



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Agronómicas

Escuela de Agronomía

Departamento de Agroindustria y Enología

Efectos del uso de ozono en barricas de roble para el control de *Brettanomyces Spp*

Memoria para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo Mención Enología y Vitivinicultura.

Por

Fernando Gabriel Colil Avila

Profesores Guías:

Eduardo Loyola

Carmen Prieto

Santiago, Chile - 2005

RESUMEN

Los objetivos del presente estudio fueron evaluar y determinar la capacidad del uso de ozono en barricas de roble para el control de *Brettanomyces spp.* y comparar los distintos métodos de aplicación. Además, se determinó el efecto del uso de este sanitizante en barricas, sobre las características físicas, químicas y sensoriales del vino.

La realización del estudio se llevó a cabo en una bodega del valle del Maipo. Se utilizó un vino Cabernet sauvignon 2002 (libre de contaminación) y 15 barricas de roble francés que presentaban contaminación con *Brettanomyces spp.* pertenecientes a la misma bodega. También se utilizó una máquina generadora de ozono disuelto en agua que entregaba una dosis de 3 a 4 ppm.

Las barricas fueron sometidas a 5 tratamientos diferentes de sanitización, combinando ozono con otros métodos de sanitizado tradicionales descritos a continuación:

Tratamiento 1 (T1): Lavado tradicional + 5g de azufre "mechado" (Testigo).

Tratamiento 2 (T2): Lavado tradicional + ozonización por 5 minutos (lavado superficial).

Tratamiento 3 (T3): Lavado tradicional + ozonización por 1 hora (Inundación).

Tratamiento 4 (T4): Lavado tradicional + ozonización por 5 minutos + 5g de azufre.

Tratamiento 5 (T5): Lavado tradicional + ozonización por 1 hora + 5g de azufre.

Posterior a la aplicación de los tratamientos las barricas fueron llenadas con vino y luego de esto se realizaron análisis físicos, químicos y microbiológicos durante el tiempo que duró el ensayo (6 meses), con el fin de determinar diferencias entre los tratamientos aplicados. Además, se realizó una evaluación sensorial del vino al término del ensayo en la que se midieron parámetros de calidad y aceptabilidad.

Los resultados de los análisis físicos y químicos determinaron que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos durante el ensayo, a excepción de la acidez volátil, ya que esta variable presentó diferencias estadísticas en los resultados obtenidos al final del ensayo, lo que se atribuye a una mayor proliferación de *Brettanomyces spp.* producto de la ineficacia de algunos tratamientos aplicados. Otras variables medidas fueron el SO₂ libre y total, las cuales fueron modificadas durante el ensayo con el objetivo de mantener rangos que no influenciaran variables como crecimiento poblacional de *Brettanomyces spp.* o parámetros a nivel sensorial. Debido a esto no se realizó análisis

estadístico de estas variables, no obstante se construyeron curvas de evolución para ellas, observándose a lo largo del ensayo tendencias producidas por algunos tratamientos en particular.

Los resultados de los análisis microbiológicos determinaron que si existió diferencias entre los tratamientos observándose tratamientos que fueron capaces de controlar e inhibir el desarrollo de *Brettanomyces spp.* T4 (O₃ 5 min y mechado) y T5 (O₃ 1 hora y mechado). Los tratamientos 1, 2 y 3 no fueron capaces de cumplir con este objetivo lo que posteriormente se evidenció por los resultados obtenidos en el análisis sensorial al término del ensayo.

Finalmente se comprobó que no existió efectos del uso de ozono en barricas, sobre las características físicas, químicas y sensoriales del vino.

Palabra claves

Control de *Brettanomyces spp.*

Ozonización

Sanitización de barricas

Ozono

SUMMARY

The objectives of the present study were evaluate and determine the capacity of using ozone in oak casks for controlling *Brettanomyces spp.* and comparing the different methods of application. Besides, it is determined the effect of using this sanitizier in casks, in relation to physical, chemical and wine sensory characteristics.

The study was carried out in a wine vault in Valle del Maipo. A wine Cabernet sauvignon 2002 was used (free of pollution) and 15 casks of French oak which did have pollution with *Brettanomyces spp.* from the same wine vault. It was also used a generating machine of ozone diluted in water, delivering a dose from 3 to 4 ppm..

The casks were subjected to 5 different treatments of sanitización, where a combination between ozone with other methods of traditional sanitization is provided below:

Treatment 1 (T1): Traditional Wash + 5g of Sulfur "mechado" (Control).

Treatment 2 (T2): Traditional Wash + ozonization in 5 minutes (superficial wash).

Treatment 3 (T3): Traditional Wash + ozonization for 1 hour (Flood).

Treatment 4 (T4): traditional Wash + ozonization in 5 minutes + 5g of Sulfur.

Treatment 5 (T5): traditional Wash + ozonization for 1 hour + 5g of Sulfur.

Subsequent to the application of the treatments, casks were filled by wine and after that physical, chemical and microbiological analyses were carried out during the essay time (6 months), in order to determine differences between the applied treatments. In addition, at the end of the essay a sensory evaluation of the wine was carried out where it is measured quality and acceptability parameters.

The results of the physical and chemical analyses indicated that significant differences between treatments did not exist during the essay, except for the volatile acidity, since this variable displayed statistical differences in the results obtained at the end of the essay, which produce a major proliferation of *Brettanomyces spp.* due to the ineffectiveness of some applied treatments. Other measured variables were free SO₂ and total SO₂, which were modified during the essay with the objective of maintaining ranges that will not influence variables as population growth of *Brettanomyces spp.* or parameters at sensory level. Due to the above mentioned an statistical analysis from these variables was not

carried out, nevertheless curves of evolution for them were built, being observed throughout the essay tendencies caused by some particular treatments.

The results of the microbiological analyses appointed that there were differences between treatments, being observed treatments that were capable of controlling and disabling the development of *Brettanomyces spp.* T4 (O₃ 5 min and “mechado”) and T5 (O₃ 1 hour and “mechado”). The treatments 1, 2 and 3 were not able to meet this objective, it was made evident later by the results obtained in the sensory analysis at the end of the essay.

Finally, it was proved that did not exist effects by the use of ozone in casks, in relation to physical, chemical and sensory characteristics of the wine.

Key Words

Control of *Brettanomyces spp.*

Ozonization

Sanitization of casks

Ozone

INTRODUCCIÓN

El uso de barricas de roble en la crianza de los vinos es una práctica que se considera como un elemento favorable en la evolución organoléptica de vinos blancos y tintos. Durante la crianza en barricas, los intercambios vino/madera favorecen una microoxigenación que provoca una estabilidad física y química al producto, y le confiere la delicadeza, el equilibrio y la complejidad aromática, tan apreciadas por el consumidor de vinos. La barrica usada, ciertamente, no posee el mismo potencial aromático que el de una nueva, pero encierra todavía un excelente valor de utilización para numerosos vinos y productos alcohólicos y a un costo menor.

Los problemas que se presentan durante la crianza del vino están esencialmente asociados a las contaminaciones microbiológicas o químicas. En ocasiones, el desarrollo de una flora indeseable puede alterar el producto de manera importante, incluso volverlo inapropiado para su consumo. La utilización de barricas usadas, mal mantenidas, aumenta los riesgos de proliferación microbiológica, pudiendo dar lugar a la aparición de los siguientes defectos: la picadura acética (aumento rápido y descontrolado de la acidez volátil), el carácter fenólico (sabor a caballeriza, a serrín) en presencia de levaduras de tipo *Brettanomyces*, la picadura láctica (principalmente en vinos con alto tenor de alcohol), o aún la «enfermedad de la grasa» (mohos).

Además, los depósitos de tartrato formados durante las crianzas precedentes se acumulan y se vuelven excelentes nidos microbianos durante una eventual redisolución en períodos calurosos. Se ha establecido que una barrica usada de 225 litros contiene alrededor de 5 litros de vino retenidos en los primeros milímetros de las duelas, la estructura microporosa de la madera favorece la penetración de los microorganismos en profundidad y vuelve su limpieza y desinfección particularmente difícil.

Es por lo anterior que se hace cada día más importante brindar la seguridad necesaria para la obtención de un producto de calidad, haciendo de la conservación de vinos en barricas una operación segura.

Los antecedentes señalados determinan que se debe asegurar una óptima higienización y sanitización de las barricas antes y después de su uso. Para lograr esto existen distintos métodos como por ejemplo el uso de luz ultravioleta aplicada en el interior

de la barrica, azufrado de barricas o “mechado”, lavado con vapor y agua caliente y muy recientemente se está utilizando el lavado con agua ozonizada como complemento a las labores tradicionales de sanitización de barricas.

Por todas las experiencias realizadas con ozono es posible establecer que este elemento es capaz de ejercer una acción sanitizante y desinfectante que complementadas con las labores de lavado tradicional de barricas puedan controlar en forma efectiva la contaminación de *Brettanomyces spp.*, debido a esto los objetivos del presente trabajo son:

- Determinar la capacidad del ozono en la sanitización de barricas de roble para el control de *Brettanomyces spp.* y compararla con los métodos tradicionales.
- Determinar el efecto del uso de ozono en barricas de roble sobre las características físicas, químicas y sensoriales del vino.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Características del género *Brettanomyces*

La calidad del vino puede ser amenazada por distintos factores, dentro de los que se cuentan alteraciones de tipo microbiológico causadas por levaduras del género *Brettanomyces*.

Dentro de las levaduras nativas existen varios géneros entre los que se cuenta *Brettanomyces spp.* Este se encuentra principalmente en el comienzo de las fermentaciones espontáneas, siendo desplazada posteriormente por *Saccharomyces spp.*, pudiendo reaparecer en vinos mientras están siendo criados en barricas (Querol, 1992 y Salvadores y Cordell, 1993).

