituido los componentes de vitaminas, aminoácidos, factores de crecimiento y elementos traza por el agregado de extracto de levadura, se ha conservado el agregado de sales Mn^{2+} , y se incorpora el ácido acético y los glicósidos de Muscat para la evaluación (Ugliano et al., 2003).

Un medio muy similar, en el que se ha bajado el contenido de alcohol a 11% y el contenido de ácido acético a $0,2 \text{ g L}^{-1}$ se ha utilizado para estudiar el desarrollo del aroma por acción de BAL, a partir de una mezcla de precursores glicosidados extraídos de uvas de las variedades Verdejo, Chardonnay, Garnacha y Tempranillo (Hernandez-Orte et al., 2009).

Si se comparan las formulaciones de estos medios sintéticos similares al vino con respecto al medio MRS utilizado para el cultivo de BAL, las diferencias más importantes están dadas por el contenido de glucosa (2 gL^{-1} vs. 20 gL^{-1}), el contenido de etanol (con etanol vs. sin etanol), y ácido málico (con ácido málico vs. sin ácido málico) y además el agregado de los glicósidos de la variedad de uva/vino que se quiera estudiar.

El medio MRS está diseñado para lograr la mejor eficacia en la recuperación de las BAL a partir del vino, y el medio sintético similar al vino, no tan favorable desde el punto de vista nutricional, está diseñado simulando las condiciones en las cuales las bacterias deberían desarrollarse para realizar la FML en el vino.

Los glicósidos necesarios para completar la formulación del medio pueden obtenerse a partir de la uva o del vino utilizando un método separativo conveniente como la adsorción en fase sólida utilizando la resina Amberlite XAD-2 (Günata et al., 1985). En el caso de trabajar con uva es necesario etapas de molienda, mezclado, filtración antes de la extracción en fase sólida (Ibarz et al., 2006). La extracción de glicósidos se realiza utilizando resinas tipo Amberlite XAD-2 (Rohm & Haas Co) o similares empacadas en una columna.

El acondicionamiento de la columna se realiza eluyendo sucesivamente con metanol, éter etílico, agua. Luego se eluye la muestra utilizando agua (elución de agua, sales, aminoácidos), pentano-diclorometano (compuestos libres). Posteriormente se eluyen los compuestos ligados con una mezcla acetato de etilo-metanol (9:1) (Günata et al., 1985). Por último se rotaevapora, el producto obtenido se usa para la preparación del medio *símil vino*.

En el presente trabajo los glicósidos para preparar el medio artificial se obtuvieron a partir de vino tinto elaborado con uvas de la variedad Tannat (variedad en la que hemos focalizado el estudio).

3.1.1 Justificación

La posibilidad de trabajar a nivel de laboratorio directamente con vinos Tannat y no con una matriz simulada resulta una opción sencilla desde el punto de vista de la disponibilidad, pero se presentan algunos inconvenientes:

- generalmente la FML se produce a nivel industrial en forma inmediata a la FA, por lo que el sustrato principal de las bacterias lácticas no está presente.
- el vino tiene la microflora nativa de levaduras y bacterias, por lo que habría que realizar una esterilización, la misma puede alterar la composición química y no se puede predecir el impacto que tendrá sobre los compuestos glicosidados.
- una esterilización por filtración por membrana de 0.22 μm puede ser una opción. Sin embargo, esta metodología tampoco pudo ser considerada debido a que algunas sustancias que están presentes en el vino se encuentran en forma de suspensión coloidal con lo cual el proceso de filtración en laboratorio se torna una práctica muy lenta y tediosa, por lo que esta opción fue descartada.

La estrategia que se siguió, para sortear los inconvenientes antedichos, fue preparar un medio sintético al que llamaremos medio *símil vino* (MSV).

El MSV se prepara teniendo en cuenta los requerimientos nutricionales de las bacterias lácticas y la composición del vino. La ventaja radica en la posibilidad de disponer de la matriz sobre la cual desarrollar el ensayo independientemente de la época del año y la posibilidad de comparar las distintas cepas sobre la misma matriz.

Para nuestro estudio el medio a formular MSV, es similar al descrito por Ugliano et al. (2003). Los glicósidos se extrajeron a partir de muestras de vinos del año elaborados con uvas de la variedad Tannat.

Un factor determinante del desarrollo de las BAL en el MSV es el pH, por un lado se tiene que el vino posee un pH en el entorno de 3,4 - 3,8 (Flanzy, 2000) y por otro lado las BAL presentan el máximo de actividad β -glucosidasa en el entorno de pH 5-6 (Grimaldi et al., 2000). Es en este sentido que se tendrá que determinar si es factible el crecimiento de la BAL a evaluar, al pH del MSV.

Otro factor a considerar es la temperatura de incubación, la temperatura mínima no debería estar por debajo de los 16 °C (Ribéreau-Gayon et al., 2006a), y trabajando a 20 °C (Hernández-Orte et al., 2009) se logran resultados satisfactorio de FML, así como a 25 °C (Ugliano et al., 2003). En nuestro caso se trabajó a en el entorno de los 25°C.

Por otro lado también hay que tener en cuenta la atmósfera de incubación, si bien el desarrollo en condiciones de anaerobiosis es el adecuado para el crecimiento de acuerdo a los aislamientos realizados, también se prueban otros sistemas de reducción de la tensión de oxígeno durante la FML con la finalidad de disminuir el costo de los ensayos y evaluar la tolerancia al oxígeno.

Otro aspecto a considerar es el inóculo que se utiliza para llevar a cabo los ensayos de fermentación. Los preparados comerciales de bacterias liofilizadas poseen 10^{11} - 10^{12} células por gramo. En función de la dosis recomendada, la cantidad inicial de bacterias por mL ronda en el entorno de 1×10^6 una vez realizada la inoculación. En la revisión de los antecedentes de trabajos con cepas comerciales (Boido et al., 2002b), se observa el seguimiento de la recomendación de los fabricantes.

En nuestro caso contamos con BAL en cultivos en medio sólido, a partir de los que se debe generar una suspensión de las BAL tal que se conozca la cantidad de células por mL, para lo cual se utiliza la escala nefelométrica de McFarland, que correlaciona el nivel de turbidez con la cantidad de células por mL (Sutton, 2011; Forbes et al., 2009). Posteriormente se inocularán las cepas autóctonas para lograr al mismo nivel de concentración que cuando se utilizan las cepas comerciales.

Un aspecto importante a evaluar en esta etapa, además de la capacidad de crecimiento, es el consumo de ácido málico, razón de ser de la FML en el proceso de vinificación. Una disminución de la concentración de ácido málico a niveles por debajo de $0,1$ - $0,2$ g L⁻¹, puede considerarse una FML concluida (Ribéreau-Gayon et al., 2006a; Köning, 2009). Para determinar el ácido málico han sido descriptos diferentes métodos: cromatografía en papel, cromatografía en capa fina, métodos enzimáticos o por HPLC (Jacobson, 2006), entre otros. Los dos primeros tienen menor sensibilidad pero son rápidos y de bajo costo, el método enzimático tiene la posibilidad de determinar por un lado el L-málico y D-málico y el método por HPLC posee una mayor sensibilidad pero el instrumental es más costoso. Por razones de disponibilidad en este trabajo se realiza el seguimiento de la FML por cromatografía en capa fina (Boido et al., 1999).

3.2 Objetivos

Determinación de las condiciones de fermentación de las bacterias lácticas, en un medio *símil vino*, que permita: su desarrollo, la completitud de la fermentación maloláctica, y la evaluación de la capacidad de liberación de compuestos aromáticos a partir de precursores glicosidados.

Caracterización de los glicósidos de Tannat a utilizar en la preparación del medio *símil vino*.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Cepas e inóculo de siembra

Las cepas a estudiar en esta fase fueron aquellas provenientes de los aislamientos realizados a partir de vinificaciones industriales que fueron conservadas en medio Skim milk (Difco®) y a -70°C . También se realizaron ensayos con cepas comerciales conservadas de la misma forma. A partir del vial de conservación se sembró en MRS, se incubó durante 5 días en anaerobiosis a 25°C . Posteriormente a partir de esas placas se realizó un nuevo repique en agar MRS y se incubó en anaerobiosis a 25°C , se siguió el crecimiento hasta observar un correcto desarrollo de las colonias al cabo de aproximadamente 7 días.

A partir de cultivo puro, crecidas en MRS, se realizó la suspensión en tubos conteniendo agua estéril hasta obtener una turbidez en la escala de McFarland de 0.5, que corresponde a una concentración de 1.5×10^8 células por mL.

En forma inmediata esta suspensión se usó para la siembra sobre el *símil vino*: al volumen del MSV, que se repartió en tubos Falcon®, se le agregó el volumen adecuado de la suspensión de bacterias para tener una concentración resultante de 1×10^6 microorganismos por mL (para 50 mL de MSV, se agrega 350 μL del inóculo).

En la Figura 3.1 se muestran los pasos a seguir para realizar la siembra de la cepa en el MSV.

En forma paralela a la siembra del inóculo en el MSV se realizó la siembra en medio sólido MRS con la finalidad de corroborar viabilidad del inóculo (crecimiento en la estría) y pureza (igual morfología de colonias crecidas).

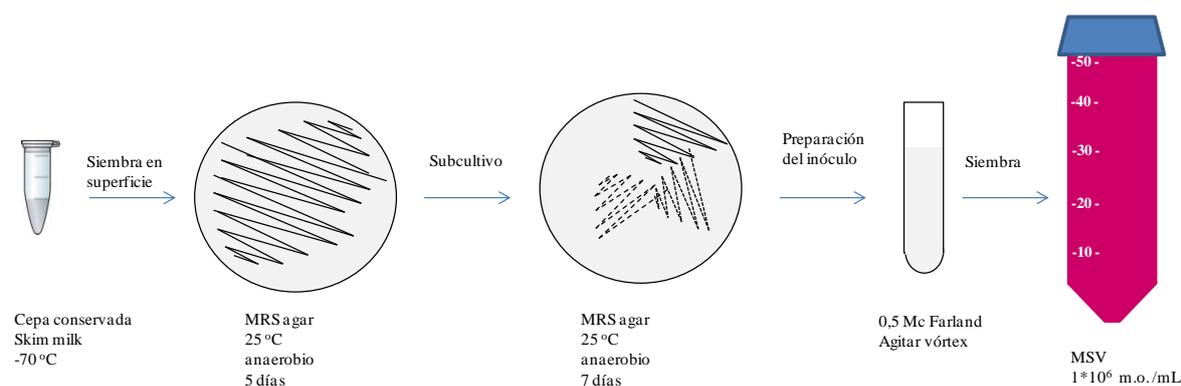


Figura 3.1: Pasos para realizar la siembra de la cepa en el MSV

3.3.2 Medio *símil vino*

El medio *símil vino* (MSV) que se preparó posee la siguiente composición: ácido tartárico 5 g L⁻¹, ácido L-málico 3,5 g L⁻¹, ácido acético 0,6 g L⁻¹, D-glucosa 2,0 g L⁻¹, D-fructosa 2,0 g L⁻¹, cloruro de sodio 0,2 g L⁻¹, sulfato de amonio 1 g L⁻¹, fosfato ácido de potasio 2 g L⁻¹, sulfato de magnesio heptahidratado 0,2 g L⁻¹, sulfato de manganeso 0,05 g L⁻¹, extracto de levadura 2 g L⁻¹, etanol 11% , glicósidos extraídos a partir de 1 litro de vino para 1 litro de medio y ajuste de pH con hidróxido de potasio.

Los constituyentes del MSV, excepto el etanol y el extracto de glicósidos, se disolvieron en agua desionizada, se ajustó el pH y se esterizaron en autoclave (121°, durante 15 minutos).

El extracto de glicósidos se disolvió en la cantidad de etanol que lleva el medio, se filtró por 0,2 μm y se incorporó mediante técnica aséptica al resto de los constituyentes ya esterilizados.

La preparación del MSV sin glicósidos, se llevó a cabo mezclando todos los componentes (excepto el etanol), se ajustó el pH 3,5 o 5,5 con hidróxido de potasio al 10%, se realizó la esterilización, posteriormente el agregado de alcohol, y por último el reparto mediante técnica aséptica en los tubos con tapa previamente esterilizados.

Los glicósidos se obtuvieron a partir de vino tinto del año elaborado de manera tradicional con uvas de la variedad Tannat. En una columna de vidrio de aproximadamente 50 cm de largo por 2 cm de diámetro, se colocaron 50 g de resina Serdolit PAD II Serva[®], tamaño de partícula 0,1 – 0,2 mm, suspendida en metanol; el acondicionamiento de la columna se realizó eluyendo sucesivamente 100 mL de metanol, 100 mL de éter etílico, 50 mL de agua. Luego se pasaron por la columna 500 mL de vino Tannat, y posteriormente unos 200 mL de agua

(elución de agua, sales, aminoácidos), posteriormente se pasaron 200 mL de pentano-diclorometano en relación 2:1 (eluyen los compuestos libres).

Posteriormente se eluyeron los compuestos ligados con 200 mL de una mezcla acetato de etilo-metanol (9:1) y se rotaevaporó el solvente utilizando el rotaevaporador Büchi R-114[®] y el baño de agua a 40°C Büchi B-480[®].

Por último la columna se acondicionó para una nueva extracción haciendo pasar 150 mL de metanol.

El extracto se caracterizó realizando el análisis de los componentes ligados (Günata et al., 1985; Boido et al., 2003) y según el procedimiento de extracción de compuestos libres y ligados descrito en el párrafo 4.3.1 y se realizó la identificación de los compuestos aromáticos según lo descrito en el párrafo 4.3.2.

El producto de la rotaevaporación se usó en la preparación de *símil vino* y constituyó el extracto de glicósidos; la cantidad agregada al volumen del *símil vino* es igual a la cantidad de *vino* que le dio origen.

Durante el trabajo experimental se realizaron en varias oportunidades extracciones con la finalidad de caracterizar los glicósidos del extracto y para obtener una cantidad suficiente para la preparación del medio *símil vino* para todos los ensayos con las diferentes cepas de bacterias lácticas con las que se trabaja.

3.3.3 Evaluación de BAL en el MSV: aptitud de crecimiento y realización de la fermentación maloláctica.

Para evaluar la aptitud de realización de la FML de las BAL en el MSV, se llevó adelante el monitoreo del consumo de ácido málico. Para ello, mediante cromatografía en capa fina, se verificó ausencia de ácido málico en la muestra.

Para realizar la cromatografía en capa fina se utilizó: fase estacionaria cromatofolios de sílica gel POLYGRAM, MACHEREY-NAGEL[®] espesor 0,25mm; fase móvil: acetato de n-butilo - ácido acético (2:1); revelador: solución de bromofenol al 1% en etanol y estándares de ácido málico 3 g L⁻¹ y de ácido láctico de 3 g L⁻¹, volumen de siembra 5 µL.

En estas condiciones cuando la mancha no se visualiza, la concentración de ácido málico en la muestra está por debajo de 0,2 g L⁻¹ y se considera como ausencia de ácido málico. Esta correlación fue realizada mediante determinación enzimática de ácido málico según método OIV-MA AS313-11 (OIV, 2011).

Con la finalidad de poder realizar una comparación entre cepas en cuanto al consumo de ácido málico, al realizar la cromatografía en capa fina se asignó un valor numérico en función de la intensidad de la mancha que corresponde a la presencia de ácido málico y ácido láctico; en caso de ausencia se le asignó valor 0, igual intensidad que el estándar se le asigna 1, los valores intermedios surgen de la intensidad relativa respecto al estándar correspondiente como se muestra en la Tabla 2.1.

Intensidad de la mancha de ácido málico en la muestra relativa a la del estándar.	Valor del atributo presencia de ácido málico
I	1
$\frac{3}{4}$ I	0.75
$\frac{1}{2}$ I	0.5
$\frac{1}{4}$ I	0.25
0 I	0

Tabla 3.1: Escala para comparar presencia o ausencia de ácido málico y láctico al realizar la cromatografía en capa fina

A la turbidez determinada visualmente se le asignó un valor numérico con la finalidad de presentar los resultados a lo largo de los días de fermentación y por otro lado correlacionar el mayor valor numérico asignado a la turbidez, con un mayor crecimiento poblacional de las BAL en el MSV (Tabla 3.2).

Turbidez	
Extremadamente alta	5
Muy alta	4
Alta	3
Moderada	2
Leve	1
Imperceptible	0

Tabla 3.2: Escala numérica utilizada para la evaluación de la presencia de turbidez en el MSV.

Por otro lado también se observó la formación del gas en el tubo como evidencia de crecimiento poblacional, indicando con 1 presencia de gas y con 0 ausencia.

3.3.4 Condiciones de crecimiento en el MSV

Las fermentaciones se llevaron a cabo en tubos Falcón™, autoclavables y aptos para centrifugación a más de 5000 rpm.

La temperatura de incubación se estableció en 25 °C, utilizando estufa de incubación de laboratorio.

En la figura Figura 3.2 se muestran esquemáticamente los distintos dispositivos usados para la incubación dentro de la estufa.

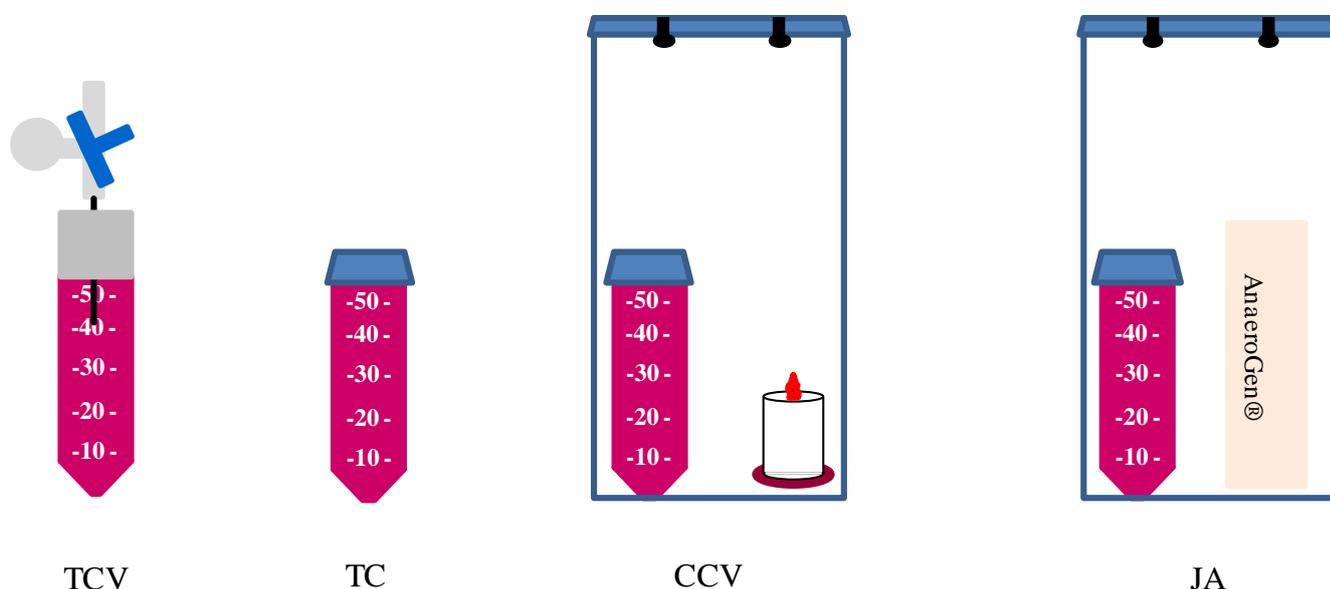


Figura 3.2: Esquema de las diferentes disposiciones de atmósfera de incubación.

La atmósfera de incubación en condiciones de baja tensión de oxígeno se estableció trabajando con tubos con válvula (TCV), tubo cerrado (TC), cámara con vela (CCV) o con jarra de anaerobiosis con la lámina Oxoid AnaeroGen® (JA).

3.4 Resultados y discusión

3.4.1 Condiciones de fermentación

Ensayo 1

Se realizó el ensayo para comprobar la recuperación de las cepas LalvinVP41® y LalvinEQ54®, desde la conservación a -70°C y su potencial desarrollo en el medio simulado.

Se inocularon en el MSV, a pH 3,5 y en TCV. En forma paralela se realizó un ensayo control sin cepa, en el mismo MSV y en las mismas condiciones de incubación. Por otro lado también se sembró el inóculo en medio MRS, se incubó a 25°C, en anaerobiosis.

La recuperación desde el medio de conservación de las cepas LalvinVP41[®] y Lalvin EQ54[®] fue exitosa, lográndose el crecimiento en el medio MRS. La viabilidad del inóculo fue corroborada, de igual manera que la pureza del cultivo.

Se realizó el seguimiento de la fermentación en el MSV, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.3 .

Al final del período de incubación 3/11/2014 al 21/11/2014, sólo se tuvo evidencia de crecimiento poblacional en una de los tubos correspondientes a la cepa LalvinVP41[®].

Para ninguna de las cepas se obtuvo desarrollo de la FML, lo que fue confirmado por los resultados de la cromatografía en capa fina para la presencia de ácido málico y ácido láctico, dónde se evidenció ausencia ácido láctico.

Si bien se partió de un inóculo viable en el momento de la siembra en el MSV, las condiciones de fermentación en MSV en TCV a pH 3,5, no fueron adecuadas para el desarrollo de las cepas LalvinVP41[®] y Lalvin EQ54[®], y por lo tanto no se realizó la FML.

MSV, TCV, pH 3,5						
Cepa	Recuperación en MRS	Repeticiones	Turbidez	Gas	Málico	Láctico
Sin Cepa	n/a	1	0	0	1	0
	n/a	2	0	0	1	0
	n/a	3	0	0	1	0
LalvinVP41 [®]	Si	1	2	0	1	0
	Si	2	0	0	1	0
	Si	3	0	0	1	0
Lalvin EQ54 [®]	Si	1	0	0	1	0
	Si	2	0	0	1	0
	Si	3	0	0	1	0

Tabla 3.3: Ensayo1- Fermentación en MSV, en TCV a pH 3,5.

Ensayo 2

El ensayo 2, fue similar al anterior pero se suprimieron del medio los glicósidos con la finalidad de determinar si podría su presencia ser una causa asignable de no crecimiento en el medio.

Al trabajar con las cepas comerciales LalvinVP41[®] y Lalvin EQ54[®], en el MSV sin glicósidos, a pH 3,5 y en atmósfera TCV no se obtuvo aumento poblacional para ninguna de las dos cepas en los triplicados realizados.

En la Tabla 3.4 se muestran los resultados obtenidos al final del período de incubación (21/07/15 al 7/08/15).

MSV sin glicósidos, TCV, pH 3,5.						
Cepa	Recuperación en MRS	Repeticiones	Turbidez	Gas	Málico	Láctico
Sin Cepa	n/a	1	0	0	1	0
LalvinVP41[®]	Si	1	0	0	1	0
	Si	2	0	0	1	0
	Si	3	0	0	1	0
Lalvin EQ54[®]	Si	1	0	0	1	0
	Si	2	0	0	1	0
	Si	3	0	0	1	0

Tabla 3.4: Ensayo 2- Fermentación en MSV sin glicósidos en TCV a pH 3,5.

Las condiciones de fermentación en MSV sin glicósidos en TCV a pH 3,5, no fueron adecuadas para el desarrollo de las cepas LalvinVP41[®] y Lalvin EQ54[®] durante el período de incubación. El extracto de glicósidos no fue el responsable de la incapacidad del desarrollo de las bacterias. Se sospecha que el sistema de TCV, que permite el intercambio gaseoso con el exterior puede haber sido la causa de que el desarrollo poblacional de las bacterias no se dio adecuadamente en el período de incubación.

La viabilidad del inóculo fue corroborada, de igual manera que la pureza del cultivo con la siembra en simultáneo en MRS, por lo que se descarta la posibilidad de que el no crecimiento se debió a una falta de viabilidad del inóculo.

Ensayo 3

El tercer ensayo se realizó con dos cepas comerciales LalvinVP41[®] y Lalvin EQ54[®] y dos cepas autóctonas UYLC36 y UYLC37, en MSV sin glicósidos y en TC y en CCV a pH 3,5 y 5,5. Al final del período de incubación (29/07/2015 al 11/08/2015) se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 3.5.

MSV sin glicósidos, TC y CCV, pH 3,5 y 5,5						
Cepa	pH	Sistema	Turbidez	Gas	Málico	Láctico
Sin Cepa	3.5	CCV	0	0	1	0
	3.5	TC	0	0	1	0
	5.5	CCV	0	0	1	0
	5.5	TC	0	0	1	0
LalvinVP41[®]	3.5	CCV	4	0	1	0
	3.5	TC	5	0	1	0
	5.5	CCV	5	0	0	1
	5.5	TC	5	0	0	1
Lalvin EQ54[®]	3.5	CCV	4	0	0,75	0,25
	3.5	TC	4	0	0	1
	5.5	CCV	5	0	0,5	0,5
	5.5	TC	5	0	0,5	0,5
UY LC 36	3.5	CCV	3	0	0	1
	3.5	TC	3	0	0	1
	5.5	CCV	3	0	0	1
	5.5	TC	3	0	0,5	0,5
UY LC 37	3.5	CCV	3	1	0	1
	3.5	TC	3	0	0	1
	5.5	CCV	3	0	0,5	0,5
	5.5	TC	3	0	0,5	0,5

Tabla 3.5: Ensayo 3-Fermentación en MSV sin glicósidos, TC y CCV a pH 3,5 y 5,5.