El papel de las levaduras en la vinificación no ha estado ajeno a discusión. Si su actividad puede considerarse como positiva, negativa o indiferente, especialmente ciertas levaduras como *Brettanomyces spp.* esto depende de varios factores que van desde el estilo de vino, hasta la capacidad o incapacidad de los encargados de la vinificación de efectuar el control del agente fermentativo generando una proliferación incontrolada en la bodega (Fugelsang, 1997; Heimoff, 1998 y Morgan, 1998).

El género *Brettanomyces* presenta 9 especies, de las cuales 2 son encontradas más a menudo en el vino, estas son: *Brettanomyces intermedius* y *Brettanomyces lambicus* (Makewine, 2002).

Existen antecedentes que han señalado a *Brettanomyces spp.* como una levadura que altera los vinos en los que se desarrolla. A pesar del cuestionamiento que esta levadura provoca, algunos productores de vino sustentan que es beneficioso cierto carácter “Brett” en ciertos tipos de vino. En estos casos, se piensa que el microorganismo juega un rol positivo en el

sabor y complejidad del “bouquet” así como también le conferiría cierta madurez a algunos vinos tintos nuevos (Morgan, 1998 y Fugelsang, 1997).

Especies tanto de *Brettanomyces spp.* como *Dekkera spp.* presentan una característica fisiológica muy importante relacionada con un fuerte poder acidificante, llegando a producir elevadas cantidades de ácido acético cuando se encuentran en presencia de glucosa (Wang, 1985, citado por Fugelsang, 1997 y Boulton *et al.*, 1996).

Otra característica fisiológica importante de este género, según Boulton *et al.*, (1996), es la resistencia a la cicloheximida. Con respecto a este último punto, se ha comprobado que el desarrollo de colonias en medios con 3 a 25 mg/L de cicloheximida, puede ser considerada una buena evidencia para confirmar la presencia de este género. El uso de 100 mg/L es un buen diagnóstico, pero el desarrollo de colonias puede tomar entre 10 a 14 días comparado con los 2 a 3 días al usar bajas concentraciones del fungicida.

Ecología y dispersión del género *Brettanomyces*

Brettanomyces spp. ha sido identificada como una levadura deteriorante en todas las áreas de producción de vino en el mundo (Heresztyn, 1986).

La descripción dada hace años atrás por Van der Walt (1958) y Kerben (1961), citados por Boulton *et al.* (1996) sobre el origen del deterioro provocado por *Brettanomyces spp.* en algunos vinos de Sudáfrica puede servir como escenario para el origen de muchos tipos de infecciones, incluyendo tanto microorganismos positivos como negativos. En el caso de *Brettanomyces spp.*, se descubrió que durante operaciones de molienda y desfangado existían algunos focos de microorganismos infecciosos en los restos de mosto que quedaban en el equipo asociado a las operaciones anteriormente mencionadas.

Una vez introducida en la bodega, *Brettanomyces spp.* puede alcanzar densidades poblacionales de importancia. Esto puede ser atribuido al uso de equipos y barricas

contaminadas o deficientemente sanitizadas y a la presencia de ciertos insectos durante el proceso fermentativo como es el caso de la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*. El mecanismo que utiliza este insecto para la dispersión de la levadura es pasivo siendo a través de la adherencia al tarso o bien a otro sector de la superficie del cuerpo del individuo adulto. Otro importante reservorio de estos microorganismos lo constituyen las canaletas de desagüe como también la acumulación de desechos sólidos en las proximidades de la bodega (Shehata y Mrak, 1951, citados por Fugelsang, 1997 y Makewine, 2002).

El lugar donde más frecuente se encuentra *Brettanomyces spp.* forma perfecta y su forma esporulante equivalente o imperfecta *Dekkera spp.* en la bodega es en el sector de barricas, pues son capaces de utilizar el disacárido celobiosa, el cual se origina en el proceso de tostado de la madera. Es así, como las barricas nuevas aparecen como el mejor sitio para el crecimiento de la levadura en comparación con barricas usadas. Una vez establecida en la bodega, su eliminación es bastante difícil debido a que las propiedades físicas de la madera contribuyen significativamente a dificultar las medidas de control microbiológico, especialmente lo que se refiere a las hendiduras y grietas de ésta.

Se desconoce si los desarrollos posteriores de la levadura se deben a la escasa efectividad en destruirlas o por contaminaciones posteriores (Blondin *et al.*, 1982; Mitrakul *et al.*, 1997 y Zoecklein *et al.*, 1995).

En general, los programas de detección y recuento poblacional se llevan a cabo en el vino, para lo cual se hace pasar un volumen conocido de éste a través de una membrana obteniendo con ello una buena recolección del microorganismo en cuestión, para luego proceder al cultivo de él en distintos medios que permitan su posterior identificación.

Los recuentos poblacionales deben comenzar en el momento de poner el vino en barricas. Los siguientes se deben realizar al juntar el vino en estanques o relleno de depósitos y antes de efectuar las mezclas y embotellar (Fugelsang, 1997).

Las poblaciones de *Brettanomyces spp.* pueden alcanzar su máxima densidad en barricas destinadas a la crianza de vinos, entre los 5 y 7 meses después de la vinificación. El tiempo en el que alcanzan a desarrollar estas poblaciones máximas depende en gran parte

de la química del vino (especialmente niveles de anhídrido sulfuroso molecular y azúcares fermentables disponibles), así como también de la temperatura ambiental (Chatonnet, 1999 y Chatonnet, 2000).

El considerar un vino “seco” no significa que *Brettanomyces spp.* no se desarrolle dentro de la botella y es por ello que las medidas preventivas nunca llegan a ser excesivas (Zoecklein *et al.*, 1995).

Generalmente se puede afirmar que un alto número de células y un largo período de contacto de ellas con el mosto provocan como resultado un impacto sensorial bastante grande. Esto se debe a que el crecimiento de *Brettanomyces spp.* es estimulado por la presencia de azúcares fermentables (Fugelsang, 1997).

Efectos en las propiedades sensoriales del vino

Brettanomyces spp. y *Dekkera spp.* son los responsables de producir una alteración llamada “sabor a ratón” ó “sabor a caballo” (Flanzy, 2000).

Largas investigaciones permitieron determinar que en todas las fermentaciones donde había participado *Brettanomyces spp.* se producía una cantidad importante de fenoles volátiles tales como 4-etil-fenol y 4-etil-guaiacol relacionados con aromas a animal, establo, humo y especias. Estos compuestos fenólicos en altas concentraciones afectan la calidad del vino (Chatonnet *et al.*, 1995; Chatonnet, 1999; Chatonnet, 2000 y Zoecklein *et al.*, 1995).

Los ácidos grasos volátiles producidos por *Brettanomyces spp.* en la calidad del vino tienen un impacto absolutamente diverso. El compuesto más conocido por los enólogos es ácido acético, que es producido durante el crecimiento de *Brettanomyces spp.* por la oxidación del etanol y puede conducir a la formación del etil acetato que puede tener un aroma del tipo de la acetona. Isovalérico, isobutírico, 2-metil-butírico son otros ácidos grasos volátiles importantes producidos por *Brettanomyces spp.* que pueden afectar la calidad del vino. Aunque la infección por *Brettanomyces spp.* puede producir estos

compuestos, es también posible que estén formados por acción de bacterias lácticas o bacterias acéticas (Makewine, 2002).

Control de levaduras del género *Brettanomyces*

Brettanomyces spp. es especialmente difícil de controlar ya que su presencia puede pasar desapercibida hasta que el vino está permanentemente afectado (Zoecklein *et al.*, 1995).

Existen algunos métodos básicos para evitar el crecimiento de *Brettanomyces spp.* en el vino, pero pueden llegar a ser perjudiciales en la calidad de éste. Si se disminuye el pH y aumenta la concentración de anhídrido sulfuroso, se retarda la polimerización de fenoles y el envejecimiento del vino se hace más prolongado (Makewine, 2002).

Otro método para prevenir la aparición de *Brettanomyces spp.* es la filtración estéril antes del envejecimiento o embotellación, pero esto le resta calidad al producto final (Makewine, 2002).

Una buena higiene de la bodega junto con una adecuada mantención de las barricas, más un adecuado uso de anhídrido sulfuroso libre en el vino (20-30 mg/L), protegen eficazmente contra la proliferación de *Brettanomyces spp.* a lo largo del tiempo (Chatonnet *et al.*, 1993 citado por Flanzky, 2000).

Finalmente la disminución de la temperatura suprime el desarrollo de todas las levaduras, incluyendo *Brettanomyces spp.*, esto limita el potencial para que los vinos presenten carácter "Brett". Una reducción leve de la temperatura, de 5 a 10 grados, puede tener un efecto significativo en el crecimiento de *Brettanomyces spp.* La desventaja de temperaturas menores en el envejecimiento de los vinos es un desarrollo más lento de estos, la polimerización de compuestos fenólicos disminuye, la evaporación y concentración de los vinos se reduce (Makewine, 2002).

Sanitización de barricas

La proliferación incontrolada de microorganismos provoca un deterioro del producto. Tradicionalmente, el anhídrido sulfuroso aplicado en barricas ha representado una herramienta importante para el control del crecimiento microbiano (Zoecklein *et al.*, 1995).

Las barricas son esenciales para producir los vinos de mayor complejidad, pero es muy común que exista contaminación de *Brettanomyces spp.* especialmente si las barricas tienen más de un uso, hay un riesgo de contaminar con *Brettanomyces spp.*, así como otros microorganismos indeseables. No hay manera eficaz de esterilizar una barrica sin destruirla. Si uno elige usar barricas usadas, puede ser apropiado aumentar las concentraciones del sulfuroso para los vinos envejecidos en tales barricas (Makewine, 2002).

El sanitizado de barricas con sucesivos ciclos de lavado con agua y vapor caliente y un posterior mechado pareciera ser suficiente para otorgar una prevención adecuada contra el ataque de *Brettanomyces spp.*, pero puede ser perjudicial para la calidad de las barricas (Blondin *et al.*, 1982; Mitrakul *et al.*, 1997 y Peynaud, 1984).

Dentro de las técnicas de esterilización de los equipos de bodega se encuentra una gran cantidad de productos y métodos que garantizan un buen resultado, esto ha llevado a que hoy en día exista preocupación por el agua que se utiliza en el lavado, la cual puede ser en algunos casos tratada con ozono para garantizar su esterilidad (Zoecklein *et al.*, 1995).

Hoy en día existe una mayor tecnología que puede ser enfocada a la utilización de agentes alternativos que procuren la conservación de productos alimenticios y garanticen una asepsia completa en su elaboración. Es acá donde surge la alternativa de utilizar ozono como medida higiénica (de seguridad), en los depósitos de alimentos (barricas), cámaras frigoríficas, medios de transporte y potabilización del agua, entre otros (Makewine, 2002).

El ozono y sus propiedades

El ozono fue descubierto por el científico holandés Von Marum en el año 1783 trabajando con máquinas electrostáticas. Así mismo le sucedió a Ciukshank en el año 1801 haciendo la electrólisis del agua. Finalmente en el año 1840 Schonbein logró detectar y clasificar al ozono dándole el nombre ya conocido por todos hoy en día. Palabra que procede del griego y cuyo significado es olor.

En el año 1863 el científico Soret comprobó y demostró que el ozono se compone solamente de oxígeno: $64800 \text{ cal} + 3 \text{ O}_2 \Leftrightarrow 2 \text{ O}_3$.

Eminentes científicos estudiaron el ozono hasta que M. Otto logró determinar su densidad, constitución molecular y estudió detenidamente su formación. Después de estos estudios ideó el sistema idóneo para producir ozono artificialmente, por medio de descargas eléctricas (como lo produce la propia naturaleza) que rompen la molécula de oxígeno, recombinando sus átomos para formar ozono. Dando lugar de esta manera al sistema Otto, que se aplica actualmente en los generadores de ozono (Rice, 1985).

El ozono es una variedad alotrópica del oxígeno, su molécula triatómica (O_3) se genera por la activación de la molécula diatómica (O_2) del oxígeno. Esta activación puede ser provocada por la acción de una descarga eléctrica o por la energía irradiada de los rayos ultravioleta (Franking, 1915, citado por Rice, 1985).

Las primeras experiencias con ozono en procesos de laboratorio fueron hechas en 1886 en Francia por Maritens quien observó que el ozono diluido en el agua contaminada producía efectos de esterilización. Cinco años más tarde, Frolich comprobó estas propiedades en una planta de tratamiento piloto en Alemania Federal. La primera planta donde se utilizó decididamente el ozono fue en Oudshoorn en Noruega en el año 1893. Posteriormente se utilizó para tratar las aguas del Rhin. El ozono fue aplicado por primera vez en la planta de tratamiento de agua potable en Niza (Francia) en 1906. Desde esta fecha se vienen estudiando las propiedades desinfectantes y antisépticas de este gas y, desde entonces, se vienen utilizando con gran eficacia en el tratamiento de aguas de abastecimiento público, aguas residuales y en tratamientos ambientales (Rice, 1985 y Arnold, 1994).

Está ampliamente reconocido que las aplicaciones adecuadas de ozono tienen una acción bactericida, viricida, funguicida y desodorizante, destruyendo con gran rapidez estreptococos, estafilococos, colibacilos, etc., así como las más potentes toxinas diftéricas y tetánicas (Paquin, 1995).

El proceso mismo de desinfección es casi inmediato. Otros oxidantes más débiles que el ozono necesitan de un mayor tiempo de contacto y mayores concentraciones. Por lo que concierne a la inactivación viral también en este ámbito, los precursores fueron franceses. Coin y otros usaron el virus de la poliomeilitis tipo 1 (1964) y tipo 2 (1967), para demostrar que con una cantidad de ozono residual equivalente a 0,4 mg/L después de 4 minutos de ozonización continua, se alcanzó un grado de inactivación de 99,9 %. El criterio adoptado, para esto, fue el de tener un residual de 0,4 mg/L después que la demanda de oxígeno inicial había sido satisfecha. Para asegurar una adecuada desactivación fueron adoptados tiempos de contacto no menores a 8 minutos y no mayores a 12 minutos (Paquin, 1995).

El ozono, debido a sus propiedades oxidantes, puede ser considerado como uno de los agentes microbicidas más rápido y eficaz que se conoce. Su acción posee un amplio espectro que engloba la eliminación de: bacterias, virus, hongos y esporas (Arnold, 1994).

La evaluación del ozono como desinfectante en comparación con el cloro presenta las siguientes ventajas: a) Tiene mayor poder oxidante; b) No produce trihalometanos y elimina los precursores de estos; c) Requiere una concentración y tiempo de contacto menor (0,4 ppm durante 4 minutos es una concentración y tiempo de contacto eficaz para eliminar bacterias y virus); d) No altera el pH del agua; e) Mejora la precipitación del agua; f) Facilita la eliminación del hierro y manganeso, y reduce en gran medida el olor, sabor y color del agua (Triozone, 2002).

El principal objetivo de un tratamiento con ozono con equipos de coeficiente reducido consiste en la desinfección del agua desde el punto de vista bacteriológico. El ozono al ser aplicado usando agua como vehículo ejerce una mayor acción y es la forma

más sencilla y menos peligrosa de aplicar. No produce en el agua aumento en el contenido de sales inorgánicas ni subproductos nocivos (Triozon, 2002).

MATERIALES Y MÉTODO

El ensayo se realizó en una bodega del Valle del Maipo. Los análisis físicos, químicos, microbiológicos y de evaluación sensorial se realizaron en los laboratorios del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Materiales

La materia prima utilizada en este ensayo correspondió a un vino cultivar Cabernet Sauvignon cosecha 2002 del Valle del Maipo, cabe señalar que este vino no presentaba contaminación o alteración por ataque de *Brettanomyces spp.* hecho que se puso de manifiesto mediante la filtración de 25 mL de este vino a través de una membrana y su posterior siembra, no encontrándose ningún crecimiento poblacional, además, se realizó un análisis de etilfenoles (4-Etil-fenol < 4 mg/L, 4-Etil-guaiacol < 4 mg/L).

Se utilizó un equipo generador de ozono modelo Ozonal 5 (AGW-0500) cuya dosificación fue de 3 a 4 ppm de ozono disuelto en agua.

La unidad experimental correspondió a 15 barricas de roble francés, marca Mercier provenientes del bosque de Allier, que presentaban tostado medio y con una capacidad de 225 litros cada una. Es importante señalar que las barricas fueron utilizadas anteriormente durante 3 temporadas y que, por análisis sensorial de las barricas y del vino que contenían se determinó que estaban contaminadas con *Brettanomyces spp.*

El medio de cultivo se basó en el que propone la A.T.C.C. (American Type Culture Collection, 2002) para el desarrollo de *Bretanomyces spp.* formulado con:

Glucosa (1%)

Peptona (1%)

Extracto de Levadura (1%)

Carbonato de Calcio (2%)

Agar (2%)

El medio de cultivo fue modificado mediante la incorporación de 50 mg/L de cicloheximida y 1 mL de difenil a fin de reducir el riesgo de contaminación de las placas con otros microorganismos, como hongos y otras levaduras.

Cuadro 1. Características físicas, químicas y microbiológicas del vino original utilizado en el ensayo.

Análisis	Vino
Grado alcohólico (% v/v)	13,2
Acidez total (g H ₂ SO ₄ /L)	3,85
Acidez volátil (g Ác. Acético/L)	0,37
Anhídrido sulfuroso libre (mg/L)	35
Anhídrido sulfuroso total (mg/L)	52
Azúcares reductores (g/L)	1,68
pH	3,55
* UFC/ 100 mL	0

* Unidades formadoras de colonias de *Brettanomyces spp.* por cada 100 mL de vino filtrado.

Método

El ensayo constó de 5 tratamientos con 3 repeticiones, siendo la unidad experimental cada barrica. Se evaluaron distintos métodos de sanitización de barricas usando ozono como agente sanitizante, combinándolo además con otros métodos de lavado tradicionales.

Implementación del ensayo

Las barricas, previo al uso de ozono, fueron sometidas a un lavado tradicional con vapor y agua caliente (60°C), con un total de 11 ciclos de lavado de 10 segundos cada uno. Posterior a esto se aplicaron los tratamientos que se describen a continuación:

Tratamiento 1 (T1): Lavado tradicional + 5g de azufre "mechado" (Testigo).

Tratamiento 2 (T2): Lavado tradicional + ozonización por 5 minutos (lavado superficial).

Tratamiento 3 (T3): Lavado tradicional + ozonización por 1 hora (Inundación).

Tratamiento 4 (T4): Lavado tradicional + ozonización por 5 minutos + 5g de azufre.

Tratamiento 5 (T5): Lavado tradicional + ozonización por 1 hora + 5g de azufre.

La ozonización se llevó a cabo mediante 2 formas de aplicación, un lavado superficial que consistió en aplicar agua ozonizada a través de un cabezal que giraba en el interior de la barrica cubriendo toda la superficie interna de ésta, durante 5 minutos. La otra forma de aplicación fue por inundación o saturación, en donde se llenó las barricas con agua ozonizada y se esperó por 1 hora, para finalmente ser vaciadas.

Posterior a esto se realizó el mechado, para los tratamientos T4 y T5, que consistió en quemar una pastilla de azufre de 5 g en el interior de las barricas una vez que las barricas se encontraban secas, 3 días después del lavado, para luego ser llenadas con vino.

El vino utilizado en el ensayo se mantuvo con un rango de concentración de 30 a 40 ppm de anhídrido sulfuroso libre, efectuándose correcciones a partir del segundo mes en adelante.