En las condiciones del ensayo 3, tanto el sistema de TC como el de CCV permitieron el aumento poblacional, condiciones de menor tensión de oxígeno favorecieron el crecimiento, independientemente del pH durante el período de incubación.

El efecto del pH del MSV en cuanto al progreso de la FML, fue variable por el tipo de cepa: para el caso de las cepas comerciales se dio un mayor avance a pH 5,5 que a 3,5 durante el tiempo de incubación. Para el caso de las cepas autóctonas tanto a pH 3,5 como a pH 5,5 se logró un avance significativo de la FML (entendiéndose como avance la capacidad de disminuir el contenido de ácido málico con el consiguiente aumento de ácido láctico). Para las cepas autóctonas, en el MSV a pH 3,5 se logró completitud de la FML en el tiempo de incubación.

Por otro lado es importante destacar que para las cepas autóctonas se logró su recuperación desde el medio de conservación a - 70°C, hecho que es corroborado por primera vez para los aislamientos realizados en nuestro laboratorio.

Para los inóculos usados en esta oportunidad de las cepas comerciales LalvinVP41[®] y Lalvin EQ54[®] y de las cepas autóctonas UYLC36 y UYLC37, también se corrobora viabilidad y pureza en medio MRS.

El MSV no inoculado (sin cepa), no presentó evidencia de crecimiento, por lo que se valida el procedimiento de siembra bajo técnica aséptica.

Ensayo 4

En este ensayo, se trabajó con 3 cepas comerciales LalvinVP41[®], Lalvin EQ54[®] y Alpha y 9 cepas autóctonas UYLC34, UYLC35, UYLC36, UYLC37, UYLC41, UYLC901, UYLC902, UYLC903, UYLC904.

El sistema de incubación fue JA y a pH 3,5 y pH 5,5. En estas condiciones los resultados obtenidos al final del período de incubación se muestran en la Tabla 3.6, con * se marca el período de incubación del 29/07/2015 al 20/08/2015 y con** el período de incubación del 03/09/2015 al 17/09/2015.

MSV sin glicósidos, JA, pH 3,5 y 5,5					
Cepa	Recuperación en MRS	MSV con ajuste de pH	Turbidez	Málico	Láctico
Sin Cepa* y **	n/a	3.5	0	1	0
	n/a	5.5	0	1	0
LalvinVP41®*	si	3.5	5	0	1
	si	5.5	5	0	1
Lalvin EQ54®*	si	3.5	4	0	1
	si	5.5	4	0	1
Alpha**	si	3.5	4	0	1
	si	5.5	4	0	1
UY LC 34**	si	3.5	4	0	1
	si	5.5	4	0	1
UY LC 35**	si	3.5	4	0	1
	si	5.5	4	0	1
UY LC 36*	si	3.5	5	0	1
	si	5.5	5	0	1
UY LC 37*	si	3.5	5	0	1
	si	5.5	5	0	1
UY LC 41**	si	3.5	5	0	1
	si	5.5	5	0	1
UY LC 901**	si	3.5	5	0	1
	si	5.5	5	0	1
UY LC 902	no	3.5	0	1	0
	no	5.5	0	1	0
UY LC 903**	si	3.5	5	0	1
	si	5.5	5	0	1
UY LC 904**	si	3.5	5	0	1
	si	5.5	5	0	1

Tabla 3.6: Ensayo 4 - Fermentación en MSV sin glicósidos, en JA, a pH 3,5 y pH 5,5.

De las 9 cepas autóctonas que se mantuvieron conservadas a -70°C , 8 pudieron ser recuperadas UYLC34, UYLC35, UYLC36, UYLC37, UYLC41, UYLC901, UYLC903, UYLC904, mientras que la cepa UYLC902 no pudo ser recuperada.

Las condiciones de anaerobiosis obtenidos en la cámara, utilizando el generados AnaeroGen[®], permitieron el crecimiento en el MSV sin glicósidos y en el tiempo de incubación se logró completitud de la FML.

Para todos los inóculos usados en este ensayo 4, también se corroboró viabilidad y pureza en medio MRS.

El MSV no inoculado (sin cepa), no presentó evidencia de crecimiento, por lo que se valida el procedimiento de siembra bajo técnica aséptica.

Ensayo 5

En función de los resultados precedentes las condiciones de fermentación que se tomaron como adecuadas para las etapas siguientes fueron fijadas en: MSV a pH 3,5 y jarra de anaerobiosis (JA).

Para seleccionar las cepas para trabajar en la próxima etapa cuya finalidad fue extraer y determinar si ocurre liberación de agliconas a partir de los glicósidos, se tuvieron en cuenta la capacidad de completar la FML y los datos previos de actividad β -glucosidasa determinada por el método EGA.

Para todos los casos se realizó la incubación del MSV, en las mismas condiciones sin cepa (testigo) con la finalidad de referenciar el aumento o disminución de compuestos determinados respecto al testigo.

Las cepas seleccionadas para evaluar y comparar la actividad β -glucosidasa en función de la variación del tipo y concentración de los compuestos aromáticos presentes luego de la FML fueron: UYLC34, UYLC35, UYLC36 y UYLC37.

Estas cepas seleccionadas fueron recuperadas sin inconvenientes desde el medio de conservación a -70°C , presentaron un adecuado desempeño en cuanto a la capacidad de llevar adelante la FML hasta completitud en el MSV sin glicósidos.

En el medio EGA, las cepas UYLC36 y UYLC37 mostraron una actividad β -glucosidasa alta a pH 6 y baja y media respectivamente a pH 4, la cepa UYLC34 una actividad media a pH 6 y baja a pH 4, mientras que la cepa UYLC35 una actividad baja a pH 6 y a pH 4.

En la Tabla 3.7 se muestran los resultados obtenidos al final del período de incubación (2 semanas) para las cepas UYLC34, UYLC35, UYLC36 y UYLC37.

MSV, JA, pH 3,5.					
Cepa	Repetición	Turbidez	Málico	Láctico	Determinación de compuestos libres y ligados
Sin Cepa Testigo 1	1	0	1	0	Si
	2	0	1	0	Si
UY LC 34	1	5	0	1	Si
	2	5	0	1	Si
	3	5	0	1	Si
UY LC 35	1	5	0	1	Si
	2	5	0	1	Si
	3	5	0	1	Si
Sin Cepa Testigo 2	1	0	1	0	Si
	2	0	1	0	Si
UY LC 36	1	5	0	1	Si
	2	5	0	1	Si
	3	5	0	1	Si
UY LC 37	1	5	0	1	Si
	2	5	0	1	Si
	3	5	0	1	Si

Tabla 3.7: Fermentación en MSV de las cuatro cepas seleccionadas.

Las condiciones de anaerobiosis obtenidas en la cámara, utilizando el generador AnaeroGen[®] permitieron el crecimiento en el MSV y en el tiempo de incubación se logró completitud de la FML.

Para todos los inóculos de las cepas UYLC34, UYLC35, UYLC36 y UYLC37 se corroboró viabilidad y pureza en medio MRS.

El MSV no inoculado (sin cepa), no presentó evidencia de crecimiento, ni consumo de ácido málico ni producción de ácido láctico.

A partir de estos ensayos de fermentación con las cepas UYLC34, UYLC35, UYLC36 y UYLC37 se prosiguió para evaluar y comparar la actividad β -glucosidasa en función de la

variación del tipo y concentración de los compuestos aromáticos como se presentará en el Capítulo 4 y la evaluación de color como se presentará en Capítulo 5.

3.4.2 Caracterización de los glicósidos de Tannat

En nuestro caso se obtuvo el extracto siguiendo el esquema resumido en la Figura 3.3. Posteriormente se analizaron los componentes ligados (glicosidados) según el procedimiento de extracción de compuestos libres y ligados descrito en el párrafo 4.3.1 y se realizó la identificación de los compuestos aromáticos según lo descrito en el párrafo 4.3.2.

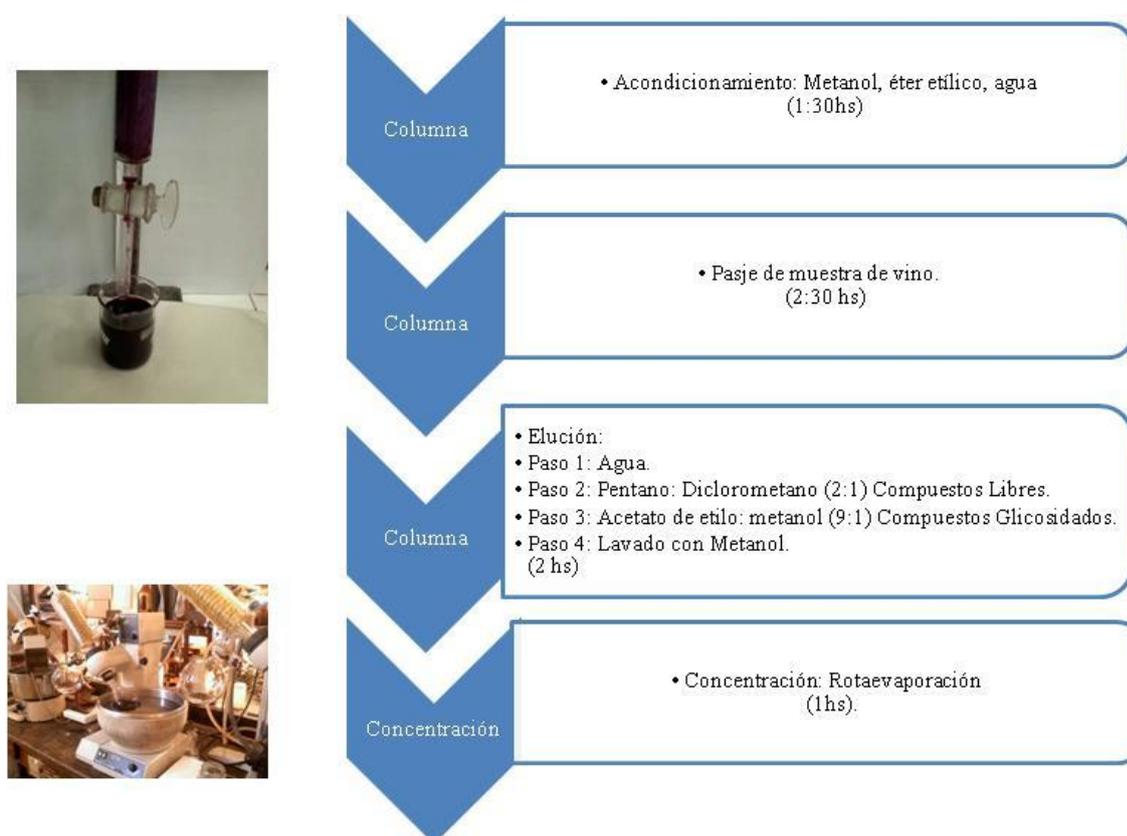


Figura 3.3: Esquema de trabajo para la extracción de glicósidos para preparar el MSV.

Una vez realizado el análisis por GC-MS del extracto de la fracción ligada se identificaron 22 compuestos, dentro de los cuales agrupados por tipo corresponden a:

- Ésteres: succinato de etilo, succinato ácido de etilo,
- Alcoholes: 3 metil-1-butanol, 2 metil-1-propanol;
- Terpenos: Oxido A (óxido *trans*-furánico del linalol), Oxido C (óxido *trans*-piránico del linalol), Oxido D (óxido *cis*-piránico del linalol), α -terpineol, nerol y geraniol
- Fenólicos (derivados del ácido shiquímico): alcohol bencílico y alcohol β -feniletílico
- Norisoprenoides: 3-hidroxi- β -damascona, 3-oxo- α -ionol, 4-oxo- β -ionol, 3-oxo-7,8-dihidro- α -ionol, 4-oxo-7,8-dihidro- β -ionol, y vomifoliol.

-Ácidos: 3-metilbutanoico, hexanoico, octanoico y decanoico.

En la Figura 3.4 se muestra el cromatograma (en dos partes) que se obtuvo una vez realizado el análisis por GC-MS del extracto. La asignación de identidad a cada pico se muestra en la Tabla 3.8.

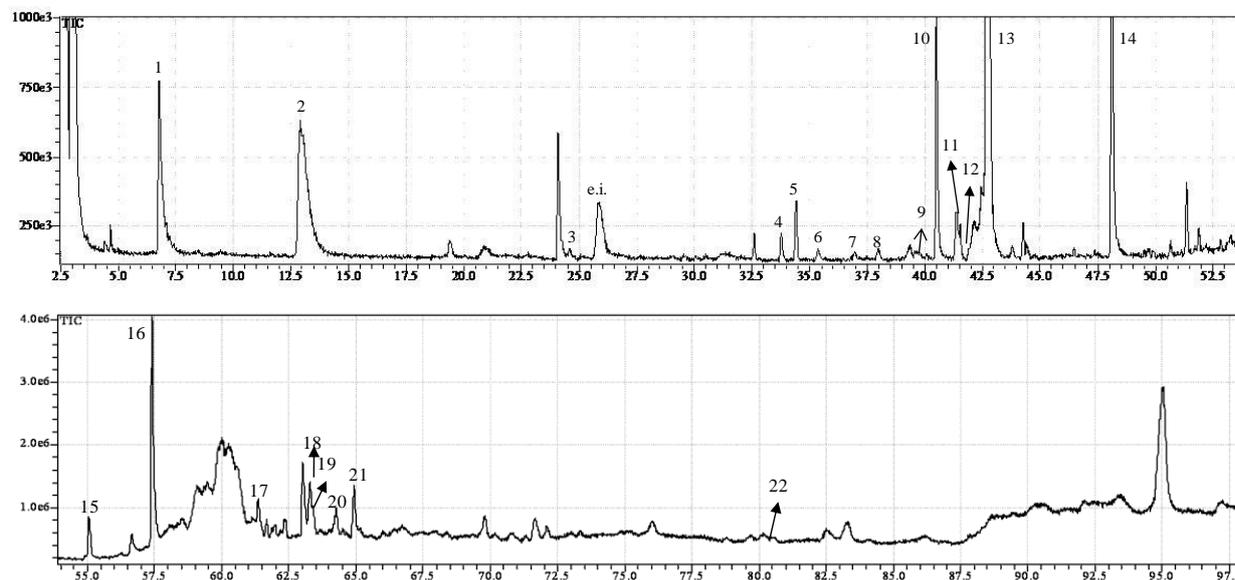


Figura 3.4: Cromatograma de los glicósidos del extracto obtenido de vino Tannat.

Pico	Compuesto	Pico	Compuesto
1	2-metil-1-propanol (alcohol isobutílico)	12	geraniol
2	3-metil-1-butanol (alcohol isoamílico)	13	alcohol β -feniletílico
3	óxido A (óxido <i>trans</i> -furánico del linalol)	14	ácido octanoico
4	ácido 3-metilbutanoico	15	ácido decanoico
5	succinato de dietilo	16	succinato ácido de etilo
6	α -terpineol	17	3-hidroxi- β -damascona
7	óxido C (óxido <i>trans</i> -piránico del linalol)	18	3-oxo- α -ionol
8	óxido D (óxido <i>cis</i> -piránico del linalol)	19	4-oxo- β -ionol
9	nerol	20	4-oxo-7,8-dihidro- β -ionol
10	ácido hexanoico	21	3-oxo-7,8-dihidro- α -ionol
11	alcohol bencílico	22	vomifoliol

Tabla 3.8: Principales agliconas identificadas de acuerdo al cromatograma de los glicósidos extraídos de vino Tannat.

En la preparación del MSV se utilizaron los glicósidos obtenidos a partir de vino Tannat. La composición cuali-cuantitativa de este extracto fue orientativa de lo que posteriormente se

obtiene una vez que ha transcurrido la fermentación en el MSV con las BAL seleccionadas. La discusión por tipo de compuestos y su relevancia con respecto al aporte al perfil aromático del vino es tratada en el capítulo 4

3.5 Conclusiones

Por primera vez se logró en nuestro laboratorio establecer las condiciones para recuperar las cepas autóctonas a partir de vinificaciones desde su medio de conservación, conservando la pureza y viabilidad. Las condiciones de conservación obtenidas, Skim milk (Difco®) a -70°C, permitieron conservar las cepas comerciales y las cepas autóctonas.

El MSV no inoculado (sin cepa), no presentó evidencia de crecimiento, por lo que se validó el procedimiento de trabajo bajo técnica aséptica.

El crecimiento de las cepas de BAL, tanto comerciales como autóctonas se logró en las condiciones de anaerobiosis obtenidos en la cámara, utilizando el generador AnaeroGen®, a una temperatura de 25° C en el MSV formulado con los glicósidos de Tannat y a pH 3,5. En el tiempo de incubación estudiado (2 semanas), y en esas condiciones se logra la completitud de la FML.

La caracterización del extracto de glicósidos de Tannat utilizado para preparar el MSV mostró 22 compuestos que potencialmente pueden sufrir cambios en su concentración al ser liberados a partir de sus formas glicosidadas o transformados durante la FML. Por lo tanto, este MSV posibilita la evaluación de la actividad β -glicosidasa de las BAL durante la FML a través de la cuantificación de los compuestos liberados por comparación con un testigo sin cepa y en las mismas condiciones de incubación.

En resumen, se concluye que la formulación del MSV y las condiciones de fermentación establecidas son adecuadas para el propósito planteado en este trabajo.

Capítulo 4

4 Liberación de compuestos aromáticos a partir de precursores glicosidados de vinos Tannat con cepas de bacterias lácticas autóctonas

4.1 Introducción

4.1.1 Composición aromática de los vinos Tannat

El cultivo de *Vitis vinifera* cv. Tannat, se adapta muy bien a las condiciones climatológicas y edafológicas del Uruguay y los vinos producidos con estas uvas se han posicionado muy bien en el mercado interno y también han marcado presencia en el mercado externo.

La caracterización de los compuestos que conforman el aroma del vino Tannat, es parte del trabajo multidisciplinario que se ha desarrollado en los últimos años en la investigación, para aportar en el conocimiento, la calidad y la mejora del producto (Carrau et al., 2011).

En el caso del estudio de la composición aromática de los vinos Tannat, son relevantes aquellos compuestos que se encuentran como precursores glicosidados y que pueden ser liberados, así como los que se generan durante la etapa de fermentación y de conservación (Boido, 2002b). Desde el punto de vista sensorial se describe al vino elaborado con uvas Tannat con notas a frutos del bosque, trufas, mermelada, frambuesa, membrillo. Una vez que la FML ha transcurrido son percibidos en menor intensidad aromas a vegetales frescos, pimiento, florales, y en mayor intensidad notas lácticas, a manteca (Gámbaro et al., 2001; Gámbaro et al., 2003).

Los volátiles libres, así como aquellos liberados de las formas glicosídicamente unidas por hidrólisis enzimática, han sido analizados para caracterizar los vinos jóvenes de Tannat (Boido et al., 2003).

Al estudiar el contenido de los compuestos encontrados en forma libre, los compuestos mayoritarios agrupados por tipo fueron:

-ésteres, lactato de etilo, succinato de etilo y 4 hidroxibutirato de etilo;

-alcoholes, 2 y 3 metil-1-butanol, 2-feniletanol, 2 metil-propanol;

-compuestos C6, 1-hexanol, *cis*-3-hexen-1-ol y *trans*-2-hexen-1-ol;

-monoterpenos, limoneno, geraniol;

-otros componentes, como los fenol volátil, 4-vinilfenol, 4-vinilguaiacol; γ -butirolactona.

Los glicoconjugados de C₁₃-norisoprenoides, monoterpenos, derivados del ácido shikímico y compuestos de C₆ están presentes en el vino Tannat.

Para el caso de los vinos Tannat, los monoterpenos que derivan de la fracción glicosidada y se encuentran en mayor proporción son los isómeros del 8-hidroxilinalol, también están presentes los óxidos *cis*- y *trans*- furánicos y piránicos del linalol, nerol y geraniol.

Los C₁₃-norisoprenoides que se liberaron en concentraciones del mismo orden han sido los compuestos 3-hidroxi- β -damascona, 3-oxo- α -ionol, 4-oxo- β -ionol, 3-oxo-7,8-dihidro- α -ionol, 4-oxo-7,8-dihidro- β -ionol, y vomifoliol.

Los compuestos derivados del ácido shikímico han sido reportados como pertenecientes a formas glicosidadas en el vino Tannat, siendo tirosol, alcohol bencílico y alcohol β -feniletílico los principales. Derivados glicosidados de compuestos C₆ también fueron encontrados, como 1-hexanol, *cis*-3-hexen-1-ol, *trans*-2-hexen-1-ol y *trans*-3-hexen-1-ol. (Boido et al., 2003; Boido, 2002b).

Las agliconas volátiles provenientes de la uva Tannat han sido objeto de estudio, coincidentemente con los trabajos realizados en vino se ha encontrado la presencia de monoterpenoles entre los que se destacan las formas furánicas y piránicas de los óxidos del linalol, el α -terpineol, nerol y geraniol; C₁₃-norisoprenoides como 3-hidroxi- β -damascona, 3-oxo- α -ionol, 4-oxo- β -ionol, 4-oxo-7,8-dihidro- β -ionol, 3-oxo-7,8-dihidro- α -ionol y vomifoliol. Entre los compuestos derivados del shikímico, las mayores concentraciones corresponden al alcohol bencílico y al alcohol β -feniletílico (Fariña et al., 2004).

En trabajos realizados sobre uva, los compuestos glicosidados identificados coinciden con los hallados en trabajos anteriores y se suman como novedosos el guaiacol y 2,6-dimetoxifenol (Boido et al., 2013).

En trabajos más recientes realizados sobre vinos Tannat adquiridos en el comercio, se determina el contenido de compuestos libres. Se identifican los reportados con anterioridad así como también nuevos compuestos: 2-metil-2-butanol, 1-propanol, butirato de etilo, 4-etilguaiacol, 4-etilfenol, alcohol homovanílico, zingerol, vitispirano, TDN, 3- hidroxi-7,8-dihidro- β -ionol, 3- hidroxi-7,8-dihidro- β -ionol, furfural, 2-furanometanol, whisky lactona (Fariña et al., 2015).

En la Tabla 4.1 se muestran, los diferentes compuestos identificados en la fracción libre y en la fracción glicosidada de uvas y vinos Tannat, a partir de los trabajos comentados con anterioridad. Esta lista se utiliza como base para la identificación de los compuestos en el presente trabajo donde se evalúa la actividad β -glicosidasa de las cepas de BAL durante la fermentación de un MSV.

Grupo	ILR	Compuesto	Fracción libre	Fracción glicosidada
Terpenos	1449	óxido <i>trans</i> -furánico del linalol (óxido A)	e	a, b, c, d
	1474	óxido <i>cis</i> -furánico del linalol (óxido B)	e	a, b, d
	1558	linalol	e	a, b, d
	1718	α -terpineol	e	a, b, c, d
	1739	óxido <i>trans</i> -piránico del linalol (óxido C)	e	a, b, c, d
	1763	óxido <i>cis</i> -piránico del linalol (óxido D)	e	a, b, c, d
	1810	nerol		a, c, d
	1860	geraniol		a, c, d
	1969	<i>trans</i> -3,7-dimetil-1,5-octadieno-3,7-diol (HO-diol I)		a, d
	1992	endiol		a
	2219	8-hidroxi-6,7- dihidrolinalol		a
	2270	<i>trans</i> -2,6 dimetil-2,7-octadieno-1,6 diol (<i>trans</i> -8-hidroxilinalol)		a, d
	2300	7-hidroxigeraniol		a
	2310	<i>cis</i> -2,6 dimetil-2,7-octadieno-1,6 diol (<i>cis</i> -8-hidroxilinalol)		a, d
	2331	ácido geránico		a, d
	2528	<i>p</i> -menten-7,8-diol		a, d
Norisoprenoides	1505	vitispirano	e	
	1626	riesling acetal	e	
	1730	1,6,6 trimetil-1,2- dihidronaftaleno (TDN)	e	
	2418	3,4-dihidro-3-oxoactinidol (I)		a, d
	2458	3,4-dihidro-3-oxoactinidol (II)		a, d
	2479	3,4-dihidro-3-oxoactinidol (III)		a, d
	2537	3-hidroxi- β -damascona		a, b, c, d
	2651	3-oxo- α -ionol	e	a, b, c, d
	2658	4-oxo- β -ionol		a, b, c, d
	2669	3- hidroxi-7,8-dihidro- β -ionol	e	
	2694	4-oxo-7,8-dihidro- β -ionol		a, b, c, d
	2726	3-oxo-7,8-dihidro- α -ionol	e	a, b, c, d
	3165	grasshoper cetona		a
	3167	vomifoliol	e	a, b, c, d
	3262	7,8-dihrovomifoliol	e	a

Tabla 4.1: Compuestos del aroma en uvas y vinos Tannat en la fracción libre y en la fracción glicosidada.

continuación

Grupo	ILR	Compuesto	Fracción libre	Fracción glicosidada
Fenoles	1753	2-hidroxibenzoato de metilo (salicilato de metilo)		a, d
	1855	guaiacol	e	d
	1882	alcohol bencílico	a, e	a, b, c, d
	1916	alcohol β -feniletílico	a, e	a, b, c, d
	2021	4-etilguaiacol	e	
	2065	<i>o</i> -cresol		a, d
	2090	<i>p</i> -cresol		a, d
	2180	4-vinilguaiacol	a, e	a, b, d
	2187	4-etilfenol	e	
	2240	2,6-dimetoxifenol	e	d
	2377	4-vinilfenol	a	a
	2779	zingerone	e	a, d
	2794	3-(4-hidroxi-3 metoxifenilo) propanoato de etilo		d
	2823	alcohol 4-hidroxi-3-metoxifeniletílico (alcohol homovanílico)	e	
	2901	4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)butan-2-ol (zingerol)	e	
	2970	3-(4-hidroxi-3 metoxifenil)-1-propanol	e	a
2993	2,5-dihidroxibenzoato de metilo		a	
2999	tirosol	e	a	
3049	3,4,5-trimetoxifenol		a, b	
Compuestos C6	1368	1-hexanol	a, e	a, b, d
	1374	<i>trans</i> -3-hexen-1-ol	a, e	d
	1382	<i>cis</i> -3-hexen-1-ol	a, e	a, b
	1410	<i>trans</i> -2-hexen-1-ol	a	a, b, d
Alcoholes	1021	2-metil-2-butanol	e	
	1048	1-propanol	e	
	1093	2-metil-1-propanol (alcohol isobutílico)	a, e	a, c, d
	1155	1-butanol	a, e	d
	1221	3-metil-1-butanol (alcohol isoamílico)	a, e	a, c, d
	1260	1-pentanol	a	a, d
	1328	4-metil-1-pentanol	a	
	1341	3-metil-1-pentanol	a	
	1395	3-etoxi-1-propanol	a	
1725	3-metiltio-1-propanol	a, e		

Tabla 4.1: Compuestos del aroma en uvas y vinos Tannat en la fracción libre y en la fracción glicosidada.

continuación

Grupo	ILR	Compuesto	Fracción libre	Fracción glicosidada
Ésteres	1015	acetato de isobutilo	a, e	
	1125	acetato de isoamilo	a, e	
	1157	butirato de etilo	e	
	1237	hexanoato de etilo (caproato de etilo)	a, e	
	1275	acetato de hexilo	a	
	1353	lactato de etilo	a, e	
	1436	octanoato de etilo (caprilato de etilo)	a, e	
	1527	3-hidroxi-butanoato de etilo	a, e	
	1614	lactato de isoamilo	a	
	1684	decanoato de etilo (caprato de etilo)	a, e	
	1714	succinato de dietilo	a, e	
	1815	acetato de β -feniletilo	a, e	
	1822	4-hidroxi-butanoato de etilo	a, e	
	2058	malato de dietilo	a, e	
	2195	2-hidroxi-glutarato de etilo	a, e	
	2249	fenil lactato de etilo	a	
	2370	succinato ácido de etilo	a, e	
	2586	vainillato de metilo		a
Ácidos	1608	ácido-2-metilpropanoico	a, e	
	1670	ácido butanoico	a, e	
	1705	ácido 2 y 3 metilbutanoico	a, e	
	1845	ácido hexanoico	a, e	a,c
	2072	ácido octanoico	a, e	a,c
	2261	ácido decanoico	a, e	a,c
Otros	1266	2-hidroxi-butanona	e	
	1453	furfural	e	
	1624	gamma-butirolactona	a, e	
	1663	2-furanometanol	e	
	2028	2-hidroxi-3,3-dimetil-gamma-butirolactona (pantolactona)	a, e	
	2042	whisky lactona	e	
	2168	4-carboetoxi-gama-butirolactona	a, e	

Tabla 4.1: Compuestos del aroma en uvas y vinos Tannat en la fracción libre y en la fracción glicosidada

a: muestras de vinos Tannat (Boido, 2002b), b: muestras de uvas (Fariña et al., 2004), c: muestras de vinos (Medina et al., 2011), d: muestras de uvas (Boido et al., 2013), e: muestras de vinos (Fariña et al., 2015).

ILR: índice de retención lineal.

4.1.2 Técnicas analíticas de cuantificación de los compuestos libres y ligados en vino

Los compuestos involucrados en el perfil aromático del vino, se encuentran en concentraciones que varían de unos pocos $\mu\text{g L}^{-1}$ hasta cientos de $\mu\text{g L}^{-1}$ o incluso mg L^{-1} , en una matriz compleja que alberga otros compuestos de naturaleza química muy diversa. La estrategia analítica empleada debe contemplar la capacidad de extracción de los compuestos de interés, con la de resolución, identificación y cuantificación de los mismos.

Uno de los mayores problemas, en la investigación de los compuestos responsables del aroma de los vinos, es la elección de la técnica de extracción que represente cualitativamente y cuantitativamente el aroma original.

Se han identificado más de 1000 componentes en la fracción volátil del vino. Los componentes volátiles tienen una naturaleza química diferente cubriendo un amplio rango de polaridad, solubilidad, volatilidad y pH.

Una cantidad importante de componentes volátiles en el vino solo se puede encontrar a muy baja concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$). Por lo tanto, las etapas de preconcentración suelen ser indispensables. Muchos de los componentes aromáticos son inestables, se pueden oxidar fácilmente en contacto con el aire o degradado por calor o pH.

Se quiere disponer de una metodología que permita estudiar los compuestos glicosidados y los libres, la extracción líquido-líquido es una buena elección para la extracción de compuestos volátiles en vino considerando que todos los compuestos volátiles tienen altos coeficientes de partición hacia la fase orgánica, pero se requiere una posterior evaporación del solvente, lo cual puede causar pérdidas o degradación de algunos compuestos, y formación de algunos que no se encontraban en la muestra original.

La extracción de compuestos volátiles previo adsorción sólida, ya sea del tipo poliestireno como la resina XAD-2, específicamente activada previo a su uso (Günata et al., 1985), o del tipo C18, empacada en columna o como cartucho. Esta técnica permite mediante una desorción selectiva separar los compuestos aromáticos libres y ligados para su posterior análisis. Actualmente se han estudiado una gran variedad de fases de adsorción comerciales como Amberlite XAD-4,7,y 16, soportes de base de sílica C_8 y C_{18} y la introducción de resinas de tipo Isolute ENV⁺.

La resina Amberlite XAD-2, de base polimérica y tamaño de partícula de 50-80 mesh presenta excelente capacidad de adsorción de los terpenos libres en el jugo de uva, permitiendo además una separación de la fracción ligada (Günata et al., 1985), presenta una capacidad de retención similar a las de tipo C18, tiene la ventaja de tener un tamaño de

partícula mayor, y por lo tanto posibilita el uso en columnas preparativas a presión atmosférica. Presenta rendimientos en la adsorción de glicósidos mucho mayor que las técnicas de extracción con solventes, siendo además posible eliminar numerosas sustancias interferentes como azúcares y ácidos por simple lavado con agua, sin pérdida de los analitos.

La elección del solvente para la elución de la fracción libre debe tener en cuenta el compromiso entre solventes más polares, como el diclorometano con el que se obtiene una buena remoción pero que eluye además parte de los glicósidos, y en el otro extremo, el pentano, que no eluye glicósidos pero tampoco recupera totalmente las formas libres. Sin embargo este último solvente es igualmente recomendado por algunos autores para su utilización en las extracciones (Günata et al., 1985) y la mezcla pentano-diclorometano, 2:1 presenta mayor capacidad de elución (Ferreira et al., 2000b).

Otra alternativa es el uso de cartuchos ISOLUTE[®]ENV+, en este caso, la resina polimérica del tipo estireno-divinilbenceno, similar a la XAD-2, se presenta en la forma de cartuchos. Respecto a la resina XAD-2, presenta grandes modificaciones en su estructura, siendo un medio adsorbente muy hidrofóbico especialmente derivatizado con la presencia de grupos fenoles, lo que le confiere una superficie fácilmente hidrofílica, eliminando la necesidad del acondicionamiento previo en el uso con soluciones acuosas, y presentando una gran capacidad de adsorción.

El mecanismo de retención está dado principalmente por la acción de fuerzas de Van der Waals, mediante interacciones hidrofóbicas entre la molécula retenida y la superficie de la resina. En la elución, el solvente -por ejemplo metanol- interrumpe estas interacciones hidrofóbicas con la superficie, y permite la elución del analito y eluyen los compuestos glicosidados.

Dada la alta capacidad de retención de la resina, la elución de los compuestos aromáticos libres del vino con la mezcla pentano-diclorometano tiene un bajo porcentaje de recuperación, por lo que se utiliza el diclorometano. De igual manera se recomienda el uso de metanol para la elución de los compuestos glicosidados (Boido et al., 2003). Con este tipo de cartucho se trabaja a presión reducida y con un sistema de adecuado se puede trabajar en batch, lo que aumenta el rendimiento de muestras procesadas por día.

El uso de cromatografía gaseosa, acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) es la metodología de elección para la separación e identificación de los compuestos del aroma del vino. La selección de la columna capilar y la determinación de las condiciones de trabajo permiten obtener resultados comparables (Versini et al., 2008).

4.1.3 Justificación

La investigación de la capacidad de cepas autóctonas de BAL para promover la liberación de compuestos aromáticos en vinos Tannat no se ha desarrollado, por lo que resulta interesante evaluar esta actividad y determinar la capacidad de las BAL de liberar compuestos que aporten al perfil aromático del vino.

4.2 Objetivos

Evaluación de la liberación de compuestos aromáticos a partir de precursores glicosidados utilizando cepas de bacterias lácticas autóctonas.

Determinación de cambios en la composición de la fracción libre y en la fracción ligada en un medio similar vino.

Determinación de diferencias entre las cepas en función de su capacidad de liberar compuestos aromáticos.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Extracción de compuestos libres y ligados

La extracción de compuestos libres y ligados, luego del proceso de fermentación llevado a cabo por las bacterias lácticas, se realizó utilizando cartuchos rellenos con una resina de tipo estireno-divinilbenceno (Isolute[®] ENV⁺, International Sorbent Technology). Se fraccionaron los aromas libres y ligados de 50 mL del vino o del ensayo de fermentación en MSV (previa centrifugación a 5000 rpm), diluidos a 100 mL con agua y adicionados de 100 µL de n-heptanol como estándar interno (0.274 gL⁻¹ de n-heptanol en solución hidroalcohólica al 50 %), se pasó a través de cartucho Isolute[®] ENV⁺. El acondicionamiento previo del cartucho se realizó pasando 15 mL de metanol y posteriormente 20 mL de agua.

Para la elución de la fracción libre de los aromas se pasaron 30 mL de diclorometano, a un flujo de 4-5 mL/min. El solvente orgánico se recogió, se almacenó en freezer, a las 24 horas, se trasvasó y se secó con Na₂SO₄. Se filtró a través de lana de vidrio. Se concentró en columna

Vigreux a 2-3 mL, en baño termostático a 40°C. La última etapa de concentración se realizó con corriente de nitrógeno hasta menos de 0,2 mL.

La elución de la fracción ligada se realizó pasando 30 mL de metanol, el solvente se recogió, se secó con Na₂SO₄ y se llevó a sequedad mediante rotaevaporación. El residuo se retomó con 2 mL de buffer citrato (pH=5), 3 veces y se adicionó una gota de enzima Cytolase PCL5 (DSM). Se dejó reaccionar durante 16 horas a 40°C, se agregó 0,100 mL de estándar interno y se realizó la extracción 3 veces con 2 mL de pentano-diclorometano 2:1 (v/v), se centrifugó cada vez para facilitar la separación de las fases. El extracto se secó con Na₂SO₄ y se concentró con corriente de nitrógeno hasta menos de 0,2 mL previo al análisis cromatográfico (Boido et al., 2003).

4.3.2 Identificación de los compuestos aromáticos y cuantificación

La identificación se realizó mediante un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17 acoplado a un espectrómetro de masa Shimadzu QP-5050. Las condiciones experimentales fueron: columna capilar de sílica fundida (25 m × 0.25 mm d.i.), con fase estacionaria polietilenglicol 20M (0.25 µm de espesor); programa de temperatura 40°C (6min), 40-180°C a 3°C/min, 180-220°C a 10°C/min, 220°C (20min). La temperatura del inyector fue 250°C; modo de inyección split, relación de split, 1:40; volumen inyectado, 1.0 µL; fase móvil, He, 92.6kPa (55.9 cm/seg); temperatura de la interfase, 250°C; rango de adquisición de masa, 40-400 uma.

Los componentes del aroma del vino se identificaron por comparación de sus índices de retención lineal (IRL) determinados en relación con una serie homóloga de n-alcanos, con aquellos estándares puros o usando datos publicados y comparación de patrones de fragmentación en los espectros de masas con los almacenados en las bases de datos (Adams, 2007; McLafferty et al., 1991; Loscos et al., 2007). En nuestro caso no fueron usados estándares puros.

La cuantificación se llevó a cabo mediante la relación de áreas de los picos cromatográficos respecto al área del n-heptanol usado como estándar interno (Boido et al., 2003).

Para aquellos compuestos que no presentaron una óptima resolución, se cuantificó trabajando en el GCMS, mediante la búsqueda de iones específicos a partir del cromatograma de corriente iónica total (TIC).

4.3.3 Cepas, condiciones y monitoreo de fermentación

Las cuatro cepas seleccionadas para llevar adelante las fermentaciones en medio similar vino fueron UYLC34, UYLC35, UYLC36 UYLC37. Para cada una de las cepas se realizó la fermentación por triplicado y por duplicado para fermentaciones sin cepa (testigo).

Las fermentaciones se llevaron a cabo sobre 55 mL de MSV clocados en tubos Falcon®. Las condiciones del ensayo se ajustaron en: pH del MSV igual a 3,5, concentración 1×10^6 bacterias por mililitro, jarra de anaerobiosis con la lámina Oxoid AnaeroGen®, temperatura de fermentación 25°C, tiempo de fermentación 15 días.

Durante el transcurso de la fermentación se realizó un monitoreo visual de los tubos.

Una vez transcurrido el tiempo total estipulado se realizó la medida de pH del medio y el análisis por TLC de málico y láctico. Posteriormente se procesó el contenido de cada tubo realizando la extracción, identificación y cuantificación de los compuestos libres y ligados.

4.3.4 Tratamiento de datos

Para cada compuesto, para cada cepa y para cada una de las repeticiones, se realizó el cálculo del incremento en la concentración de compuestos libres mediante la diferencia existente entre el valor de concentración del compuesto en la fracción libre con cepa y el valor de la concentración del compuesto en la fracción libre sin cepa (testigo), a este parámetro se lo llama variación de libres (VARLIBRES).

$$\text{VARLIBRES} = [\text{Compuesto}]_{\substack{\text{con cepa} \\ \text{fracción} \\ \text{libre}}} - [\text{Compuesto}]_{\substack{\text{sin cepa} \\ \text{fracción} \\ \text{libre}}}$$

Posteriormente se realizó el cálculo del promedio de estas diferencias y la desviación estándar.

A partir de los datos obtenidos al procesar la fracción ligada, se realizó el cálculo de la diferencia entre el valor de la concentración del compuesto en la fracción ligada sin cepa (testigo) y el valor de la concentración del compuesto en la fracción ligada con cepa, y le llamaremos variación de ligados (VARLIGADOS).

$$\text{VARLIGADOS} = [\text{Compuesto}]_{\substack{\text{sin cepa} \\ \text{fracción} \\ \text{ligada}}} - [\text{Compuesto}]_{\substack{\text{con cepa} \\ \text{fracción} \\ \text{ligada}}}$$

Posteriormente se realizó el cálculo del promedio de estas diferencias y la desviación estándar. Una mayor liberación de compuestos provoca un incremento en los valores de VARLIBRES como en los de VARLIGADOS.

Las variaciones obtenidas para la fracción libre como para la fracción ligada, se procesaron para evaluar la existencia de diferencias estadísticas entre cepas realizando el análisis de varianza usando el software Statistica 7.1 (StatSoft, Tulsa, 1984-2005).

4.4 Resultados y discusión

Los análisis GC MS realizados sobre los ensayos de fermentación en el medio símil vino, muestran la presencia de terpenos, norisoprenoides, compuestos fenólicos, alcoholes y ésteres producto de la liberación a partir de precursores glicosidados como compuestos asociados al metabolismo de las bacterias lácticas, consistentemente con los reportes previos en cuanto a la actividad metabólica de las BAL (Bartowsky et al., 2009).

Los valores de VARLIBRES para cada tipo de compuestos en función de la cepa se presentan en la Tabla 4.2 y los valores de VARLIGADOS se presentan en la Tabla 4.3.

Ha sido posible identificar en la fracción libre como en la fracción ligada, 4 terpenos, 5 norisoprenoides, 4 compuestos fenólicos, 5 alcoholes entre los que se encuentran compuestos C6, 2 ésteres y otros dos compuestos no agrupados con los anteriores. Todos los compuestos identificados concuerdan con los que se presentan tanto en uva como en vino de la variedad Tannat y se han reportado en trabajos anteriores (Boido, 2002b; Fariña et al., 2004; Boido et al., 2013; Fariña et al., 2015). Dada la metodología de preparación del medio símil vino, donde se toman sólo los compuestos glicosidados para su elaboración, como era de esperar, los metabolitos de la FA no estuvieron presentes en las cantidades que habitualmente se encuentran en el vino.

Grupo	IRL	Compuesto	UY LC 34	UY LC 35	UY LC 36	UY LC 37	<i>p</i>
Terpenos	1449	óxido <i>trans</i> -furánico del linalol (óxido A)	0,5 ± 0,4 ^(a)	nc	2,7 ± 0,4 ^(b)	nc	*
	1474	óxido <i>cis</i> -furánico del linalol (óxido B)	3,0 ± 1,5 ^(a)	nc	2,6 ± 1,2 ^(a)	1,1 ± 0,2 ^(a,b)	***
	1763	óxido <i>cis</i> -piránico del linalol (óxido D)	12,2 ± 4,8 ^(a)	0,5 ± 0,1 ^(b)	2,1 ± 1,2 ^(b)	nc	**
Norisoprenoides	2537	3-hidroxi-β-damascona	20,8 ± 2,7 ^(b)	nc	8,1 ± 0,8 ^(a)	42,1 ± 2,0 ^(b)	*
	2651	3-oxo-α-ionol	14,9 ± 0,1 ^(a)	nc	46,0 ± 1,0 ^(b)	11,9 ± 3,1 ^(a)	*
	2658	4-oxo-β-ionol	13,9 ± 0,9 ^(a)	nc	6,0 ± 2,7 ^(b)	nc	*
	2694	4-oxo-7,8-dihidro-β-ionol	9,8 ± 1,1 ^(a)	nc	9,4 ± 2,8 ^(a)	7,8 ± 3,5 ^(a)	ns
	2726	3-oxo-7,8-dihidro-α-ionol	8,9 ± 1,1 ^(a)	nc	15,5 ± 6,6 ^(b)	22,7 ± 8,8 ^(b)	*
Fenoles	1855	guaiacol	nc	17,1 ± 0 ^(b)	nc	nc	*
	1882	alcohol bencílico	179,3 ± 8,3 ^(b)	3,9 ± 0,5 ^(a)	19,5 ± 4,3 ^(a)	160 ± 33 ^(b)	*
	1916	alcohol β-feniletílico	147 ± 12 ^(b)	50 ± 13 ^(a)	269,5 ± 2,8 ^(c)	252,3 ± 9,7 ^(c)	*
	2180	4-vinilguaiacol	-123 ± 17	-86 ± 17	-47,6 ± 9,3	9,0 ± 4,4	nd
Compuestos C6	1368	1-hexanol	35,0 ± 7,2 ^(b)	3,2 ± 2,1 ^(a)	26,0 ± 7,4 ^(b)	57,4 ± 2,8 ^(c)	*

Tabla 4.2: Valores medios y desviación estándar de VARLIBRES en µg L⁻¹ para cada compuesto por cepa.

continuación

Grupo	IRL	Compuesto	UY LC 34	UY LC 35	UY LC 36	UY LC 37	<i>p</i>
Alcoholes	1093	2-metil-1-propanol (alcohol isobutílico)	16,6 ± 0,7 ^(b)	13,4 ± 3,5 ^(b)	7,6 ± 1,2 ^(a)	2,6 ± 0,9 ^(a)	*
	1139	2-pentanol	3,8 ± 2,5	6,9 ± 4,9	5,4 ± 1,5	18,3 ± 8,2	ns
	1152	1-butanol	49,6 ± 2,8 ^(b)	1,7 ± 0,8 ^(a)	15,7 ± 19,9 ^(a,b)	108 ± 27 ^(c)	*
	1221	3-metil-1-butanol (alcohol isoamílico)	127 ± 16 ^(b)	52,4 ± 8,2 ^(a)	62 ± 20 ^(a)	100 ± 48 ^(a,b)	***
Ésteres	1353	lactato de etilo	924 ± 10 ^(a,b)	67,5 ± 3,1 ^(a)	1761 ± 627 ^(b)	4037 ± 824 ^(c)	*
	1714	succinato de dietilo	11,1 ± 4,8 ^(a)	15,3 ± 5,2 ^(a)	9,8 ± 2,9 ^(a)	42,2 ± 6,2 ^(b)	*
Otros compuestos	1266	3-hidroxiбутanona (acetoína)	0,6 ± 0,4 ^(a,b)	1,1 ± 0,8 ^(b)	nc	nc	***
	1624	gamma-butirolactona	nc	4,2 ± 1,6	nc	15,1 ± 2,2	nd

Tabla 4.2: Valores medios y desviación estándar de VARLIBRES en µg L-1 para cada compuesto por cepa.

Diferentes letras indican diferencias significativas, * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,05$, ns $p \geq 0,05$ diferencias no significativas, nd: no determinado, nc: no cuantificado

Grupo	IRL	Compuesto	UY LC 34	UY LC 35	UY LC 36	UY LC 37	<i>p</i>
Terpenos	1449	óxido <i>trans</i> -furánico del linalol (óxido A)	3,7 ± 2,9	1,2 ± 1,1	7,1 ± 2,6	3,0 ± 1,7	ns
	1474	óxido <i>cis</i> -furánico del linalol (óxido B)	8,0 ± 5,2	7,3 ± 2,0	11,3 ± 4,1	8,4 ± 1,4	ns
	1718	α-terpineol	nd	nd	2,3 ± 1,5	1,9 ± 1,5	ns
	1763	óxido <i>cis</i> -piránico del linalol (óxido D)	10,2 ± 3,8 ^(b)	1,4 ± 0,3 ^(a)	5,9 ± 0,8 ^(a,b)	0,6 ± 0,9 ^(a)	**
Norisoprenoides	2651	3-oxo-α-ionol	13,8 ± 2,6 ^(a)	20,9 ± 6,8 ^(a)	48,8 ± 6,5 ^(b)	46,0 ± 8,6 ^(b)	**
	2658	4-oxo-β-ionol	16,7 ± 4,0 ^(a)	19,0 ± 0,0 ^(a)	nd	nd	*
	2694	4-oxo-7,8-dihidro-β-ionol	20,0 ± 0,0 ^(a)	19,7 ± 0,6 ^(a)	11,8 ± 2,8 ^(b)	11,4 ± 2,6 ^(b)	**
	2726	3-oxo-7,8-dihidro-α-ionol	30,2 ± 6,6	25,2 ± 9,6	30,0 ± 4,5	23,0 ± 3,3	ns
Fenoles	1882	alcohol bencílico	35 ± 14 ^(b)	21,5 ± 2,3 ^(a,b)	37,0 ± 5,5 ^(b)	16,0 ± 0,9 ^(a)	***
	1916	alcohol β-feniletílico	37 ± 12	27,6 ± 3,6	43 ± 13	34,3 ± 4,3	ns
	2180	4-vinilguaiacol	74,0 ± 1,0 ^(b)	83,3 ± 3,1 ^(b)	31 ± 12 ^(a)	26,1 ± 4,7 ^(a)	*
Compuestos C6	1368	1-hexanol	35,7 ± 2,0 ^(a)	30,8 ± 2,0 ^(a,b)	39,9 ± 4,7 ^(b)	39,9 ± 4,0 ^(b)	***
Alcoholes	1093	2-metil-1-propanol (alcohol isobutílico)	nc	nc	-2,5 ± 0,7 ^(a)	-3,2 ± 0,4 ^(a)	*
	1155	1-butanol	nc	nc	30 ± 10 ^(a)	33,5 ± 2,9 ^(a)	**
	1221	3-metil-1-butanol (alcohol isoamílico)	38,0 ± 0,6 ^(a)	7,6 ± 1,2	36,9 ± 7,5 ^(a)	45,7 ± 8,0 ^(a)	*

Tabla 4.3: Valores medios y desviación estándar de VARLIGADOS en $\mu\text{g L}^{-1}$, para cada compuesto por cepa.