Cabe señalar que se realizaron rellenos de barricas una vez por semana utilizándose un vino libre de contaminación y cuya concentración de anhídrido sulfuroso libre fue de 500 ppm, a fin de asegurar la completa esterilización de éste.

Análisis físicos y químicos

Previo al ensayo se efectuaron análisis del vino original con el fin de dejar establecidos los índices de interés, y así poder establecer en forma posterior si existió algún cambio a lo largo del ensayo. Estos análisis se realizaron en los laboratorios del Departamento de Agroindustria y Enología de la Universidad de Chile según los métodos recopilados por Bordeu y Scarpa (1998), considerando las siguientes determinaciones:

Análisis

Grado alcohólico

Método

Densimétrico

Acidez total	Potenciómetro (Titulación con NaOH)
Acidez volátil	Cash-Still
Anhídrido sulfuroso Libre	Por Aspiración
Anhídrido sulfuroso total	Ripper
Azúcares reductores	Luff
Determinación del pH	Potenciométrico

Se realizaron análisis mensuales durante el período del ensayo, de anhídrido sulfuroso libre, anhídrido sulfuroso total y acidez volátil, mientras que el resto de las variables se midió al inicio, a los 3 meses y a los 6 meses (final del ensayo).

También se midió la temperatura del vino en cada barrica periódicamente, a fin de establecer la incidencia de esta variable en el desarrollo del ensayo.

Análisis microbiológico

Se realizaron análisis mensuales durante el período del ensayo. La toma de muestras se realizó con pipetas de 100 mL, completamente esterilizadas, previo a esto se efectuó un bastonaje de un minuto (aproximadamente) en cada barrica para obtener de esta forma un muestreo representativo y homogéneo.

Se realizaron recuentos poblacionales en placa con siembra directa por homogenización de 1 mL de vino con el medio de cultivo propuesto por la A.T.C.C. (2002), descrito en la pagina 12.

También se realizó recuento poblacional en placas, por filtración de 25 mL de vino a través de una membrana estéril de 0,45 μm sobre el mismo medio de cultivo anteriormente descrito. La temperatura de incubación de las placas correspondió a 26° C. El recuento poblacional se realizó al cabo de 15 a 20 días después de la siembra.

Para corroborar que las colonias pertenecían a *Brettanomyces spp.*, ya que se utilizó un medio de cultivo selectivo para este tipo de levaduras, la identificación y el posterior recuento de éstas se realizó por observación microscópica según la clave de clasificación descrita por Fugelsang (1997).

Análisis sensorial

De acuerdo con el segundo objetivo expuesto, se debía comprobar si existía algún efecto en el vino por el uso de ozono en barricas de roble.

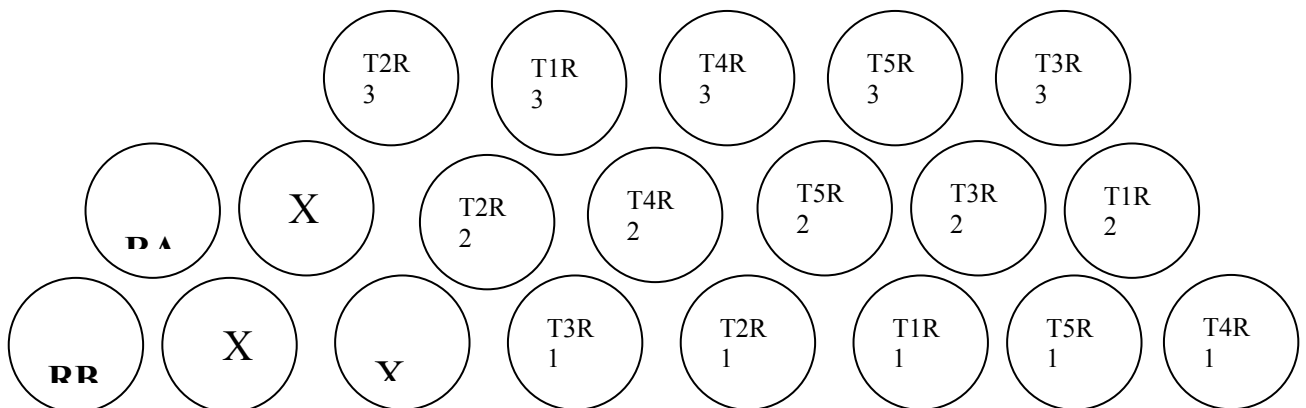
Para esto se realizó la evaluación sensorial de los vinos una vez finalizado el ensayo, en donde se midió calidad utilizándose un panel entrenado compuesto por 12 personas y aceptabilidad mediante un panel formado por 24 personas.

Para medir la aceptabilidad se utilizó el método de la Escala Hedónica con una pauta no estructurada de 0 a 15 cm (Anexo I) y la calidad se midió con un método descriptivo cuantitativo que utilizó una pauta no estructurada de 0 a 15 cm, especialmente elaborada y basada en la pauta propuesta por la O.I.V. (Anexo II).

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental utilizado en el ensayo fue de 3 bloques completos aleatorios con 5 tratamientos.

Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza (ANDEVA) y test de rango múltiple de Duncan. La unidad experimental en cada caso correspondió a cada barrica en estudio. El esquema de tratamientos queda representado en la figura 1.



RA: Relleno A; RB: Relleno B; X: Barricas de soporte.

Figura 1. Diagrama del ensayo con los respectivos tratamientos ordenados en forma aleatoria.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presencia de *Brettanomyces spp.* en el vino puede generar modificaciones a nivel químico y sensorial. Por otra parte no está claro que el uso de ozono en barricas no produzca alteraciones en las propiedades químicas y sensoriales del vino.

Debido a esto se realizaron comparaciones entre los distintos tratamientos con el fin de determinar diferencias entre ellos y así poder evaluar los parámetros que fueron influenciados por el ensayo.

Es importante señalar que la concentración de anhídrido sulfuroso libre y total fueron analizadas y modificadas durante el ensayo, con el fin de mantener valores uniformes para cada tratamiento y no afectar variables como crecimiento poblacional de *Brettanomyces spp.* o características sensoriales en el vino. Dada las condiciones de este ensayo fue muy difícil mantener dichos valores, por lo que fue necesario establecer rangos para el anhídrido sulfuroso libre entre 30 a 40 ppm.

Análisis físicos y químicos

Los resultados de los análisis químicos que se presentan en los Cuadros 2, 3 y 4, representan los promedios de las repeticiones medidos al inicio, mitad y final del ensayo.

Cuadro 2. Características físicas y químicas del vino en el primer mes del ensayo.

Tratamientos	Ac. Titulación (g H ₂ SO ₄ /L)	Ac. Volátil (g Ác. Acético/L)	Az. Reductores (g/L)	pH	Grado alcohólico (v/v)
T1	3,84a	0,37a	1,64a	3,57a	13,2a
T2	3,80a	0,38a	1,68a	3,58a	13,2a
T3	3,84a	0,39a	1,72a	3,58a	13,2a
T4	3,85a	0,35b	1,71a	3,57a	13,2a
T5	3,79a	0,35b	1,68a	3,57a	13,2a

Letras iguales en cada parámetro indican que no existen diferencias significativas a un nivel del 5%.

Cuadro 3. Características físicas y químicas del vino en el tercer mes del ensayo.

Tratamientos	Ac. Titulación (g H ₂ SO ₄ /L)	Ac. Volátil (g Ác. Acético/L)	Az. Reductores (g/L)	pH	Grado alcohólico (v/v)
T1	3,65a	0,38a	1,55a	3,54a	13,2a
T2	3,61a	0,40a	1,52a	3,56a	13,2a
T3	3,60a	0,38a	1,48a	3,55a	13,1a
T4	3,63a	0,37a	1,54a	3,53a	13,2a
T5	3,63a	0,38a	1,51a	3,52a	13,1a

Letras iguales en cada parámetro indican que no existen diferencias significativas a un nivel del 5%.

Cuadro 4. Características físicas y químicas del vino en el sexto mes del ensayo.

Tratamientos	Ac. Titulación (g H ₂ SO ₄ /L)	Ac. Volátil (g Ác. Acético/L)	Az. Reductores (g/L)	pH	Grado alcohólico (v/v)
T1	3,69a	0,52a	1,50a	3,56a	13,5a
T2	3,75a	0,55a	1,48a	3,58a	13,5a
T3	3,70a	0,56a	1,47a	3,57a	13,4a
T4	3,69a	0,41b	1,54a	3,51a	13,4a
T5	3,64a	0,41b	1,54a	3,52a	13,4a

Letras iguales en cada parámetro indican que no existen diferencias significativas a un nivel del 5%.

Anhídrido sulfuroso libre

Es importante señalar que no se aplicó análisis estadístico a las variables de SO₂ libre y SO₂ total, debido a las modificaciones a que fueron sometidas explicadas en la página anterior. Sin embargo con los resultados de los análisis mensuales se construyeron curvas de evolución de estas variables a lo largo del ensayo.

Las concentraciones de SO₂ libre varían en gran medida a lo largo del ensayo, en la Figura 2 se observa la existencia de 2 grupos marcados para los distintos tratamientos.

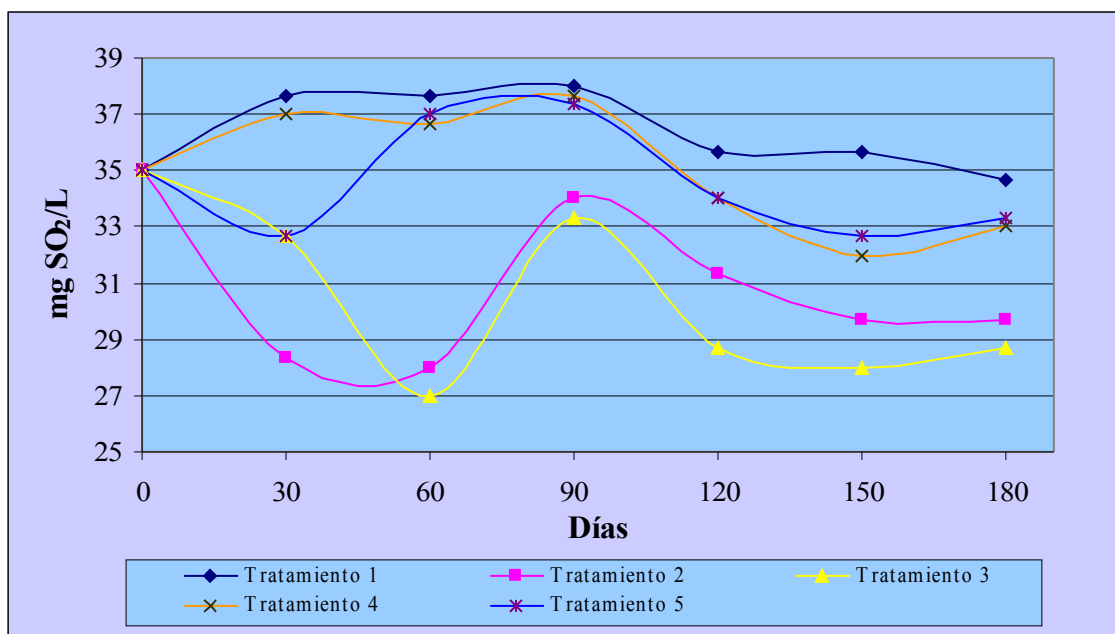


Figura 2. Evolución de la concentración de SO₂ libre durante el ensayo.

Los tratamientos T2 y T3 muestran una baja en las concentraciones de SO₂ libre comparadas con las medidas al inicio del ensayo (35 ppm), esto se puede explicar porque al efectuar el traspaso del vino, de la cuba a las barricas del ensayo existe pérdida de SO₂ por oxigenación u otros factores.

Este fenómeno debería ser similar en todos los tratamientos, pero no sucede así en los tratamientos T1, T4 y T5, ya que estos últimos a diferencia de los antes mencionados mantienen o aumentan la concentración de SO₂ libre en el vino. Esto sucede por un aporte gradual de SO₂ que hace la barrica a través del tiempo, junto con el SO₂ residual producto del mechado, el que puede disolverse en forma posterior parcialmente en el vino.

Esta diferencia se debería al mechado al que fueron sometidas las barricas de los tratamientos T1, T4 y T5 previo al llenado (Zoecklein *et al.*, 1995).

Anhídrido sulfuroso total

Según se observa en la Figura 3, las concentraciones de SO₂ total presentaron 2 tendencias, coincidiendo con las observadas en el SO₂ libre.

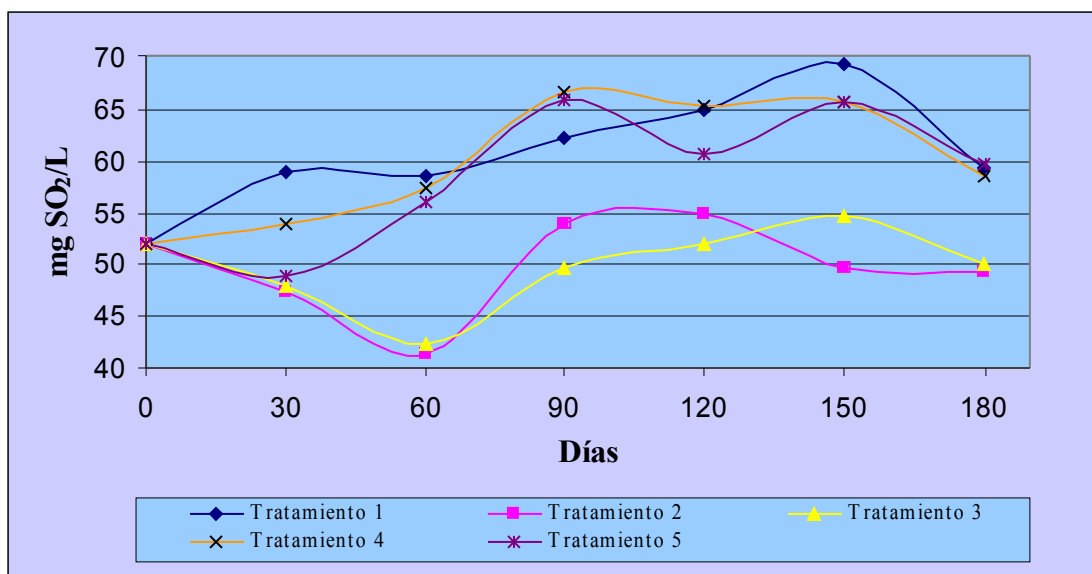


Figura 3. Evolución de la concentración SO₂ total durante el ensayo.

Esto se explicaría de la misma manera que en el caso anterior, producto del mechado aplicado en las barricas de los tratamientos T1, T4 y T5.

Acidez de titulación

La acidez de titulación a lo largo del ensayo no presenta diferencias significativas entre los tratamientos.

Al comparar los promedios de cada tratamiento correspondientes al primer mes del ensayo (Cuadro 2), con la acidez de titulación del vino base (3,85), tampoco se aprecian diferencias significativas entre estos. Es interesante destacar una baja en la acidez de titulación en todos los tratamientos al comparar los análisis obtenidos en el mes 1 respecto a los del mes 3, esto se podría explicar por el término de la fermentación maloláctica en las barricas, cuya característica principal es la baja de la acidez y un aumento del pH (Flanzy, 2000).

Las mediciones realizadas en el último mes del ensayo (Cuadro 4), muestran una leve alza en la acidez de titulación en todos los tratamientos, esto se debería a un incremento de la acidez volátil aumentando la concentración total de ácidos presentes en el vino (Flanzy, 2000).

Acidez volátil

La acidez volátil en un vino seco y recién fermentado varía entre 0,2 y 0,4 g/L (Ribereau-Gayon, 1961 citado por Zoecklein *et al.*, 1995).

Concentraciones superiores de acidez volátil en un vino pueden ser atribuidas a la presencia de bacterias acéticas o levaduras del tipo *Brettanomyces/Dekkera* (Zoecklein *et al.*, 1995 y Makewine, 2001).

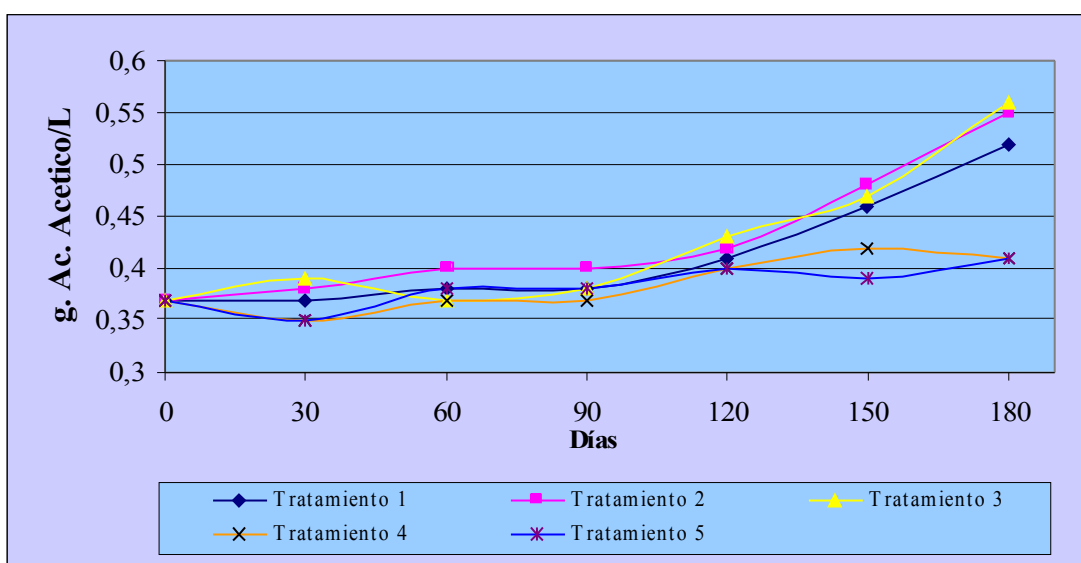


Figura 4. Evolución de la concentración de la acidez volátil durante el ensayo.

Según los resultados obtenidos en el tercer mes de muestreo (Cuadro 3), no existen diferencias significativas entre los tratamientos, sí existe un aumento leve en la concentración de la acidez volátil comparada con la concentración del vino base. Esto queda demostrado en la Figura 4, ya que se observa un incremento gradual de la acidez volátil en todos los tratamientos, siendo muy leve en un inicio, pero a partir del tercer mes se produce un alza de mayor proporción. Esto posiblemente se debe a un aumento en la población de *Brettanomyces spp.* en algunos tratamientos a partir del tercer mes, coincidiendo la mayor concentración de acidez volátil con los tratamientos que presentan un mayor crecimiento poblacional (T2 y T3).

En análisis efectuados en el sexto mes del ensayo, se observa que existen diferencias significativas entre algunos tratamientos. Los tratamientos T1, T2 y T3, no presentan diferencias entre ellos, pero comparados con los tratamientos T4 y T5, sí existen diferencias, siendo estos últimos los que presentan la menor concentración de acidez volátil. Esto se puede atribuir a la nula proliferación de levaduras en estos tratamientos, ya que dada las condiciones de SO_2 libre, SO_2 total, pH y temperatura presentes al final del ensayo, debiera existir una inhibición y control de la actividad bacteriana, por lo que se descarta una relación entre la concentración de acidez volátil y la presencia de bacterias acéticas en el vino (Zoecklein *et al.*, 1995).