Diferentes letras indican diferencias significativas, * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,05$, ns $p \geq 0,05$ diferencias no significativas, nd: no determinado, nc: no cuantificado

De los 16 terpenos reportados para vinos Tannat (Boido, 2002b; Fariña et al., 2015) en el presente trabajo se identificaron 4: óxido *trans*-furánico del linalol (óxido A), óxido *cis*-furánico del linalol (óxido B), óxido *cis*-piránico del linalol (óxido D) y α -terpineol. Estos 4 compuestos son los que integran el grupo de los 5 más reportados en estudios previos, tanto para vinos Tannat como para otras vinificaciones (Ribéreau-Gayon et al., 2006b).

En el caso del óxido *cis*-piránico del linalol (óxido D), el incremento de VARLIBRES para las cepas UYLC34 es significativamente mayor que para las cepas UYLC35, UYLC36 y UYLC37.

Para todas las cepas la VARLIGADOS de los terpenos identificados sufrió un incremento, lo que significa que la porción que ha quedado ligada luego de la actividad metabólica de la cepa en estudio es menor que lo que se liberó respecto al testigo.

La cepa UYLC 35 es la que presentó una menor actividad respecto a la liberación de terpenos, tanto si se observa el incremento en VARLIGADOS, que es el menor para casi todos los terpenos o si se observa desde el punto de vista del incremento de libres, donde no hay un aumento respecto al testigo tanto para el óxido A como para el óxido B y de apenas $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$ para el óxido D.

Comparando los valores de VARLIGADOS para los terpenos identificados no se hallaron diferencias significativas en la liberación de terpenos entre las cepas, a excepción del óxido D, donde la cepa UYLC34 y UYLC36 se mostraron más similares y con un mejor desempeño en cuanto al aumento de VARLIGADOS respecto a la UYLC35 y UYLC37.

El aporte sensorial de los terpenos se considera positivo dado los descriptores aromáticos asociados a los compuestos identificados (Tabla 4.4).

Los norisoprenoides que se identificaron en la fracción ligada fueron 4: 3-oxo- α -ionol, 4-oxo- β -ionol, 4-oxo-7,8-dihidro- β -ionol, 3-oxo-7,8-dihidro- α -ionol, que mostraron variaciones en la fracción glicosidada, en la fracción libre se reveló además la presencia de 3-hidroxi- β -damascona. Si bien estos compuestos por sus umbrales de percepción suelen ser poco relevantes, su presencia es importante ya que pueden ser precursores de compuestos que si se manifiestan aún a muy baja concentración, que incluyen β -damascona, β -ionona, vitispirano, 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TDN) (Ribéreau-Gayon et al., 2006b) y (E) -1- (2,3,6-trimetilfenil) buta-1,3-dieno (TPB) (Janus et al., 2003).

Para la cepa UYLC35 no se mostró un incremento de VARLIBRES para ninguno de los norisoprenoides identificados, diferenciándose significativamente de las cepas UYLC34,

UYLC36 y UYLC37, donde si existió un incremento de VARLIBRES para los norisoprenoides. En el caso de las cepas UYLC34 y UYLC37 presentaron el mayor incremento para la liberación de la 3-hidroxi- β -damascona, significativamente diferente a la cepa UYLC36. La cepa UYLC36 presentó el mayor incremento para 3-oxo- α -ionol, mientras que para 4-oxo- β -ionol fue la cepa UYLC34. Las cepas UYLC 36 y 37 presentaron el mayor incremento de VARLIBRES para 3-oxo-7,8-dihidro- α -ionol. En el caso del 4-oxo-7,8-dihidro- β -ionol, las cepas UYLC34, UYLC36 y UYLC37 mostraron incremento en VARLIBRES para los norisoprenoides similares entre sí.

El comportamiento de las cepas para los norisoprenoides en VARLIGADOS, evidenció que existe similitud para todas las cepas para el 3-oxo-7,8-dihidro- α -ionol, sin embargo para 3-oxo- α -ionol, 4-oxo- β -ionol, 4-oxo-7,8-dihidro- β -ionol, existió similitud de comportamiento para las cepas UYLC34 y UYLC35 por un lado y UYLC36 y UYLC37 por otro.

En la Tabla 4.4 se presentan descriptores para norisoprenoides y sus umbrales de percepción. En base a los descriptores reportados para los norisoprenoides liberados, la presencia de los mismos afecta positivamente la percepción aromática en el vino. A su vez productos potenciales de su transformación como los derivados megastigmanos β -damascona, β -ionona, o los derivados no megastigmanos como TDN y TPB pueden aportar positivamente al perfil sensorial del vino.

Los compuestos fenólicos encontrados fueron 4: guaiacol, 4-vinilguaiacol, alcohol bencílico y alcohol β -feniletílico.

Para el alcohol bencílico y alcohol β -feniletílico en todas las cepas, los valores de VARLIBRES presentaron incremento. La cepa que menos incremento manifestó fue la UYLC35. En el caso del alcohol bencílico las cepas UYLC34 y UYLC37 que presentaron los mayores incrementos, no se diferencian significativamente, una situación similar se da para las cepas UYLC36 y UYLC37 para el alcohol β -feniletílico. La única cepa que mostró incremento de VARLIBRES para el guaiacol es la UYLC35.

Una mención especial merece los resultados que se obtuvieron para el 4-vinilguaiacol en la fracción libre, los valores de VARLIBRES son negativos, lo que significa que el testigo presentó un valor mayor del compuesto libre que el valor luego de la fermentación con las cepas. Una posible explicación a este hecho es la existencia en las cepas UYLC34, UYLC35 y UYLC36 de la actividad enzimática capaz de transformar el 4-vinilguaiacol a especies reducidas como el 4-etilfenol como ha sido reportado por algunos autores (Couto et al., 2006;

Knockaert et al., 2012). Sin embargo no pudo demostrarse el incremento de 4-etilfenol para ninguna de las cepas.

Para todas las cepas se dio un incremento de VARLIGADOS en los compuestos fenólicos identificados. Para el alcohol β -feniletílico, no existió diferencias significativas entre ellas. La cepa UYLC37 es la que presentó menor incremento en VARLIGADOS para alcohol bencílico y el 4-vinilguaiacol. Las cepas UYLC34 y UYLC35 presentaron los niveles de mayor incremento en VARLIGADOS para el 4-vinilguaiacol.

El incremento VARLIBRES para el alcohol β -feniletílico fue mayor que el correspondiente incremento de VARLIGADOS, respondiendo este aumento al metabolismo secundario de las BAL (Edwards, 1990; Edwards et al., 1994). Para el caso del alcohol bencílico se da una situación similar sin embargo no se han reportado evidencias para la formación de alcohol bencílico por parte de BAL, aunque si existen para otro tipo de microorganismos (Shaw et al., 1990; Martin et al., 2016).

En la Tabla 4.4 se muestran los descriptores asociados a los compuestos fenólicos y los valores de umbral de percepción. Los descriptores asociados a estos compuestos son positivos respecto al aroma del vino.

Dentro de los compuestos C6, se identificó al 1-hexanol, tanto en la fracción ligada como en la libre. La cepa UYLC35 es la que presentó el menor incremento en VARLIBRES para el 1-hexanol, las cepas UYLC34, UYLC36 presentaron un incremento similar y sin diferencias significativas entre ellas, mientras que la cepa UYLC37 fue la que presentó el mayor incremento de VARLIBRES. El incremento de VARLIGADOS para el 1-hexanol para todas las cepas fue del mismo orden, sin embargo desde el punto de vista estadístico, existe mayor similitud entre UYLC36 y UYLC37 respecto a UYLC34 y UYLC35.

Compuesto	Descriptor	Umbral de percepción (ug L ⁻¹)
óxido <i>trans</i> -furánico del linalol (óxido A)	Vegetal, dulce, terroso	6000 (a)
óxido <i>cis</i> -furánico del linalol (óxido B)	Vegetal, dulce, terroso	6000 (a)
α -terpineol	Floral, pino	400 (b)
óxido <i>cis</i> -piránico del linalol (óxido D)	Vegetal, dulce, terroso	3000 (a)
3-oxo- α -ionol	Tabaco	nd (b)
3-hidroxi- β -damascona	Té, tabaco	nd (b)
β -damascona	Frutado-florido, miel manzana cocida	0,05 (c)
β -ionona	Dulce, violeta	2,6 (c)
TDN	Petróleo, kerosene	20 (d)
TPB	Floral, geranio; más de 0,3 insecticida, plástico	0,040 (e)
Vitispirano	Picante, madera	nd (a)
Vomifoliol	Fruta, asociado a otros norisoprenoides.	nd (d)
Guaiacol	Ahumado, hospital	9,5 (f)
4-vinilguaiacol	Clavo, curry	40 (g)
alcohol benfílico	Floral, rosa, bálsamo, fenólico	200.000 (h)
alcohol β -feniletílico	Rosa, talco, miel	10.000 (g)
1-hexanol	Frutado	8000 (c)
<i>trans</i> -3-hexen-1-ol	Herbáceo	1000 (a)
2-metil-1-propanol (alcohol isobutílico)	Etéreo, frutado	40000 (c)
1-butanol	Alcohólico, medicinal	150000 (c)
3-metil-1-butanol (alcohol isoamílico)	Frutado, esmalte de uñas	30000 (c)
2-propanol	Alcohólico	nd (i)
lactato de etilo	Frambuesa, fresa	154000 (a)
succinato de dietilo	Melón maduro, lavanda	100000 (a)
3-hidroxiбутanona (acetoína)	Leche agria	150000 (c)
gamma-butirolactona	Tostado quemado	35000 (c)

Tabla 4.4: Descriptores y umbrales de percepción para compuestos identificados en uvas/vinos Tannat.

nd: no determinado

a- (Fariña et al., 2004)

b- (Ribéreau-Gayon et al., 2006b)

c- (Rodrigues et al., 2017)

d- (Roubelakis-Angelakis, 2009)

e- (Janus et al., 2003)

f- (Maga, 1973)

g- (Guth, 1997)

h- (López de Lerma et al., 2012)

i- (Clarke et al., 2004)

En el siguiente grupo integrado por los alcoholes no fenólicos, se lo denominó grupo de alcoholes. Dentro del mismo se identificaron el 2-metil-1-propanol (alcohol isobutílico), 1-butanol y 3-metil-1-butanol (alcohol isoamílico) y 2-pentanol, el incremento de estos compuestos está directamente relacionado con el metabolismo bacteriano (Bartowsky et al., 2009).

La cepa UYLC34 presentó el mayor incremento en VARLIBRES para los alcoholes isobutílico e isoamílico, la cepa UYLC37 fue la que presentó el mayor incremento para el 1-butanol. Para el 2-pentanol el incremento en VARLIBRES fue similar para todas las cepas y tuvo un peso relativo menor en comparación con el incremento del resto de los alcoholes.

En la fracción ligada en todas las cepas se dio el incremento de VARLIGADOS en el alcohol isoamílico. Siendo las cepas UYLC34, UYLC36 y UYLC37 las que mostraron incrementos similares y en mayor magnitud que la cepa UYLC35. El 1-butanol sólo fue identificado en las cepas UYLC36 y UYLC37.

En la Tabla 4.4 se indican los descriptores y umbrales de percepción para los alcoholes identificados

Los ésteres que se presentaron en VARLIBRES fueron el lactato de etilo y el succinato de etilo. La cepa UYLC37 fue la que presentó el mayor incremento en lactato de etilo, seguida por la UYLC36, UYLC34 y muy por debajo se encontró a la cepa UYLC35. En el caso del succinato de etilo la cepa UYLC37 fue la que presentó el mayor incremento, separada del resto, y le siguieron las cepas UYLC35, UYLC34 y UYLC36 con valores similares entre sí.

La acetoína y la gamma-butirolactona se encontraron presentes sólo en la fracción libre. La acetoína en las cepas UYLC34 y UYLC35 tiene un incremento de VARLIBRES muy escaso y en UYLC36 y UYLC37 no fue detectada. La gamma-butirolactona se detectó en las cepas UYLC37 y UYLC35.

En la fracción libre la presencia de acetoína, gamma-butirolactona y los ésteres lactato de etilo y succinato de etilo se relacionó directamente con la producción a través del metabolismo bacteriano.

El estudio individual por compuesto y por cepa permitió determinar que se dieron cambios en la concentración de los compuestos respecto al testigo, estas variaciones a su vez fueron de diferente magnitud en función del compuesto que se analizó y la cepa.

La variación en la concentración de cada compuesto en particular en función de las cepas ensayadas, permitió establecer diferencias por compuesto entre cepas. Al considerar todos los

compuestos en todas las fracciones el mayor incremento de las variaciones se dio en las cepas UYLC34 y UYLC37 en un 33% de los compuestos, en un 26% para la cepa UYLC36 y en un 1 % para la cepa UYLC35.

Los parámetros analizados presentaron una variabilidad importante, reflejada en los valores de desviación estándar obtenidos (del orden de lo que habitualmente se obtiene en este tipo de determinaciones), consecuencia de la secuencia de pasos propia del método y del propio comportamiento de la cepa en cada uno de los ensayos y del bajo nivel de concentración. En este sentido, se ha establecido una relación empírica entre la concentración y la desviación estándar de una método que tiene la siguiente expresión $RSD = \pm 2^{(1-0,5 \log C)}$, donde RSD es la desviación estándar relativa y C es la concentración (Miller et al., 2010), la representación gráfica de esta ecuación se conoce como trompeta de Horwitz. En la Figura 4.1 se muestra la representación de la trompeta de Horwitz que para valores de concentración en 1 mgL^{-1} y $1 \text{ }\mu\text{gL}^{-1}$, los valores de RSD es predecible que se encuentren entre un 20 a 40 %.

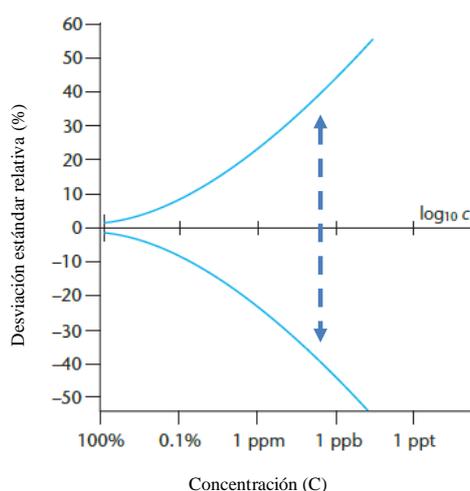


Figura 4.1: Trompeta de Horwitz

Adaptada de Miller et al (2010).

Para los valores determinados de concentración para cada uno de los compuestos, las desviaciones estándares calculadas fueron consistentes la mayoría de la veces con lo predecible en función de la trompeta de Horwitz, es decir a menor valor de concentración mayor variabilidad relativa.

Otro análisis de datos que se llevó a cabo para evaluar el comportamiento de las cepas fue por grupo de compuestos. Particularmente para los compuestos glicosidados que originan las agliconas pertenecientes al grupo de terpenos y norisoprenoides, se calculó para cada cepa, la

sumatoria de VARLIBRES y VARLIGADOS. Los valores obtenidos expresados en $\mu\text{g L}^{-1}$ se muestran en Tabla 4.5.

Sumatorias	UY LC 34	UY LC 35	UY LC 36	UY LC 37	P
VARLIBRES Terpenos	15,7 \pm 5,1 ^(a)	0,5 \pm 0,1 ^(b)	7,4 \pm 1,5 ^(b)	1,1 \pm 0,2 ^(b)	**
VARLIBRES Norisoprenoides	66,4 \pm 2,2 ^(a)	Nc	85 \pm 13 ^(a)	85 \pm 14 ^(a)	**
VARLIGADOS Terpenos	21,9 \pm 9,5	9,9 \pm 2,7	26,6 \pm 4,8	13,9 \pm 3,6	ns
VARLIGADOS Norisoprenoides	80,7 \pm 7,4	85 \pm 12	90 \pm 11	80,4 \pm 6,5	ns

Tabla 4.5: Valores medios y desviación estándar para la sumatoria de las VARLIBRES y VARLIGADOS para terpenos y norisoprenoides.

Diferentes letras indican diferencias significativas, * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,05$, ns $p > 0,05$ diferencias no significativas, nc: no cuantificado.

Al analizar el comportamiento de cada una de las cepas en función de la sumatoria de VARLIBRES para los terpenos, se diferenció la cepa UYLC34 por ser la que originó la mayor presencia de compuestos libres respecto al UYLC35, UYLC36, UYLC37.

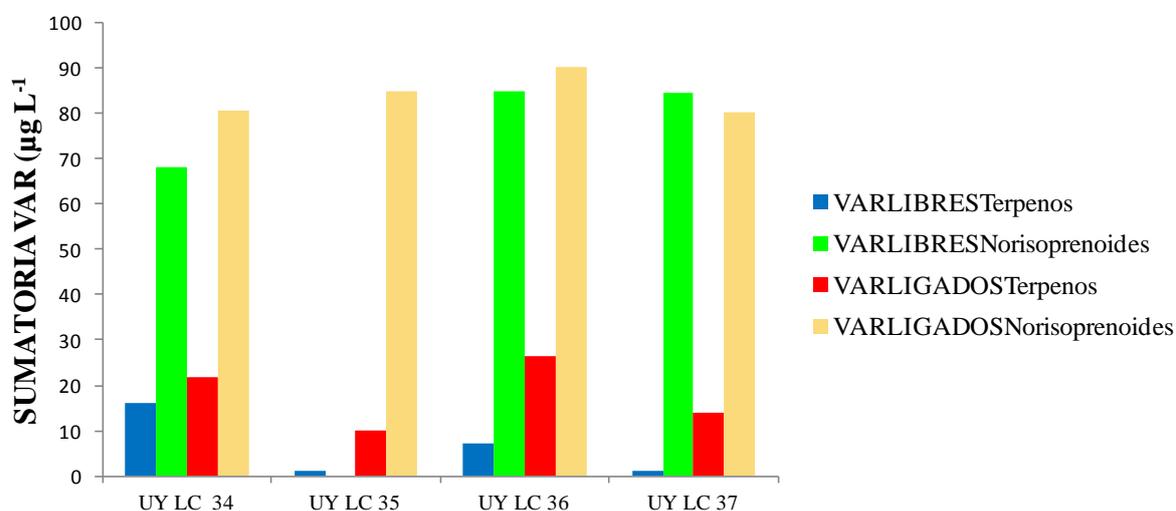


Figura 4.2: Sumatoria de las VARLIBRES y VARLIGADOS por grupo de compuestos en función de la cepa de bacterias lácticas.

Sin embargo, todas las cepas presentaron el mismo comportamiento para la sumatoria de VARLIGADOS para los terpenos, es decir que no existieron diferencias entre cepas en cuanto a la fracción de ligados que fueron capaces de liberar.

La evaluación de la sumatoria de VARLIBRES para los norisoprenoides permitió diferenciar a las cepas UYLC34, UYLC36, UYLC37, de la UYLC35 que no presentó compuestos liberados. Sin embargo la evaluación de la sumatoria de VARLIGADOS para los norisoprenoides, no permitió evidenciar una diferenciación entre las cuatro cepas.

Se atribuyó la menor presencia de concentración de los compuestos en la fracción libres a los fenómenos de adsorción de las agliconas liberadas por los polisacáridos generados por las propias bacterias (Dufour, 1999; Boido, 2002b; Moreno-Arribas et al. 2009)

4.5 Conclusiones

A través de la metodología seleccionada, utilizando un medio similar vino conteniendo glicósidos de Tannat fue posible evaluar la liberación de compuestos aromáticos a partir de precursores glicosidados utilizando cepas de bacterias lácticas autóctonas. Todas las cepas autóctonas de BAL presentaron actividad β -glicosidasa liberando las agliconas correspondientes a estructuras de terpenos, norisoprenoides, compuestos fenólicos y compuestos de C6.

Se identificaron cambios en la concentración tanto en la fracción libre como en la fracción ligada, para 4 terpenos, 5 norisoprenoides, 4 compuestos fenólicos, 5 alcoholes entre los que se encuentran compuestos C6, 2 ésteres y otros dos compuestos no agrupados con los anteriores. Los cambios en la concentración de terpenos, norisoprenoides, compuestos fenólicos y compuestos C6 fueron correlacionados con la actividad, β -glicosidasa de las cepas de bacterias lácticas autóctonas, mientras que los cambios en la concentración de los alcoholes y ésteres fueron correlacionados con el propio metabolismo secundario bacteriano.

El estudio individual por compuesto y por cepa permitió determinar que se produce una liberación diferencial en función del compuesto que se analice y la cepa.

La liberación de cada compuesto en particular como función de cada cepa ensayada, permitió establecer diferencias entre cepas. Al considerar todos los compuestos en todas las fracciones las mayores variaciones se dieron en las cepas UYLC34 y UYLC37 con 33% de las determinaciones, un 26% para la cepa UYLC36, 1 % para la cepa UYLC35.

La variedad y las características sensoriales de los compuestos identificados, permitió establecer que la selección y utilización de cepas de bacterias lácticas autóctonas puede utilizarse para desarrollar aromas responsables de aportar complejidad y atributos positivos en el vino.

La metodología aplicada hizo posible evaluar la actividad β -glicosidasa y la liberación de aromas para cepas de bacterias lácticas en un ambiente controlado y establecer diferencias de comportamiento entre ellas.

Capítulo 5

5 Evaluación del color durante la fermentación maloláctica realizada con cepas de bacterias lácticas autóctonas

5.1 Introducción

El color es un atributo de calidad que caracteriza al vino, lo identifica, marca su tipicidad y condiciona la elección del consumidor al adquirirlo (Moulton et al., 2001).

En la uva Tannat se encuentran los glicósidos de malvidina, cianidina, petunidina, peonidina y delphinidina, los derivados acetilados y cumáricos (González-Neves et al., 2004), en el vino también predomina el glicósido de malvidina y se encuentran las mismas antocianinas que en las uvas así como derivados de estos (González-Neves et al., 2010).

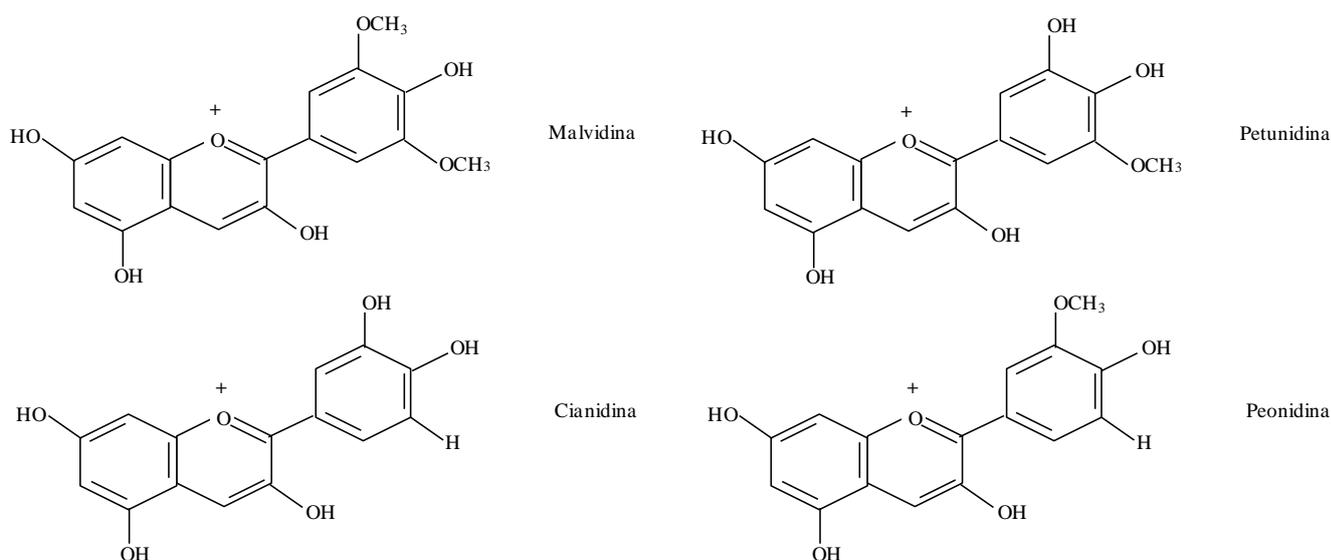


Figura 5.1: Antocianidinas de uvas y vinos.

Durante el proceso de elaboración del vino y en particular durante la FML ocurren cambios y pérdida en el color.

Los cambios de color durante la FML se atribuyen a diversos fenómenos:

-disociación de los complejos de copigmentación, probablemente debido al cambio iónico que ocurre durante la fermentación maloláctica,

- la formación de nuevos pigmentos (Boulton, 2001; Saint-Cricq de Gaulejac et al., 1999; Nonier Bourden et al., 2008; Nonier et al., 2010),
- la variación de pH (Ribéreau-Gayon et al., 2006b),
- la liberación y degradación de las antocianidinas a partir de las antocianinas y
- fenómenos de adsorción directamente sobre la membrana celular de las bacterias muertas (Vivas et al., 1997).

En estudios realizados en cultivos de BAL (*Leuconostoc oeni* actual *Oenococcus oeni*) en medios similares a vino con antocianinas, se ha demostrado que existen pérdidas por oxidación (15%), por contacto con células inactivas (32%), por células viables pero no en crecimiento (54%) y por células en crecimiento (81%), siendo entonces el metabolismo bacteriano lo que explica el mayor decaimiento en la cantidad de antocianinas en estas condiciones (Vivas et al., 1997).

En productos fermentados con otras cepas de bacterias lácticas también se da el mismo fenómeno de disminución de antocianinas (Scibisz et al., 2012).

Esta disminución de color se observa en evaluaciones realizadas en vinos elaborados con diferentes variedades, y suele corresponderse con la disminución de la concentración de antocianinas totales, antocianinas no acetiladas, acetilglucósido y cumarilglucósido de antocianinas (Martínez-Pinilla et al., 2012; Pérez Magariño et al., 2007), aunque no siempre una disminución de las antocianinas es la responsable de la disminución del color después de la FML (Moreno-Arribas et al., 2008).

Si bien la liberación de las antocianidinas a partir de las antocianinas puede ser una causa de la disminución del color, la actividad antocianásica no aparece siempre en las cepas de *Oenococcus oeni* (Barbagallo et al., 2004).

En nuestro estudio, se trató de determinar en forma simultánea la liberación de compuestos aromáticos y la evaluación del color, una vez realizada la FML por las diferentes cepas de BAL en el MSV. El color del MSV está determinado por la cantidad de compuestos (pigmentos) que fueron extraídos junto con los precursores glicosidados aromáticos, si bien existe extracción, las condiciones para extraer la mayor cantidad de pigmentos y particularmente antocianidinas conllevan una elución con metanol acidificado según lo reportado por varios autores (Oszmianski et al., 1988; Di Stéfano et al., 1989; Di Stéfano et al., 1990; Flamini et al., 2000; Lee, 2002), sin embargo en la forma que es preparado el MSV se presentan una cantidad de pigmentos que pueden ser evaluados tanto en el testigo como en los diferentes ensayos de fermentación.

La diversidad de antocianos y taninos, y de los compuestos derivados que pueden tener influencia en el color es extremadamente variada. Si bien existen procedimientos de análisis químico (HPLC, MS, RMN), que permiten identificar y cuantificar muchos de estos compuestos ya sean las unidades o los polímeros, generalmente en los vinos se determinan índices de taninos, índice de antocianos, índice de polifenoles totales y de esta manera se obtiene una aproximación al contenido total.

Para la determinación del contenido de polifenoles se puede utilizar la determinación del índice Folin-Ciocalteu, que consiste en la oxidación de los compuestos fenólicos por el reactivo Folin-Ciocalteu y la medida de absorbancia a 750 nm. La medición de la absorbancia a 280 nm y el cálculo del índice de polifenoles totales (IPT) es preferible a la prueba de Folin-Ciocalteu, ya que presenta como ventajas la rapidez y la reproducibilidad, sin embargo, ciertas moléculas como ácidos cinámicos y chalconas, no tienen un máximo de absorción en esta longitud de onda pero como están presentes en el vino en concentraciones muy bajas, el error en el valor será muy pequeño (Ribéreau-Gayon et al., 2006b).

Para la medida de color se puede optar por los métodos establecidos por la Comisión Internacional de Iluminación (CIE), el método CIELab, que se basa en la medida de tres coordenadas: L luminosidad, a coordenadas rojo/verde, b coordenadas azul/amarillo (Pérez Magariño et al., 2003). Si bien este método es ampliamente utilizado para la medida de color en infinidad de productos (pinturas, alimentos, etc.) e incluso incorporado como método OIV (Method OIV-MA-AS2-11 Type I method Determination of chromatic characteristics according to CIELab Resolution Oeno 1/2006), en el ámbito de la industria enológica su uso es limitado y poco difundido.

Dado que el espectro de vinos tintos tiene un máximo de absorción en 520 nm, debido a las antocianinas y la combinación con flavilio, y un mínimo en 420, toma en cuenta la contribución de rojo y amarillo al color general, el enfoque del análisis del color en la elaboración del vino requiere mediciones de absorbancia a 420 y 520 nm, con una medición adicional a 620 nm para incluir el componente azul en vinos tintos jóvenes. La intensidad colorante es la sumatoria de las absorbancia a estas tres longitudes de onda, se asume que la intensidad del color representa la cantidad de color. La relación entre la absorbancia a 420 y 520, llamada matiz, proporciona información respecto a la evolución del color hacia la tonalidad anaranjada (Ribéreau-Gayon et al., 2006b). El método se encuentra ampliamente utilizado en la industria enológica y descrito como OIV-MA-AS2-07B (OIV, 2007), que toma como base el método desarrollado por Glories (1984).

5.1.1 Justificación

Dado que el color es un atributo significativo para categorizar la calidad del vino y valorado por los consumidores a la hora de la selección del producto y que las bacterias lácticas durante el transcurso de la fermentación maloláctica puede ocasionar transformaciones que causan disminución en la intensidad colorante del vino, se propone evaluar y seleccionar las cepas de bacterias lácticas autóctonas que provoquen la menor pérdida posible de color.

5.2 Objetivos

Selección de cepas con mínima capacidad de remoción de color durante la fermentación maloláctica.

Evaluación de la intensidad colorante, polifenoles totales y matiz y su variación por efecto de cepas de bacterias lácticas autóctonas.

5.3 Materiales y métodos

Una vez finalizado el proceso de fermentación llevado a cabo por las bacterias lácticas autóctonas, los tubos conteniendo el MSV de testigo de fermentación y con cepa se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos. Se midió el pH del sobrenadante y una porción de 2 ml de sobrenadante se utilizó para la determinación de IC e IPT.

Para realizar las medidas de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Beckam DU 640.

Para la determinación de IC se realizó la medición directa de la absorbancia a 420 nm, 520nm y 620 nm en celda de vidrio de 1 cm de camino óptico utilizando como blanco de medición agua purificada. El IC se calculó como la sumatoria de los valores de absorbancia medida. El valor de matiz se determinó como el cociente entre los valores de absorbancia a 420 nm y 520 nm.

El IPT se determinó mediante dilución 1 en 100 en agua, y medida de la absorbancia a 280 nm en celda de cuarzo.

Para cada cepa, para cada una de las repeticiones de los ensayos de fermentación realizados según lo descrito en el capítulo 4, se realizó la determinación de la IC y del IPT y también para el testigo. Se calculó la diferencia existente entre el valor de IC en el testigo y de IC en el tubo con cepa a este parámetro se lo llamó variación de intensidad colorante VARIC. Posteriormente se realizó el cálculo del promedio de estas diferencias y la desviación estándar. El mismo tratamiento de datos se realizó con las determinaciones del IPT y se definió el parámetro variación del índice de polifenoles totales VARIPT.

Mediante el cociente de los valores de absorbancia determinados a 420nm y 520 nm se calculó el valor de matiz, a partir de ellos se calculó el valor de Δ Matiz como la diferencia entre el valor del matiz en los tubos con cepa menos el valor del matiz en el testigo.

Las variaciones obtenidos para IC, IPT y matiz es decir VARIC, VARIPT, Δ Matiz se procesaron para evaluar la existencia de diferencias estadísticas entre cepas realizando el análisis de varianza usando el software Statistica 7.1 (StatSoft, Tulsa, 1984-2005).

5.4 Resultados y discusión

Las determinaciones de IC y del IPT para todos los ensayos con cepas mostraron una disminución respecto al testigo, por lo que VARIC y VARIPT toman valores mayores que cero, corroborándose lo que se reporta en bibliografía en cuanto a la caída de color y polifenoles durante el proceso de la FML (Ribéreau-Gayon et al., 2006a).

Los valores de IC del MSV fueron mucho menores que los que habitualmente se encuentran en vino Tannat tal y como fue previsto de acuerdo a las condiciones de preparación del MSV.

Los resultados de IC e IPT para los diferentes ensayos se muestran en la Tabla 5.1.

En la Tabla 5.2, se muestran los valores de pH al inicio y al final de la FML, así como Δ pH calculado como pH_f menos pH_i . Como puede verse los valores de pH finales que se obtuvieron son muy similares para las cuatro cepas ensayadas, de esta forma el efecto pH en el color esta minimizado y se pudo despreciar como factor de influencia en el cambio de IC en este ensayo.

Para las cepas estudiadas el decaimiento de color, evaluado a partir de la disminución de IC en términos porcentuales, presentó valores de: 31,3% para la cepa UYLC34; 29,6% para la cepa UYLC35; 32,9 % para la cepa UYLC36 y 26,6% para la cepa UYLC37.

El orden de las cepas en función de menor a mayor decaimiento de IC fue UYLC37, UYLC35, UYLC34 y UYLC36.

Para las cuatro cepas ensayadas se verificó un aumento del valor de matiz respecto al testigo explicado por una disminución de la absorbancia a 520 nm para todas las cepas, el valor de la absorbancia a 420 también disminuyó pero en menor medida. El efecto visual fue una percepción de tono más anaranjado en los tubos con cepa y un tono más rojizo en el testigo.

La cepa UYLC34 mostró el mayor aumento de matiz, mientras que las cepas UYLC35, UYLC36 y UYLC37 no presentaron diferencias significativas (Tabla 5.3).

Intensidad colorante												
	UYLC34	Testigo	VARIC	UYLC35	Testigo	VARIC	UYLC36	Testigo	VARIC	UYLC37	Testigo	VARIC
1	0,67	0,98	0,31	0,69	0,98	0,29	0,654	0,974	0,320	0,719	0,974	0,255
2	0,67	0,98	0,31	0,70	0,98	0,29	0,654	0,974	0,320	0,702	0,974	0,272
3	0,68	0,98	0,30	0,69	0,98	0,29	0,652	0,974	0,322	0,728	0,974	0,247
promedio	0,673	0,980	0,307	0,690	0,980	0,290	0,653	0,974	0,321	0,716	0,974	0,258
% disminución			31,3			29,6			32,9			26,5
Índice de Polifenoles Totales												
	UYLC34	Testigo	VARIPT	UYLC35	Testigo	VARIPT	UYLC36	Testigo	VARIPT	UYLC37	Testigo	VARIPT
1	10,2	12,0	1,8	10,1	12,0	1,9	10,8	11,8	1,0	10,6	11,8	1,2
2	10,6	12,0	1,4	10,5	12,0	1,5	10,1	11,8	1,7	11,0	11,8	0,8
3	10,4	12,0	1,6	10,3	12,0	1,7	10,4	11,8	1,4	10,9	11,8	0,9
promedio	10,4	12,0	1,6	10,3	12,0	1,7	10,4	11,8	1,4	10,8	11,8	1,0
% disminución			13,3			14,2			11,6			8,2

Tabla 5.1: IC e IPT para los ensayos de FML en medio simil vino y las diferentes cepas.

	UY LC 34			UY LC 35			UY LC 36			UY LC 37		
	pH _i	pH _f	ΔpH	pH _i	pH _f	ΔpH	pH _i	pH _f	ΔpH	pH _i	pH _f	ΔpH
1	3,60	3,75	0,15	3,60	3,78	0,18	3,59	3,78	0,19	3,59	3,78	0,19
2	3,60	3,78	0,18	3,60	3,75	0,15	3,59	3,79	0,20	3,59	3,79	0,20
3	3,60	3,75	0,15	3,60	3,74	0,14	3,59	3,75	0,16	3,59	3,75	0,16
promedio	3,60	3,76	0,16	3,60	3,76	0,157	3,590	3,77	0,18	3,59	3,77	0,18

Tabla 5.2: Variación de pH durante el transcurso de la FML en el MSV.

Desde el punto de vista estadístico las diferencias encontradas en VARIC fueron significativas, la cepa UYLC37 fue la que presentó el menor decaimiento de color y se diferenció de las otras tres cepas, las cepas UYLC35 y UYLC34 tuvieron un decaimiento similar entre sí, al igual que la UYLC34 y UYLC36 (Tabla 5.3).

	UY LC 34	UY LC 35	UY LC 36	UY LC 37	<i>p</i>
VARIC	0,307 ± 0,003 ^(a,b)	0,290 ± 0,005 ^(a)	0,321 ± 0,001 ^(b)	0,258 ± 0,013 ^(c)	*
VARIPT	1,6 ± 0,2 ^(a)	1,7 ± 0,2 ^(a)	1,4 ± 0,4 ^(a,b)	1,0 ± 0,2 ^(b)	***
ΔMatiz	0,15 ± 0,02 ^(a)	0,11 ± 0,01 ^(b)	0,10 ± 0,05 ^(b)	0,12 ± 0,02 ^(b)	**

Tabla 5.3: Variación de la IC, del IPT y del matiz en el MSV en función de las cepas.

Diferentes letras indican diferencias significativas: * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,05$.
Diferencias no significativas: ns $p \geq 0,05$.

En el caso de IPT la disminución del índice se ubicó en el entorno de 10 %, la cepa UYLC37 presentó el menor VARIPT, las cepas UYLC34, UYLC35 y UYLC36 tuvieron una VARIPT similar entre sí (Tabla 5.3). Si bien la contribución al color no es de todos los compuestos que son capaces de absorber a 280 nm, es un parámetro asociado a la posible interrelación antociano taninos. Lo que si se corroboró es la disminución del IPT como ocurre habitualmente en el transcurso de la FML en los procesos industriales y va en el mismo sentido con la disminución de antocianinas.

La evaluación de la actividad β -glucosidasa mediante el método EGA (capítulo 2) para la cepas UYLC34 y UYLC35 mostraron que presentan actividad media y baja respectivamente, mientras que la cepas UYLC36 media-muy alta y la cepa UYLC37 alta-muy alta. En base a estos resultados, y asociando que una mayor actividad β -glucosidasa puede desencadenar una liberación de antocianidina a partir de las antocianinas, podría esperarse un mayor pérdida de color para la cepa UYLC37, situación que no se verificó. En definitiva la pérdida de color no pudo asociarse a una mayor actividad β -glucosidasa, es decir que la mayor actividad β -glucosidasa no se correspondió con una mayor actividad antocianásica.

Por otra parte la disminución de color que resultó del entorno del 30% en las condiciones ensayadas pueden ser explicadas por otros fenómenos como disociación de los complejos de copigmentación, (Boulton, 2001; Saint-Cricq de Gaulejac et al., 1999; Nonier Bourden et al., 2008; Nonier et al., 2010) y a fenómenos de adsorción directamente sobre la membrana celular de las bacterias muertas. (Vivas et al., 1997).

La variación de pH en nuestro caso no fue una fuente de variación entre cepas ya que el pH se mantuvo dentro de valores muy similares para cada uno de las cepas ensayadas aunque si se le puede considerar como un factor de influencia con respecto al testigo ya que el aumento de pH durante la FML se encuentra en el entorno de 0,2 unidades, valores que están acorde con el cambio esperado como consecuencia de la metabolización de ácido málico a ácido láctico (Flanzy, 2000; Bartowsky et al., 2009).

5.5 Conclusiones

La evaluación de color se realizó mediante la medida de IC y se corroboró, para las cepas evaluadas, una pérdida de color en el entorno del 30 % en las condiciones del ensayo. La cepa UYLC37 presentó la menor pérdida de color por lo que resultó ser la que posee el mejor comportamiento frente a la disminución de color durante la FML.

La disminución de IPT fue del orden del 10 %, siendo la cepa UYLC37 la que presenta la menor disminución coincidiendo la misma cepa en la menor disminución de IC.

En las cuatro cepas ensayadas se verificó un aumento del valor de matiz respecto al testigo que, desde el punto visual, provocó en una percepción de tono más anaranjado en los tubos con cepa y un tono más rojizo en el testigo. La cepa UYLC34 presentó el mayor aumento de matiz, con respecto a las cepas UYLC35, UYLC36 y UYLC37, por lo que resultó ser la que originó el cambio menos favorable respecto al matiz.

La evaluación de color utilizando las medidas de IC, IPT y matiz permitió diferenciar las cepas entre sí, siendo en el ensayo en el que se utilizó la cepa UYLC37 en el que se obtuvo la menor pérdida de color.

Capítulo 6

6 Caracterización del contenido metálico de vinos Tannat y correlación con la dinámica de la FML

6.1 Introducción

El proceso de vinificación involucra la FA y la FML. La FA llevada a cabo por las levaduras que transforma los azúcares en etanol y dióxido de carbono, mientras que la FML realizada por las BAL convierte el ácido málico en ácido láctico y dióxido de carbono.

Si bien existe una amplia investigación de los factores que afectan el normal desarrollo de la FML, que durante el proceso de vinificación pueden ser controlados (alcohol, pH, temperatura, dióxido de azufre), se siguen presentando casos expuestos por los industriales bodegueros, donde la FML no ocurre dentro de los plazos esperados o ocurre lentamente, incluso cuando el vino es inoculado con cepas comerciales.

La supervivencia de las BAL en el vino y su posterior actividad como se sabe es influenciada por múltiples factores como la variedad de la uva, procesos de filtración y centrifugación que disminuyen la población de bacterias, requerimientos de factores nutricionales, interacción con levaduras, bacteriófagos y otros microorganismos.

Otros autores han mencionado también la inhibición por agroquímicos utilizados en el viñedo y hay conclusiones encontradas. Los agroquímicos, muchos de ellos fungicidas son usados para tratar las enfermedades que atacan a la vid como el mildiu (*Plasmopara viticola* Berl. y de Toni), y *Botrytis*. En algunas oportunidades estos tratamientos son necesarios en la última fase de maduración de la uva, y los productores tienen que aplicar un tratamiento químico justo antes de la cosecha, que puede conducir a residuos de plaguicidas en las uvas. Por esta razón, se establecen límites máximos legales y se establecen tiempos de espera obligatorios entre la aplicación final de pesticidas y la cosecha (Vidal et al., 2001). La composición química de los agroquímicos utilizados es muy variada, dependiendo de cuál sea la afectación del cultivo y las prácticas agrícolas del establecimiento, existe un gran número de productos orgánicos y también de sales inorgánicas, que pueden ser utilizadas. En este sentido y en concordancia con una corriente de agricultura ecológica, es que se ha visto incrementado el uso de fungicidas a base de cobre (Provenzano et al., 2010).

Por otro lado se ha visto que el contenido de iones metálicos, es uno de los factores que poseen influencia en el desarrollo de las BAL y de la actividad de la enzima maloláctica. Los estudios realizados para evaluar el efecto del contenido de calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, potasio, sodio, zinc han mostrado que la carencia o el exceso producen un impacto en el normal desarrollo de las BAL (Terrade et al., 2009a; Vidal et al., 2001; Carreté et al., 2006).

Los medios que se utilizan para el cultivo de las bacterias lácticas, como los desarrollados para estudiar el comportamiento de la actividad β -glucosidasa poseen una suplementación con sales de manganeso y magnesio, también están presentes el potasio como una sal de fosfato y el sodio como cloruro de sodio o como acetato. Por otro lado el uso de extracto de levadura aporta pequeñas cantidades de calcio y otros metales (hierro, zinc, cobre).

Los requerimientos específicos de calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, potasio y zinc en medios sintéticos han mostrado que efectivamente el manganeso resulta esencial, que resultan no esenciales cobre, hierro, y zinc (Terrade et al., 2009a), resultados contradictorios se han obtenido para el calcio y el magnesio (Terrade et al., 2009a; Boyaval, 1989), mientras que para el potasio como se utiliza una sal de fosfato para preparar el medio la esencialidad es respecto al fosfato y no al potasio (Terrade et al., 2009a).

Por otro lado el estudio de efectos inhibitorios de metales sobre el crecimiento de las BAL han mostrado que por encima de determinados valores de concentración hay disminución del crecimiento para el caso de cobre, zinc e incluso manganeso (Vidal et al., 2001; Mesas et al., 2004; Tong et al., 2017) o disminución de la actividad de la enzima maloláctica por efecto de la presencia de calcio, cobre, hierro, magnesio, potasio y zinc (Wang et al., 2014).

Por cierto que el estudio del contenido de iones metálicos en el vino también es importante por otros aspectos, como el toxicológico donde se debe prestar especial atención a otros elementos como Cd, Cr, Hg, Pb, As por su potencial toxicidad (Baran, 1995). Por otro lado también el contenido metálico es relevante desde el punto de vista del control de calidad y el proceso de producción porque determina la estabilidad del vino y los atributos sensoriales (Pohl, 2007; Ribéreau-Gayon et al., 2006b; Acuña-Avila et al., 2016). Además, la información elemental en vinos terminados es usada como una herramienta para identificar el origen geográfico del producto (Kment et al., 2005; Moreno et al., 2007; Galgano et al., 2008; Bentlin et al., 2011; Pérez Trujillo et al., 2011; Jurado et al., 2012; Martín et al., 2012; Boschetti et al., 2013; Selih et al., 2014; Azcarate et al., 2015; Sixto et al., 2015).

El origen de los minerales puede relacionarse, en buena medida, con factores directamente vinculados al tipo de suelo. Por otra parte, dentro del origen antropogénico se cita como fuentes de metales: la aplicación de fertilizantes orgánicos y minerales, pesticidas inorgánicos, contaminación del ambiente circundante, la aplicación de aditivos alimentarios y el uso de determinada maquinaria. Elementos como Pb, Zn y Sn pueden eventualmente estar presentes en cantidades importantes como resultado del impacto industrial en el área o de prácticas agrícolas en el viñedo. Fertilizantes y pesticidas son responsables del aumento en los niveles de aniones como fosfato y nitrato así como de la presencia de Cu, Zn, As y Mn. Además debido a su acidez, los vinos son capaces de disolver metales presentes en los equipos utilizados en su elaboración como Cu, Ni, Zn, e incluso Cr (Pohl, 2007).

La concentración de metales en vinos de diversas partes del mundo ha sido analizada (Guerrero et al., 1997; Lara et al., 2005; Moreno et al., 2007; Galgano et al., 2008; Paneque et al., 2010; Bentlin et al., 2011; Jurado et al., 2012; Martín et al., 2012; Boschetti et al., 2013), tanto en vinos jóvenes o como en vinos durante la crianza (Paneque et al., 2010); o en elaboraciones de vinos especiales (Paneque et al., 2009). Al analizar los resultados en estos trabajos se encuentra una amplia variabilidad de contenido para los diferentes metales analizados. Para K el valor más bajo de concentración es de 241 mg L⁻¹ y el mayor de 2457 mg L⁻¹, sin embargo los valores más habituales rondan en los 1300 mg L⁻¹. Para el Mg y el Ca, 60 y 236 mg L⁻¹ y 28 y 213 mg L⁻¹ son los menores y mayores valores respectivamente, siendo los valores más frecuentes en el entorno de 100 mg L⁻¹. Al observar los valores de concentración para el Na se encuentran valores tan bajos como 1,6 mg L⁻¹ como tan altos de 256 mg L⁻¹, aunque los valores oscilan en el entorno de los 80 mg L⁻¹. En este punto se debe acotar que el límite máximo permitido para sodio en vinos fijado por OIV es de 80 mg L⁻¹.

Para los valores de Fe se tienen que la concentración está entre 0,4 mg L⁻¹ a 5,4 mg L⁻¹ y el valor más habitual en el entorno de 2 mg L⁻¹. Si bien para Fe en vino desde el punto de vista normativo no está establecido un valor máximo de concentración, desde el punto de vista tecnológico los valores por encima de 5 mg L⁻¹ aproximadamente, junto con la influencia de factores como aireación, estado de oxidación, pH, concentración de proteínas y fenoles ocasionan alteraciones tanto por fenómenos de precipitación como de oxidación (Ribéreau-Gayon et al., 2006b).

El Mn se ha encontrado en valores que van desde 0,4 mg L⁻¹ hasta 8,6 mg L⁻¹, encontrándose valores en todo el rango. Desde el punto de vista normativo no está establecido un valor máximo de concentración en vino (en agua potable es 0,1 mg L⁻¹ (UNIT, 2017)).

Para el caso del Cu y Zn está definido el valor máximo permitido (VMP) y establecido por OIV, que son 1 y 5 mg L⁻¹ respectivamente. Muy eventualmente se han encontrado vinos que superen los valores máximos permitidos, y los valores reportados se encuentran distribuidos desde el límite de cuantificación de los métodos aplicados hasta los VMP correspondientes.

Los antecedentes reportados para vinos en Uruguay son escasos. Un estudio de sólo tres elementos Na, Ca y Cu en muestras de tinto Tannat obtenidas en el mercado (González et al., 2013) reporta que los valores de Na se encuentran entre 9 a 46 mg L⁻¹, de calcio entre 50 a 115 mg L⁻¹ y de cobre menores a 0,22 mg L⁻¹. Un trabajo anterior en el que no se especifica origen ni variedad (Rivero Huguet, 2004) en vinos de calidad preferente (VCP) del Uruguay, se determina el contenido de 7 elementos entre los que se encuentran Cu, Fe, Mn y Zn, se informa que los valores de Cu se encuentran entre 0,034 a 0,65 mg L⁻¹, de Fe entre 0,73 a 4,6 mg L⁻¹, de Mn entre 0,74 a 2,2 mg L⁻¹ y de Zn entre 0,49 a 2,2 mg L⁻¹.

Para el análisis químico de metales existen técnicas analíticas variadas (volumétricas, electroquímicas, espectrométricas), dependiendo del contenido del analito en el objeto a estudiar, la matriz y la disponibilidad de equipamiento unas se prefieren frente a otras (Skoog et al., 2008).

En nuestro caso, la técnica empleada fue la espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS), siguiendo la metodología descrita por la OIV para la determinación del contenido de calcio, cobre, hierro, magnesio, potasio, sodio y zinc. Para la determinación de manganeso se establecieron las condiciones experimentales para el vino utilizando condiciones reportadas en otras matrices (APHA, 2005).