Finalmente es importante señalar que las concentraciones de acidez volátil de los tratamientos obtenidas al final del ensayo no sobrepasan el umbral de percepción sensorial 0,7 mg/L para este parámetro (Zoecklein *et al.*, 1995).

Grado alcohólico

Los resultados obtenidos a lo largo del ensayo y que se pueden ver en los Cuadros 2, 3 y 4, demuestran que estadísticamente no hay diferencias significativas de la graduación alcohólica entre los tratamientos. Se puede observar que este parámetro se mantuvo prácticamente inalterable entre las mediciones efectuadas el primer y tercer mes del ensayo, y que comparadas con las del vino base no existen mayores diferencias.

Se observó (Cuadro 4), un leve aumento en la concentración alcohólica en todos los tratamientos en análisis efectuados al final del ensayo (mes 6). Esto podría deberse a la producción de etanol por la fermentación de azúcares residuales presentes en el vino (Flanzy, 2000), y no a la influencia de algún tratamiento en particular.

pH

Los valores de pH obtenidos a lo largo del ensayo no presentan diferencias significativas entre los tratamientos.

Se observaron diferencias a nivel decimal en los valores de pH, entre las distintas fechas de medición (Cuadros 2, 3 y 4). Se produjo una baja y luego un aumento del pH al inicio y final del ensayo respectivamente.

Estos distintos valores de pH se pueden explicar por la acción de la fermentación maloláctica en un inicio y posteriormente una subida de la acidez, producto de un incremento en la acidez volátil. __

Azúcares reductores

No existen diferencias significativas entre los tratamientos durante el ensayo. Se observó una leve variación de los promedios entre las distintas fechas de medición, en respuesta a una disminución en la concentración de azúcares, desde el primer mes hasta el final del ensayo. Esto se explica por el consumo del azúcar residual presente en el vino, esto último concuerda con el leve aumento de la graduación alcohólica producto del consumo de estos azúcares.

Cabe señalar que existe una relación entre los tratamientos T2 y T3, diferenciándose levemente del resto, ya que estos presentan la menor concentración de azúcar residual al término del ensayo, lo que se puede explicar por el consumo del azúcar debido a una mayor actividad microbiológica de *Brettanomyces spp.* en estos tratamientos.

Temperatura

La temperatura es un factor físico que está relacionado directamente con el crecimiento de microorganismos en el vino y su posterior deterioro.

La actividad microbiana en el vino puede variar sustancialmente debido a la temperatura, pudiendo aumentar al doble e incluso cuadruplicar su valor con un aumento de 5 o 10 grados en la temperatura respectivamente (Rankine, 1989).

Según se observa en la Figura 5, esto queda demostrado claramente ya que al comparar los valores de temperatura de los distintos bloques del ensayo, existen diferencias en la población de levaduras, encontrándose un aumento gradual de éstas en todos los tratamientos a medida que aumenta la temperatura.

Los resultados obtenidos corresponden al último mes del ensayo y concuerdan con lo sucedido a lo largo de él. Se observó diferencias de un grado Celsius entre un bloque y otro, siendo menor en el bloque 1 (barricas a piso), aumentando su temperatura a medida que los bloques se encontraban a mayor altura.

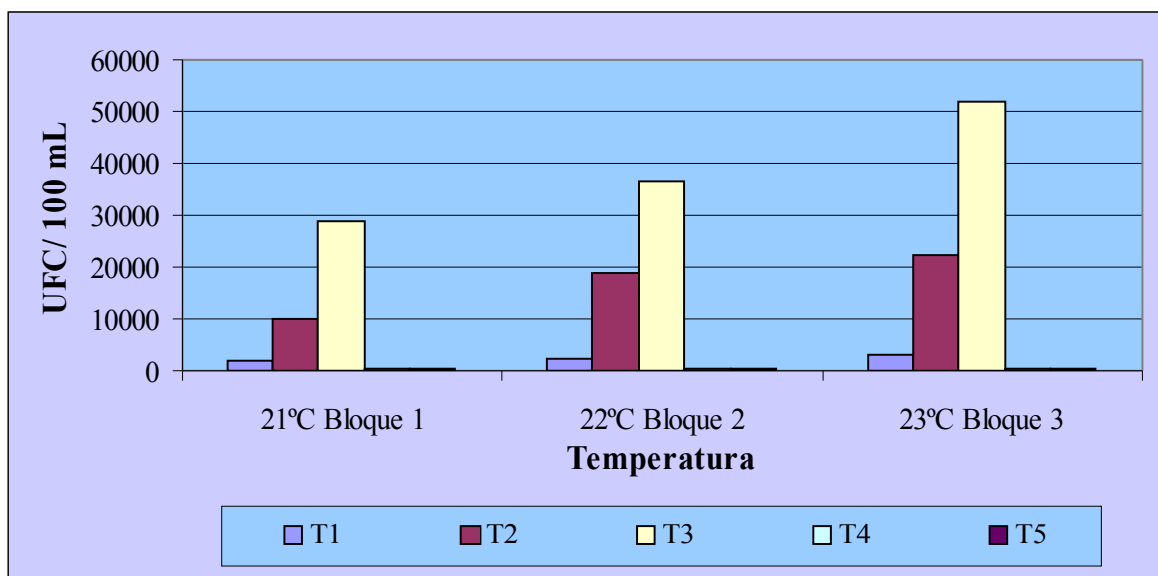


Figura 5. Desarrollo poblacional de *Brettanomyces spp.* a distintos valores de temperatura obtenidos en los diferentes bloques en el sexto mes del ensayo.

Análisis microbiológico

Durante el ensayo se realizaron recuentos poblacionales a fin de determinar diferencias significativas entre los tratamientos y confeccionar curvas de crecimiento para cada uno de ellos (Apéndice I).

Debido a la naturaleza microbiológica del ensayo, fue necesario garantizar la total y completa sanidad del vino usado en él. Por lo que previo al ensayo se realizó un recuento en placas de 25 mL de vino filtrado por una membrana de 0,45 μm , arrojando como resultado ningún crecimiento poblacional.

Además se realizó análisis de fenoles volátiles que son atribuibles a la presencia de *Brettanomyces spp.*, encontrándose una concentración de 4-etil-fenol menor a 4 mg/L y 4-etil-guaiacol menor a 4 mg/L, lo que descarta con total seguridad la presencia de esta levadura en el vino previo al ensayo (Chatonnet *et al.*, 1992; citado por Boulton *et al.*, 1996).

Los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos son los promedios de las repeticiones de cada tratamiento. Los valores se obtuvieron por recuento en placas después

de filtrar 25 mL de vino a través de una membrana estéril de 0,45 μm , expresando estos resultados en UFC (Unidades Formadoras de Colonias) por cada 100 mL de vino.

En el Apéndice I, se puede observar claramente la existencia de 2 niveles marcados de poblaciones, demostrando la importancia y diferencia de cada tratamiento. Los tratamientos T4 y T5 prácticamente no presentan crecimiento poblacional, demostrando la eficacia que produce el efecto conjunto de la quema de 5 gramos de azufre “mechado” más la aplicación de 3 a 4 ppm de ozono disuelto en agua, como método de control microbiológico para barricas de roble destinadas a la guarda de vino.

Este efecto conjunto se comprueba porque al comparar en el último mes del ensayo los tratamientos T4 y T5 con el testigo T1, y que estadísticamente no presentan diferencias significativas entre ellos (Cuadro 5), hay claramente una mayor población de levaduras en el tratamiento T1, demostrando la importancia del uso de ozono como factor restrictivo para el desarrollo microbiológico (Paquin, 1995).

La inexistencia de diferencias significativas entre los tratamientos T1, T4 y T5 al final del ensayo se puede explicar por la amplitud de los valores obtenidos entre la totalidad de los tratamientos, esto se comprobó porque al eliminar los tratamientos T2 y T3 del análisis estadístico, se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos en que se usó ozono y mechado conjuntamente T4 y T5, y el testigo T1 que solo ocupó mechado.

Cuadro 5. Poblaciones de *Brettanomyces spp.* presentes en los distintos tratamientos a lo largo del ensayo.

Tratamientos	Tiempo					
	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 6
T1	0	9b	68b	139b	380b	761c
T2	0	36a	240a	1067a	13921a	39161a
T3	0	35a	172ab	1031a	6482a	17081b
T4	0	5bc	16c	17b	36b	36c
T5	0	1c	9c	9b	12b	12c

Letras iguales en cada parámetro indican que no existen diferencias significativas a un nivel del 5%.
 Datos expresados en UFC/100 mL de vino.

Por otro lado la mayor concentración poblacional se produjo en los tratamientos T2 y T3, alcanzando su máximo valor en el último mes del ensayo, observándose una evolución poblacional de tipo exponencial (Apéndice I).

Debido a las características de crecimiento del género *Brettanomyces*, más los factores restrictivos para él mismo presentes en el vino al inicio del ensayo (SO_2 , acidez, pH); no existió crecimiento en el primer mes en ninguno de los tratamientos (Cuadro 5).

En el Cuadro 5 se aprecia una diferencia estadística de los tratamientos a lo largo del ensayo, en los resultados obtenidos en los primeros 3 meses del ensayo, se observaron diferencias entre los tratamientos, etapa en la cual no se ve una tendencia, ya que se encontraron tratamientos estadísticamente diferentes en un mes y que posteriormente no presentan diferencias estadísticas al mes siguiente.

A partir del cuarto mes en adelante se aprecia una clara diferenciación de los tratamientos, agrupando los tratamientos T1, T4 y T5 en el grupo que presenta el menor o nulo crecimiento poblacional y que no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí. Esto demuestra la efectividad de estos tratamientos para el control microbiológico de *Brettanomyces spp.*

Es importante señalar que si bien no existe diferencia estadística entre estos tratamientos, se observa una mayor efectividad en los tratamientos que usaron ozono por 5 minutos mas mechado (T4) y ozono por 1 hora mas mechado (T5), respecto al testigo (T1) evitando así la proliferación de *Brettanomyces spp.* a lo largo del ensayo.