En la FAAS los elementos presentes en una muestra se convierten en átomos o iones elementales en estado gaseoso por medio de un proceso denominado atomización por efecto de una llama. De esta manera se mide la absorción ultravioleta/visible, de las especies atómicas en el vapor.

6.1.1 Justificación

La determinación de la concentración de potasio, magnesio, calcio, sodio, hierro, manganeso zinc y cobre, aportan información no recabada hasta el momento y que permite caracterizar el contenido metálico de vinos Tannat en Uruguay.

Por otra parte una vez conocido el contenido de estos metales se puede evaluar si es un factor de enlentecimiento o inhibición de la FML en dichos vinos. Por lo que se propone:

-realizar el análisis de calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, potasio, sodio y zinc, en muestras de vinos jóvenes (vinos del año), elaborados con uva Tannat, obtenidas de diferentes viñedos, y siguiendo el mismo esquema de elaboración es decir las mismas prácticas enológicas.

-correlacionar el contenido de metales en vinos Tannat con la forma en que la FML ha transcurrido en estos vinos, en cuanto a completitud y duración de la misma.

6.2 Objetivos

Los objetivos que se plantean son:

- caracterización los vinos Tannat en cuanto su contenido de metales mediante la determinación de la concentración de potasio, magnesio, calcio, sodio, hierro, zinc, cobre y manganeso en vinos.
- correlacionar la concentración de elementos que pueden provocar alteración en la dinámica de la FML con la duración de la misma.

6.3 Materiales y métodos

Las muestras de vinos, correspondían a 10 elaboraciones diferentes de uva Tannat realizadas durante la vendimia 2015, siguiendo un protocolo de elaboración tradicional. Las prácticas agrícolas sobre los viñedos desde donde provenía la uva fueron similares. Las muestras fueron extraídas durante el mes de julio y en todas las elaboraciones la FML se completó. Los parámetros analíticos de porcentaje alcohol, azúcar, acidez total, pH y ácido málico presentados se realizaron en la bodega mediante análisis por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), utilizando un analizador Oenos FossTM.

Para cada una de una de las elaboraciones se conoce el tiempo transcurrido entre el fin de la FA y el fin de la FML.

Las determinaciones de K, Mg, Ca, Na, Fe, Zn, Cu y Mn se realizaron utilizando un espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer (Waltham, MA, USA) AAnalyst 200, llama de aire-acetileno, quemador de 10 cm, un nebulizador que utiliza una estructura de perlas de impacto de cerámica que mejora la eficacia de la nebulización. Para cada elemento analizado se utilizó la lámpara de cátodo hueco correspondiente operada de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica o superior. Se utilizó agua purificada (ASTM Tipo I, 18 MΩ cm) obtenida de un purificador Millipore modelo DIRECT Q-5.

Se prepararon las soluciones estándares stock de 1000 mg L⁻¹ a partir de los sólidos cloruro de potasio (Fluka), sulfato de magnesio heptahidratado (Baker) , carbonato de calcio (Sigma), cloruro de sodio (Fluka), sulfato ferroso amónico hexahidratado (Baker), zinc (Aldrich) y a partir de estándares líquidos comerciales para el cobre y manganeso (Merck). A partir de éstas soluciones diariamente se prepararon los estándares intermedios de 10 mg L⁻¹.

Se preparó una solución de Ce al 5 % (6,33 g de cloruro de cesio en 100 mL de agua), como buffer de ionización y una solución de La al 5 % (13.369 g de cloruro de lantano heptahidratado, adicionar 1 mL de HCl 1M llevar a 100 mL con agua) como agente liberador.

Se preparó una solución modelo constituida por ácido cítrico 3,5 g, sacarosa 1,5 g, glicerol 5,0 g, cloruro de calcio 50 mg, cloruro de magnesio 50 mg, alcohol etílico 50mL y agua hasta 500 mL. Para el caso de Na y K la preparación de los estándares de trabajo se realizó utilizando 2 mL de la solución modelo (igualación de matriz), 1 mL de solución de Ce al 5%, por cada 100 mL. En la preparación de los estándares de trabajo de calcio se agregó 2 mL de la solución de La al 5% por cada 100 mL.

Un resumen de las condiciones de análisis para K, Mg, Ca, Na, Fe, Zn, Cu, Mn se muestra en la Tabla 6.1.

Analito	Estándares	Tratamiento Muestra	λ
K	en matriz igualada*	Dilución acuosa*	769,9
Ca	acuoso**	Dilución acuosa**	422,7
Mg	acuoso	Dilución acuosa	285,0
Na	en matriz igualada*	Dilución acuosa*	589,0
Fe	acuoso	Rotaevaporación 50-60 °C y dilución si es necesario	248,3
Mn	acuoso	dilución si es necesario	279,5
Zn	acuoso	Rotaevaporación 50-60 °C dilución si es necesario	213,9
Cu	acuoso	dilución si es necesario	324,8

Tabla 6.1: Esquema de condiciones para la determinación de metales por FAAS.

*agregado de buffer de ionización de Ce, ** agregado de agente liberador de La.

La preparación de muestras y las medidas para K, Mg, Ca, Na, Fe, Zn, y Cu, se realizaron siguiendo los procedimientos normalizados en el compendio de análisis de OIV (OIV, 2018).

Para el caso de la determinación de Mn, cuyo procedimiento no se encuentra dentro de los procedimientos normalizados OIV, se optimizan las condiciones. Se trabaja a λ 279,5 nm, se realiza la curva de calibración utilizando estándares acuosos de 0, 0,17, 0,36, 0,50 y 1,10 mg L⁻¹ de Mn. Las muestras de vino se miden directamente (o se diluyen en agua) en las mismas condiciones que los estándares. Se realizan medidas de muestras fortificadas.

En todos los casos se realizaron las determinaciones por duplicado.

Se trabajó con material descontaminado con HNO₃ 10(v/v) durante toda la noche y enjuagado con agua purificada.

Para la rotaevaporación a 60°C se utilizó el rotaevaporador Büchi R-114 y el baño de agua Büchi B-480.

6.4 Resultados y discusión

En todas las determinaciones donde se siguió el método normalizado se obtuvieron curvas de calibración con un coeficiente de determinación mayor al 0,99. Los valores promediados cumplieron con el criterio establecido de desviación estándar relativa porcentual menor de 10%.

Para el caso de la determinación de Mn se determinó el cumplimiento de linealidad en el rango de trabajo de 0 a 1,10 mg L⁻¹, obteniéndose un coeficiente de determinación mayor a 0,99. Para el caso de las 4 muestras fortificadas con Mn, los porcentajes de recuperación obtenidos fueron 98,8, 99,6, 102,1 y 103,5%. La medida directa de Mn sin tratamiento previo de la muestra de vino, como la preparación de la curva en estándares acuosos permitió realizar la determinación de Mn cumpliendo con los requerimientos de calidad analítica establecidos.

Los valores de límite de detección y límite de cuantificación fueron respectivamente para Fe 0,018 y 0,059 mg L⁻¹, para Mn 0,040 y 0,135 mg L⁻¹, para zinc 0,004 y 0,013 mg L⁻¹ para cobre 0,008 y 0,027 mg L⁻¹. Para el caso de K, Mg, Ca y Na que se encuentran en mayor concentración estos límites no fueron determinados.

En la Tabla 6.2 se muestran los resultados obtenidos para la determinación de K, Mg, Ca, Na, Fe, Mn, Zn y Cu, en las 10 muestras analizadas.

Identificación de la muestra	Concentración del analito (mgL ⁻¹)							
	K	Mg	Ca	Na	Fe	Mn	Zn	Cu
1	1443	73	64	25	0,60	0,80	0,20	0,14
2	1300	112	60	44	1,01	0,76	0,94	0,06
3	1588	92	60	37	0,72	0,46	0,64	0,13
4	1374	71	53	42	1,02	0,38	0,61	0,14
5	1207	83	61	17	0,93	0,84	0,38	0,07
6	1622	86	58	29	1,51	sd	0,89	0,20
7	1522	92	54	39	0,78	0,46	0,71	0,11
8	1263	76	60	26	0,65	0,88	0,39	0,2
9	1386	101	48	21	0,56	0,92	0,64	0,16
10	1497	101	59	32	1,1	sd	0,48	0,08

Tabla 6.2: Concentraciones promedios para los metales analizados en vinos Tannat.
sd: sin dato.-

Los resultados obtenidos para los diferentes metales estuvieron dentro de los rangos de valores que se han encontrados en estudios similares para diferentes tipos de vinos en diferentes regiones del mundo (Guerrero et al., 1997; Moreno et al., 2007; Galgano et al., 2008; Paneque et al., 2009; Paneque et al., 2010; Bentlin et al., 2011; Jurado et al., 2012; Martín et al., 2012; Boschetti et al., 2013).

Sin embargo, el rango de valores de la concentración de K, Mg, Ca, Na, Fe, Zn, Cu y Mn que fue determinado fue más estrecho, es decir que existe un menor variabilidad, asignable al hecho que se trabajó con un mismo tipo de variedad, con prácticas enológicas muy similares para cada elaboración y la extracción de las muestras se realizó en la misma etapa del proceso de vinificación para cada elaboración.

El valor medio de la concentración de K en las muestras analizadas fue de 1420 mg L⁻¹ (RSD 9,8), un valor que se encuentra muy cercano al valor habitual de 1300 mg L⁻¹.

Los valores medios de concentración para Mg y Ca fueron de 89 mg L⁻¹ (RSD 15%) y 58 mg L⁻¹ (RSD 8%) respectivamente. En el caso del Ca el valor medio se encuentra un poco por debajo de lo que han reportado otros autores en España e Italia (Galgano et al., 2008; Moreno et al., 2007) y con mayor similitud a vinos de la región (Bentlin et al., 2011). Para el caso del Mg el valor medio en los vinos Tannat se asemeja más al valor medio encontrado en diferentes vinos del mundo.

El valor medio para el Na fue de 31 mg L⁻¹ (RSD 8%), por debajo del valor habitual encontrado en vinos analizado en el resto del mundo y por debajo del valor máximo permitido en vinos fijado por la OIV de 80 mg L⁻¹.

El valor medio del contenido de Fe fue de 0,89 mg L⁻¹ con un valor de RSD del 33%. Si bien la dispersión entre las muestras en principio parece bastante alta, el valor menor es de 0,56 y el mayor de 1,5 mg L⁻¹. Por otro lado, estos valores de concentración de Fe son adecuados desde el punto de vista de la estabilidad del producto frente a posibles ocurrencia de formación de precipitados u oxidaciones causadas por Fe.

La concentración de Mn en las 8 muestras analizadas se encuentra comprendida entre 0,38 mg L⁻¹ y 0,92 mg L⁻¹ (RSD 63%), rango mucho menor del que se ha visto en trabajos previos en vinos en el mundo (0,4 a 8,6 mg L⁻¹).

La concentración de Zn en las 10 muestras analizadas estuvo entre 0,20 y 0,94 mg L⁻¹ (RSD 39 %), y por debajo del VMP de 5 mg L⁻¹.

La concentración de Cu en las 10 muestras analizadas se encontró entre 0,06 y 0,20 mg L⁻¹ (RSD 39 %), y por debajo del VMP de 1 mg L⁻¹.

Si se comparan los valores medios de la concentración de metales en los vinos analizados con la concentración de los mismos en los medios de cultivo que se utilizan para el desarrollo de las BAL (Tabla 6.3), se encuentran situaciones diferentes.

Para los elementos que se encuentran en mayor concentración (K, Ca, Na y Mg) se observó que en el caso de K, Mg y Ca la concentración de estos elementos fue mayor en las muestras de vino que la que contenían los medios utilizados, para el Na la concentración fue menor en el vino que en los medios.

El valor de Mg en el vino si bien fue mayor al que contiene el medio, no se alcanzó el valor de 243 mg L⁻¹ que provoca la inhibición del crecimiento de las BAL (Mesas et al., 2004). El valor de Na fue menor en el vino que en el medio, pero la supresión de Na en el medio no afecta el crecimiento de las BAL (Terrade et al., 2009a).

Los valores de concentraciones de Fe, Zn y Cu en el vino se encuentran en todos los casos por debajo de las concentraciones que condicionan el crecimiento de las BAL (Mesas et al., 2004; Vidal et al., 2001). Por otra parte aunque estos tres elementos presenten valores muy bajos de concentración (menos de 5 mg L⁻¹) la supresión de los mismos no afecta el crecimiento (Terrade et al., 2009a).

Analito	Concentración (mg L ⁻¹)				
	Respuesta de BAL frente a la supresión ^(a)		MRS	MSV	Tolerancia ^(b)
K	224	No crece*	562	562	sd
Mg	9,85	No se afecta	23	23	> 243 ^b
Ca	158	No se afecta	2	2	sd
Na	sd	Sd	1406	85	5000 ^d
Fe	4	No se afecta	< 0.1	< 0.1	> 558 ^b
Mn	24	No crece	12	12	> 549 ^b
Zn	0,03	No se afecta	< 0.1	< 0.1	Hasta 65 ^b
Cu	0,0038	No se afecta	< 0.1	< 0.1	Hasta 31 ^b , 5 ^c

Tabla 6.3: Concentración de elementos en medios de cultivo y en estudios de tolerancia e inhibición.

(*) afectado por la supresión de P; (sd) sin dato; a (Terrade et al., 2009a); b (Mesas et al., 2004); c (Vidal et al., 2001); d (Boyaval, 1989).

Los medios de cultivo poseen Mn en una concentración que alcanza los 12 mg L⁻¹, por otra parte la supresión de Mn en el medio artificial no permite el crecimiento de las BAL.

En el vino la concentración de Mn que se encontró fue 0,55 mg L⁻¹ (valor medio). Es decir que se encuentra un resultado paradójico ya que los niveles de Mn en el vino son muy bajos respecto a las necesidades que se han reportado para el desarrollo de las BAL. Queda por saber que sucede con los niveles de Mn previo a la FML, investigación que excedió los objetivos de esta tesis y queda como perspectiva de trabajos futuros. Sin embargo se debe acotar que se han reportado valores de la concentración de Mn en los granos de uvas tintas en otras regiones y que se encuentran en el rango de 0,47 a 0,8 mg kg⁻¹ (Acuña-Avila et al., 2016), también han sido reportado valores de concentración de Mn en jugo de 0,29 a 0,45 mg kg⁻¹ y en la parte sólida de 0,7 a 2,4 mg kg⁻¹ (Pepi et al., 2017). Una hipótesis podría ser que este valor de concentración de Mn aunque pequeño aún permite un lento desarrollo de la población que al fin es capaz de realizar la FML.

Los vinos correspondientes a las elaboraciones que se tomaron para realizar las determinaciones de la concentración de K, Mg, Ca, Na, Fe, Zn, Cu y Mn, realizaron la FML en un lapso de tiempo que fue de 26 días la que demoró menos y 130 días la que tardó más Tabla 6.4. Para estas muestras se determinó mediante FTIR la concentración de alcohol, azúcar, acidez total, pH y ácido málico.

Identificación de la muestra	Alcohol (% v/v)	pH	Acidez total (g L ⁻¹)	Azúcar residual (g L ⁻¹)	Ácido málico (g L ⁻¹)	Mn (mg L ⁻¹)	Duración de FML (días)
1	12,0	3,55	3,9	1,6	0,1	0,80	45
2	15,3	3,72	4,5	7,3	0,1	0,76	26
3	15,3	3,66	4,8	1,9	0,1	0,46	133
4	13,3	3,58	4,5	2,2	0,1	0,38	38
5	14,3	3,61	4,1	2,2	0,1	0,84	87
6	14,3	3,78	4,3	2,3	0,1	sd	32
7	15,3	3,66	5,1	2,2	0,1	0,46	129
8	12,8	3,49	3,7	2,2	0,1	0,88	45
9	14,2	3,68	3,3	2,1	0,1	0,92	70
10	13,4	3,64	4,1	2,7	0,1	sd	63

Tabla 6.4: Parámetros de vinos y duración de FML.

En estas elaboraciones en este año en particular el contenido alcohólico se presentó por encima de lo que es la media habitual. La duración de la FML es contabilizada en días, después que culmina la FA, y en todos los casos la duración también se presentó mayor a lo habitual consecuencia posiblemente del alto contenido alcohólico. Para el caso de la muestra 2, que a priori parece ser que es la que se comporta mejor en el proceso de la FML, sufrió una FA difícil, muy lenta de más de 25 días. En todos los casos la FML se da por terminada cuando el contenido de ácido málico es de 0,1 g L⁻¹ o menos.

Si se grafica (Figura 6.1) el contenido de Mn (multiplicado por 10) y la duración de la FML (en semanas), puede observarse que no existe una correlación directa entre los diferentes parámetros, es decir muestras con mayor contenido de Mn no desencadenaron un FML más rápida.

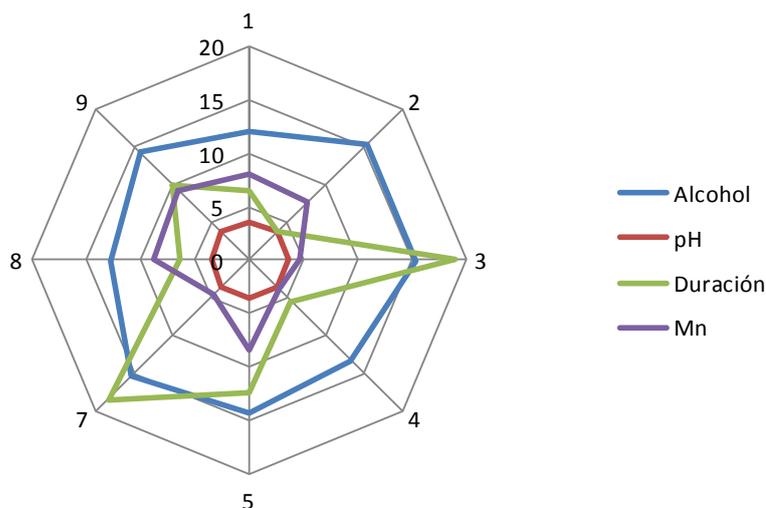


Figura 6.1: Interacción entre los parámetros alcohol, pH, Mn y la duración de la FML.
Las muestras 6 y 10 fueron excluidas por no tener dato de la concentración de Mn.

En el mismo gráfico también se presenta el contenido de alcohol y el pH, dado que estos dos parámetros influyen el desarrollo de la FML (Ribéreau-Gayon et al., 2006a; Davis et al., 1986). En el caso de alcohol, y excluyendo la muestra 2, que tuvo un comportamiento diferente durante la FA, para las muestras 3 y 7 que poseen el mayor contenido alcohólico, también han sido las que presentan la mayor duración de la FML.

El valor de pH para las muestras analizadas, se encuentra dentro del rango que las BAL pueden desarrollarse normalmente. Lo mismo sucede con el contenido de dióxido de azufre total (datos no mostrados).

6.5 Conclusiones

Se caracterizó el contenido de K, Mg, Ca, Na, Fe, Zn, Cu y Mn en vinos Tannat del Uruguay. Para todos los elementos los valores de concentración hallados estuvieron dentro del rango de concentraciones reportadas para vinos regionales y extraregionales, sin embargo la variabilidad de concentración de cada uno de los elementos fue menor que la reportada en otros trabajos.

La metodología para la determinación de Mn mediante FAAS, que se adoptó para este trabajo, cumplió con la finalidad buscada.

De los elementos que pueden tener incidencia en el crecimiento de las BAL se encontró que para el caso de Mg, Na y Fe las concentraciones determinadas en los vinos Tannat tuvieron valores muy por debajo de valor de tolerancia.

Para el caso de Cu y Zn, donde está previsto por la normativa internacional valores máximos permitidos, la concentración de ambos elementos se encuentran por debajo. A su vez la concentración para ambos elementos estuvo por debajo del valor de tolerancia para las bacterias lácticas.

El contenido de Mn se encontró por debajo de los requerimientos de las BAL, sin embargo la FML transcurrió hasta completitud en las elaboraciones analizadas. La dinámica de la FML en estas elaboraciones analizadas fue más lenta de lo habitual, pero la causa asignable no puede decirse que es el contenido de Mn.

Capítulo 7

7 Conclusiones generales y perspectivas

Los resultados que se obtuvieron en el desarrollo de este trabajo de tesis, y que fueron presentados individualmente en cada uno de los capítulos planteados, permiten exponer una serie de conclusiones en forma global:

-fue posible obtener una colección de cepas de bacterias lácticas autóctonas, aisladas a partir de vinificaciones industriales locales durante la fermentación maloláctica. Estas cepas fueron utilizadas durante el desarrollo de esta tesis y se generó un banco de cepas como insumo para investigaciones futuras.

-se desarrollaron las condiciones de conservación, en medio Skim milk (Difco[®]) a -70°C, para las cepas comerciales y las cepas autóctonas. Además se establecieron condiciones para lograr recuperar cepas de bacterias lácticas autóctonas obtenidas a partir de vinificaciones, desde su medio de conservación, manteniendo la pureza y viabilidad.

-se adoptó el método EGA (Agar Esculina Glicerol) para la caracterización de la actividad β -glucosidasa, en bacterias lácticas autóctonas obteniéndose resultados consistentes con el método *p*-NPG. El método EGA presenta la ventaja adicional de ser rápido, sencillo y de bajo costo. Los resultados obtenidos de la actividad β -glucosidasa por el método EGA, permitieron clasificar a las cepas en función de su potencial actividad. De este modo fue posible seleccionar aquellas cepas de bacterias lácticas que presentaron la mayor actividad. Su inoculación en un medio similar vino permitió una mayor liberación de compuestos aromáticos sobre precursores glicosídicos de la variedad Tannat durante la fermentación maloláctica.

- se optimizaron las condiciones para el crecimiento de las cepas de bacterias lácticas (BAL), tanto comerciales como autóctonas, y para que se completara la fermentación maloláctica (FML) en un medio similar vino formulado con glicósidos de Tannat. Las condiciones experimentales óptimas para la fermentación maloláctica fueron: pH 3,5, anaerobiosis (cámara de anaerobiosis con generados AnaeroGen[®]), a 25° C, con un tiempo de

incubación de 2 semanas. El extracto de glicósidos de Tannat utilizado para preparar el medio similar vino fue caracterizado liberando enzimáticamente las agliconas que fueron estudiadas mediante espectrometría de masa.

El modelado de la fermentación maloláctica utilizando las cepas seleccionadas, permitió verificar la existencia de compuestos que pueden sufrir cambios en su concentración al ser liberados a partir de sus formas glicosidadas y/o transformados durante la FML. Por lo tanto este medio similar vino posibilitó la evaluación de la actividad β -glucosidasa de las BAL durante la FML a través de la cuantificación de los compuestos liberados en comparación con un testigo sin cepa en las mismas condiciones de incubación.

-todas las cepas autóctonas de BAL presentaron actividad β -glucosidasa produciendo liberación de agliconas correspondientes a terpenos, norisoprenoides, compuestos fenólicos y compuestos de C6. Por otra parte la metodología empleada, utilizando un medio similar vino conteniendo glicósidos de Tannat permitió evaluar la liberación de compuestos aromáticos a partir de precursores glicosidados utilizando cepas de bacterias lácticas autóctonas.

-el estudio individual por compuesto y por cepa permitió establecer diferencias por compuesto entre cepas. La diversidad y las características sensoriales de los compuestos identificados, demostró que la selección y utilización de cepas de bacterias lácticas autóctonas es una herramienta que puede ser utilizada para desarrollar aromas capaces de aportar complejidad y atributos positivos al vino.

El análisis de los resultados mostró que la cepa que presentó la menor actividad β -glucosidasa determinada por el método EGA fue también la que presentó la menor liberación de compuestos aromáticos a partir de precursores glicosidados de Tannat utilizando el medio similar vino. Lo opuesto también fue verificado: las cepas que presentaron la mayor actividad β -glucosidasa determinada por el método EGA, también fueron de las que presentaron la mayor liberación de compuestos aromáticos. Por lo tanto, el método EGA puede utilizarse como un método de screening, para selección de cepas que son capaces de la liberación de compuestos aromáticos a partir de precursores glicosidados.

-la evaluación de color en las fermentaciones permitió constatar diferencias significativas entre cepas.

Se demostró que la pérdida de color se relaciona con una pérdida de antocianos y del contenido de polifenoles totales para todas las cepas de bacterias lácticas. A su vez para las cuatro cepas ensayadas se verificó un aumento del valor de matiz respecto al testigo que, desde el punto visual, manifestó un tono más anaranjado en comparación con el testigo. La cepa UYLC37 fue la que presentó el mejor desempeño ya que fue la que originó la menor pérdida de intensidad colorante luego de la fermentación maloláctica realizada en el medio símil vino.

-el contenido de K, Mg, Ca, Na, Fe, Zn, Cu y Mn en vinos Tannat del Uruguay estudiados se encontró dentro del rango de concentraciones reportadas para vinos regionales y extraregionales.

La variabilidad de concentración de cada uno de los elementos en las muestras analizadas fue menor que la reportada, lo que significa que el perfil de los metales en los vinos Tannat podría utilizarse para su georeferenciación al poseer diferencias con otros vinos del mundo. Este fenómeno deberá ser verificado mediante una validación estadística analizando un número mucho mayor de muestras.

-los contenidos de Mg, Ca, Na, Fe, Zn, Cu y Mn en los vinos no superan los valores inhibitorios para el crecimiento de las bacterias lácticas, por lo que se concluye que no fueron la causa de las FML enlentecidas en las elaboraciones industriales de vinos Tannat.

Por otra parte para el caso de Mn, que resulta ser un metal esencial, su concentración se encuentra por debajo de los requerimientos de las bacterias lácticas, sin embargo la fermentación maloláctica transcurrió hasta completitud en las elaboraciones analizadas. La dinámica de la fermentación maloláctica en estas elaboraciones analizadas fue más lenta de lo habitual, pero para concluir que la causa asignable fue el contenido de Mn, sería necesario evaluarlo tanto en la uva como en el mosto.

Siendo este trabajo de tesis el primero realizado para el aislamiento y caracterización de cepas de bacterias lácticas autóctonas en vinos Tannat en Uruguay, y en función de los resultados obtenidos en cuanto a la posibilidad de selección de cepas con mayor liberación de compuestos aromáticos, las perspectivas a futuro involucrarían la utilización en condiciones de vinificación industriales.

En resumen y en función de la información recabada en este trabajo, se puede afirmar que el control de las condiciones de la atmósfera de incubación es crítico para lograr el crecimiento

de las bacterias lácticas autóctonas. Por lo tanto el diseño de un sistema de multiplicación y conservación de estas bacterias para su uso a nivel industrial es un aspecto crítico que debe ser atendido con el mismo nivel de relevancia que la caracterización genética de las cepas.

Finalmente, se puede concluir que se debe seguir investigando el rol del Mn en el metabolismo de las bacterias lácticas, su contenido en el vino, y el vínculo con la concentración que es indispensable para el desarrollo de las bacterias lácticas.

Referencias bibliográficas

- Acuña-Avila, P. E., Vásquez-Murrieta, M. S., Franco Hernández, M. O., López-Cortéz, M. S. (2016). Relationship between the elemental composition of grapeyards and bioactive compounds in the Cabernet Sauvignon grapes *Vitis vinífera* harvested in Mexico. *Food Chem.*, 203, 79–85.
- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. 4th ed. Carol Stream: allured Publ.Corp.
- Antalick, G., Perello, M. C., de Revel, G. (2012). Characterization of fruity aroma modifications in red wine during malolactic fermentation. *J. Agric. Food Chem.*, 60, 12371-12383.
- APHA, AWWA, WPCF. (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington: A. P. Association Ed.
- Archibald, F. (1983). *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *Microbiology Letters*, 19, 29-32.
- Avedovech, R. M., Mcdaniel, M. R., Watson, B. T., Sandine, W. E. (1992). An evaluation of combination of wine yeast and *Leuconostoc oeni* in malolactic fermentation of Chardonnay wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 43, 253-260.
- Azcarate, S. M., Martínez, L. D., Savio, M., Camiña, J. M., Gil, R. A. (2015). Classification of monovarietal Argentinean White wines by their elemental profile. *Food Control*, 57, 268 - 274.
- Badotti, F., Moreira, A., Tonon, L., de Lucena, B., Gomes, F., Kruger, R., Thompson, F. (2014). *Oenococcus alcoholitolerans* sp. nov., a lactic acid bacteria isolated from cachaca and ethanol fermentation processes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106, 1259-1267.
- Bae, S., Fleet, G. H., Heard, G. M. (2006). Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *J. Appl. Microbiol.*, 100, 712–727.
- Bandara, N., Jo, J., Ryu, S., Kwang-Pyo, K. (2012). Bacteriophages BCP1-1 and BCP8-2 require divalent cations for efficient control of *Bacillus cereus* in fermented foods. *Food Microbiol.*, 31, 9-16.
- Baran, E. J. (1995). *Química Bioinorgánica*. Madrid: McGraw-Hill.

- Barbagallo, R., Spagna, G., Palmieri, R., Torriani, S. (2004). Assessment of β -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, 34, 292-296.
- Bartowsky, E. (2005). *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation moving into the molecular arena. *Aust. J. of Grape Wine Res.*, 11, 174-187.
- Bartowsky, E. E., Pretorius, I. S. (2009). Microbial Formation and Modification of Flavor and Off-Flavor Compounds in Wine. En H. König, *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (págs. 209-231). Berlin: Springer-Verlag.
- Bartowsky, E. J., Borneman, A. R. (2011). Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 92, 441-447.
- Bartowsky, E. J., Henschke, P. A. (2004). The 'buttery' attribute of wine – diacetyl – desirability, spoilage and beyond. *Int. J. Food Microbiol.*, 96, 235-252.
- Bartowsky, E. J., Francis, I. L., Bellon, J. R., Henschke, P. A. (2002). Is buttery perception in wines predictable from diacetyl concentration? *Aust. J. Grape Wine Res.*, 8, 180-185.
- Bartowsky, E., Costello, P., Chambers, P. (2015). Emerging trends in the application of malolactic fermentation. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 21, 663-669.
- Baumes, R., Wirth, J., Bureau, S., Günata, Y., Razungles, A. (2002). Biogenesis of C13-norisoprenoid compounds: experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines. *Anal. Chim. Acta*, 458, 3-14.
- Bentlin, F., Pulgati, F., Dressler, V. L., Pozebon, D. (2011). Elemental analysis of wines of South America and their classification according to country. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2, 327-336.
- Berger, R. G. (2007). *Flavours and Fragrances*. Berlin: Springer.
- Blanchard, P. (1999). Tannat en Pyreneos Atlanticos. *An*, 94-99.
- Bloem, A., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A., de Revel, G. (2007). Vanillin production from simple phenols by wine associated lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.*, 44, 62-67.
- Bloem, A., Lonvaud-Funel, A., de Revel, G. (2008). Hydrolysis of glycosidically bound flavour compounds from oak wood by *Oenococcus oeni*. *Food Microbiol.*, 25, 99-104.
- Blomqvist, J., Sánchez Nogué, V., Gorwa-Grauslund, M., Passoth, V. (2012). Physiological requirements for growth and competitiveness of *Dekkera bruxellensis* under oxygen limited or anaerobic conditions. *Yeast*, 29, 265-274.
- Blouin, J., Guimberteau, G. (2012). *Maduración y madurez de la uva*. Madrid: Mundi-Prensa.

- Boido, E., Lloret, A., Medina, K., Carrau, F., Dellacassa, E. (2002a). Effect of β -glycosidase activity of *Oenococcus oeni* on the glycosylated flavor precursors of Tannat wine during the malolactic fermentation. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2344-2349.
- Boido, E. (2002b). *Modificaciones producidas por la fermentación maloláctica en la fracción aromática de los vinos Tannat. Tesis de doctorado*. Montevideo: Universidad de la República.
- Boido, E., Dellacassa, E., Carrau, F., Moyna, P. (1999). An improved mean of monitoring malolactic fermentation in wines by TLC densitometry. *J. Planar Chromatogr.*, 12, 269-271.
- Boido, E., Fariña, L., Carrau, F., Dellacassa, E., Cozzolino, D. (2013). Characterization of Glycosylated Aroma Compounds in Tannat Grapes and Feasibility of the Near Infrared Spectroscopy Application for their Prediction. *Food Anal. Methods*, 6, 100-111.
- Boido, E., Lloret, A., Medina, K., Fariña, L., Carrau, F., Versini, G., Dellacassa, E. (2003). Aroma Composition of *Vitis vinífera* Cv. Tannat: the Typical Red Wine from Uruguay. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 5408-5413.
- Borneman, A. R., Bartowsky, E. J., Mc Carthy, J. (2010). Genotypic diversity in *Oenococcus oeni* by High-density microarray comparative genome hybridization and whole genome sequencing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86, 681-691.
- Borneman, A. R., McCarthy, J. M., Chambers, P. J., Bartowsky, E. J. (2012). Functional divergence in the genus *Oenococcus* as predicted by genome sequencing of the newly-described species, *Oenococcus kitaharae*. *PLoS ONE* 7, 1-10.
- Boschetti, W., de Oliveira Rios, A., Rampazzo, R. T., Hertz, P., Dessuy, M. B., Manfroi, V., Ferrao, M. F. (2013). Detection of the origin of Brazilian wines based on the determination of only four elements using high-resolution continuum source flame AAS. *Talanta*, 111, 147-155.
- Boulton, R. (2001). The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 52, 67-87.
- Boyaval, P. (1989). Lactic acid bacteria and metal ions. *Lait*, 69, 87-113.
- Cameira-dos-Santos, P. J., Brillouet, J., Cheynier, V., Moutounet, M. (1996). Detection and Partial Characterisation of New Anthocyanin-Derived Pigments in Wine. *J. Sci. Food Agric.*, 70, 204-208.

- Capozzi, V., Ladero, V., Beneduce, L., Fernández, M., Alvarez, M., Benoit, B., Spano, G. (2011). Isolation and characterization of tyramine producing *Enterococcus faecium* strains from red wine. *Genoma Biol. Evol.*, 7, 1506-1518.
- Cappello, M. S., Zapparoli, G., Logrieco, A., Bartowsky, E. (2017). Linking wine lactic acid bacteria diversity with aroma and flavour. *Int. J. Food Microbiol.*, 243, 16-27.
- Cappello, M.S., Zapparoli, G., Stefani, D., Logrieco, A. (2010). Molecular and biochemical diversity of *Oenococcus oeni* strains isolated during spontaneous malolactic fermentation of Malvasia Nera wine. *Syst. Appl. Microbiol.*, 33, 461-467.
- Carrau, F. M., Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gaggero, C., Dellacassa, E., Henschke, P. A. (2005). De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.*, 243, 107-115.
- Carrau, F., Boido, E., Dellacassa, E. (2008). Terpenoides in grapes and wines: origin and micrometabolism during the vinification process. *Nat. Prod. Commun.*, 4, 577-592.
- Carrau, F., Medina, K., Fariña, L., Boido, E., Dellacassa, E. (2010). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* inoculum size on wine fermentation aroma compounds and its relation with assimilable nitrogen content. *Int. J. Food Microbiol.*, 143, 81-85.
- Carrau, F., Boido, E., Gaggero, C., Medina, F., Fariña, L., Disegna, E., Dellacassa, E. (2011). *Vitis vinifera* Tannat, chemical characterization and functional properties. Ten years of research. En R. Filip, *Multidisciplinary approaches on Food Science and Nutrition for the XXI Century*. (págs. 53-71). Kerala: Transworld Research Network.
- Carreté, R., Reguant, C., Rozès, N., Constantí, M., Bordons, A. (2006). Analysis of *Oenococcus oeni* Strains in Simulated Microvinifications with Some Stress Compounds. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57, 356-362.
- Castagnino, C., Vercauteren, J. (1996). Castavinol, a new series of polyphenols from Bordeaux red wines. *Tetrahedron Lett.*, 37, 7739-7742.
- Clarke, R. J., Bakker, J. (2004). *Wine Flavour Chemistry*. Oxford: Blackwall Publishing Ltd.
- Coetzee, C., du Toit, W. J. (2012). A comprehensive review on Sauvignon Blanc aroma with a focus on certain positive volatile thiols. *Food Res. Int.*, 45, 287-298.
- Constantini, A., García-Moreno, E., Moreno-Arribas, M. V. (2009). Biochemical Transformations Produced by Malolactic Fermentation. En M. V. Moreno-Arribas, & M. C. Polo, *Wine Chemistry and Biochemistry*. 1st ed., págs. 23-53. New York: Springer.

- Cordonnier, R., Bayonave, C. (1974). Mise en évidence dans la baie de raisin variété Muscat d' Alexandrie, de monoterpènes liés révélables par une ou plusieurs enzymes du fruit. *Comptes Rendus Acad. Sci*, 278, 3390-3397.
- Costello, P. J., Henschke, P. A. (2002). Mousy Off-Flavor of Wine: Precursors and Biosynthesis of the Causative N-Heterocycles 2-Ethyltetrahydropyridine 2-Acetyltetrahydropyridine, and 2-Acetyl-1-pyrroline by *Lactobacillus hilgardii* DSM 20176. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 7079-7087.
- Costello, P. J., Francis, I. L., Bartowsky, E. J. (2012). Variations in the effect of malolactic fermentation on the chemical and sensory properties of Cabernet Sauvignon wine: interactive influences of *Oenococcus oeni* strain and wine matrix composition. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 18, 287-301.
- Costello, P. J., Henschke, P. A., Markides, A. (2003). Standardised methodology for testing malolactic bacteria and wine yeast compatibility. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 9, 127-137.
- Costello, P. J., Marrinson, G. J., Lee, T. H., Fleet, G. H. (1983). Numbers and species of lactic acid bacteria in wines during vinification. *Food Technol. Aust.*, 35, 14-18.
- Costello, P. J., Siebert, T. E., Solomon, M. R., Bartowsky, E. J. (2013). Synthesis of fruity ethyl esters by acyl coenzyme A: alcohol acyltransferase and reverse esterase activities in *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.*, 114, 797-806.
- Coucheney, F., Desroche, N., Bou, M., Tourdot-Maré, R., Guzzo, J. (2005). A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters. *Int. J. Food Microbiol.*, 105, 463-470.
- Couto, J. A., Campos, F. M., Figueredo, A. R., Hogg, T. A. (2006). Ability of lactic acid bacteria to produce volatile phenols. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57, 166-171.
- D'Incecco, N., Bartowsky, E., Kassara, S., Lantea, A., Spettoli, P., Henschke, P. (2004). Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation. *Food Microbiol.*, 21, 257-265.
- Darriet, P., Bouchilloux, P., Poupot, C., Bugaret, M., Clerjeau, M., Sauris, P., Dubourdieu, D. (2001). Effects of copper fungicide spraying on volatile thiols of the varietal aroma of Sauvignon blanc, Cabernet Sauvignon and Merlot wines. *Vitis*, 40, 93-99.
- Davis, C. R., Wibowo, R. D., Lee, T. H., Fleet, G. H. (1986). Growth and metabolism of lactic acid bacteria during and after malolactic fermentations of wines at different pH. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 539-545.

- de Frutos, E., Beretta, A. (1999). *Un siglo de tradición. Primera historia de uvas y vinos del Uruguay*. Montevideo: Santillana.
- de Revel, G., Martin, N., Pripis-Nicolau, L., Lonvaud-Funel, A., Bertrand, A. (1999). Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4003- 4008.
- Di Stéfano, R., Cravero, M. (1990). Frazionamento dei polifenoli dei vini rossi. *Riv. Vitic. Enol.*, 3, 99-106.
- Di Stéfano, R., Cravero, M., Gentilini, N. (1989). Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. *L' Enotecnico*, 83-89.
- Dicks, L. M., Endo, A. (2009). Taxonomic status of lactic acid bacteria in wine and key characteristics to differentiate species. *S. Afr. J. Enol. Viticult.*, 30, 72-90.
- Disegna, E., Rodriguez, P., Ferreri, J. (2001). Efecto de los diferentes portainjertos en la producción de uvas y calidad de vinos de la variedad Tannat. *VII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología*. Montevideo.
- du Toit, M., Engelbrecht, L., Lerm, E., Krieger-Weber, S. (2011). *Lactobacillus*: the next generation of malolactic fermentation starter cultures an overview. *Food Bioprocess Technol.*, 4, 876-906.
- Dufour, C., Bayonave, C. L. Influence of wine structurally different polysaccharides on the volatility of aroma substances in a model system (1999). *J. Agric Food Chem.*, 47, 671-677.
- Dugelay, I., Baumes, R. R., Gunata, Z., Razungles, A., Bayonave, C. (1995). Evolution de l'arome au cours de la conservation du vin: formation de 4-(1-ethoxyethyl)-phenol et 4-(1-ethoxyethyl)-guaiacol. *Sci. Alim.*, 41, 423-433.
- Eades, C. H., Womack, M. (1953). Calcium as a growth stimulant for *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.*, 65, 322-325.
- Edwards, C., Beelman, R. B., Bartley, C., Mc Conell, A. L. (1990). Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification. *Am. J. Enol. Vitic.*, 41, 48-56.
- Edwards, C. G., Peterson J.C. (1994). Sorbent Extraction and Analysis of Volatile Metabolites Synthesized by Lactic Acid Bacteria in a Synthetic Medium. *J. Food Sci.*, 59, 192-195.
- Elleuche, S., Fodor, K., Klippel, B., Von der Heyde, A., Wilmanns, M., Antranikian, G. (2013). Structural and Biochemical characterisation of a NAD (+) dependent alcohol

- dehydrogenase from *Oenococcus oeni* as a new model molecule for industrial biotechnology applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97, 8963–8975.
- Endo, A., Okada, S. (2006). *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting *Oenococcus* isolated from a compositing distilled shochu residue. *Int. J. Syst. Evol. Bacteriol.*, 56, 2345-2348.
- ENTAV. (21 de 11 de 2017). Obtenido de Establissement National Technique pour l'Amelioration de la Viticulture.: <http://www.vignevin.com>
- Fariña, L., Carrau, F., Boido, E., Disegna, E., Mendez, M., Medina, K., Dellacassa, E. (2004). Caracterización Quimiotaxonómica de la *Vitis vinifera* var. Tannat. Importancia de las fracciones glicosidadas en la uva y el vino. *Ingeniería y Ciencia Química*, 21, 20-24.
- Fariña, L., Villar, V., Ares, G., Carrau, F., Dellacassa, E., Boido, E. (2015). Volatile composition and aroma profile of Uruguayan Tannat wines. *Food Res. Int.*, 69, 244-255.
- Feng, M. H., Lalor, B., Hu, S. W., Mei, J., Huber, A., Kidby, D., Holbein, B. (1997). Inhibition of yeast growth in grape juice through removal of iron and other metals. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 32, 21-28.
- Ferreira, V., Lopez, R., Cacho, J. F. (2000a). Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1659-1667.
- Ferreira, V., Ortega, L., Escudero, A., Cacho, J. (2000b). A Comparative Study of the Ability of Different Solvents and Adsorbents to Extract Aroma Compounds from Alcoholic Beverages. *J. Chromatogr. Sci.*, 38, 469-476.
- Fia, G., Giovani, G., Rosi, I. (2005). Study of β -glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation. A new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. *J. Appl. Microbiol.*, 99, 509-517.
- Figueiredo, A. R., Campos, F., de Freitas, V., Hogg, T., Couto, J. A. (2008). Effect of phenolic aldehydes and flavonoides on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Food Microbiol.*, 25, 105-112.
- Flamini, R., Tomasi, D. (2000). The anthocyanin content in berries of the Hybrid grape cultivars Clinton and Isabella. *Vitis*, 39, 79-81.
- Flanzy, C. (2000). *Fundamentos científicos y tecnológicos*. Madrid: Mundi Prensa Libros S.A. : A. Madrid Vicente, Ediciones.
- Forbes, B., Sahm, D., Weissfeld, A. (2009). *Bailey y Scotts Diagnóstico Microbiológico*. 12^a ed. Madrid: Médica Panamericana.

- FPS UC Davis. (10 de 12 de 2017). Obtenido de Foundation Plant Service. University of California, Davis.: <http://www.fps.ucdavis.edu>
- Fugelsang, K., Edwards, C. (2007). *Wine Microbiology*. 2nd ed. New York: Springer.
- Gagné, S., Lucas, P.M., Perello, M.C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., De Revel, G. (2011). Variety and variability of glycosidase activities in an *Oenococcus oeni* strain collection tested with synthetic and natural substrates. *J. Appl. Microbiol.*, 110, 118-128.
- G-Alegría, E., López, I., Ruiz, J. I., Sáenz, J., Fernández, E., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F. (2004). High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiol. Lett.*, 230, 53-61.
- Galgano, F., Favati, F., Caruso, M., Scarpa, T., Achille Palma, A. (2008). Analysis of trace elements in the southern Italian wines and their classification according to provenance. *LWT - Food Sci. Technol.*, 41, 1808 - 1815.
- Gámbaro, A., Boido, E., Zlotejablko, A., Medina, K., Lloret, A., Dellacassa, E., Carrau, F. (2001). Effect of malolactic fermentation on the aroma properties of Tannat wine. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 7, 27-32.
- Gámbaro, A., Varela, P., Boido, E., Gimenez, A., Medina, K., Carrau, F. (2003). Aroma characterization of commercial red wines of Uruguay. *J. Sens. Stud.*, 18, 353-366.
- García-Carpintero, E. G., Gómez Gallego, M. A., Sánchez-Palomo, E., González Viñas, M. A. (2012). Impact of alternative technique to ageing using oak chips in alcoholic or in malolactic fermentation on volatile and sensory composition of red wines. *Food Chem.*, 134, 851-863.
- García-Carpintero, E. G., Sánchez-Palomo, E., González Vinas, M. A. (2014). Volatile composition of Bobal red wines subjected to alcoholic/malolactic fermentation with oak chips. *LWT - Food Sci. Technol.*, 55, 586-594.
- Gendy, S. (1983). Fermented Foods of Egypt and the Middle. *J. Food Protection*, 46, 358-367.
- Gerbaux, V., Briffox, C., Dumont, A., Krieger, S. (2009). Influence of inoculation bacteria on volatile phenols in wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 60, 233-235.
- Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. 2e Partie: Mesure origine et interpretation. *Conn. vigne et Vin*, 4, 253-271.

- González, P., Prieto-Hernández, V., Pistón, M. (2013). Determinación de sodio, calcio y cobre en vinos uruguayos y estudio de la relación de estos elementos con el tipo de vino. *Av. cien. ing.*, 4, 27-35.
- González-Neves, G., Barreiro, L., Gil, G., Franco, J., Ferrer, M., Moutounet, M., Carbonneau, A. (2004). Anthocyanic composition of Tannat grapes from the south region of Uruguay. *Anal. Chim. Acta*, 513, 197-202.
- González-Neves, G., Gil, G., Barreiro, L., Favre, G. (2010). Pigment profile of red wines cv. Tannat made with alternative winemaking techniques. *J. Food Compost. Anal.*, 23, 447-454.
- Grimaldi, A., Bartowsky, E., Jiranek, V. (2005a). Screening of *Lactobacillus* spp. And *Pediococcus* spp. for glycosidase activities that are important in oenology. *J. Appl. Microbiol.*, 99, 1061-1069.
- Grimaldi, A., Bartowsky, E., Jiranek, V. (2005b). A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *Int. J. Food Microbiol.*, 105, 233-244.
- Grimaldi, A., McLean, H., Jiranek, V. (2000). Identification and partial characterization of glycosidic activities of commercial strains of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Am. J. Enol. Vitic.*, 51, 362-369.
- Guerrero, M., Herce-Pagliai, H., Camean, A., Troncoso, A., Gonzalez, A. (1997). Multivariate characterization of wine vinegars from the south of Spain according to their metallic content. *Talanta*, 45, 379-386.
- Guilloux-Benatier, M., Son, H. S., Bouhier, S., Feuillat, M. (1993). Activités enzymatiques glycosidases et peptidase chez *Leuconostoc oenos* au cours de la croissance bactérienne. Influence des macromolécules de levures. *Vitis*, 32, 51-57.
- Günata, Y. Z., Bayonove, C. L., Tapiero, C., Cordonnier, R. E. (1990). Hydrolysis of grape monoterpenyl β -D-glucosides by various β -glucosidases. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1232-1234.
- Günata, Y., Bayonove, C., Baumes, R., Cordonnier, R. (1985). The aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidally bound fractions of some grape aroma components. *J. Chromatogr.*, 331, 83-90.
- Günata, Z. Y., Bitteur, S., Brillouet, J. M., Bayonave, C. L., Cordonnier, R. E. (1988). Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grapes. *Carbohydr. Res.*(184), 139-149.
- Guth, H. (1997). Identification of character impact odorants of different white wine varieties. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3027-3032.

- Guzzo, J., Desroche, N. (2009). Physical and Chemical Stress Factors in Lactic Acid Bacteria. En H. König, *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. (págs. 293-306). Berlín: Springer-Verlag.
- Harold, F. M., Van Brunt, J. (1977). Circulation of H⁺ and K⁺ across the plasma membrane is not obligatory for bacterial growth. *Science*, 197, 372-373.
- Herjavec, S., Tupajic, P. (1998). Changes in acidity, some aroma compounds and sensory properties of Frankovka wine after malolactic fermentation. *Food Technol. Biotechnol.*, 36, 209-213.
- Hernández, L., Espinosa, J., Fernández-González, M., Briones, A. (2003). β -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *Int. J. Food Microbiol.*, 80, 171-176.
- Hernandez-Orte, P., Cersosimo, M., Loscosa, N., Cacho, J., Garcia-Moruno, E., Ferreira, V. (2009). Aroma development from non-floral grape precursors by wine lactic acid bacteria. *Food Res. Int.*, 42, 773-778.
- Hornsey, I. (2007). *The Chemistry and Biology of Winemaking*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- House, J. (2013). *Inorganic Chemistry*. 2nd ed. Oxford: Elsevier.
- Hurst, A., Lazarus, W. (1968). Calcium uptake during growth of *Streptococcus lactis*. *Nature*, 219, 404-405.
- Ibarz, M. J., Ferreira, V., Hernández-Orte, P., Loscos, N., Cacho, J. (2006). Optimization and evaluation of a procedure for the gas chromatographic–mass spectrometric analysis of the aromas generated by fast acid hydrolysis of flavor precursors extracted from grapes. *J. Chromatogr. A*, 1116, 217-229.
- INAVI. (2017a). Obtenido de Instituto Nacional de Vitivinicultura: <http://www.inavi.com.uy> consultado el 12 de diciembre de 2017.
- INAVI. (2017b). *Estadísticas de viñedos 2017. Datos Nacionales*. Las Piedras: Instituto Nacional de Vitivinicultura.
- INRA. (2018). *PlantGrape*. Obtenido de PlantGrape Institut national de la recherche agronomique : <http://plantgrape.plantnet.project.org> consultado el 3 de marzo de diciembre de 2017.
- Izquierdo-Cañas, P. M., Mena-Morales, A., García-Romero, E. (2016). Malolactic fermentation before or during wine aging in barrels. *LWT- Food Sci. Technol.*, 66, 468-474.