Respecto a los tratamientos que solo ocuparon ozono para el control de *Brettanomyces spp.*, T2 (ozono 5 minutos) y T3 (ozono 1 hora), estadísticamente diferentes de los tratamientos antes mencionados, y que se caracterizan por el mayor crecimiento poblacional de ésta levadura a lo largo del ensayo. En el cuarto y quinto mes del ensayo no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos T2 y T3, en ambos tratamientos existe un aumento en las poblaciones de *Brettanomyces* a partir del cuarto mes en adelante, esto se puede deber a que el efecto del ozono disuelto en agua como único método de control, no ejerce un control efectivo sobre *Brettanomyces spp.* También se podría deber a la baja concentración de ozono ocupada en estos tratamientos, esto coincide con estudios realizados en cubos de madera de roble contaminada con esta levadura y que indican que rangos entre 1 a 5 mg/L de ozono disuelto en agua aplicado por 3 minutos en

los cubos, no tienen ningún efecto sobre el crecimiento de *Brettanomyces spp.* (Cantacuzene *et al.*, 2003).

En el último mes del ensayo (Cuadro 5), se aprecia una diferencia estadística entre los tratamientos T2 y T3, lo que se puede deber a la diferencia que existe en los tiempos de aplicación de ozono en estos tratamientos, siendo el tratamiento T3 el que presenta menor crecimiento poblacional, lo que evidencia un mayor control sobre esta levadura debido al mayor tiempo de exposición (ozonización por una hora), de las barricas en donde difunde de mejor forma el ozono al interior de la madera, demorando el crecimiento y proliferación de *Brettanomyces spp.* a lo largo del tiempo.

Evaluación sensorial de los vinos

Los resultados obtenidos en la degustación y su análisis estadístico aparecen compilados en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Resultados del análisis sensorial realizado al término del ensayo.

Parámetros	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5
Color	10,1a	10,2a	9,9a	10,5a	10,3a
Animal	3,8b	7,8a	7,9a	1,8c	1,7c
Tempera	3,3b	8,9a	6,9a	1,9b	2,1b
Volátil	2,1c	5,1a	4,0b	0,9d	1,4dc
Vegetal	3,9a	3,3a	4,1a	3,6a	3,5a
Metálico	2,3a	2,6a	3,7a	3,2a	2,9a
Floral	2,5a	3,7a	2,9a	3,6a	3,3a
Cuerpo	8,0a	7,5a	7,2a	8,1a	8,1a
Aceptabilidad No entrenado	8,5a	8,1a	8,1a	7,2a	8,4a
Aceptabilidad Entrenado	10a	5,8b	6,1b	10,1a	10,9a

Letras iguales en cada parámetro indican que no existen diferencias significativas a un nivel del 5%.

Aceptabilidad

La aceptabilidad se determinó mediante el método de la Escala Hedónica con una pauta no estructurada de 0 a 15 cm (Anexo I). Se consideró una evaluación formada por 2 paneles de degustación, un panel de 12 personas no entrenadas y otro con 12 personas entrenadas, a fin de establecer una comparación entre el grupo de evaluadores más especializados y el otro sin especialización.

Para el análisis se consideraron los diferentes rangos que presenta el método de la Escala Hedónica, determinando zonas de rechazo, indiferencia y agrado (Araya, 2004).

Los valores expresados en el Cuadro 6, corresponden a los promedios de los puntajes de cada tratamiento, y que fueron analizados estadísticamente por un análisis de varianza y test de rango múltiple de Duncan.

En la evaluación de aceptabilidad correspondiente al panel no entrenado (Cuadro 6), se aprecia que no existen diferencias significativas entre los tratamientos, aunque los puntajes de estos son muy similares entre sí, existe una pequeña diferencia de calificación, ubicándose los tratamientos T1, T2, T3 y T5 en la zona de aceptación y el tratamiento T4 en la zona de indiferencia.

En la evaluación de aceptabilidad para el panel entrenado, en el Cuadro 6 se observaron diferencias entre los tratamientos, encontrándose dos grupos según los puntajes obtenidos. Los tratamientos T2 y T3 estadísticamente diferentes del resto de los tratamientos, pero iguales entre sí, presentan el menor puntaje asignado y ambos caen en la zona de rechazo, esto tiene directa relación con alteraciones que afectan en forma negativa las características sensoriales del vino y que son atribuibles a la presencia de *Brettanomyces spp.* y su elevado desarrollo poblacional en ambos tratamientos.

Los tratamientos T1, T4 y T5 estadísticamente iguales, presentan los mayores puntajes que corresponden a la zona de aceptación, esto concuerda con el menor crecimiento poblacional de *Brettanomyces spp.* en estos tratamientos y que en consecuencia no hay caracteres defectuosos a nivel sensorial presentes en el vino.

Es importante señalar la diferencia que se produce entre los dos grupos de evaluadores, siendo los entrenados capaces de distinguir y diferenciar con mayor precisión las características sensoriales que afectan la calidad de un vino y que se expresan en los puntajes asignados a los distintos tratamientos.

Finalmente, no se atribuyen diferencias entre los tratamientos producto del olor que produce el ozono aplicado en barricas (chispas, cables quemados), debido a que no existe relación que lo demuestre.

Calidad

La calidad de los vinos una vez terminado el ensayo fue determinada con una pauta no estructurada de 0 a 15 cm especialmente elaborada y basada en la pauta propuesta por la OIV (Anexo II).

Los resultados son los promedios de los puntajes obtenidos en los diferentes tratamientos y están representados en el Cuadro 6.

En la pauta utilizada se emplearon parámetros descriptivos atribuibles a la alteración de un vino debido de la presencia de *Brettanomyces spp.* o debido al uso de ozono en barricas para la guarda de vino.

Estos atributos organolépticos fueron medidos de acuerdo a la intensidad presente en el vino.

El color es un parámetro muy importante en la evaluación sensorial, debido a las propiedades altamente oxidativas del ozono, se esperaba la alteración de este parámetro producto de la influencia particular de algún tratamiento. Por el contrario, en el cuadro 6 se aprecia que no hay diferencias entre los tratamientos observándose puntajes bastante elevados para este descriptor, descartando un efecto negativo en el vino producto del uso de ozono en la sanitización de barricas previo a su llenado.

Para el carácter animal, se encontró diferencias significativas entre los distintos tratamientos, como se aprecia en el Cuadro 6 existen 3 grupos.

Los tratamientos T2 (O₃ por 5 minutos) y T3 (O₃ por 1 hora), no presentan diferencia significativa entre ellos, son los que promedian el mayor puntaje de acuerdo a la intensidad de este descriptor. Lo que tiene una directa relación con la alta concentración de levaduras del género *Brettanomyces* presente en estos tratamientos.

Esto se puede explicar porque el sabor con carácter animal presente en un vino es producido por el compuesto 4-etil-fenol, y que se detecta cuando las densidades poblacionales alcanzan un alto número, alrededor de 200 UFC/mL (Chatonnet *et al.*, 1995).

Después de los tratamientos mencionados aparece el testigo (T1), tratamiento en que solo se usó mechado como agente de sanitización donde se observó una intensidad bastante mas baja y que por efectos estadísticos es diferente significativamente del resto de los tratamientos.

Finalmente el carácter animal se encuentra menos representado en los tratamientos T4 y T5, con el menor puntaje asignado (Cuadro 6), lo que demuestra una baja percepción por los panelistas y que coincide con el menor desarrollo poblacional de *Brettanomyces spp.* en estos tratamientos, donde no existe diferencia estadística entre ellos, pero sí con el resto de los tratamientos.

Otro descriptor evaluado en el ensayo es el carácter químico o tempera, presente en un vino alterado por *Brettanomyces spp.*

En promedio los tratamientos T2 y T3 presentan los mayores puntajes siendo estadísticamente diferentes del resto de los tratamientos pero iguales entre sí, ambos reflejan una mayor intensidad de este carácter, concordando nuevamente con una mayor alteración por *Brettanomyces spp.* debido al alto desarrollo poblacional de la levadura presente en estos tratamientos.

El carácter químico (tempera) de un vino esta relacionado con el fenol 4-etil-guaiacol (Chatonnet *et al.*, 1995), cuya presencia puede ser atribuida a *Brettanomyces spp.*

Respecto a los tratamientos T1, T4 y T5, estadísticamente diferentes del resto de los tratamientos, pero iguales entre sí, se observa una similitud al análisis realizado para el carácter animal, encontrándose una mayor intensidad en el tratamiento T1 (solo mechado) y puntajes menores en los tratamientos que usaron ozono por 5 minutos combinado con mechado (T4) y ozono por 1 hora mas mechado (T5), descartando la alteración de estos tratamientos por efectos de *Brettanomyces spp.*

Los análisis para el descriptor volátil están relacionados con la concentración de ácido acético en un vino y que generalmente es usada como un indicador de alteración microbiológica o avinagramiento en el vino (Zoecklein *et al.*, 1995).

Los bajos promedios obtenidos y que se observan en el Cuadro 6, indican que este descriptor no está claramente detectado en las muestras evaluadas, lo que concuerda con las

concentraciones de acidez volátil encontradas en los análisis químicos anteriormente descritos en las páginas 21 y 22.

Respecto a los tratamientos se aprecia que la mayor intensidad nuevamente recae en los tratamientos T2 y T3, que estadísticamente son diferentes al resto. Esto se podría deber a la mayor carga poblacional presente en estos tratamientos.

El mayor puntaje corresponde al tratamiento T2 (5,1) y luego se encuentra el tratamiento T3 (4,0). Esto no presenta relación con la concentración de acidez volátil observada en los análisis químicos del vino al final del ensayo (Cuadro 4), ya que ésta es prácticamente igual en ambos tratamientos.