- Jacobson, J. L. (2006). *Introduction to wine Laboratory Practices and Procedures*. 1st ed. New York: Springer.
- Janus, A., Capone, D. L., Puglisi, C. J., Perkins, M. V., Elsey, G. M., Sefton, M. A. (2003). (E)-1-(2,3,6-trimethylphenyl)buta-1,3-diene: a potent grape-derived odorant in wine. *J. Agric. Food Chem.*, 26, 7759-7763.
- Juega, M., Constantini, A., Bonello, F., Cravero, M., Martínez-Rodríguez, A., Carrascosa, A., García-Moruno, E. (2013). Effect of malolactic fermentation on the composition and sensory profile of Albarino and Caino white wines by *Pediococcus damnosus*. *J. Appl. Microbiol.*, 116, 586-595.
- Jurado, J. M., Alcázar, A., Palacios-Morillo, A., de Pablos, F. (2012). Classification of Spanish DO white wines according to their elemental profile by means of support vector machines. *Food Chem.*, 135, 898- 903.
- Kment, P., Mihaljevic, M., Ettler, V., Strnad, L., Sebek, O., Rohlova, L. (2005). Differentiation of Czech wines using multielement composition- A comparison with vineyard soil. *Food Chem.*, 91, 157 - 165.
- Knockaert, D., Raes, K., Willi, C., Struijs, K., Van Camp, J. (2012). Metabolism of ferulic acid during growth of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus collinoides*. *J. Sci. Food Agric.*, 92, 2291-2296.
- König, H., Gutfried, U., Fröhlich, J. (2009). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Berlín: Springer-Verlag.
- Krieger-Weber, S. (2009). Application of Yeast and Bacteria as Starter Cultures. En H. König, G. Uden, J. Fröhlich, *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (págs. 489-511). Berlín: Springer-Verlag.
- Lara, R., Cerutti, S., Salonia, J. A., Olsina, R. A., Martinez, L. D. (2005). Trace element determination of Argentine wines using ETAAS and USN-ICP-OES. *Food Chem. Toxicol.*, 43, 293-297.
- Lee, H. S. (2002). Characterisation of major anthocyanins and the color of red-fleshed blood orange (*Citrus sinensis*). *J. Agric. Food Chem.*, 50, 1243-1246.
- Liu, S. Q. (2002). A review: malolactic fermentation in wine beyond deacidification. *J. Appl. Microbiol.*, 92, 589-601.
- Liu, S. Q., Davis, C. R., Brooks, J. D. (1995). Growth and metabolism of selected lactic acid bacteria in sythetic wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 166-174.
- Lockshin, L., Corsi, A. M. (2012). Consumer behaviour for wine 2.0: A review since 2003 and future directions. *Wine Economics and Policy*, 1, 2-23.

- Lonvaud-Fonel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, 317-331.
- Lonvaud-Fonel, A., Joyeux, A., Desens, C. (1988). Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism. *J. Sci Food Agric.*, 44, 183-191.
- López de Lerma, N., Bellicontro, A., Mencarelli, F., Moreno, J., Peinado, R. A. (2012). Use of electronic nose, validated by GC-MS, to establish the optimum off-vine dehydration time of wine grapes. *Food Chemistry. Food Chem.*, 130, 447-452.
- Loscos, N., Hernández-Orte, P., Cacho, J., Ferreira, V. J. (2007). Release and formation of varietal aroma compounds during alcoholic fermentation from nonfloral grape odorless flavor precursors fractions. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 6674-6684.
- Louvaud-Fonel, A., Joyeux, A., Ledoux, O. (1991). Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non isotopic DNA probes. *J. Appl. Bacteriol.*, 71, 501-508.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D., Clark, D. P. (2010). *Brock Biology of microorganisms*. 13th ed. San Francisco: Pearson.
- Maga, J. A. (1973). Taste thresholds values for phenolic acids which can influence flavor properties of certain flours, grains and oilseeds. *Cereal Sci.Today*, 18, 326-330.
- Maicas, S., Mateo, J. J. (2005). Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other grape juice: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67, 322-335.
- Maicas, S., Gil, J., Pardo, I., Ferrer, S. (1999). Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. *Food Res. Int.*, 32, 491-496.
- Makarova, K. S., Koonin, E. V. (2007). Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.*, 189, 1199-1208.
- Malherbe, S., Menichelli, E., du Toit, M., Tredoux, A., Muller, N., Naes, T., Nievwoudt, H. (2013). The relationships between consumer liking, sensory and chemical attributes of *Vitis vinifera* L. cv. Pinotage wines elaborated with different *Oenococcus oeni* starter cultures. *J. Sci Food Agric.*, 93, 2829-2840.
- Mañes-Lazano, R., Ferrer, S., Rosello-Mora, R., Pardo, L. (2009). *Lactobacillus oeni* sp. nov., from wine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59, 2010-2014.
- Martín, A. E., Watling, R. J., Lee, G. S. (2012). The multi-element determination and regional discrimination of Australian wines. *Food Chem.*, 133, 1081-1089.
- Martin, V., Boido, E., Giorello, F., Mas, A., Dellacassa, E., Carrau, F., (2016). Effect of yeast assimilable nitrogen on the synthesis of phenolic aroma compounds by *Hanseniaspora vineae* strains. *Yeast.*, 33, 323-328.

- Martínez-Pinilla, O., Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarán, B. (2012). Sensory profiling and changes in colour and phenolic composition produced by malolactic fermentation in red minority varieties. *Food Res. Inter.*, 46, 286-293.
- Matthews, A., Grbin, P. R., Jiranek, V. (2007). Biochemical characterization of esterase activities of wine lactic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77, 329-337.
- Matthews, A., Grbin, P., Jiranek, V. (2006). A survey of lactic acid bacteria for enzymes of interest to oenology. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 12, 235-244.
- Matthews, A., Grimaldi, A., Walker, M., Bartowsky, E., Grbin, P., Jiranek, V. (2004). Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 5715-5731.
- McLafferty, F. W., Stauffer, D. B. (1991). *The Wiley/NBS registry of mass spectral data*. 5th ed. New York: Wiley.
- Medina, M., Dellacassa, E., Boido, E., Pérez, G. (2011). Efecto de cepas de bacterias lácticas con actividad β – glicosidasa sobre aromas ligados y antocianos en la vinificación. *Segundo Encuentro Nacional de Ciencias Químicas*. Montevideo.
- Medina, M., Dellacassa, E., Boido, E., Perez, G., Fariña, L. (2013). Efecto de cepas de bacterias lácticas con actividad β – glicosidasa sobre aromas ligados y antocianos en la vinificación. *Tercer Encuentro Nacional de Ciencias Químicas*. Montevideo.
- Mesas, J., Rodriguez, M., Alegre, M. (2004). Tolerance of *Oenococcus oeni* RS1 to stress environmental conditions of wine. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4, 278-282.
- Miller, J. N., Miller, J. C. (2010). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 6th ed. Harlow: Pearson.
- Moreno, I. M., Gonzalez-Weller, D., Gutierrez, V., Marino, M., Camean, A. M., Gonzalez, A. G., Hardisson, A. (2007). Differentiation of two Canary DO red wines according to their metal content from inductively coupled plasma optical emission spectrometry and graphite furnace atomic absorption spectrometry by using Probabilistic Neural Networks. *Talanta*, 72, 263-268.
- Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. (2009). *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York: Springer.
- Moreno-Arribas, M. V., Gómez-Cordove, C., Marín-Álvarez, P. J. (2008). Evolution of red wine anthocyanins during malolactic fermentation, postfermentative treatments and ageing with lees. *Food Chem.*, 109, 149-158.
- Moulton, K., Lapsley, J. (2001). *Successful Wine Marketing*. Gaithersburg: Aspen Publishers Inc.

- Mtshali, P. S., Divol, B., van Rensburg, P., du Toit, M. (2010). Genetic Screening of wine-related enzymes in *Lactobacillus* species isolated from South African wine. *J. Appl. Microbiol.*, *108*, 1389-1397.
- Mtshali, P. S. (2011). *Molecular Screening of Lactic Acid Bacteria Enzymes and Their Regulation Under Oenological Conditions*. PhD dissertation, Stellenbosch University.
- Nisiotou, A., Dourou, D., Filippousi, M., Banilas, G., Tassou, C. (2014). *Weisella uvarum* sp.nov. isolated from wine grapes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, *64*, 3885-3890.
- Nisiotou, A., Dourou, D., Filippousi, M., Diamantea, E., Fragkoulis, P., Tassou, C., Banilas, G. (2015). *Biomed. Res. Int.*, *2015*, 9-17.
- Nonier Bourden, M. F., Vivas, N., Absalon, C., Vitry, C., Fouquet, E., Vivas de Gaulejac, N. (2008). Structural diversity of nucleophilic adducts from flavanols and oak wood aldehydes. *Food Chem.*, *107*, 1494-1505.
- Nonier, M. F., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Vitry, C. (2010). Study by LC/ESI/MS and ESI/HR/MS of SO₂ interactions in flavanols–aldehydes nucleophilic reactions. *Food Chem.*, *122*, 488-494.
- Nonier, M., Pianet, I., Laguerre, M., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N. (2006). Condensation products derived from flavan-3-ol oak wood aldehydes reaction 1. Structural investigation. *Anal. Chim. Acta*, *226847*, 76-83.
- OIV. (2015). *Grapevine varieties' area by country*. París: Organización Internacional de la Viña y el Vino.
- OIV. (2017). *Los datos sobre la coyuntura vitivinícola mundial*. Paris: Organización Internacional de la Viña y el Vino.
- OIV. (2007). *Method OIV-MA-AS2-07B* Obtenido de Organización Internacional de la Viña y el Vino: <http://www.oiv.int>
- OIV. (2011). *Method OIV-MA AS313-11* Obtenido de Organización Internacional de la Viña y el Vino: <http://www.oiv.int>
- OIV (2018). Obtenido de Organización Internacional de la Viña y el Vino: <http://www.oiv.int>
- Oliver, J. D. (2005). The viable but notculturable state in bacteria. *J. Microbiol.*, *43*, 93-100.
- Oszmianski, J., Ramos, T., Bourzeix, M. (1988). Fractionation of phenolic compounds in red wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, *39*, 259-262.
- Palmeri, R., Spagna, G. (2007). β -Glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enzyme Microb. Technol.*, *40*, 382-389.
- Paneque, P., Álvarez-Sotomayor, M. T., Gómez, I. (2009). Metal contents in “oloroso” sherry wines and their classification according to provenance. *Food Chem.*, *117*, 302-305.

- Paneque, P., Álvarez-Sotomayor, M. T., Clavijo, A., Gómez, A. I. (2010). Metal content in southern Spain wines and their classification according to origin and ageing. *Microchem. J.*, 94, 175-179.
- Pepi, S., Sansone, L., Chicca, M., Vaccaro, C. (2017). Relationship among geochemical elements in soil and grapes asterroir fingerprints in *Vitis vinifera* L. cv. "Glera". *Chemie der Erde*, 77, 121–130.
- Pérez Magariño, S., González San José, M. L. (2003). Application of absorbance values used in wineries forestimating CIELAB parameters in red wines. *Food Chem.*, 81, 301-306.
- Pérez Magariño, S., Sánchez- Iglesias, M., Ortega-Heras, M., González-Huertas, C., González-Sanjosé, M. L. (2007). Colour stabilization of red wines by microoxygenation treatment before malolactic fermentation. *Food Chem.*, 101, 881-893.
- Pérez-Martín, F., Seseña, S., Izquierdo, P., Martín, R., Palop, M. (2012). Screening for glycosidase activities of lactic acid bacteria as a biotechnological tool in oenology. *World J Microbiol Biotechnol.*, 28, 1423-1432.
- Pérez-Martín, F., Seseña, S., Izquierdo, P. M., Palop, M. L. (2013). Esterase activity of lactic acid bacteria isolated from malolactic fermentation of red wines. *Int. J. Food Microbiol.*, 163, 153-158.
- Pérez Trujillo, J. P., Conde, J. E., Pérez Pont, M. L., Cámara, J., Marques, J. C. (2011). Content in metallic ions of wines from Madeira and Azores archipelagos. *Food Chem.*, 124, 533-537.
- Pérez, G., Fariña, L., Barquet, M., Boido, E., Gaggero, C., Dellacassa, E., Carrau, F. (2011a). A quick screening method to identify β -glucosidase activity in native wine yeast strains: application of Esculin Glycerol Agar (EGA) medium. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 47-55.
- Pérez, G., Urruty, M., Medina, M., Carrau, F., Dellacassa, E., Boido, E. (2011b). Determinación de la actividad beta-glicosidasa de bacterias lácticas mediante el uso de la técnica agar esulina. *ALAM*. Montevideo.
- Pohl, P. (2007). What do metals tell us about wine? *Trends Analy. Chem.*, 26, 941-949.
- Pozo-Bayon, M. A., Alegría, E., Polo, M. C., Tenorio, C., Martín-Alvarez, P. J., Calvo De La Banda, M. T., Moreno-Arribas, M. V. (2005). Wine volatile and aminoacid composition after malolactic fermentation effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 8729-8735.

- Pripis-Nicolau, L., De Revel, G., Bertrand, A., Lonvaud-Funel, A. (2004). Methionine catabolism and production of volatile sulphur compounds by *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol.*, 96, 1176-1184.
- Provenzano, M. R., El Bilali, H., Simeone, V., Baser, N., Mondelli, D., Cesari, G. (2010). Copper contents in grapes and wines from a Mediterranean organic vineyard. *Food Chem.*, 122, 1338- 1343.
- Razungles, A., Günata, Z., Pinatel, S., Baumes, R., Bayonave, C. (1993). Étude quantitative de composés terpéniques noisoprenoides et de leurs précurseurs dans diverses variétés de raisins. *Sci. Aliments*, 13, 59-72.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2006a). *Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications*. (Vol. 1). 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2006b). *Handbook of Enology. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. (Vol. 2). 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Rivero Huguet, M. E. (2004). Monitoring of Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn in Fine Uruguayan Wines by Atomic Absorption Spectroscopy. *At. Spectrosc.*, 25, 177-184.
- Rodrigues, H., Sáenz-Navajas, M. P., Franco-Luesma, E., Valentin, D., Fernández-Zurbano, P., Ferreira, V., Ballester, J. (2017). Sensory and chemical drivers of wine minerality aroma: An application to Chabalis wines. *Food Chem.*, 230, 553-562.
- Roubelakis-Angelakis, K. (2009). *Grapevine Molecular Physiology and Biotechnology*. 2nd ed. New York: Springer.
- Ruiz, P. I. (2010a). Selection of autochthonous *Oenococcus oeni* strains according to their oenological properties and vinification results. *Int. J. Food Microbiol.*, 137, 230-235.
- Ruiz, P., Izquierdo, P., Seseña, P., Palop, M. (2010b). Analysis of lactic acid bacteria populations during spontaneous malolactic fermentation of Tempranillo wines at five wineries during two consecutive vintage. *Food Control*, 21, 70-75.
- Saint-Cricq de Gaulejac, N., Glories, Y., Vivas, N. (1999). Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines. *Food Res. Int.*, 32, 327-333.
- Sauvageot, F., Vivier, P. (1997). Effects of malolactic fermentation on sensory properties of four Burgundy wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 48, 187-192.
- Scibisz, I., Ziarno, M., Mitek, M., Zareba, D. (2012). Effect of probiotic cultures on the stability of anthocyanins in blueberry yoghurts. *Food Sci. Technol.*, 49, 208-212.

- Selih, S., Sala, M., Drgan, V. (2014). Multi-element analysis of wines by ICP-MS and ICP-OES and their classification according to geographical origin in Slovenia. *Food Chem.*, 414-423.
- Semon, M. J., Edwards, C., Forsyth, D., Dinn, C. (2001). Inducing malolactic fermentation in Chardonnay musts and wines using different strains of *Oenococcus oeni*. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 7, 52-59.
- Shaw J.P., Harayama S. (1990). Purification and characterisation of TOL plasmid-encoded benzyl alcohol dehydrogenase and benzaldehyde dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. *Eur. J. Biochem.* 191,705-714.
- Sixto, A., Noya, L., Medina, M., Mollo, A. (2015). Determinación de metales en vino: avances en el estudio de su perfil según el origen geográfico. *ENAGUI 4*. Montevideo.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R. (2008). *Principios de Análisis Instrumental* . 6^a ed. México D. F.: Cengage Learning Editors.
- Spano, G., Rinaldi, A., Ugliano, M., Moio, L., Beneduce, L., Massa, S. (2005). A β -glucosidase gene isolated from wine *Lactobacillus plantarum* is regulated by abiotic stresses. *J. Appl. Microbiol.*, 98, 855-861.
- Strauss, M., Jolly, N., Lambrechts, M., van Rensburg, P. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.*, 91, 182-190.
- Strickland, M. T., Schopp, L. M., Edwards, C. G., Osborne, J. P. (2016). Impact of *Pediococcus* spp. on pinot noire wine quality and growth of *Brettanomyces*. *Am. J. Enol. Vitic.*, 67, 188-198.
- Sutton, S. (2011). Determination of Inoculum for Microbiological Testing. *Journal of GXP Compliance*, 15, 49-53.
- Swiegers, J., Bartowsky, E., Henschke, P., Petrorius, I. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 139-173.
- Terrade, N., Mira de Orduña, R. (2009a). Determination of the essential nutrient requirements of wine-related bacteria from the genera *Oenococcus* and *Lactobacillus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 133, 8-13.
- Terrade, N., Noël, R., Couillaud, R., Mira de Orduña, R. (2009b). A new chemically defined medium for wine lactic bacteria. *Food Res. Int.*, 42, 363-367.
- Tominaga, T., Baltenweck-Guyot, R., Peyrot Des Gachons, C., Dubourdieu, D. (2000). Contribution of Volatile Thiols to the Aromas of White Wines Made From Several *Vitis vinifera* Grape Varieties. *Am. J. Enol. Vitic.*, 51, 178-181.

- Tong, Y., Zhai, Q., Lu, W., Tian, F., Zhao, J. (2017). New insights in integrated response mechanism of *Lactobacillus plantarum* under excessive manganese stress. *Food Res. Int.*, 102, 323 - 332.
- Ugliano, M., Henschke, P. A. (2009). Yeast and Wine Flavour. En M. V. Moreno-Arribas, & M. C. Polo, *Wine Chemistry and Biochemistry* (págs. 313-292). New York: Springer.
- Ugliano, M., Moio, L. (2005). Changes in the concentration of yeast-derived volatile compounds of red wine during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *J. Agric. Food Chem.*, 26, 10134-10139.
- Ugliano, M., Bartowsky, E. J., Mc Carthy, J., Moio, L., Henschke, P. A. (2006). Hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during fermentation with three *Saccharomyces* yeast strains. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 6322-6331.
- Ugliano, M., Genovese, A., Moio, L. (2003). Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of de *Oenococcus oeni*. *J. Agric. Food Chem*, 55, 5073-5078.
- UNIT. (2017). *UNIT 833:2008- Agua potable requisitos*. Obtenido de www.ose.com.uy
- Versini, G., Dellacassa, E., Carlin, S., Fedrizzi, B., Magno, F. (2008). Analysis of Aroma Compounds in Wine. En R. Flamini, *Hyphenated Techniques in Grape and Wine Chemistry*. Chichester: John Wiley Sons Ltd.
- Vidal, M. T., Poblet, M., Constantí, M., Bordons, A. (2001). Inhibitory Effect of Copper and Dichlofluanid on *Oenococcus oeni* and Malolactic Fermentation. *Am.J. Enol. Vitic.*, 52, 223-229.
- Villamor, R., Evans, M., Mattinson, D., Ross, C. (2013). Effects of ethanol, tannin and fructose on the headspace concentration and potential sensory significance of odorants in a model wine. *Food Res. Int.*, 50, 38-45.
- Vivas, N., Lonvaud-Funel, A., Glories, Y. (1997). Effect of phenolic acids and anthocyanins on growth, viability and malolactic activity of a lactic acid bacterium. *Food Microbiol.*, 14, 291-300.
- Vogel, R. F., Ehrmann, M. A., Gänzle, M. G. (2002). Development and potential of starter lactobacilli resulting from exploration of the sourdough ecosystem. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 631-638.
- Walling, E., Gindreau, E., Lovaud-Fonel, A. (2005). A putative glucan synthase gene dps detected in exopolysaccharide producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni* strains isolated from wine and cider. *Int. J. Food Microbiol.*, 98, 53-62.

- Wang, P., Li, A., Dong, M., Fan, M. (2014). Induction, purification and characterization of malolactic enzyme from *Oenococcus oeni* SD-2a. *Eur. Food Res. Technol.*, 239, 827-835.
- William, P. J., Strauss, C. R., Wilson, B., Massywestropp, R. A. (1982). Use of C18 reversed phase liquid chromatography for the isolation of monoterpene glycosides and norisoprenoid precursors from grape juice and wine. *J. Chromatogr.*, 235, 471-480.
- Winterhalter, P., Sefton, M. A., Williams, P. J. (1990). Volatile C13 norisoprenoide compounds in Riesling wine are generated from multiple precursors. *Am. J. Enol. Vitic.*, 41, 277-283.
- Wood, C., Siebert, T. E., Parker, M., Capone, D. L., Eelsey, G. M., Pollnitz, A. P., Herderich, M. J. (2008). From wine to pepper: rotundone, an obscure sesquiterpene, is a potent spicy aroma compound. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 3738-3744.
- Wright, C. T., Klaenhammer, T. R. (1981). Calcium induced alteration of cellular morphology affecting the resistance of *Lactobacillus acidophilus* to freezing. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 807-815.
- Zambonelli, C. (1988). *Microbiologia e biotecnologia dei vini*. Bologna: Ed. Agricole.

8 Anexo

8.1 Publicaciones

Mollo, A., Sixto, A., Falchi, L., Medina, M., Knochen, M. (2017). Zinc determination in Tannat wine by direct injection onto graphite tube: Electrothermal AAS as an alternative to flame AAS. *Microchemical Journal*, 135, 239-244.

Carrau, F., Medina K., Pérez G., Gaggero C., Barquet M., Urruty M., Disegna E., Conibert A., Ferrari V., Martín V., Canoura C., Medina M., Fariña L., Boido E., Dellacassa E.(2012). Vitis Vinífera Tannat, el resultado de un trabajo de investigación multidisciplinario. *Revista Digital Universitaria*. 13: 5, 2012.

8.2 Trabajos presentados

Medina, M., Falchi, L., Martínez, M., Mollo, A., Sixto, A., Knochen, K. (2017). Correlación entre el contenido de metales en uva, mosto y vino: primeros avances. 5^{to} *Encuentro Nacional de Ciencias Química*, Montevideo, Uruguay.

Sixto, A., Noya, L., Medina, M., Mollo, A. (2015). Determinación de metales en vino: avances en el estudio de su perfil según el origen geográfico. 4^{to} *Encuentro Nacional de Ciencias Química*, Montevideo, Uruguay.

Boido, E. , Medina, M. , Dellacassa, E., Fariña, L., Medina, K., Pérez Giffoni, G., Carrau, F. (2014). Efecto de cepas de bacterias lácticas con actividad β -glicosidasa sobre aromas ligados y antocianos en la vinificación. TRAMA Expone (ANII).

Medina, M., Dellacassa E., Boido E., Fariña L., Pérez G. (2013). Efecto de cepas de bacterias lácticas con actividad β -glicosidasas sobre los aromas ligados y antocianos en la vinificación de vinos Tannat, avances. , 3^{er} *Encuentro Nacional de Ciencias Químicas*, Montevideo, Uruguay.

Medina M., Dellacassa E., Boido E., Pérez G. (2011). Efecto de cepas de bacterias lácticas con actividad β -glicosidasa sobre los aromas ligados y antocianos en la vinificación. 2^{do} *Encuentro Nacional de Ciencias Químicas*, Montevideo, Uruguay.

Pérez, G., Urruty, M., Medina, M., Carrau, F., Dellacassa, E., Boido, E. (2011). Determinación de la actividad β -glicosidasa en bacterias lácticas mediante el uso de la técnica del agar esculina. *XX Congreso Latinoamericano de Microbiología, IX Encuentro Nacional de Microbiólogos*, Montevideo, Uruguay.