En el Cuadro 6, también se puede observar la relación que existe entre los otros 3 tratamientos, encontrándose similitud estadística entre los tratamientos T4 y T5, y los tratamientos T5 y T1.

Al analizar los tratamientos T4 y T1 si se observaron diferencias significativas obteniendo el menor valor de intensidad el tratamiento T4.

Los resultados obtenidos por los tratamientos T1, T4 y T5 tienen directa relación con la acidez volátil encontrada en los análisis químicos realizados al final del ensayo.

Respecto al carácter vegetal presente en el vino los valores observados son bajos y no se observaron diferencias significativas a un nivel del 5 % entre los tratamientos, lo que significa que este descriptor no tiene relación con la influencia de *Brettanomyces spp.* en los tratamientos, tampoco se ve afectado por la diferencia que existe entre los tratamientos respecto al uso de ozono previo al ensayo.

El carácter metálico se incluyó en la evaluación sensorial como un carácter atribuible al uso de ozono en barricas y que posteriormente podría verse reflejado en el vino. En relación a esto, no se encontró diferencias atribuibles al uso de ozono en los distintos tratamientos, encontrándose valores bajos para éste parámetro y no existiendo diferencias estadísticamente significativas en el ensayo.

Otro parámetro evaluado fue el carácter floral presente en el vino atribuible a alguna alteración química presente en él, según lo observado en el Cuadro 6, no se encontraron

diferencias estadísticas entre los tratamientos, lo que indica que no hubo alteración de este descriptor producto del efecto de algún tratamiento en particular.

En la evaluación del cuerpo en los 5 tratamientos se obtuvo un puntaje bastante bueno encontrándose valores por sobre la media de la regla de medición (Anexo II), muy similares entre sí, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Esto descarta la influencia de algún tratamiento en particular sobre esta característica sensorial.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación permiten concluir que los distintos tratamientos fueron determinantes en el crecimiento y control de *Brettanomyces spp.*

De los 5 tratamientos evaluados, los tratamientos que combinaron el uso de ozono más mechado fueron capaces de controlar en forma efectiva la proliferación de *Brettanomyces spp.* Respecto al efecto de los tratamientos que solo usaron ozono como agente sanitizante, fueron los tratamientos que obtuvieron los peores resultados, siendo incapaces de controlar el crecimiento de *Brettanomyces spp.*

Esto nos permite concluir que el ozono disuelto en agua como único agente de sanitización de barricas, no ejerce un control adecuado sobre el crecimiento de esta levadura, provocando un deterioro posterior en la calidad del vino.

Al comparar el testigo T1 (solo mechado) con los tratamientos que mezclaron el uso de ozono y mechado T4 y T5 se concluyó que el mechado como único agente de sanitización no tiene un efecto completamente restrictivo en el crecimiento y desarrollo de la levadura.

Finalmente se puede concluir que el uso combinado de 3 a 4 ppm de ozono disuelto en agua más el mechado de 5 g de azufre (T5), es el método más efectivo para el control de *Brettanomyces spp.*, además se observó que el uso de ozono aplicado durante mayores tiempos de exposición ejerce un mejor control sobre la actividad microbiológica, como se aprecia al comparar los tratamientos que usaron ozono por 5 minutos versus los que fueron ozonizados por 1 hora.

Respecto al efecto que puede ejercer el uso de ozono en barricas, sobre las características químicas y sensoriales del vino, se comprobó que no existe ninguna alteración sobre éstas.

Las alteraciones que se observaron en los análisis químicos son producto de las modificaciones producidas por el alto nivel poblacional de *Brettanomyces spp.* presentes en algunos tratamientos, lo que en forma posterior altera y modifica las propiedades sensoriales del vino. Por lo tanto la única relación que existe entre el ozono y la alteración

de las características sensoriales del vino se debe al control o no, que pueda ejercer este agente sanitizante sobre el desarrollo de *Brettanomyces spp.* en el vino.

Como recomendación final se sugiere un posterior estudio evaluando otras formas de aplicación de ozono (gaseoso), con distintas dosis y diferentes métodos.

LITERATURA CITADA

ARAYA, E. 2004. Guía de laboratorio del curso de Evaluación sensorial. Departamento de Agroindustria y Enología. Universidad de Chile, Santiago. 80 p.

ARNOLD, J. 1994. Efectos y usos del ozono. Revista de Ciencia del Instituto Pasteur y Fauvel, 125 (32): 28-32 .

ATCC, 2002. Formulaciones microbianas de los medios. The Global Bioresource Center [en línea]. Disponible en el WWW: <<http://www.atcc.org>> (Consulta: Noviembre 2002).

BLONDIN, B.; RATOMAHENINA, R.; ARNAUD, A. and GALZY, P. 1982. A study of cellobiose fermentation by a Dekkera strain. Biotechnology and bioengineering, (24): 2031-2037.

BORDEU, E. y SCARPA, J. 1998. Análisis químico del vino. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago. 254p.

BOULTON, R.; SINGLETON, V.; VISON, L. and KUNKEE, R. 1996. Principles and practiques of winemaking. Ed . Chapman and Hall, New York. 604p.

CANTACUZENE, N.; DORMEDY, E.; SMILANICK, J.; FUGELSANG, K.; WAMPLE, R.; BACON, D. and DORMEDY, D. 2003. Treating *Brettanomyces* in Oak Cubes with Gaseous and Aqueous Ozone. [en línea]. Disponible en el WWW: <http://www.asev.org/events/annualmeeting/2003abstracts/49_abstract.pdf> (Consulta: Julio 2004).

CHATONNET, P; DUBORDIEU, D. and BOIDRON, J. N.1995. The influence of Brettanomyces/Dekkera spp. Yeasts and Lactic Acid Bacteria on the Ethylphenol Content of Red Wines. *Am. J. Enol. Vitic*, 46 (4): 463-468.

CHATONNET, P. 1999. Prévention et détection des contaminations par Brettanomyces au cours de la vinification et de l' élevage des vins. *Revue Francaise d' Oenologie*, 39 (179): 20-24.

CHATONNET, P. 2000. La contamination des vins par Brettanomyces au cours de la vinification et de l' élevage : incidence, détection et de lutte. *Revue des Oenologues et des techniques vitvinoles et oenologiques*, (96): 23-26.

FLANZY, C. 2000. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Ediciones Mundi-prensa y AMV ediciones. Madrid. 782 p.

FUGELSANG, K. 1997. *Wine microbiology*. Ed Chapman and Hall, New York. 245 p.

HEIMOFF, S. 1998. Brett study yields surprises, Can problem yeast infect wine in new barrels, too? [en línea]. Disponible en el WWW: <<http://www.winebusiness.com/html/siteframeset.cfm?fn=../archives/monthly/1996/9607/bmo79637.htm>> (Consulta: Septiembre 2002).

HERESZTYN, T. 1986. Formation of substituted tetrahydropyridines by species of Brettanomyces and Lactobacillus isolated from mousy wines. *Am. J. Enol. Vitic*, 37 (2): 127-132.

MAKEWINE, 2002. *The Amateur Winemakers of Ontario* [en línea]. Disponible en el WWW: <<http://www.makewine.com/default.eht>> (Consulta: Diciembre 2002).

MITRAKUL, C.; EGLI, C. and HENICK-KLING, T. 1997. Identification of Brettanomyces / Dekkera Yeast From California Wines [en línea]. Disponible en el WWW:

<http://www.nysaes.cornell.edu/pubs/wine_grape_found/enology97.html> (Consulta: Diciembre 2002).

MORGAN, J. 1998. Filtration and fining: important tools, not dirty words [en línea]. Disponible en el WWW: <<http://www.winespector.com/wine/spector/unfiltered/22297.archive>> (Consulta: Noviembre 2002).

PAQUIN, G. 1995. Destrucción de bacterias y virus por ozono [en línea]. Disponible en el WWW: <<http://www.delozone.com/products/application>> (Consulta: Noviembre 2002).

PEYNAUD, E. 1984. Enología Práctica: conocimientos y elaboración del vino. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 414p.

QUEROL, A. 1992. Selección y caracterización molecular de levaduras vínicas en la D.O. Alicante. Memoria de título doctor en Ciencias biológicas. Facultad de biología, Universidad de Valencia, España. 728 p.

RANKINE, B. 1989. Manual Práctico de enología. Prefacio de Maynard Amerine. Adelaida, Australia. 394p.

RICE, R. 1985. Uses of Ozono I drinking water Treatment [en línea]. Disponible en el WWW: <<http://www.ozono.cubaweb.cu/simposios/2doproceeding1.htm>> (Consulta: Enero 2003).

SALVADORES, M. y CORDELL, E. 1993. Estudio comparativo de las especies de levaduras autóctonas aisladas durante dos vendimias en la isla de Tenerife. Revista Alimentaria, (27): 75-77.

TRIOZON, 2002. Generadores de Ozono [en línea]. Disponible en el WWW: <<http://www.atexport.org/pagesp/info/alimentos>> (Consulta: Noviembre 2002).

ZOECKLEIN, B.; FUGELSANG, K; GUMP, B. and NURY, F. 1995. Wine analysis and production. Ed. Chapman and Hall, New York. 621 p.

ANEXO I

Universidad de Chile
 Facultad de ciencias Agronómicas
 Departamento de Agroindustria y Enología

PAUTA DE ANÁLISIS DE ACEPTABILIDAD PARA VINOS
 (Pauta no estructurada)

Por favor, indique la aceptabilidad de las muestras, haciendo una línea vertical sobre la horizontal.

.....

0		
15		
Me desagrada mucho	Indiferencia	Me gusta

.....

0		
15		
Me desagrada mucho	Indiferencia	Me gusta

.....

0		
15		
Me desagrada mucho	Indiferencia	Me gusta

.....

0		
15		

Me desagrada
mucho

Indiferencia

Me gusta

.....

0

15

Me desagrada
mucho

Indiferencia

Me gusta

Comentarios: