

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**CARACTERÍSTICAS ENOLÓGICAS DE LOS CULTIVOS INICIADORES
COMERCIALIZADOS EN CHILE PARA LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA
EN VINOS TINTOS**

ÁLVARO ANDRÉS AMÉSTICA MARÍN

Santiago, Chile

2015

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**CARACTERÍSTICAS ENOLÓGICAS DE LOS CULTIVOS INICIADORES
COMERCIALIZADOS EN CHILE PARA LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA
EN VINOS TINTOS**

**OENOLOGICAL CHARACTERISTICS OF STARTER CULTURES FOR
CHILEAN MARKET FOR MALOLACTIC FERMENTATION IN RED WINE**

ÁLVARO ANDRÉS AMÉSTICA MARÍN

Santiago, Chile
2015

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

**CARACTERÍSTICAS ENOLÓGICAS DE LOS CULTIVOS INICIADORES
COMERCIALIZADOS EN CHILE PARA LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA
EN VINOS TINTOS**

Memoria para optar al Título Profesional de:
Ingeniero Agrónomo

ÁLVARO ANDRÉS AMÉSTICA MARÍN

| Profesores Guía | Calificaciones |
|--|----------------|
| Srta. Carla Jara C. Ingeniero Agrónomo, Dr. | 6,3 |
| Sr. Jaime Romero O. Bioquímico, Dr. | 6,0 |
| Profesores Evaluadores | |
| Sra. Carmen Prieto D. Ingeniero Agrónomo, Mg. Sc. | 6,7 |
| Sra. Loreto Cánaves S. Ingeniero Agrónomo, M.S. | 6,3 |

**Santiago, Chile
2015**

*A mi madre, padre y familia.
“Your future is whatever you make it, so make it a good one”*

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores guías Carla Jara y Jaime Romero, por su disponibilidad de atenderme en cualquier momento del día. A mi pareja Nahomi (coshita), por acompañarme, apoyarme y ayudarme en todo el proceso universitario. A mis amigos que estuvieron conmigo y las nuevas amistades que se constituyeron en la Universidad de Chile

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| Palabras clave..... | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| Key words..... | 2 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 6 |
| Lugar de estudio..... | 6 |
| Materiales..... | 6 |
| Metodología..... | 6 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 8 |
| 1. Bacterias Lácticas comunmente involucradas en la Fermentación Maloláctica..... | 8 |
| Bacterias Lácticas | 8 |
| La Fermentación Maloláctica | 9 |
| 2. Riesgos de la Fermentación Maloláctica espontánea en vinos tintos | 12 |
| Factores ambientales que afectan la Fermentación Maloláctica espontánea | 12 |
| pH..... | 12 |
| Anhidrido sulfuroso (SO ₂) | 13 |
| Etanol | 14 |
| Temperatura | 14 |
| Interacción entre levaduras y Bacterias Lácticas | 14 |
| Prácticas enológicas que afectan la Fermentación Maloláctica espontánea | 15 |
| Desviaciones organolépticas producidas por Bacterias Lácticas alterantes en vinos tintos..... | 16 |
| Acidez volátil | 16 |
| Amargor en el vino..... | 17 |
| Producción de fenoles volátiles y bases heterocíclicas aromáticas | 18 |
| Compuestos generados por Bacterias Lácticas, nocivos para la salud humana | 19 |
| Éxito en la Fermentación Maloláctica..... | 25 |
| 3. Cultivos iniciadores de la Fermentación Maloláctica | 26 |
| Fundamentos de la Fermentación Maloláctica inducida..... | 26 |

| | |
|--|----|
| Incidencia de la utilización de cultivos iniciadores de Bacterias Lácticas en la duración de la Fermentación Maloláctica | 26 |
| Producción de compuestos tóxicos por Bacterias Lácticas, en la fabricación de vinos tintos | 29 |
| Cultivos iniciadores de la Fermentación Maloláctica comercializados en Chile..... | 32 |
| Productos comerciales marca Anchor Wine Yeast | 33 |
| Productos comerciales marca CHR-Hansen..... | 34 |
| Productos comerciales marca Laffort..... | 35 |
| Productos comerciales marca Lallemmand | 36 |
| Productos comerciales marca Lamothe-abiet..... | 38 |
| Productos comerciales marca Oenofrance | 39 |
| Comparación de las propiedades enológicas de los cultivos comercializados en Chile | 40 |
| Impacto del uso de cultivos iniciadores comerciales en las propiedades organolépticas del vino..... | 44 |
| Aportes de los cultivos iniciadores para la Fermentación Maloláctica en las propiedades organolepticas del vino | 44 |
| Disminución en la intensidad colorante del vino, producto de la Fermentación Maloláctica..... | 47 |
| Generación de olores indeseables por parte de inóculos comerciales de Bacterias Lácticas | 47 |
| Incremento en la acidez volátil producto de la inoculación de Bacterias Lácticas..... | 48 |
| CONCLUSIONES | 49 |
| BIBLIOGRAFÍA | 50 |

RESUMEN

La fermentación maloláctica (FML) es un proceso bioquímico típico en la producción de vinos tintos en Chile, conducido por las bacterias lácticas (BL). Se produce la transformación del ácido L-málico en ácido L-láctico, reduciendo el nivel de acidez. Además, esta fermentación conlleva una modificación en el sabor y en los aromas y otorga estabilidad microbiológica al vino.

La FML se puede producir espontáneamente mediante la acción de microbiota láctica nativa presente en el vino, o también se puede inducir a través de cultivos seleccionados de BL. Durante una FML espontánea se ha reportado que la BL mejor adaptada a las condiciones de vinificación, tales como pH bajo y alto contenido de etanol, es *Oenococcus oeni*. Sin embargo, existen otros géneros de BL indeseadas, como *Pediococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, que conllevan a alteraciones en la composición organoléptica del vino. Es por esto que se han buscado alternativas para el control de este proceso fermentativo, para lo cual se han utilizado cultivos comerciales de BL seleccionadas. Los catálogos o fichas técnicas de estos cultivos enfatizan una rápida implantación de estos microorganismos en el vino, por lo que se controla la FML, otorgándole tempranamente una estabilidad microbiológica. Además, en estos catálogos, describen aportes beneficiosos al perfil sensorial, destacando una muy baja producción de aminas biógenas y acidez volátil.

La práctica de inocular con BL seleccionadas no es muy utilizada en la elaboración de vinos tintos en Chile, debido a los resultados inciertos que se han obtenidos. Es por esto, que se recopiló la mayor información relacionada al tema, con el fin de analizar estudios que respaldasen el uso de los cultivos comerciales de BL.

Los estudios en Chile sobre la utilización de cultivos comerciales de BL, no exponen consistencia en sus resultados sobre los aportes organolépticos que otorgan estos cultivos comerciales al vino. Se reportaron que estos cultivos comerciales lograron disminuir el tiempo de la FML, aunque no fue tan preponderante como las descritas en estudios extranjeros. Se aprecia un consenso, a nivel internacional, sobre la nula producción de aminas biógenas y acidez volátil por parte de BL comerciales. En ningún caso se evidenció algún defecto organoléptico atribuible a la utilización de los inóculos comerciales de BL, respaldando la seguridad y rápida implantación que se promocionan en los catálogos comerciales de BL.

Palabras clave: Vinos, Fermentación Maloláctica, Bacterias Lácticas, inoculación.

ABSTRACT

Malolactic fermentation (MLF) is a biochemical process that is typically used in the production of red wine in Chile, undertaken by the lactic acid bacteria (LAB). The conversion of L-malic acid into L-lactic acid reduces the level of acidity. Moreover, this fermentation entails an change in the flavor, aroma and gives a microbiological stability to the wine.

MLF may be spontaneously produced by the native lactic microbiota actions that are present in the wine, or it can be introduced through selective LAB cultures. During an spontaneous MLF, it has been reported that the LAB best tolerant to wine making production such as low pH levels and high levels of ethanol, is *Oenococcus oeni*. However, there are others undesirable LAB species as *Pediococcus*, *Lactobacillus* and *Leuconostoc*, which produce alterations in the organoleptic components of the wine. This is the reason why alternatives to the control of the fermentation process have been looked for. In order to do this, selective LAB cultures has been commercially used. The catalogs or data sheets of these cultures emphasize a fast introduction of those microorganisms in the wine; controlling MLF gives an early microbiological stability. In addition, in those catalogs are described the beneficial contributions to the sensorial profile, highlighting the low production of biogenic amines and volatile acidity.

Inoculation practices with LAB are not very used in Chilean winemaking industry, since the uncertain results obtained. This is why, it has been compiled a big amount of information related to it, with the purpose of analyzing the use of LAB cultures.

Chilean research about the use of commercial LAB cultures does not show consistency in results of organoleptic contributions. It was reported that those commercial cultures decreased MLF time, even though it was not as preponderant as described in foreign research. It was seen, as an international consensus, the lack of production of biogenic amines and volatile acidity from commercial LAB cultures. Under no circumstances there were shown organoleptic flaws ascribable to the use of commercial LAB inoculums backing security and the fast implantation that is promoted in commercial LAB catalogs.

Key words: Wine, Malolactic Fermentation, Lactic Acid Bacteria, inoculation.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos como las bacterias y las levaduras están involucrados en innumerables procesos en la elaboración de alimentos, tales como la producción de vino, elaboración de yogurt, quesos y vinagres, entre otros (Muñoz *et al.*, 2011). En el proceso de elaboración del vino, existe una convivencia entre los grupos microbianos de mohos, levaduras, bacterias acéticas y bacterias lácticas (González-Arenzana *et al.*, 2013). Las levaduras, son las responsables del proceso bioquímico más importante en la elaboración del vino: la fermentación alcohólica (FA), en la cual se transforman los azúcares fermentables (glucosa y fructosa), en etanol y dióxido de carbono (CO₂) (Carretero, 2006). En la vinificación, se puede producir otro proceso importante conocido como la fermentación maloláctica (FML), y que es conducido por bacterias lácticas (BL).

La FML, es un proceso en donde existe una transformación del ácido málico en ácido láctico (Epifanio, 2005). Esta reacción está catalizada por la enzima maloláctica, que está presente en las BL (Catania y Avagnina, 1994). Este proceso fermentativo modifica la composición química del vino, otorgándole características organolépticas, tales como la desacidificación del vino; que resulta de la transformación del ácido málico en ácido láctico. También, reduce las sensaciones herbáceas y vegetales al vino (Boido, 2002). Por otro lado, la FML le confiere al vino estabilidad microbiológica. Este fenómeno, se debe a que las BL agotan los nutrientes en suspensión como azúcares, ácidos orgánicos y péptidos, compuestos esenciales para el desarrollo de microorganismos, como BL perjudiciales (*Pediococcus*, *Lactobacillus*) y bacterias acéticas (Romero, 2010 y Vestner *et al.*, 2011). Durante la FML se produce la pérdida en la coloración del vino, debido a una hidrólisis de los antocianos por el aumento del pH en el medio (Araque, 2010). Esta pérdida, también se asocia a una adsorción de antocianos, por las paredes celulares de las bacterias (Carrascosa *et al.*, 2005).

La FML se puede realizar de forma espontánea o inducida (Muñoz *et al.*, 2011). La FML espontánea, se produce por acción de las BL nativas presentes en la superficie de bayas y en equipos en la bodega (Catania y Avagnina, 1994). Los géneros bacterianos asociados a la FML espontánea son *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* (Du Toit, 2012). En cambio la FML inducida, se puede realizar mediante la inoculación de cultivos iniciadores comerciales de BL (Masqué *et al.*, 2007b). Los géneros bacterianos utilizados como cultivos iniciadores comerciales corresponden a *Oenococcus* y *Lactobacillus* (Palop, 2006).

Generalmente durante la FML espontánea, la proliferación y el desarrollo de las BL, se produce lentamente o simplemente no ocurre (Bordons *et al.*, 2004). Esto puede llevar a la multiplicación de poblaciones bacterianas alterantes, las cuales pueden degradar azúcares residuales o metabolizar el ácido cítrico, dando como resultado un aumento en la acidez volátil del vino (Catania y Avagnina, 1994). Por otra parte, en la FML espontánea no existe

un control específico del proceso, debido a la gran diversidad de microbiota láctica presente en el mosto y en el vino, existiendo la posibilidad de que BL alterantes (*Lactobacillus* y *Pediococcus*) proliferen generando así defectos organolépticos, como un notorio aumento en la acidez volátil, la generación de olores del tipo animal, entre otros (Boutou y Chatonnet, 2007 y Olgúin *et al.*, 2009). Debido a estos antecedentes, la inoculación con cultivos iniciadores seleccionados, reduce la posibilidad de contaminaciones con otro tipo de bacterias (Bauer, 2004), al poseer una alta carga de BL seleccionadas, se promueve una rápida iniciación de la FML, y un mejor control del perfil aromático y gustativo (Muñoz *et al.*, 2011).

Oenococcus oeni es la especie mejor adaptada a las condiciones del vino (Boido, 2002). Soporta bajos niveles de pH (3,0 - 3,3), altas concentraciones de etanol (>10 % v/v) y altas dosis SO₂ (50 mg L⁻¹) (Masqué *et al.*, 2007b y Muñoz *et al.*, 2011). Es por esto, que *Oenococcus oeni* es comúnmente utilizada como cultivo iniciador para la FML (Osborne y Edwards, 2005). *O. oeni*, es una especie heterofermentativa, por lo cual se recomienda inocular después de la FA, cuando existen menores niveles de azúcares fermentables (Bartowsky y Henschke, 1995). Esto se debe, a que las BL pueden consumir azúcares fermentables, generando ácido acético y ácido D-láctico, produciendo un defecto en el vino, denominado "picado láctico" (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975 y Jussier *et al.*, 2006). Sin embargo, estudios recientes reportaron que el consumo masivo de azúcares por *O. oeni*, comienza una vez terminado el consumo de ácido málico, no generando aumento en la acidez volátil (Azzolini *et al.*, 2010 y Izquierdo *et al.*, 2012).

Actualmente, en el mercado se pueden encontrar varios cultivos iniciadores de la FML, en su mayoría *O. oeni*. Estos cultivos están disponibles en forma liofilizada, congelada e incluso en formato líquido. Estos pueden ser de inoculación directa o con una fase de aclimatación previa. Con el objetivo de proporcionar una buena ejecución durante la FML, estos cultivos se utilizan asociados a distintos sistemas de reactivación y nutrición (Jackson, 2014a). Los inóculos comerciales, ofrecen modular las características organolépticas y respetar las características propias del cultivar. Estos inóculos se pueden utilizar en un mayor rango de condiciones enológicas, como vinos con alta graduación alcohólica, resistente pH bajos o al anhídrido sulfuros, entre otras, ya que se dispone de cepas específicas para esas condiciones, o bien, una mezcla de cepas.

De acuerdo con lo expuesto, los objetivos de esta monografía son los siguientes:

Compilar y comparar las propiedades enológicas de los cultivos iniciadores comercializados en Chile para la fermentación maloláctica en vinos tintos.

Analizar y discutir estudios que respalden el uso de los cultivos iniciadores en la fermentación maloláctica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar del estudio

La revisión bibliográfica se llevó a cabo en las dependencias de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Materiales

Para la elaboración de esta revisión bibliográfica, se utilizaron diferentes fuentes de información escritas, textos digitales y comunicaciones personales. Se acudió a los recursos informativos escritos tales como memorias de título, tesis de grado, revistas científicas relacionadas con el tema de investigación y libros especializados en Microbiología Enológica. Se accedió a recursos bibliográficos en línea como: artículos científicos mediante la plataforma VPN (Virtual Private Network), Servicio de Información y Bibliotecas de la Universidad de Chile (SISIB) y catálogos de empresas especializadas en cultivos iniciadores utilizados en la FML. También, se concurrió a los enólogos que representan estas empresas en Chile, mediante una entrevista (Lamothe-abiet, Lallemand S.A. y Oenofrance).

Metodología

Se inició el proyecto con una búsqueda exhaustiva de información, desde lo más general hasta llegar a fuentes informativas lo más específica, relacionadas con el tema de investigación, para así, generar un trabajo confiable y con resultados consistentes.

Se recopiló información de los cultivos iniciadores comerciales contenida en catálogos de empresas nacionales especializadas en Enología, tales como Vínicas y Partner S.A. También, se buscó información de empresas globales que cuenten con cultivos de bacterias lácticas en Chile como Anchor Wine Yeast, Chr. Hansen, Laffort, Lallemand, Oenobrand y Oenofrance. Mediante entrevistas personales, se acudió a los enólogos representantes de empresas de insumos enológicos, con el objetivo de evaluar la situación nacional que existe con respecto a los efectos en la utilización de bacterias lácticas comerciales en vinos tintos. Paralelamente, se buscaron y seleccionaron estudios científicos nacionales y extranjeros, que respaldasen la aplicación de estos cultivos iniciadores comerciales, con el fin de obtener una información integral con respaldo científico. Recopilada esta información, se procedió a analizar los resultados de estos reportes con los contenidos en los catálogos comerciales, y así encontrar alguna concordancia entre estas dos fuentes de información.

Terminado este análisis, se procedió a sintetizar y transcribir la información relevante para la investigación, con el objetivo de crear un documento íntegro que contenga la información adquirida de las distintas fuentes informativas utilizadas en la realización de esta monografía.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Bacterias lácticas comúnmente involucradas en la fermentación maloláctica

Bacterias Lácticas

Las BL son microorganismos que cumplen un rol fundamental en el proceso de elaboración de vinos tintos, las cuales son las responsables de conducir la FML (Carrascosa *et al.*, 2005). Estos microorganismos presentan diversas características morfológicas y metabólicas. Son microorganismos Gram-positivos, anaerobios facultativos, microaerófilos (para su desarrollo requieren pequeñas cantidades de oxígeno), inmóviles, no esporulados, son especies mesófilas y quimiorganotrófica (Costello *et al.*, 1985; Bordons, 1997 y Boido, 2002).

Las BL se pueden dividir según su morfología, presentando formas de cocos y bacilos (Jackson, 2014a). Estas bacterias pueden metabolizar los azúcares fermentables de diversas formas, constituyendo también un criterio de clasificación. Estas bacterias tienen metabolismo homofermentativo y heterofermentativo (Figura 1). El mecanismo homofermentativo (*Pediococcus*), se caracteriza que a partir de una hexosa (glucosa) producirán, en su mayoría, ácido láctico y una molécula de ATP, mediante la vía glicolítica Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Este mecanismo fermentativo no tiene la capacidad de metabolizar pentosas, debido a la ausencia de la enzima fosfoacetolasa, responsable de transformar la pentosa en ácido láctico etanol y/o ácido acético (Stiles y Holzappel, 1997 y Muñoz *et al.*, 2011). Las BL heterofermentativas (*Leuconostoc* y *Oenococcus*), asimilan la glucosa mediante la vía pentosa-fosfato o fosfoacetolasa, con la producción subsecuente de dióxido de carbono, ácido láctico, ácido acético, etanol y ATP (Costello *et al.*, 1985 y Muñoz *et al.*, 2011). El género *Lactobacillus* posee metabolismo heterofermentativo, el cual tiene la particularidad de que se divide en facultativos y obligados, según la especie (Figura 1) (Boido, 2002). Las BL heterofermentativas facultativas, tienen la capacidad de metabolizar glucosa produciendo exclusivamente ácido láctico, pero asimilan las pentosas transformándolas en ácido láctico y acético mediante la vía pentosa-fosfato (Osborne y Edwards, 2005 y Muñoz *et al.*, 2011). Las heterofermentadoras obligadas, metabolizan hexosas en ácido láctico, etanol, ácido acético, dióxido de carbono y ATP, a través de la vía fosfoacetolasa (Boido, 2002 y Ramírez *et al.*, 2011). La ruta metabólica fosfoacetolasa de las bacterias heterolácticas (facultativas y obligadas), reduce las pentosas a acetato en lugar de etanol, como es en el caso de la fermentación de las hexosas, lo que podría incrementar notoriamente la acidez volátil del vino (Boido, 2002; Osborne y Edwards, 2005 y Muñoz *et al.*, 2011).

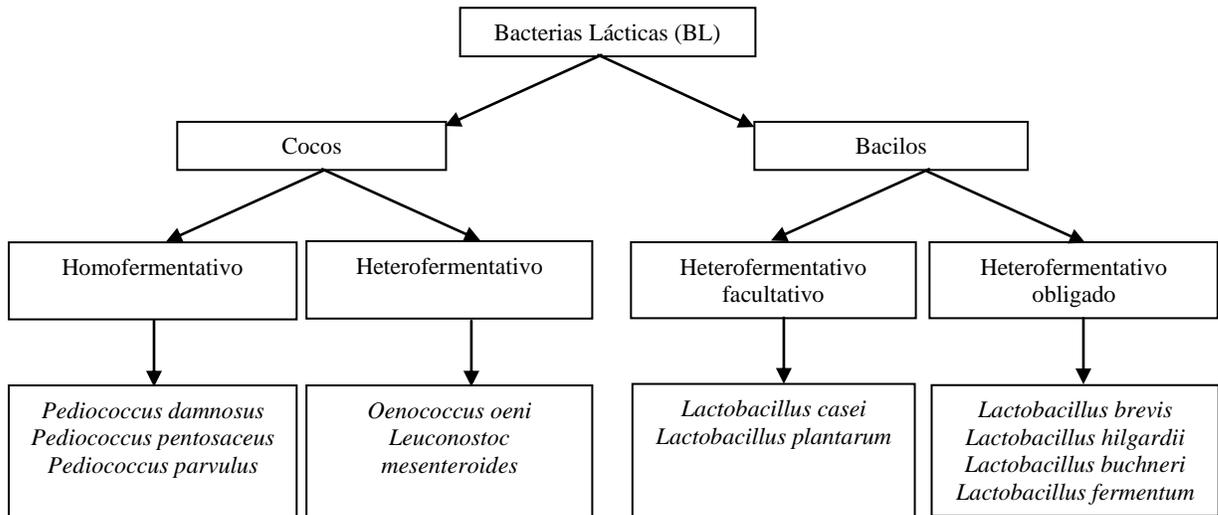


Figura 1: Clasificación de las especies de BL encontradas en el vino (Boido, 2002).

La Fermentación Maloláctica

La FML, es un proceso bioquímico, que ocurre generalmente al término de la fermentación alcohólica (Alcaide *et al.*, 2007). Consiste en la descarboxilación del ácido málico (L-malato), dando como productos finales el ácido láctico (L-lactato) y dióxido de carbono. Esta transformación es por acción de la enzima malato-carboxilasa (enzima maloláctica) presente en las BL (Figura 2). Además, durante la FML se modifica la composición organoléptica del vino, dado que producto del metabolismo de las BL, se generan compuestos como el acetato de etilo (éster), el cual a bajas concentraciones aporta un carácter afrutado al vino ($<80 \text{ mg L}^{-1}$) (Plata *et al.*, 2003 y Sumby *et al.*, 2010), o el diacetilo que le confiere un carácter mantecoso al vino (aroma a mantequilla) (Bordons, 1997). El consumo del ácido málico, por parte de las BL, otorga estabilidad microbiológica, debido a un agotamiento de nutrientes (azúcares, ácido málico, ácido cítrico, péptidos, vitaminas), eliminando su disposición para los microorganismos alterantes como bacterias acéticas y géneros de *Pediococcus* y *Lactobacillus* (Jussier *et al.*, 2006).

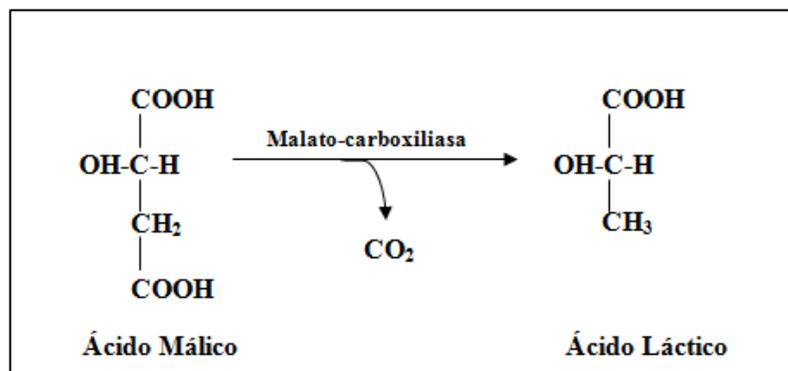


Figura 2: Metabolismo del ácido málico por parte de BL (Lonvaud-Funel, 2010).

La FML se puede llevar a cabo espontáneamente por acción de la microbiota láctica nativa de BL presentes en hojas, tallos, en la superficie de la baya y en equipos en la bodega (Knoll *et al.*, 2011 y Petri *et al.*, 2013). En este tipo de fermentación, se han reportado alrededor de 25 especies de BL, pertenecientes a los géneros: *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Weissella* (Wibowo *et al.*, 1985 y Petri, *et al.*, 2013). Estas BL están presentes en todos los procesos en la elaboración del vino (Petri *et al.*, 2013). Sin embargo, al comienzo de la FA existe un descenso paulatino en la población de BL (Figura 3) (Lonvaud-Funel, 2010). Esta dinámica entre las poblaciones de levaduras y BL, que se muestra en la Figura 3, es comúnmente encontrada durante la vinificación, ya que existe un aumento en la concentración de etanol, descenso del pH y una fuerte competencia de nutrientes con las levaduras (Muñoz *et al.*, 2011). La adición de SO₂ en dosis comúnmente utilizadas antes de la FA, que varía de 3 g hL⁻¹ (Guzmán, 1996 y Villarroel, 1999) a 5 g hL⁻¹ (Boido, 2002), también repercute en una reducción significativa en la población de BL, por lo que sumado a lo anterior, solo un número reducido de BL logra desarrollarse de forma exitosa (Carrascosa *et al.*, 2005).

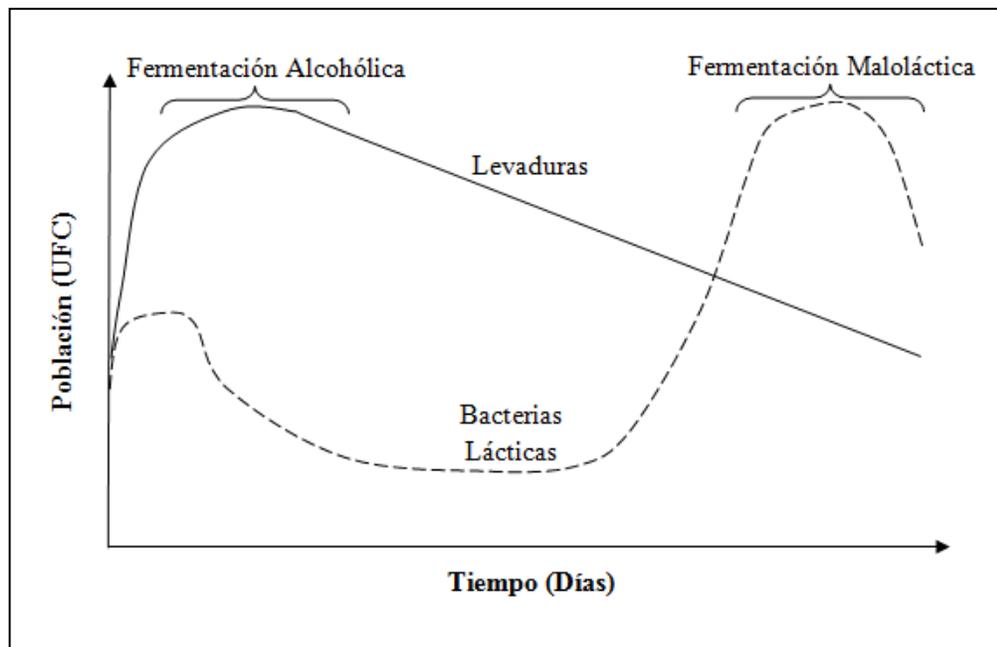


Figura 3: Ecología de levaduras y BL durante la vinificación (Adaptado de Lonvaud-Funel, 2010).

Otra forma de realizar la FML, es inducirla mediante la inoculación de cultivos iniciadores seleccionados de BL (Osborne y Edwards, 2005). Estos preparados comerciales, son capaces de proliferar y manifestar su actividad maloláctica en condiciones estresantes que presenta el vino, tales como pH inferior a 3,5 y a una concentración mayor a 10% ^{v/v} de etanol (Bordons, 1997 y Knoll *et al.*, 2011). Por lo general, *Oenococcus oeni* es la especie de BL quién logra desarrollarse en estas condiciones y, es por esto, que es frecuentemente

utilizada como cultivo iniciador para la FML (Guerrini *et al.*, 2003 y Petri *et al.*, 2013). Otro motivo por el cual *Oenococcus oeni*, es seleccionado como cultivo iniciador de la FML, es debido a que genera compuestos volátiles que enriquecen la composición organoléptica del vino (Alcaide *et al.*, 2007).

Du Toit, (2012) y Guidone *et al.*, (2014), han reportado que la especie *Lactobacillus plantarum*, tiene potencial para ser utilizada como un cultivo iniciador de la FML. Debido a que esta especie, posee alta tolerancia al pH (<3,5), soporta altas concentraciones de etanol (hasta 14% v/v), tiene una tolerancia al SO₂ similar a *O. oeni* (<50 mg L⁻¹) (Osborne y Edwards, 2005). Además, posee metabolismo heterofermentativo facultativo, por lo cual genera solo ácido láctico a partir de una glucosa, sin correr el riesgo de que se eleve la acidez volátil, producto del metabolismo de la glucosa (Guidone *et al.*, 2014). Además, produce compuestos aromáticos similares a *O. oeni* (Lerm *et al.*, 2011). A pesar de tener estas características, la velocidad en la transformación del ácido málico en ácido láctico que posee *L. plantarum* es menor que *O. oeni* en condiciones estresantes (Du Toit *et al.*, 2011). Du Toit *et al.* (2011), recomiendan que los cultivos de *Lb. plantarum* deben ser utilizados en vinos con baja graduación alcohólica y baja acidez, o bien, realizar una co-inoculación junto a las levaduras, en donde estos parámetros (alcohol y acidez) ejercen una menor presión sobre estas cepas bacterianas. Alegría *et al.* (2004), evaluaron el efecto del pH y el etanol sobre 25 cepas de *Lactobacillus plantarum* y 43 cepas de *Oenococcus oeni* aisladas de un vino tinto (no especifica cultivar), en la Rioja, España. Reportaron que a valores de pH 3,2, existió una mortalidad del 33% en *Lb. plantarum* y un 27% en *O. oeni*. Con 13% v/v de etanol la mortalidad de *Lb. plantarum* fue del 61,5%, mientras que en *O. oeni* fue solo 34,6%, quedando en evidencia la susceptibilidad de *Lb. plantarum* a condiciones ácidas y alta graduación alcohólica presente en los vinos.

2. Riesgos de la Fermentación Maloláctica espontánea en vinos tintos

En Chile, la mayoría de las bodegas realizan la FML espontánea (Villaruel, 1999 y Embeita, 2013¹). Esta práctica se basa en el desarrollo de la microbiota láctica nativa de BL, transcurrida la FA (Hervé, *et al.*, 2004). Sin embargo, esta acción se puede ver interrumpida por las condiciones físicas y químicas del vino, las prácticas enológicas y la interacción existente con otros microorganismos (Lonvaud-Funel, 2001 y Knoll *et al.*, 2011). De acuerdo a este escenario, existe la probabilidad que la FML no se produzca o que ésta se realice de forma parcial, dejando nutrientes disponibles para BL alterantes como *Pediococcus* y algunos géneros de *Lactobacillus*, tales como *Lb. collinoides*, *Lb. hilgardii* y *Lb. diolivorans*, afectando así la calidad final del vino (ver detalladamente punto: Desviaciones organolépticas producidas por Bacterias Lácticas alterantes en vinos tintos) (Sauvageot *et al.*, 2000; Hervé *et al.*, 2004; Garai-Ibabe *et al.*, 2008 y Muñoz *et al.*, 2011).

A continuación, se exponen los factores que podrían afectar la FML y las posibles alteraciones organolépticas que conllevaría realizar una FML espontánea.

Factores ambientales que afectan la Fermentación Maloláctica espontánea

pH. Es el factor más relevante a considerar al momento de realizar la FML, ya que condiciona el comportamiento de las BL. Este parámetro influye en la fase de aclimatación de las BL al medio, la tasa de crecimiento y actúa como seleccionador natural, ya que determina qué especies de BL es la idónea para conducir la FML (Wibowo *et al.*, 1985 y Knoll *et al.*, 2011). Esta condición de estrés que genera el pH, no solo discrimina al tipo de BL que realiza la FML, sino que también, afecta la velocidad de la FML. Bastías (2000), evaluó el proceso de la FML utilizando cepas comerciales de BL (Lallemand) en vinos cv. Cabernet Sauvignon, bajo dos condiciones de pH (3,42 y 3,0). Se obtuvo que a pH 3,42, la FML se logró completar en 48 días. Mientras, que en 75 días terminó la FML espontánea. A pH 3,0, no se logró la conversión total del ácido málico en ácido láctico, con ningún tratamiento, quedando en evidencia la influencia que posee el pH sobre las BL.

Rosi *et al.* (2003), inocularon un vino del cv. Cabernet Sauvignon con un cultivo comercial de BL (Lalvin 31, Lallemand) bajo 3 condiciones de pH: 3,2, 3,4 y 3,6. El consumo total de ácido málico se logró a los 11 días a pH 3,6; 15 días a pH 3,4 y finalmente 19 días a pH 3,2, existiendo una diferencia del 42,1% en la duración de la FML, entre los tratamientos a pH 3,2 y 3,6. Gockowiak y Henschke (2003); Rosi *et al.* (2003); Solieri *et al.* (2010) y Knoll *et al.* (2011), señalan que el pH es el atributo del vino que más afecta a la FML, y generalmente a pH inferior de 3,5, la FML se ve fuertemente inhibida, teniendo como

¹ Embeita, A. 2013, oct. Cultivos comerciales de bacterias lácticas. [Entrevista personal]. San Francisco de Mostazal, Lamothe-Abiet.

umbral mínimo de sobrevivencia para los inóculos comerciales un rango de pH de 3,2 (Solieri *et al.*, 2010 y Knoll *et al.*, 2011) a 2.9 (Gockwiak y Henschke, 2003).

Anhídrido sulfuroso (SO₂). Al igual que el pH, es un factor importante que debe ser considerados antes de realizar una FML, debido a que las BL son muy sensibles a este compuesto (Jackowetz y Mira de Orduña, 2012). El anhídrido sulfuroso, tiene un efecto inactivador o incluso impedir considerablemente el desarrollo bacteriano, puesto que inhibe la actividad ATPasa (H⁺-ATPasa). Esta actividad está unida a la membrana plasmática de las bacterias, afectando la generación de energía y por ende, al desarrollo de la BL (Carreté *et al.*, 2002 y Malherbe, 2007). Por otra parte, se ha reportado que la actividad de H⁺-ATPasa está directamente relacionada con la actividad maloláctica de las BL, por lo que cualquier alteración provocará un retraso o incluso una inhibición de la FML (Tourdot *et al.*, 1999). En el vino, el SO₂ puede estar presente de forma libre (molecular, bisulfito y sulfito) y combinada con otros compuestos (mayoritariamente ácido acetaldehído sulfuroso y anhídrido gluco sulfuroso), siendo la porción libre la que posee el efecto antimicrobiano, especialmente la forma molecular del anhídrido sulfuroso (ácido sulfuroso) (Carreté *et al.*, 2002 y Knoll *et al.*, 2011). Por otra parte, el pH define la distribución del SO₂ libre en el vino, mientras más bajo sea el pH (<3,0) la fracción del ácido sulfuroso es mayor (Figura 4) (Wibowo *et al.*, 1985 y Jackowetz y Mira de Orduña, 2012). Con dosis mayores a 40 mg L⁻¹ de SO₂ total o 10 mg L⁻¹ de SO₂ libre, combinado con valores bajo de pH (<3,2), el crecimiento bacteriano es fuertemente inhibido, debido a que a este pH está presente en el medio la forma molecular del anhídrido sulfuroso (Muñoz *et al.*, 2011).

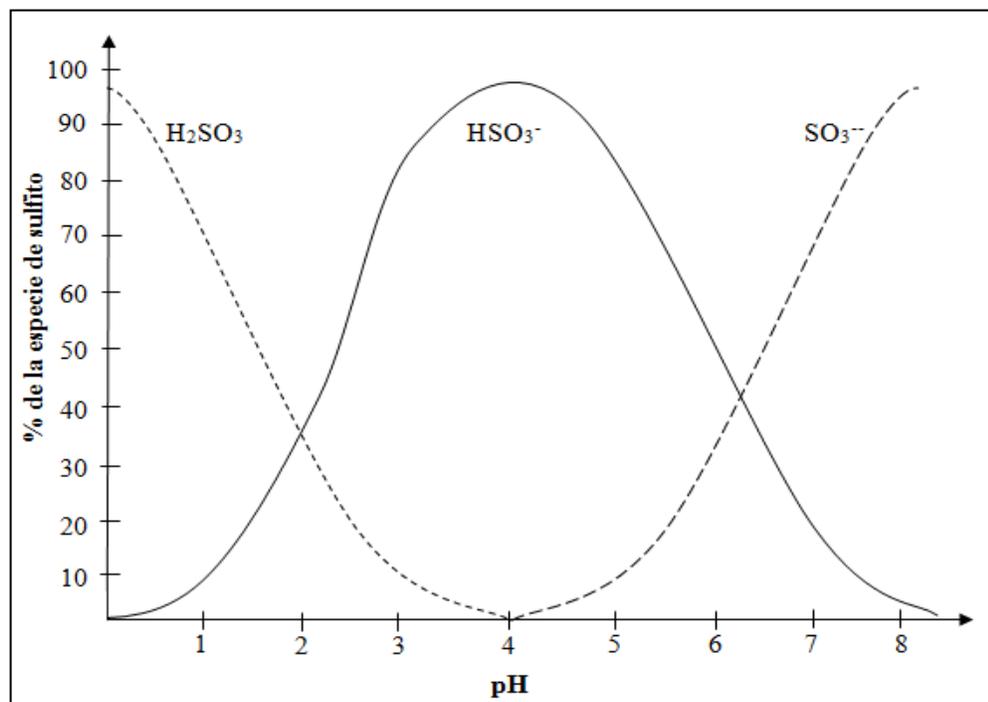


Figura 4: Distribución de los estados ionizados del SO₂ libre a diferentes pH (Adaptado de Guzzo y Desroche, 2009).

Etanol. A medida que progresa la fermentación alcohólica, existe un descenso poblacional de BL debido a un aumento continuo en la concentración de etanol en el medio (Ruiz *et al.*, 2010b). El efecto inhibitorio del etanol, está relacionado directamente con la temperatura del medio. El límite máximo que toleran la mayoría de las cepas de *O. oeni* es de 18°C con un 14% ^{v/v} de etanol (Catania y Avagnina, 1994). Knoll *et al.* (2011), evaluaron la duración de la FML en vinos del cv. Chardonnay, inoculados con dos cepas comerciales de BL (R1105 y R1106, Lallemand), bajo dos concentraciones diferentes de etanol (12,3% ^{v/v} y 14,8% ^{v/v}) y pH 3,2. Se observó que la FML, se vio fuertemente afectada con una concentración de 14,8% ^{v/v} de etanol, provocando que ninguna de las cepas utilizadas consumieran totalmente el ácido málico. Con una concentración de etanol de 12,3% ^{v/v}, ambas cepas utilizadas, lograron terminar la FML en 47 días. Teixeira *et al.* (2002); Silveira *et al.* (2004) y Spano y Massa (2006), explican que el efecto del etanol sobre las BL, es la fluidización de la membrana celular, por lo cual se modifica la proporción lipídica y proteica. Dando como resultado, un aumento en la permeabilidad de la membrana celular, provocando una acidificación intracelular. Este descenso, en el pH dentro de la BL, conlleva a alteraciones en las funciones metabólicas, como la inhibición de la enzima maloláctica (Wibowo *et al.*, 1985 y Jackson, 2014a).

Temperatura. La temperatura está directamente relacionada con la tasa de crecimiento de las BL y por lo tanto, el arranque de la FML (Van der Westhuizen y Loos, 1981). Las BL, al ser microorganismos mesófilos, su rango de temperatura óptima estará comprendida entre los 18°C a 26°C (Muñoz *et al.*, 2011 y Wibowo *et al.*, 1985). Tanto como por encima como por debajo de este umbral de temperatura, existe un retardo o incluso la inhibición en la FML (Muñoz *et al.*, 2011). Este retardo en la FML, se asocia a que la temperatura afecta de forma directa la tasa de descarboxilación del ácido málico por parte de las BL, siendo de 20°C a 25°C donde existe la mayor tasa de descarboxilación (Jackson, 2014a). Gerbaux (2006), en vinos del cv. Pinot Noir, evaluó la velocidad fermentativa de tres cultivos iniciadores comerciales de BL (Lalvin 31, Enoferm alfa y FML expertise S) bajo tres condiciones de temperatura (18°C, 14°C y 11°C). En el ensayo a 18°C, se logró completar la FML en 18 días. Mientras, que a 11°C, los cultivos bacterianos promediaron 110 días en consumir el ácido málico del vino. Esto es causado, a que las BL en presencia de bajas temperaturas (<18°C), prolongan su fase de latencia, provocando una disminución en la velocidad de la fase de crecimiento bacteriano (Bastías, 2000 y Muñoz *et al.*, 2011). A pesar que altas temperaturas (<25°C) estimulan el crecimiento bacteriano, las recomendaciones enológicas son mantener los vinos a una temperatura no mayor a 18°C (Guzmán, 1996 y Gerbaux, 2006). Esto se debe fundamentalmente a que un desarrollo rápido de las BL, conlleva a un mayor consumo de azúcares por parte de las bacterias, generando así vinos con mayor acidez volátil (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975 y González *et al.*, 2011).

Interacción entre levaduras y Bacterias Lácticas

Estas interacciones entre levaduras y BL, pueden inhibir como también estimular el

crecimiento bacteriano (Hervé *et al.*, 2004). Es mucho más recurrente, que ocurra un antagonismo entre estos grupos microbianos, debido a la generación de algunos compuestos propios del metabolismo de las levaduras que inhiben el desarrollo de BL, tal es el caso de la producción de SO₂, por parte de las levaduras, uno de los responsables mayoritarios de esta inhibición (Henick-Kling y Park 1994 y Mendoza *et al.*, 2010). El SO₂, es uno de los compuestos más limitantes para las BL (ver detalladamente punto: Anhídrido sulfuroso), y su concentración en el vino dependerá de la adición al mosto y la producción de dióxido de azufre por parte de las levaduras (Mendoza *et al.*, 2010). Generalmente, la producción SO₂ por parte de las levaduras, varía de entre 15 a 75 mg L⁻¹ total (Larsen *et al.*, 2003). Esto debe ser considerado en el cálculo de dosificación de SO₂, antes de la FML, para así no dañar la viabilidad de las BL (Osborne y Edwards, 2007).

Otro metabolito perjudicial para el crecimiento bacteriano, producido por las levaduras, son los ácidos grasos de cadena media, tales como el ácido decanoico y el ácido dodecanoico (Jackson, 2014a). Estos compuestos se disocian en el interior de la BL, provocando una disminución del pH intracelular (Capucho y San Ramão, 1994). Esto se traduce en el aumento en la concentración de protones de hidrógeno dentro de la célula y produce dos efectos: a) alteración de la composición de la membrana celular, por la pérdida de su permeabilidad y b) eliminación de la actividad ATPasa de la bacteria (Carreté *et al.*, 2002). Concentraciones del orden de 30 mg L⁻¹ de un ácido graso de cadena media (ácido decanoico y ácido dodecanoico) es letal para las BL (Hervé *et al.*, 2004).

La producción de etanol, SO₂ y ácidos grasos de cadena media, dependen netamente de la cepa de levadura utilizada en la fermentación alcohólica (Beelman, *et al.*, 1982 y Mendoza *et al.*, 2010). Paralelamente, las levaduras ejercen un antagonismo sobre las BL debido al agotamiento de nutrientes resultante de la fermentación alcohólica, como vitaminas y aminoácidos, compuestos esenciales para el desarrollo de las BL (Hervé *et al.*, 2004).

Curiosamente, el antagonismo existente entre levadura y BL, se reduce considerablemente si la FML se realiza en presencia de lías (levaduras muertas) (Beelman *et al.*, 1982 y Hervé *et al.*, 2004). Las lías de levaduras son producto de la autólisis, debido a este fenómeno se liberan nutrientes esenciales para el desarrollo de las BL, tales como péptidos, aminoácidos, proteínas, manoproteínas y glucanos (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2001). Además, durante la fermentación alcohólica, las levaduras pueden liberar compuestos beneficiosos para las BL como manoproteínas, vitaminas, lípidos y nucleótidos, influyendo positivamente en el crecimiento y desarrollo de las BL (Hervé *et al.*, 2004).

Prácticas enológicas que afectan a la Fermentación Maloláctica espontánea

Distintas prácticas enológicas durante la vinificación afectan negativamente el desarrollo de BL, como la clarificación del mosto (Krieger *et al.*, 1992; Epifanio, 2005 y Romero, 2010). Esta práctica elimina gran parte de la población bacteriana y reduce la incidencia del desarrollo de estas mismas poblaciones de bacterias, ya que se eliminan nutrientes en suspensión que estimulan el desarrollo bacteriano (Ruiz *et al.*, 2010a). De igual manera, la

centrifugación del vino elimina nutrientes y lías de levaduras que pueden ser absorbidos por BL, limitando así el desarrollo de éstas bacterias en el vino (Jackson, 2014a).

La combinación de factores expuestos anteriormente, aumentan la probabilidad de un fracaso en la FML, lo que adicionalmente provocaría que las poblaciones de microorganismos alterantes proliferen en el vino, entre otras bacterias acéticas, algunas cepas de BL perjudiciales como *Pediococcus* y *Lactobacillus*, llevando así, a desviaciones en la composición organoléptica del vino (Hervé, *et al.*, 2004).

Desviaciones organolépticas producidas por Bacterias Lácticas alterantes en vinos tintos

Indudablemente, la FML mejora los atributos sensoriales del vino, confiriéndole una mayor complejidad aromática (González-Arenzana *et al.*, 2013). No obstante, si no existe un control de los parámetros que se describen en el capítulo anterior, se puede producir un deterioro irreversible en el vino (Hervé *et al.*, 2004 y Jackowetz y Mira de Orduña, 2012).

Algunos de los problemas asociados a una FML espontánea, sin un debido control, es el notorio aumento en la acidez volátil y una pérdida de aromas frutales en el vino (De Revel *et al.*, 1999). Además, se pueden generar compuestos nocivos para la salud, como las aminas biógenas y carbamato de etilo (Muñoz *et al.*, 2011). También, puede existir, una pérdida significativa de la intensidad colorante del vino, entre otros (Laurent *et al.*, 1994).

A continuación, se describen detalladamente las desviaciones organolépticas más importantes producidas en una FML espontánea, por acción de microorganismos alterantes a causa de una mala gestión en la vinificación.

Acidez volátil. El notorio aumento en la acidez volátil, también denominado "picado láctico", es un defecto que puede presentarse durante la vinificación o incluso durante el almacenamiento del vino (Olguín *et al.*, 2009). Este defecto, se presenta cuando existen condiciones favorables para la aparición de BL alterantes, como paradas de fermentación alcohólica, quedando azúcares fermentables en el medio (Boido, 2002). Estos azúcares son metabolizados por las BL, produciendo ácido acético e isómeros del ácido láctico (D-lactato) en cantidades excesivas, produciéndose un aumento considerable en la acidez volátil (Catania y Avagnina, 1994). Generalmente, las BL asociadas al picado láctico pertenecen a la especie *Lactobacillus hilgardii* y *Lactobacillus fructivorans* (Muñoz *et al.*, 2011).

Por otro lado, la degradación del ácido cítrico tiene un gran impacto en la calidad de los vinos tintos, aunque la concentración de este ácido es baja ($0,1 - 1 \text{ g L}^{-1}$), el metabolismo por parte de las BL (Figura 5) conduce a la producción de ácido acético, lo que aumenta la acidez volátil total del vino (Bordons, 1997; Lonvaud-Funel, 2010 y Olguín *et al.*, 2009).

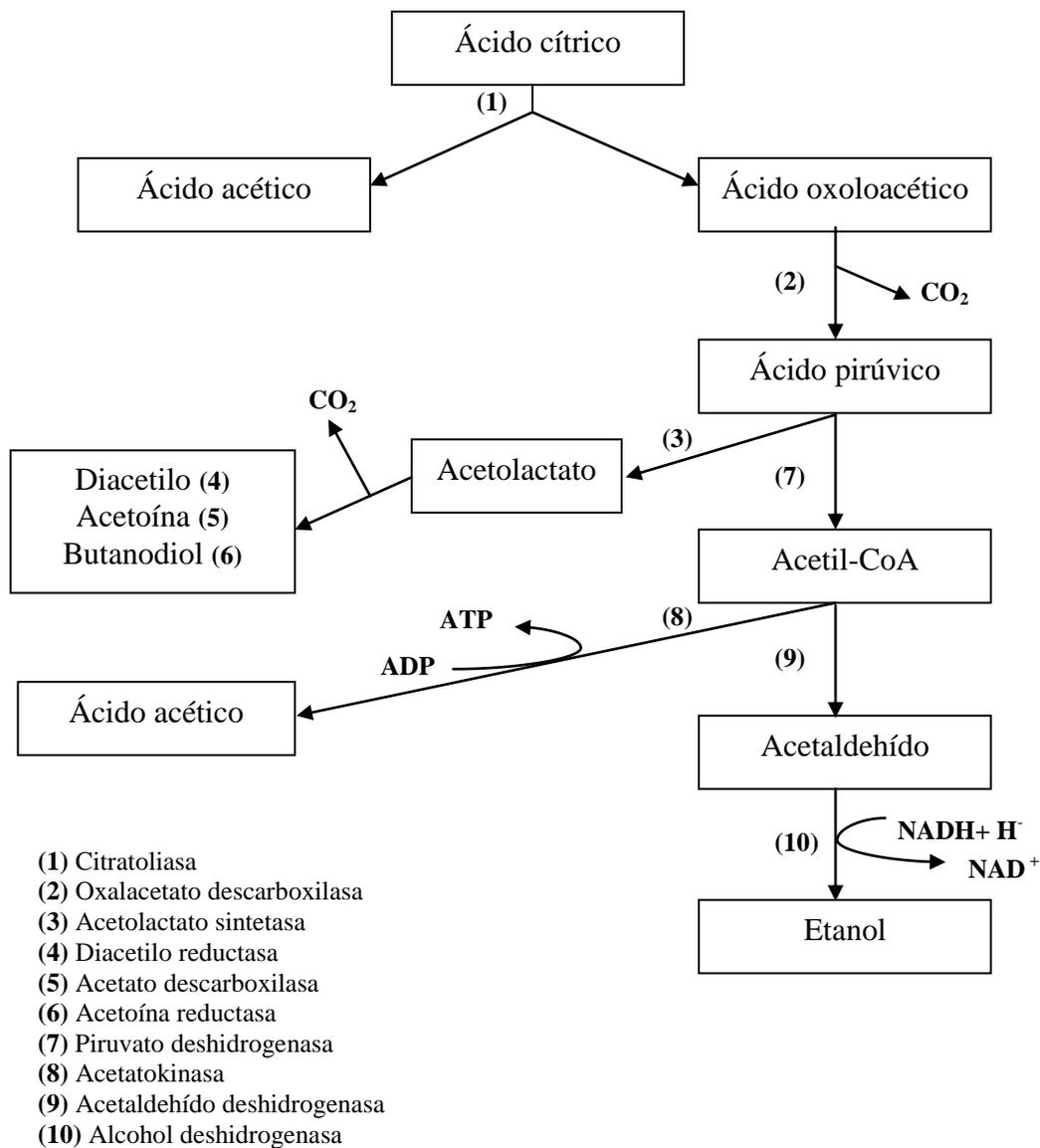
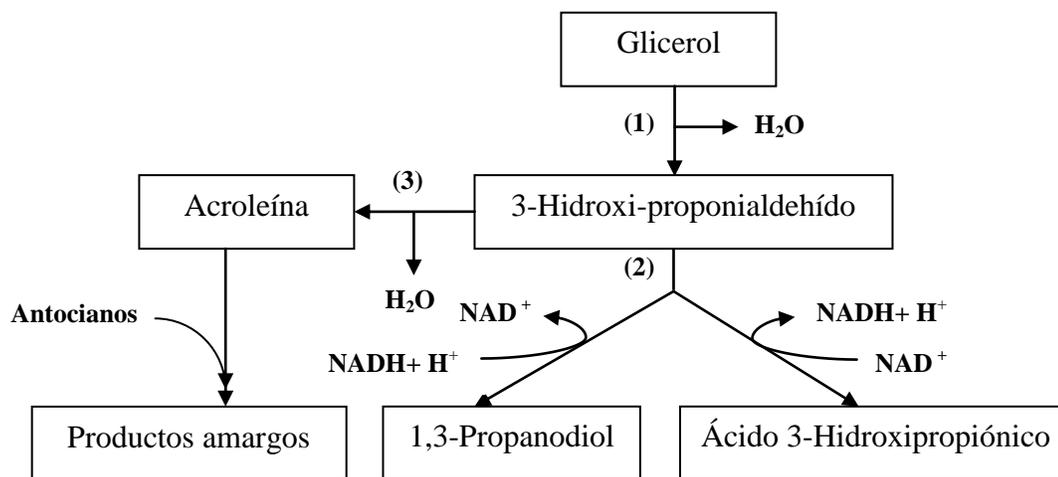


Figura 5: Ruta metabólica del ácido cítrico por parte de BL (Muñoz *et al.*, 2011).

Amargor en el vino. Este defecto se asocia a la degradación del glicerol por parte de las BL (Vestner *et al.*, 2011). El glicerol es generado durante la FA por las levaduras y es uno de los compuestos más abundantes en el vino, encontrándose en concentraciones que varían entre 5 a 8 g L⁻¹ (Bauer *et al.*, 2010 y Muñoz *et al.*, 2011). Algunos géneros de *Lactobacillus* como *Lb. collinoides* (Sauvageot *et al.*, 2000), *Lb. hilgardii* (Muñoz *et al.*, 2011) y *Lb. diolivorans* (Garai-Ibabe *et al.*, 2008) poseen la enzima glicerol deshidratasa, capaz de metabolizar el glicerol en 3-Hidroxi-proponialdehído (3-HPA) (Figura 6). El 3-HPA en condiciones ácidas (pH <3,6), es fácilmente deshidratado, formando así la acroleína (Claisse y Lonvaud-Funel, 2000). La acroleína como compuesto individual no genera defectos. Sin embargo, ésta reacciona con compuestos fenólicos del vino como los

antocianos y los taninos, lo que generará sabores amargos muy notorios, lo que causa un desmedro del producto final (Muñoz *et al.*, 2011 y Henríquez *et al.*, 2012).



- (1) Glicerol deshidratasa
 (2) 1,3-propanodiol deshidrogenasa
 (3) Condiciones ácidas

Figura 6: Ruta metabólica del glicerol por parte de BL y formación de compuestos amargos (Sauvageot *et al.*, 2000 y Cavin *et al.*, 2003).

Producción de fenoles volátiles y bases heterocíclicas aromáticas. La producción de los compuestos que proporcionan olores desagradables son, en parte, responsabilidad de las BL (Cedrón, 2004). En este grupo podemos incluir los olores del tipo animal, que se atribuyen a niveles excesivos de fenoles volátiles siendo los principales: 4-etil-fenol, 4-etil-guayacol, 4-vinil-fenol y 4-vinil-guayacol (Boutou y Chatonnet, 2007 y Muñoz *et al.*, 2011). Las especies de BL responsables de la generación de estos compuestos son *Pediococcus* y *Lactobacillus* (Boutou y Chatonnet, 2007; Ruiz *et al.*, 2010a y Muñoz *et al.*, 2011).

La generación de los fenoles volátiles, se debe a la descarboxilación de los ácidos hidroxicinámico *p*-cumárico y ferúlico por parte de BL (*Pediococcus* y *Lactobacillus*), originando 4-vinil-fenol y 4-vinil-guayacol, respectivamente (Lonvaud-Funel, 2010). Luego de esta descarboxilación, se produce una reducción de vinil-fenol a etil-fenol, dando como resultado la generación del 4-etil-fenol y 4-etil-guayacol (De la Rivas *et al.*, 2009 y Silva *et al.*, 2011).

La producción de los compuestos heterocíclicos, originan olores y sabores desagradables en el vino, descrito como "sabor a ratón" (Bartowsky, 2009 y Costello y Henshcke, 2002). Este defecto se atribuye a 3 compuestos volátiles: 2-acetil-1-pirrolina, 2-acetiltetrahidropiridina y 2-etil-3,4,5,6-tetrahidropiridina. Estos compuestos son producidos por BL heterofermentativas pertenecientes a las especies *Lactobacillus brevis* (Costello y

Henshcke, 2002), *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus hilgardii* (Muñoz *et al.*, 2011 y Izquierdo *et al.*, 2012), también a especies de *Pediococcus* (Costello y Henshcke, 2002) y en menor medida, a *O. oeni* (Muñoz *et al.*, 2011).

Existen un reducido número de estudios relacionados a la producción de bases heterocíclicas por parte de BL. Costello y Henshcke (2002) y Lonvaud-Funel (2010), relacionaron la generación de estas bases heterocíclicas al metabolismo de los aminoácidos ornitina y lisina en presencia de etanol, glucosa o fructosa y hierro (Fe^{+2}). Estos aminoácidos son ciclados y acetilados dando origen a estos compuestos (Figura 7) (Costello *et al.*, 2001 y Costello y Henshcke, 2002). Muñoz *et al.* (2011), asociaron la producción de estos compuestos a pH altos ($>3,5$) y bajos niveles de dióxido de azufre en el vino, lo cual condiciona la aparición de cepas bacterianas productoras de estos compuestos.

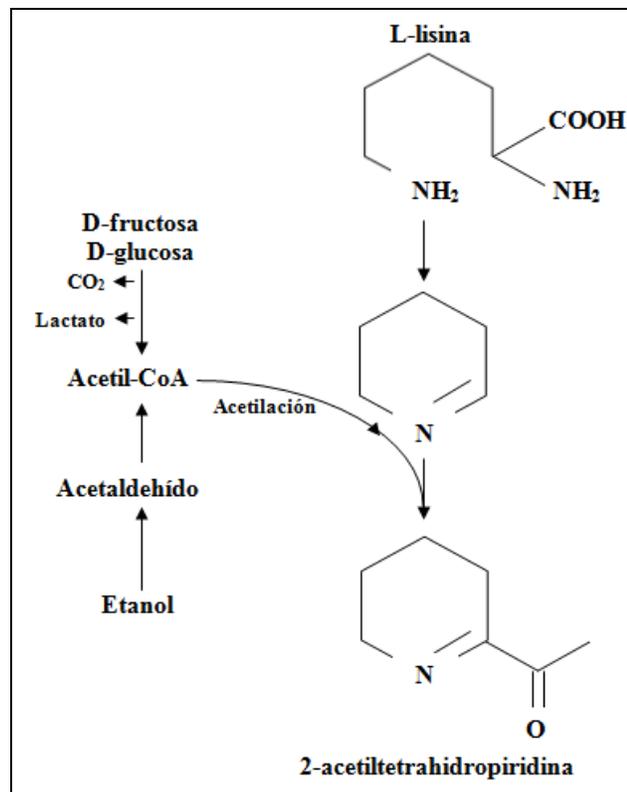


Figura 7: Formación de una base heterocíclica (2-acetiltetrahidropiridina) a partir de un aminoácido (Lisina) por *Lactobacillus hilgardii* (Costello y Henshcke, 2002).

Compuestos generados por Bacterias Lácticas, nocivos para la salud humana. Las BL de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y algunas cepas de *O. oeni*, tienen la capacidad de metabolizar aminoácidos, para formar una amplia gama de compuestos nocivos para el ser humano (Jackson, 2014a). Estos compuestos se conocen como aminas biógenas y precursores de carbamato de etilo, lo que le darán un impacto negativo en la calidad del vino (Lonvaud-Funel, 2010; García-Moruno y Muñoz, 2012 y Henríquez *et al.*, 2012).

Las aminas biógenas, son bases nitrogenadas que resultan de la descarboxilación de los aminoácidos en CO_2 y aminas (Figura 8) (Rossi *et al.*, 2009). Su producción está directamente relacionada a la cantidad de aminoácidos libres (precursores), que están presentes en el medio (Izquierdo *et al.*, 2008a). Esta condición, a su vez, está dada por diversos factores que derivan del manejo del viñedo, como una excesiva fertilización nitrogenada, lo que repercute finalmente, en una mayor cantidad de compuestos nitrogenados al vino; entre ellos aminoácidos (precursores de aminas biógenas) (García, 2012).

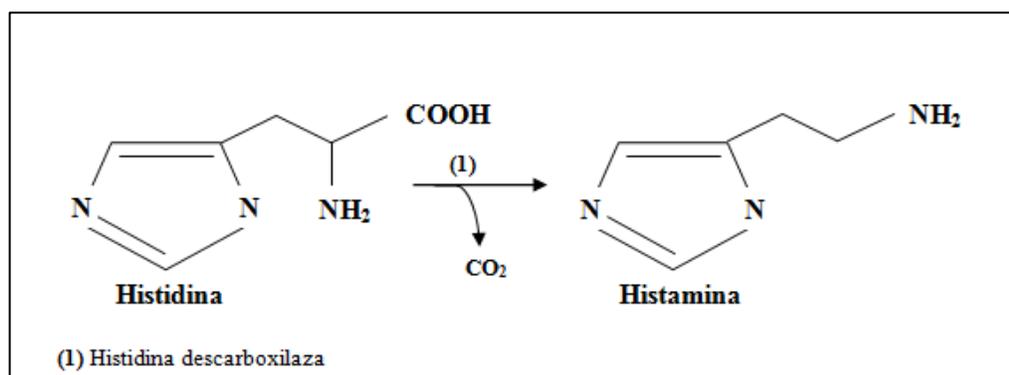


Figura 8: Formación de histamina a partir de histidina (Boido, 2002).

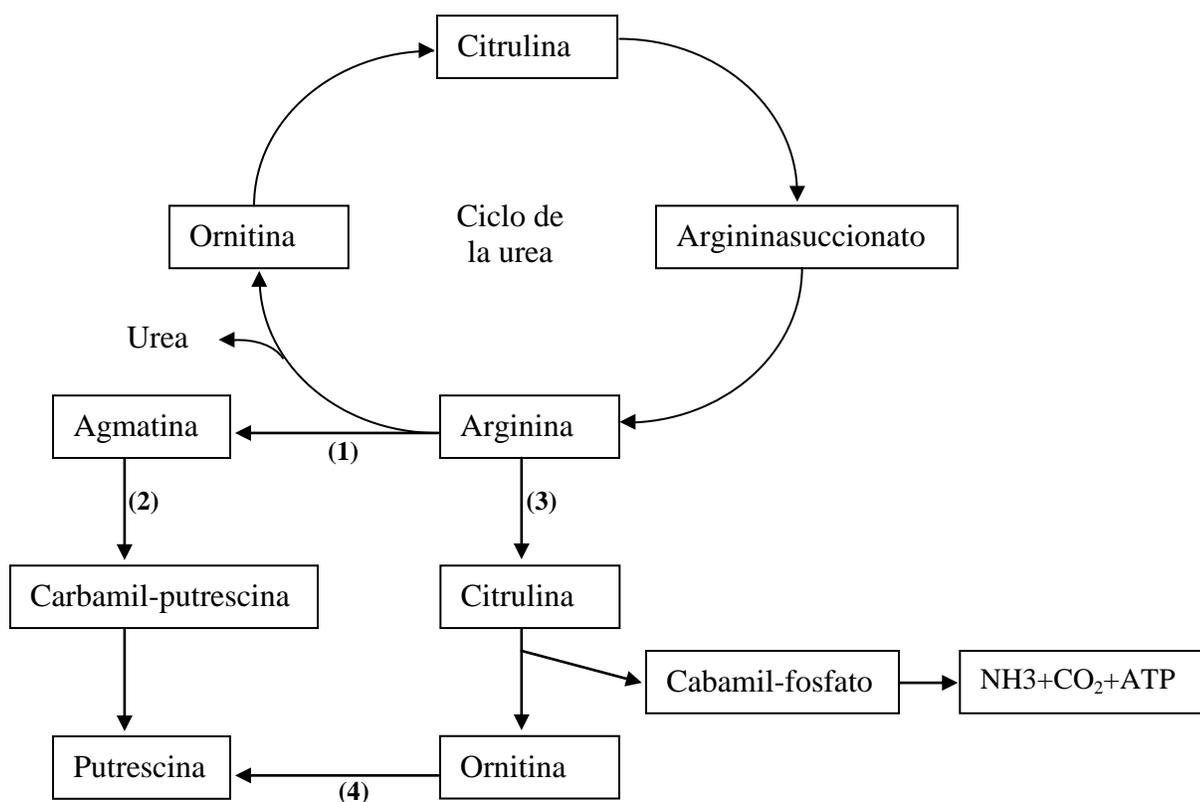
También, el cultivar de uva establece la cantidad de nutrientes asimilables durante la FML, puesto a que cuando se acaba el ácido cítrico y el ácido L-málico, las BL empiezan a metabolizar los aminoácidos (Rossi *et al.*, 2009). Por otra parte, las diferentes prácticas durante la vinificación influirán en la cantidad de precursores de aminas biógenas, como la maceración con piel de la uva, que proporciona aminoácidos al mosto (Henríquez-Aedo *et al.*, 2012), o FML con presencia de lías de levadura, que producto de la lisis celular, libera aminoácidos al medio (Landete, 2005). Por último, los pH elevados (>3,5) y las bajas dosis de SO_2 en el medio, crean condiciones para que los géneros de BL alterantes como *Pediococcus* y *Lactobacillus* proliferen en la FML, produciendo así, este tipo de compuestos (Cuadro 1) (Rossi *et al.*, 2009 y Muñoz *et al.*, 2011).

Herbert *et al.* (2006) y Maygar *et al.* (2011), reportaron que el contenido de aminas biógenas aumenta, cuando existe la presencia de *Botrytis cinerea* en las uvas (Cuadro 1). Este hongo, es responsable de descarboxilar los aminoácidos presentes en la uva, aumentando así el contenido de aminas biógenas entre un 7% (Sass-Kiss *et al.*, 2008) a un 40% (Eder *et al.*, 2002).

Cuadro 1: Origen microbiano de las aminas biógenas encontradas en el vino (Moreno-Arribas *et al.*, 2010).

| Especie | Amina biógena reportada. |
|--|--|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Histamina |
| <i>Brettanomyces bruxellensis</i> | Agmatina, feniletilamina y etanolamina |
| <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Candida stellata</i> , <i>Metschnikowia pulcherrima</i> | Agmatina, feniletilamina y etilamina |
| <i>Botrytis cinerea</i> | Tiramina, putrescina, cadaverina, feniletilamina y espermidina |
| <i>Lactobacillus</i> spp y <i>Pediococcus</i> spp | Histamina, tiramina, putrescina y feniletilamina |
| <i>Oenococcus oeni</i> | Histamina, y putrescina. |

Las aminas biógenas más comunes que se pueden encontrar en los vinos son, histamina, tiramina y putrescina, las cuales derivan de la descarboxilación de los aminoácidos histidina, tiramida y ornitina, respectivamente (Lonvaud-Funel, 2001 y Muñoz *et al.*, 2011). La aparición de putrescina, también está asociada al ciclo de la urea, por parte de algunas BL (*Lb. brevis*, *Lb. hilgardii*, *P. parvulus* y *P. pentosaceus*). Este ciclo, suministra arginina al vino (Figura 9), y mediante la ruta metabólica de la arginina deiminasa, la arginina es metabolizada a ornitina, la cual mediante la enzima ornitina descarboxilasa, se transformará en putrescina (Constantini *et al.*, 2013).



- (1) Arginina descarboxilasa
 (2) Agmatina deiminasa
 (3) Arginina deiminasa
 (4) Ornitina descarboxilasa

Figura 9: Formación de putrescina, a partir del ciclo de la urea, por *Lactobacillus hilgardii* X1B (Constantini *et al.*, 2013)

El problema a nivel de salud, radica a que un número reducido de la población humana puede ser intolerante a estos compuestos, que según la organización mundial de la salud, se calcula en un 1% a un 3% de la población mundial adulta (WHO, 2006). Los consumidores de vino pueden presentar signos y síntomas de hipertensión, hipotensión, náuseas, vómitos, diarrea, migrañas, insuficiencia renal, shock anafiláctico, e inclusive la muerte (Henríquez *et al.*, 2012). Las aminas biógenas relacionadas con estos efectos tóxicos son histamina, tiramina, putrescina, cadaverina, β -feniletilamina y triptamina (Moreno-Arribas *et al.*, 2010).

Si bien, la concentración de aminas biógenas en el vino es baja en comparación con otros alimentos fermentados (quesos y embutidos), el efecto tóxico de estos compuestos se ve potenciado con la presencia de etanol (Álvarez y Moreno-Arribas, 2014). Esto se debe a que el alcohol, inhibe las enzimas monoamino oxidasa y diamino oxidasa, responsables del catabolismo de las aminas biógenas en el organismo (Rossi *et al.*, 2009). Estas enzimas,

presente en el tracto intestinal, convierten a las aminos biógenas en compuestos no tóxicos, que finalmente son excretados del cuerpo humano (Moreno-Arribas *et al.*, 2010). Valores del orden de 8 - 40 mg L⁻¹ de histamina, podrían producir ligeros síntomas de intoxicación (Landete, 2005). Actualmente, en Chile no existe alguna normativa que fije un máximo en el contenido de aminos biógenas en los vinos (Henríquez *et al.*, 2012 y Pineda *et al.*, 2012). Sin embargo, algunos países ya optaron por establecer un máximo en el contenido de histamina en los vinos como: Alemania (2 mg L⁻¹), Austria (10 mg L⁻¹), Bélgica (5-6 mg L⁻¹), Francia (8 mg L⁻¹), Holanda (3 mg L⁻¹) y Suiza (10 mg L⁻¹) (García-Marino *et al.*, 2010).

Paralelamente, la producción de aminos biógenas no solo tiene implicancias para la salud humana, sino también, repercute en la calidad final del vino. La producción de ciertas aminos biógenas (volátiles), pueden generar alteraciones en el perfil aromático del vino, como lo es la cadaverina que genera olores a humedad, cárnico y avinagrado (ver detalladamente punto: Producción de compuestos tóxicos por Bacterias Lácticas, en la fabricación de vinos tintos) (Catania y Avagnina, 1994 y Manfroi *et al.*, 2009). Mientras, que la putrescina en cantidades superior a 30 mg L⁻¹ genera olores tales como: fruta podrida y ranciedad. Sin embargo, a una concentración de 10 a 20 mg L⁻¹ esta amina biógena repercute positivamente ya que redondea el sabor de los vinos tintos (Landete, 2005).

Por otra lado, el metabolismo de la arginina por parte de algunas BL heterofermentativas formará carbamato de etilo (también llamado uretano); compuesto potencialmente cancerígeno (Uthurry *et al.*, 2006 y Izquierdo *et al.*, 2008a). La formación de este compuesto implica una reacción del etanol con la citrulina, un compuesto intermedio en el metabolismo del aminoácido arginina, mediante la ruta de la arginina deiminasa (ADI) por parte de algunas BL (Figura 10) (Mira de Orduña *et al.*, 2001; Araque, 2010 y Alberto *et al.*, 2012). En los mamíferos, el 90% del carbamato de etilo es hidrolizado por el hígado a etanol, amoniaco y dióxido de carbono. Sin embargo, una pequeña proporción del carbamato de etilo total es convertido a N-hidroxycarbamato (0,01%), hidroxycarbamato de etilo y carbamato de vinilo (0,05%) (Zhao *et al.*, 2013). El N-hidroxycarbamato, en presencia de cobre (Cu⁺²), es transformado en oxígeno y óxido nítrico, oxidando y depurinando (rompimiento del enlace glicosídico entre la base y la desoxirribosa) el ADN, provocando mutaciones (Schlatter *et al.*, 2010). El hidroxycarbamato y el carbamato de vinilo, tienen la propiedad de unirse al ADN, ARN y proteínas, pudiendo provocar tumores benignos y malignos (Sakano *et al.*, 2002). La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC), perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (WHO), reveló que el cáncer al hígado es el más común provocado por la ingesta de carbamato de etilo (IARC, 2010). Si bien, no se ha profundizado mucho en investigación sobre que BL específicamente son productoras de este compuesto (Muñoz *et al.*, 2011). Mira de Orduña *et al.* (2000); Arenas *et al.* (2002) y Uthurry *et al.* (2006), revelaron que especies como *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus brevis* y *Oenococcus oeni* en medios que contienen altos niveles de arginina (1,5 a 2,3 g L⁻¹), tienen la capacidad de excretar citrulina; un precursor de carbamato de etilo (Mira de Orduña *et al.*, 2000; Bourdineaud, 2006).

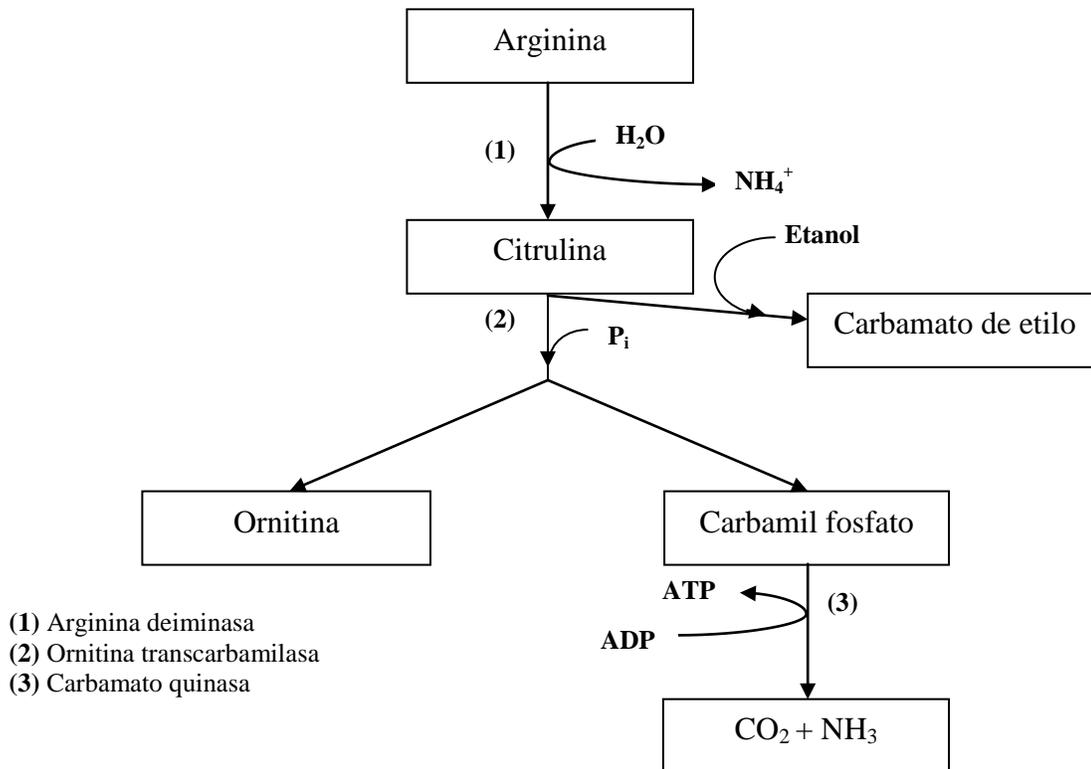


Figura 10: Degradación de la arginina por la vía de la arginina deiminasa (ADI) por parte de BL (Mira de orduña *et al.*, 2001).

El carbamato de etilo en un vino, al igual que las aminas biógenas, tienen un umbral de toxicidad. Schalatter y Lutz (1990), señalaron que el consumo de carbamato de etilo no debería ser mayor a $0,3 \text{ ppb Kg}^{-1}$ de peso corporal al día. Por otra parte, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), ha expuesto un límite máximo en vinos de mesa ($>14\% \text{ V/v}$ de etanol) de $0,06 \text{ mg L}^{-1}$ de carbamato de etilo. Mientras, que para los vinos de mesa con menor graduación alcohólica ($<14\%$ de etanol), la concentración de carbamato de etilo no debe ser mayor a $0,015 \text{ mg L}^{-1}$ (FDA, 2000). Por otro lado la Organización Internacional del Vino y de la Viña (OIV), recomienda un máximo de $0,18 \text{ mg L}^{-1}$ de carbamato de etilo en vinos tintos (FAO, 2009).

Debido a los efectos dañinos a la salud humana que posee el carbamato de etilo y las aminas biógenas, es necesario encontrar estrategias que permitan anular la producción de estas moléculas (Henriquez *et al.*, 2012). La inoculación con cultivos iniciadores comerciales podría reducir considerablemente la aparición de estos compuestos, ya que gracias a los avances en la Biotecnología, es posible detectar las cepas que producen una mayor proporción de aminas biógenas y precursores de carbamato de etilo. Esta estrategia, permitiría inocular con cepas comerciales que produzcan una nula cantidad de estos compuestos (Uthurry *et al.*, 2004 y Muñoz *et al.*, 2011).

Éxito de la Fermentación Maloláctica

Para que ocurra la FML espontánea, se requiere que las distintas especies de BL nativas (mayoritariamente géneros de *Oenococcus oeni*) se adapten a las condiciones del vino, para así, lograr su proliferación y comiencen a degradar el ácido málico (Bordons, 1997). En una FML espontánea existen factores que no pueden ser controlados, como la ocurrencia de ésta, la probabilidad que se produzcan compuestos indeseables, lo que podría alterar la composición aromática del vino (Wibowo *et al.*, 1985; Bordons, 1997 y Sleczkowski y Gerland, 2004). González *et al.* (2011), señalan que la inoculación con cultivos comerciales de BL seleccionadas, se puede obtener una mayor seguridad en el proceso de la FML, debido a que estos cultivos poseen una alta carga bacteriana (alrededor de 10^{11} UFC mL⁻¹) (OIV, 2012a). Esto conlleva a un desplazamiento de las BL nativas por parte de los inóculos comerciales, disminuyendo así el riesgo de que géneros alterantes de BL (*Pediococcus* y *Lactobacillus*) proliferen en el vino (Muñoz *et al.*, 2011). Por otra parte, se ejerce un efecto positivo en las características sensoriales en un vino, dependiendo del inóculo comercial utilizado, otorgándole una mayor complejidad aromática, potenciando sus aromas propios, lo que permite controlar las características organolépticas del producto final (Rossi *et al.*, 2003). González *et al.* (2011), también indican que en el mercado existen una amplia gama de cultivos bacterianos, lo que permite escoger el cultivo de BL que mejor se adapte a las condiciones de la materia prima y estrategia de vinificación.

3. Cultivos Iniciadores de la Fermentación Maloláctica

Fundamentos de la Fermentación Maloláctica inducida

La inducción de la FML mediante cultivos iniciadores comerciales presenta claras ventajas. En primer lugar, se tiene la certeza del momento de ocurrencia y la velocidad de esta fermentación (Du Plessis, 2005). Al final de la fermentación alcohólica, la biomasa de BL que contiene el vino es muy reducida y, por lo tanto, se puede requerir de semanas para que exista de una población bacteriana adecuada para producir una FML exitosa (Edward y Beelman, 1989). A continuación, se analizarán los beneficios de utilizar inóculos comerciales de BL, apoyándose en diferentes estudios científicos que respaldan el uso de los cultivos iniciadores de la FML.

Incidencia de la utilización de cultivos iniciadores de Bacterias Lácticas en la duración de la Fermentación maloláctica. Al inocular el vino con cultivos iniciadores comerciales de BL se puede evitar retrasos importantes, ya que estos inóculos poseen una alta carga bacteriana (a lo menos 10^{11} UFC mL⁻¹) (OIV, 2012a y González *et al.*, 2011), desplazando las BL nativas por superioridad numérica, lo que conlleva a una iniciación rápida de la FML (Rossi *et al.*, 2003 e Izquierdo *et al.*, 2012). Además, se asegura que el tipo de BL que está realizando la FML corresponde a la selección elegida por el enólogo y no por los múltiples géneros de BL que se generan en una FML espontánea (González *et al.*, 2011). Se reduce el riesgo que otros géneros de BL actúen en el vino, los cuales generan metabolitos indeseados que pudieran afectar la calidad del vino (ver detalladamente punto: Generación de olores indeseables por parte de inóculos comerciales de bacterias lácticas) (Coucheney *et al.*, 2005). Estos cultivos comerciales se seleccionan para que expresen su actividad maloláctica en medios con pH bajo y un alto contenido de etanol, condiciones comúnmente encontradas luego de la FA (González *et al.*, 2011).

Edward y Beelman (1989), explican que la utilización de cultivos comerciales de BL logrará una rápida implantación, consiguiendo así una mayor rapidez en la FML; obteniendo también así, una estabilidad microbiológica temprana, deseada por el enólogo.

López *et al.* (2012), evaluaron el efecto en la velocidad de la FML de un cultivo comercial de BL (UvaFerm Alfa U de Lallemand), frente a una FML espontánea en vinos cv. Tempranillo en España (La Rioja). El cultivo comercial logró consumir el ácido málico en 14 días con un pH de 3,4, mientras que las bacterias nativas terminaron la FML en 28 días, a un mismo pH. Por lo que el uso de un cultivo comercial de BL, disminuyó la velocidad de la FML. Resultados muy similares obtuvo Izquierdo *et al.* (2013), quienes evaluaron el efecto de seis cultivos de BL en la duración de la FML, en un vino del cv. Tempranillo en España. Los cultivos comerciales utilizados fueron Enoferm alfa MBR, PN4 MBR, C22L9 MBR, Enoferm alfa 1-Step, PN4 1-Step y C22L9 1-Step, todos proporcionados por Lallemand. La FML logró completarse en 11 días (C22L9 1- Step), 12 días (C22L9 MBR), 13 días (PN4 1-step), 14 días (PN4 MBR y enoferm alfa 1-step) y 16 días (enoferm alfa

MBR). Los cultivos que necesitaron reactivarse antes de ser inoculados (1-step), fueron los más eficientes en consumir el ácido málico, los cuales tardaron 12 días promedio en terminar el proceso, mientras que las cepas de inoculación directa (MBR) promediaron 14 días en completar la FML.

En Chile, la experiencia del uso de cultivos iniciadores de la FML se muestra muy variada. Un estudio realizado por Guzmán (1996), quien utilizó tres cepas comerciales: Viniflora (Chr. Hansen), BitecD (Bitec) y OSU (mezcla de dos cepas: EY-2D y ER-1A de Lallemand), en vinos del cv. Cabernet Sauvignon (etanol 13,5% v/v , pH 3,79, SO_2 total 26 mg L^{-1}). Se obtuvo que el término de la FML fue a los 25 días con la cepa Viniflora, mientras que las cepas BitecD y OSU demoraron 42 y 40 días, respectivamente. El tratamiento testigo (FML espontánea), le tomó 39 días degradar el ácido málico, no existiendo mayor beneficio en el uso de estos cultivos bacterianos, a excepción de la cepa comercial Viniflora. Para la mezcla de cepas OSU, la empresa Lallemand recomienda una segunda fase en la reactivación del cultivo bacteriano, antes de ser inoculado en vinos con estas características, que en este caso no fue realizada. Se sabe, que el éxito en la FML viene dada directamente por la capacidad que tiene los inóculos comerciales para adaptarse y desplazar a la microbiota láctica autóctona del vino (Zhao y Zhang, 2009). En este caso, en particular, los cultivos comerciales (BitecD y OSU) fueron desplazados por las BL nativas que se encontraban en el vino, siendo ellas las responsables de conducir la FML (Van der Westhuizen y Loos, 1981 y González *et al.*, 2011).

Villarroel (1999), inoculó un vino cv. Cabernet Sauvignon con la FML parada, con cepas comerciales MBR EQ 54, OSU y 3X1 Step, todas pertenecientes a la empresa Lallemand. El medio poseía un pH 3,14, SO_2 total 29 mg L^{-1} , etanol 13,9% v/v y una concentración muy baja de ácido málico (0,505 mg L^{-1}). La cepa comercial 3X1 Step, fue la que inicialmente degradó el ácido málico con mayor velocidad. Sin embargo, ningún tratamiento se diferenció del testigo (FML espontánea), en la duración de la FML, teniendo una duración de 17 días para todos los tratamientos. El nulo beneficio de estos cultivos, se atribuye a la carencia de nutrientes en el medio. En este caso en particular, el vino contenía bajos niveles de ácido málico (0,505 mg L^{-1}). Según Krieger *et al.* (1992), los niveles altos de ácido málico estimulan el desarrollo de *Oenococcus oeni*, generando mayor biomasa, lo que resulta en una mayor velocidad de transformación del ácido málico en ácido láctico. La velocidad de la FML, también puede estar influenciada por el tipo de inoculación de BL. Tomando en cuenta, que la cepa 3X1 Step (cultivo que ya no lo comercializa la empresa Lallemand), fue la que degradó el ácido málico con mayor velocidad inicial, puesto a que requiere un proceso de pie de cuba, en donde la cepa recibe un proceso de adaptación antes de ser inoculado en el vino (Van der Westhuizen y Loos, 1981 y Izquierdo *et al.*, 2013). Por otro lado, el vino inoculado con el cultivo comercial de BL MBR EQ 54 de inoculación directa, logró disminuir el tiempo de la FML mínimamente, resultados que concuerdan con los obtenidos por Prat (1996) y Ulloa (1996) (datos no presentados). Esto se debe a que este tipo de inóculos comerciales son sometidos a un proceso de secado por congelación (liofilización). Este proceso podría afectar a las BL, pudiendo existir una pérdida en la viabilidad (González *et al.*, 2011 y Masqué *et al.*, 2007b). Para el caso de la mezcla de

cultivos OSU, a pesar que requería un proceso de reactivación, no se diferenció del tratamiento testigo, debido a que este inóculo no está recomendado para ser utilizado en condiciones tan estresantes (tolerancia máxima de etanol 12,5% V/v). Tomando en cuenta que estas bacterias deben reactivarse y multiplicarse dentro del vino, también se debe considerar la fuerte competencia existente con las BL nativas, lo que sumado a lo anterior dificultará su adaptación (Prat, 1996; Guzmán, 1999 y González *et al.*, 2011).

Bastías (2000), en el Valle del Maule, utilizó las cepas comerciales Lalvin 31 y EQ 54 (Lallemand), en vinos cv. Cabernet Sauvignon (pH 3,42, SO_2 total 29 mg L^{-1} , Etanol 13,5% V/v). La FML tardó en completarse 48 y 59 días, respectivamente. En contraste, las BL nativas (tratamiento testigo) demoraron 75 días en consumir el ácido málico. Por lo tanto, el uso de los cultivos iniciadores para la FML, efectivamente cumplió su objetivo, logrando disminuir la duración de ésta en un 28,7%, en comparación a la FML espontánea.

De igual modo, Silva (2008), evaluó la cinética fermentativa en vinos cv. Carménère en Chile. Comparó 9 cepas comerciales de BL (PN4, 49A1, V22, Lalvin VP41, Lalvin 31, Lalvin ICV Elios Blanc, Lalvin Elios 1, Uvaferm Alpha y Uvaferm Beta), pertenecientes a la empresa Lallemand. Se logró reducir el tiempo de la FML un 24% en promedio utilizando los cultivos comerciales, comparado con una FML espontánea (tratamiento testigo). Las cepas que lograron consumir el ácido málico con mayor velocidad fueron: 49A1, PN4, Lalvin VP41 y Uvaferm Alpha y Beta que lograron terminar la FML en 21 días, en contraste con los 31 días que le tomo a la FML espontánea.

Para los ensayos de Bastías (2000) y Silva (2008), donde las concentraciones (promedios) de alcohol fue de 13,5% V/v , pH de 3,29 y SO_2 total de 29 mg L^{-1} , estos cultivos de BL no estaban del todo adaptados a estas condiciones consideradas estresantes (Embeita, 2013²). Para Du Plessis (2005), la eficiencia de los preparados comerciales de BL, depende exclusivamente del medio en donde fueron aislados. Por su naturaleza, los cultivos comerciales de BL toleran concentraciones de etanol menores a 14% V/v , pH superior a 3,2 y hasta 50 mg L^{-1} SO_2 total. Mientras más cercanos son los valores de estos parámetros, las BL se vuelven extremadamente sensibles (Knoll *et al.*, 2011). Esto se confirma con el estudio realizado por Masqué *et al.* (2007b), en La Rioja, en donde inoculó vinos cv. Tempranillo (12% V/v de etanol y pH de 3,5) con cultivos comerciales Lalvin EQ54 y Lalvin Elios 1 (Lallemand). El consumo total del ácido málico fue en 12 y 15 días a 20°C, utilizando las cepas Lalvin EQ54 y Lalvin Elios, respectivamente. Mientras, que para un vino del cv. Merlot (14% V/v de etanol y pH de 3,37), en iguales condiciones, la FML tardó 1 mes en terminar.

En síntesis, se puede apreciar que la utilización de BL seleccionadas ha logrado disminuir la duración de la FML, desde el ensayo de Guzmán (1996) a Silva (2008). Esto corrobora

² Embeita, A. 2013, oct. Cultivos comerciales de bacterias lácticas. [Entrevista personal]. San Francisco de Mostazal, Lamothe-Abiet.

que ha existido un avance en la producción de cepas de BL más robustas, capaces de conducir la FML en condiciones adversas (alcohol 14% V/v , $pH < 3,3$ y $SO_2 > 50 \text{ mg L}^{-1}$), condiciones típicas encontradas durante la elaboración de vinos tintos en Chile (González *et al.*, 2011).

Producción de compuestos tóxicos por Bacterias Lácticas, en la fabricación de vinos tintos. Frecuentemente, las BL están asociadas a la producción de aminas biógenas y precursores de carbamato de etilo en el vino (Landete, 2005; Izquierdo *et al.*, 2008a y Muñoz *et al.*, 2011). Ambos compuestos, producen un deterioro en la calidad del vino, ya que son tóxicos para el ser humano (ver detalladamente punto: Compuestos generados por BL, nocivos para la salud humana) (Muñoz *et al.*, 2011). También, la aparición de algunas aminas biógenas volátiles conllevan a alteraciones en la composición organoléptica del vino (Izquierdo *et al.*, 2008a; Henríquez *et al.*, 2011 y López *et al.*, 2012).

Las aminas biógenas que generalmente están en mayor proporción en el vino son la histamina, tiramina y putrescina (Muñoz *et al.*, 2011). La generación de histamina está asociada a las especies *O. oeni* (IOEB 9204) (Lonvaud-Funel, 2001), *Lb. hilgardii* (García *et al.*, 2011) y *P. parvulus* (García-Moruno y Muñoz, 2012). Estas son las BL, aisladas del vino, que poseen más activa la ruta metabólica de la histidina descarboxilasa, lo que se traduce a una mayor concentración de histamina en el vino (Landete *et al.*, 2005 y Moreno-Arribas *et al.*, 2010). Lonvaud-Funel (2001) y Muñoz *et al.* (2011), revelaron que *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus hilgardii* poseen muy activa la ruta metabólica de la tiramida descarboxilasa, metabolizando la tiramida, generando tiramina en el vino. La aparición de putrescina, está asociada a microorganismos como: *O. oeni* IOEB 8419, *Lb. brevis*, *Lb. hilgardii*, *P. parvulus* y *P. pentosaceus* (Lonvaud-Funel, 2001 y Constantini *et al.*, 2013).

En relación a la producción de precursores de carbamato de etilo durante la FML (citrulina y fosfato de carbamilo), está asociada a BL heterofermentativas con la ruta metabólica ADI activa como: *Lb. buchneri*, *Lb. hilgardii*, *Lb. brevis* y algunas cepas de *O. oeni* (*O. oeni* X₂L) (ver detalladamente punto: Compuestos generados por BL, nocivos para la salud humana) (Mira de Orduña *et al.*, 2000; Bordons *et al.*, 2004; Uthurry *et al.*, 2006 y Muñoz *et al.*, 2011). Es muy importante señalar, que los inóculos comerciales se seleccionan por sus propiedades enológicas y tecnológicas, entre éstas se considera la nula o muy baja producción de aminas biógenas (ausencia de las enzimas aminoácido descarboxilasa) y la mínima degradación de la arginina (mínima actividad de arginina deiminasa), con el objetivo de no producir precursores de carbamato de etilo (González *et al.*, 2011).

López *et al.*, (2012) en La Rioja (España), utilizaron cepas comerciales UvaFerm alfa U (Lallemand) en vinos cv. Tempranillo. Concluyeron que la utilización de inóculos seleccionados comerciales logran reducir en un 30% la cantidad de aminas biógenas producidas durante la FML, en comparación a una FML espontánea. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Masqué *et al.* (2007b), quienes utilizaron las cepas Lalvin EQ 54 y Lalvin Elios pertenecientes a Lallemand (Cuadro 2).

Cuadro 2: Contenido de aminas biógenas en vinos cultivar Merlot (Masqué *et al.*, 2007b).

| Cepa inoculada | Aminas biógenas total (mg L ⁻¹) |
|----------------|---|
| EQ54 | 0,8 |
| Elios 1 | 1,0 |
| Espontánea | 1,5 |

Estos estudios (López *et al.*, 2012 y Masqué *et al.*, 2007b), concuerdan que la utilización de cultivos comerciales de BL reducen considerablemente la producción de aminas biógenas. Gracias a los avances en la Biotecnología enológica, es posible obtener cepas específicas que produzcan una nula cantidad de estas moléculas. A pesar de obtener este progreso en la industria enológica, no ha sido posible erradicar la aparición de estos compuestos (Muñoz *et al.*, 2011). Numerosos estudios, concuerdan que la cantidad de aminas biógenas en vinos, es directamente proporcional a la cantidad de aminoácidos que contiene el vino después de la FA (Lonvaud-Funel, 2001; Masqué *et al.*, 2007a y Masqué *et al.*, 2007b). También, López *et al.* (2012), demostraron que a pH bajos (<3,4), el consumo de aminoácidos por parte de las levaduras en la fermentación alcohólica es menor; incidiendo así, en un mayor consumo de aminoácidos por las BL, lo que conlleva a un aumento en la producción de aminas biógenas.

Henríquez *et al.* (2012), realizaron un estudio sobre el contenido de aminas biógenas en vinos cv. Merlot, Carménère y Cabernet Sauvignon varietales reserva comercializados en Chile, de todos los Valles Vitivinícolas de Chile. El contenido promedio de las 39 muestras superó los 25 mg L⁻¹ de aminas biógenas total, dentro de los cuales el 38% de las muestras superaron los 8 mg L⁻¹ de histamina (7,8 mg L⁻¹ de histamina promedio). Resultados similares arrojó un estudio realizado por Pineda *et al.* (2012), sobre vinos jóvenes varietales comercializados en Chile. Se obtuvo, que el 11,1% de las muestras promedió como mínimo 8 mg L⁻¹ de histamina. El Codex enológico recomienda que la cantidad de aminas biógenas en un vino no sea superior a 12 mg L⁻¹ (OIV, 2005), valores ampliamente superados por los vinos Chilenos.

Es por esto que se debe investigar más sobre la generación de aminas biógenas por parte de cultivos iniciadores para la FML en Chile, ya que las autoridades de los países importadores de vinos están siendo más estricto (García-Marino *et al.*, 2010), debido fundamentalmente a que en los últimos 20 años se ha duplicado las alergias alimentarias, alcanzando niveles que bordean el 3% de la población mundial, en el cual dentro de estos alérgenos está la histamina (WHO, 2006).

En el caso de la formación de precursores de carbamato de etilo, existe muy insuficiente información disponible, y con resultados no muy claros. Uthurry *et al.* (2006), evaluaron la capacidad de metabolizar la arginina de una cepa comercial de *O. oeni* (Uvaferm MLD de Lallemand) en vinos cv. Cabernet Sauvignon, bajo dos condiciones de temperaturas (25°C y 30°C). El cultivo bacteriano, fue capaz de metabolizar la arginina a citrulina en las dos

condiciones de temperatura Sin embargo, solo se detectó un discreto aumento en la concentración de carbamato de etilo en los vinos a 30°C (0,0065 mg L⁻¹). Muñoz *et al.* (2011), atribuyen un mayor consumo de aminoácidos. Por parte de las BL a la presencia de altas temperaturas, combinado con un bajo nivel de glucosa durante la FML. Ambas condiciones, se presentaron durante el progreso de la FML en el estudio de Uthurry *et al.* (2006). La altas temperaturas (>18°C), incrementan la tasa de crecimiento de biomasa bacteriana, aumentando el consumo indiscriminado de nutrientes. También, al no poseer un azúcar fermentable en el medio, las BL consumen aminoácidos, entre ellos la arginina (Izquierdo *et al.*, 2008a).

A pesar, que la arginina fue consumida en su totalidad por las BL (datos no presentados), hubo un discreto aumento en la concentración de carbamato de etilo presentado en el estudio de Uthurry *et al.* (2006). Para Mira de Orduña *et al.* (2000); Orduña *et al.* (2001) y Romero (2010), las BL heterofermentativas (como *O. oeni*) poseen muy activa la ruta enzimática ADI de degradación de la arginina (ver detalladamente punto: Compuestos generados por BL, nocivos para la salud humana). Sin embargo, la citrulina no es excretada inmediatamente al medio. La citrulina es almacenada de forma intracelular, para ser reutilizada cuando se agota la arginina, o bien, es excretada luego de la lisis celular.

Araque (2010), en Tarragona (España), evaluó la capacidad de 4 cepas comerciales de *Oenococcus oeni* para metabolizar la arginina en citrulina en vino cv. Tempranillo. Los cultivos de BL utilizados fueron Uvaferm Alfa (Lallemand), CH16, CH29 y Viniflora Oenos (Chr. Hansen). La cepa Uvaferm Alfa degradó un 20,8% de la arginina presente en el medio, mientras que las cepas de CHR-Hansen lo degradaron un 10,7%. En ninguno de los casos, hubo un aumento en el contenido de carbamato de etilo. Este estudio confirma los avances en la Biotecnología enológica, ya que las cepas estudiadas (Uvaferm Alfa, CH16, CH29 y Viniflora oenos) no fueron capaces de consumir la totalidad de la arginina presente en el medio. Esto se debe, a que gracias a los métodos moleculares, las empresas de insumos enológicos son capaces de seleccionar cepas de *Oenococcus oeni* con una muy baja actividad de la enzima arginina deiminasa (ADI), responsable de la degradación de la arginina, teniendo así, una muy baja conversión a citrulina (Araque, 2010; González *et al.*, 2011 y Patrignani *et al.*, 2012).

Aún existe una controversia sobre la influencia que tiene la FML en la formación de carbamato de etilo. Diversos estudios, concluyeron que las prácticas enológicas durante la vinificación, pueden influir en el contenido de carbamato de etilo en los vinos resultante (Mira de Orduña *et al.*, 2001; Uthurry *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2007; Araque 2010; Romero 2010 y Patrignani *et al.*, 2012). En una FML (inducida o espontánea) larga (2 meses) en presencia de lías; la autólisis de éstas suministraría aminoácidos al vino, entre ellos la arginina, que es metabolizado por las BL, lo que podría contribuir en un aumento en el contenido de carbamato de etilo en los vinos (Uthurry *et al.*, 2006). El control de la temperatura una vez terminada la FML es muy importante. Zhao *et al.* (2013), reportaron que a una mayor temperatura (>19°C) terminada la FML, aumenta la incidencia de contaminación con microorganismos no deseados, que podrían metabolizar la arginina a

citrulina. Es por esto que terminada la FML, se debe emplear alguna técnica en la vinificación que termine con la actividad de las BL en el vino, como un control en la T°, aplicación de SO₂ o lisozimas, entre otros (Uthurry *et al.*, 2006). De todas formas, todos los estudios relacionados con esta investigación, arrojaron niveles de carbamato de etilo muy por debajo del máximo recomendado por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) (0,03 mg/L) (WHO, 2006).

Cultivos iniciadores de la Fermentación Maloláctica comercializados en Chile

En Chile, por lo general, se espera a que la FML transcurra espontáneamente, y el empleo de cultivos comerciales de BL, no ha sido masivo. Solo se emplean como una medida correctiva frente a una FML parada (Embeita, 2013³).

La utilización de estos cultivos en nuestro país, aún no han dado buenos resultados⁴. Este problema se puede atribuir al cambio climático, que afecta a todo el mundo (incluyendo Chile), donde existe un marcado aumento en las temperaturas en zonas vitivinícolas (Neuenschwander, 2010). Como consecuencia de esto, existe un incremento en la tasa respiratoria de las bayas, aumentando la concentración de azúcares en éstas (25 a 26° Brix). Lo que conlleva a obtener vinos con mayor graduación alcohólica, hasta 15,5% ^{V/V} de etanol (Mira de Orduña, 2010). También, la temperatura influye fuertemente en la concentración del ácido málico en las bayas. A medida que aumenta la temperatura, existe un descenso progresivo de este ácido (Sepúlveda, 2009 y Lee *et al.*, 2013). El problema con este ácido, radica en que actúa como estimulante para el crecimiento de las BL (Krieger *et al.*, 1992). También, las cosechas con mayor nivel de madurez (25° a 26° Brix), daría una menor concentración de ácido málico en las bayas (Malherbe *et al.*, 2007; Olguín *et al.*, 2009 y Lee *et al.*, 2013). Du Plessis (2005), atribuye esta condición a la utilización de cultivos de BL foráneos. Por lo tanto, la productividad de éstos se ve limitada, puesto que las condiciones de vinificación donde fueron aisladas, son completamente distintas a las condiciones que existen en los vinos de Chile.

Las empresas de insumos enológicos en Chile ofrecen una amplia gama de cepas pertenecientes a la especie *Oenococcus oeni*; por su gran capacidad de adaptación al medio estresante del vino. Estas empresas cuentan con cultivos de *O. oeni* o una mezcla de diferentes cepas pertenecientes a esta misma especie, por la sencilla razón de que es la BL más fiable para el desarrollo de la FML (Boido, 2002 y Du Plessis, 2005).

En la actualidad, existen empresas internacionales como Anchor Wine Yeast y Lallemend, que en base a sus investigaciones (investigaciones no publicadas), concluyeron que *Lactobacillus plantarum* posee un efecto positivo en una FML espontánea. Esto se debe, a

³ Embeita, A. 2013, oct. Cultivos comerciales de bacterias lácticas. [Entrevista personal]. San Francisco de Mostazal, Lamothe-Abiet.

⁴ Loc. Cit.

su gran capacidad de manifestar su actividad maloláctica en ambientes estresantes (pH <3,5, tolerancia al etanol hasta 14% V/v). También, concluyeron que gracias a su metabolismo heterofermentativo facultativo, no se produce ácido acético, a partir de glucosa. Además, sus atributos sensoriales son similares a *O. oeni* (Du Toit, 2012). Mtshali *et al.* (2009), revelaron que *Lb. plantarum* posee una proporción de enzimas asociadas a la producción de aromas, que impactan positivamente en el vino, como proteasas y esterases mayor que *O. oeni*. Posee una alta viabilidad después de ser liofilizada (Alegría *et al.*, 2004). Por estos motivos, las empresas decidieron aislarla y comercializarla como cultivo iniciador para la FML. La empresa Anchor Wine Yeast (en colaboración con Lallemand), desde el año 2011 exhibe en sus catálogos un cultivo iniciador, que contiene una mezcla de *O. oeni* y *Lb. plantarum* (NT 202). La empresa Lallemand el año 2007, lanzó entre sus productos un cultivo iniciador puro de *Lb. plantarum* (cepa V22®). Tanto el cultivo iniciador NT 202 y V22, están presentes en Chile (Lallemand S.A., 2011).

A continuación, se presenta la oferta de cultivos iniciadores para la FML, que las distintas empresas internacionales de insumos enológicos tienen presentes en Chile, especificando sus propiedades técnicas (Cuadros 3, 5, 7, 9, 11 y 13) y las características enológicas que se promocionan para el producto final (Cuadros 4, 6, 8, 10, 12 y 14).

Productos comerciales marca Anchor Wine Yeast. Empresa de origen Sudafricano, fundada en 1923. En sus inicios se dedicaba a la producción de levaduras destinadas a la industria panadera. En el año 2006, Anchor Wine Yeast, fue adquirida por el grupo Lallemand. En la actualidad, esta empresa se orienta a producir levaduras para la industria alimenticia y vitivinícola. En el año 2011, introduce entre sus productos un cultivo de BL (Mezcla de *O. oeni* y *Lb. plantarum*) para la industria del vino. La empresa encargada de distribuir los productos de Anchor Wine Yeast en Chile, es Oenobrand (Anchor Wine Yeast, 2013).

Cuadro 3: Ficha técnica de los cultivos iniciadores para la FML disponibles en Chile de la empresa Anchor wine yeast (Catálogos comerciales Anchor Wine Yeast, 2014).

| Nombre del producto | Bacteria Láctica | Rango de pH | Rango de SO ₂ total | Tolerancia al alcohol | T° | Velocidad de la FML |
|---------------------|--------------------------------------|-------------|--------------------------------|-----------------------|-------|---------------------|
| NT 202 Co-inoculant | <i>O. oeni</i> y <i>L. plantarum</i> | >3,4 | <50 mg L ⁻¹ | <15,5% V/v | >20°C | Rápida |

Cuadro 4: Características enológicas de los cultivos iniciadores para la FML ofrecido por la empresa Anchor Wine Yeast (Catálogos comerciales Anchor Wine Yeast, 2014).

| Nombre del producto | Características enológicas |
|---------------------|--|
| NT 202 Co-inoculant | Este cultivo iniciador consta de una mezcla bacteriana entre <i>O. oeni</i> y <i>L. plantarum</i> , es la primera mezcla de BL que se comercializa en el mundo. La actividad maloláctica de <i>L. plantarum</i> es mayor a pH alto en comparación con <i>O. oeni</i> , por lo que permite un inicio de la FML más rápido a un pH elevado y con esto una mayor seguridad durante esta fermentación. En cuanto a los aportes otorgados por este cultivo, se señala que mejora el carácter afrutado del vino y reduce las sensaciones herbáceas en éste, mínimo aumento en la acidez volátil e imperceptible para el paladar. Posee nula producción de aminas biógenas. |

Productos comerciales marca Chr. Hansen. Christian Hansen (Chr. Hansen) fue fundada en 1874 en Dinamarca, Hoerscholm. En sus inicios desarrollaba colorantes naturales para mantequillas y quesos. En la actualidad, esta empresa se orienta mayoritariamente a desarrollar y producir cultivos microbiológicos (bacterias lácticas, levaduras, probióticos y enzimas) para la industria agroalimentaria y fármacos. Aún mantiene la tradición de elaborar colorantes naturales, para luego ser utilizados en la industria alimenticia (Chr. Hansen, 2005). Esta empresa cuenta con oficinas en nuestro país.

Cuadro 5: Ficha técnica de los cultivos iniciadores para la FML disponibles en Chile de la empresa Chr. Hansen (Catálogos comerciales Chr. Hansen, 2014).

| Nombre del producto | Bacteria Láctica | Rango de pH | Rango de SO ₂ total | Tolerancia al alcohol | T° | Velocidad de la FML |
|---------------------|------------------|-------------|--------------------------------|-----------------------|-------|---------------------|
| Viniflora® CH16 | <i>O. oeni</i> | >3,4 | <40mg L ⁻¹ | <16% V/v | >17°C | Rápida |
| Viniflora® CiNe | <i>O. oeni</i> | >3,2 | <30mg L ⁻¹ | <14% V/v | >17°C | Rápida |
| Viniflora® Oenos | <i>O. oeni</i> | >3,2 | <40mg L ⁻¹ | <14% V/v | >17°C | Rápida |

Cuadro 6: Características enológicas de los cultivos iniciadores para la FML ofrecido por la empresa Chr. Hansen (Catálogos comerciales Chr. Hansen, 2014).

| Nombre del producto | Características enológicas |
|---------------------|---|
| Viniflora®CH16 | Cultivo iniciador para la FML que ofrece una rápida implantación y corta duración de la fermentación, con una alta seguridad en ésta gracias a su alto número de células activas. No produce aminos biógenas y aumenta muy poco la acidez volátil. No dispone de información sobre aportes sensoriales al vino. |
| Viniflora®CiNe | Cultivo puro de <i>Oenococcus oeni</i> recomendado para cualquier tipo de vino. Garantiza una rápida y segura fermentación maloláctica, no produce aminos biógenas. El aumento de la acidez volátil es imperceptible, gracias a su nulo consumo de ácido cítrico. Aporta aromas a frutos primarios, con muy bajos toques lácteos. |
| Viniflora®Oenos | Recomendado para vinos tintos y blancos. Se asegura una FML rápida y segura, gracias a su alta tolerancia a pH bajos y alta graduación alcohólica. No produce aminos biógenas. Aporta buena complejidad aromática y un nulo aumento en la acidez volátil del vino. |

Productos comerciales marca Laffort Fundada en Burdeos el año 1895. Desde su inicio, esta empresa ha estado enfocada en la industria enológica. Laffort, cuenta con insumos enológicos tales como Levaduras, BL, enzimas, nutrientes para levaduras y BL, taninos, roble francés (duelas, virutas y chips), entre otros (Laffort, 2015). La empresa encargada de distribuir sus productos en Chile es Partner S.A.

Cuadro 7: Ficha técnica de los cultivos iniciadores para la FML disponibles en Chile de la empresa Laffort (Catálogos comerciales Laffort, 2014).

| Nombre del producto | Bacteria Láctica | Rango de pH | Rango de SO ₂ total | Tolerancia al alcohol | T° | Velocidad de la FML |
|-------------------------|------------------|-------------|--------------------------------|-----------------------|-------|---------------------|
| Lactoenos 450 PreAc® | <i>O. oeni</i> | >3,5 | <80mg L ⁻¹ | <17% V/v | >16°C | Rápida |
| Lactoenos 350 PreAc® | <i>O. oeni</i> | >2,9 | <80mg L ⁻¹ | <16% V/v | >15°C | Moderada |
| Lactoenos B28 PreAc® | <i>O. oeni</i> | >3,1 | <80mg L ⁻¹ | <16% V/v | >16°C | Rápida |
| Lactoenos SB3 Instant® | <i>O. oeni</i> | >3,3 | <30mg L ⁻¹ | <15% V/v | >16°C | Lenta |
| Lactoenos B16 standard® | <i>O. oeni</i> | >2,9 | <60mg L ⁻¹ | <16% V/v | >16°C | Moderada |

Cuadro 8: Características enológicas de los cultivos iniciadores para la FML ofrecido por la empresa Laffort (Catálogos comerciales Laffort, 2014).

| Nombre del producto | Características enológicas |
|-------------------------|--|
| Lactoenos 450 PreAc® | Es una de las cepas con mayor actividad maloláctica en el mercado, por lo que se garantiza una FML muy ágil y con excelente control, sin que aumente la acidez volátil del vino. Gracias a su gran tolerancia a altas concentraciones de alcohol es recomendada para vinos de alta gama. Es aromáticamente neutra, la producción de diacetilo es baja, lo que permite conservar las características varietales del vino. La producción de aminos biógenas es nula. |
| Lactoenos 350 PreAc® | Este cultivo es muy robusto frente a distintas condiciones en el mosto, gracias a su alta tolerancia al pH puede aclimatarse rápidamente dando origen a una FML temprana y muy segura, con una nula producción de aminos biógenas. En cuanto a los aportes sensoriales que otorga este cultivo el productor no los especifica. |
| Lactoenos B28 PreAc® | Esta cepa de <i>O. oeni</i> posee una elevada actividad maloláctica en condiciones estresantes del medio como: es resistente a niveles medio de ácidos grasos (C8 y C10), a bajas temperaturas, a elevados niveles de ácido tartárico y alto contenido alcohólico del vino, lo que resulta en una FML rápida y segura. La empresa no especifica cambios o aportes organolépticos en el vino. |
| Lactoenos SB3 Instant® | Cepa de inoculación directa, diseñada especialmente para vinos tintos de alta gama con FML en barrica. Es compatible con una amplia gama de levaduras comerciales. Gracias a la baja producción de acidez volátil, diacetilo y a que es aromáticamente neutra, permite conservar el carácter afrutado propio de la variedad. |
| Lactoenos B16 standard® | Cultivo recomendado para variedades blancas de vinos. También se recomienda para cualquier tipo de vino en condiciones estresantes o con parada de FML. La empresa no especifica cambios o aporte en la composición organoléptica. |

Productos comerciales marca Lallemand. Empresa canadiense fundada en Montreal a finales del siglo XIX. Durante sus inicios, la empresa solo se enfocaba a la producción de levaduras para panaderías. En el año 1970, Lallemand comenzó a elaborar levaduras con fines enológicos, y ya en 1985, añadió cultivos de BL para la FML, entre sus productos (Lallemand, 2011). Según Lavarello *et al.* (2011), esta empresa abarca el 70% del mercado de levaduras y BL a nivel global, y está presente en 36 países del mundo, incluyendo Chile.

Cuadro 9: Ficha técnica de los cultivos iniciadores para la FML disponibles en Chile de la empresa Lallemand (Catálogos comerciales Lallemand S.A., 2014).

| Nombre del producto | Bacteria Láctica | Rango de pH | Rango de SO ₂ total | Tolerancia al alcohol | T° | Velocidad de la FML |
|---------------------|---------------------|-------------|--------------------------------|-----------------------|-------|---------------------|
| Lalvin 31® | <i>O. oeni</i> | >3,1 | <45mg L ⁻¹ | <14% V/v | >13°C | Moderada |
| Lalvin VP41® | <i>O. oeni</i> | >3,1 | <60mg L ⁻¹ | <16% V/v | >16°C | Rápida |
| Lalvin ICV Elios 1® | <i>O. oeni</i> | >3,4 | <50mg L ⁻¹ | <15% V/v | >18°C | Rápida |
| Uvaferm Alpha® | <i>O. oeni</i> | >3,2 | <60mg L ⁻¹ | <15,5% V/v | >14°C | Rápida |
| Uvaferm beta ® | <i>O. oeni</i> | >3,2 | <60mg L ⁻¹ | <15% V/v | >14°C | Rápida |
| V22 ® | <i>L. plantarum</i> | >3,5 | <50mg L ⁻¹ | <15,5% V/v | >17°C | Lenta |

Cuadro 10: Características enológicas de los cultivos iniciadores para la FML ofrecido por la empresa Lallemand (Catálogos comerciales Lallemand S.A., 2014).

| Nombre del producto | Características enológicas |
|---------------------|---|
| Lalvin 31® | Este tipo de cultivo proporciona una buena FML y fiable. Le otorgará al vino un mayor volumen en boca, una mayor estructura tánica, también aportará notas a picantes, frutos rojos como grosella y leves toque a mantequilla. Esta recomendado para regiones frías. |
| Lalvin VP41® | Este cultivo iniciador al poseer gran resistencia al SO ₂ y a altas concentraciones de etanol hace que sea un cultivo muy confiable. Le dará al vino mayor volumen en boca y una moderada intensidad tánica, pero con taninos muy suaves (en comparación a Lalvin 31®). Contribuirá con aromas a chocolate, café y frutos rojos como arándano, frutilla y grosella roja. Se recomienda usarlo en bodegas donde las condiciones de vinificación estén bien controladas. |
| Lalvin ICV Elios 1® | Cultivo puro de <i>Oenococcus oeni</i> que soporta condiciones media de pH y temperatura. Evita la formación de aminas biógenas y evita la incidencia de aparición de BL alterantes, debido a su rápida implantación en el vino. En los vinos tintos potencia los aromas varietales frescos, aporta notas de licor pimienta y fruta madura. |
| Uvaferm Alpha® | Las características propias de este cultivo hacen que sea capaz de soportar múltiples condiciones de vinificación, lo que la hace un cultivo muy confiable para la FML. Tiene una producción moderada de diacetilo lo cual otorgará aromas a mantequilla, aporta notas a frutos rojos como a moras y frutilla y disminuye considerablemente los aromas herbáceos del vino. Asegura una buena calidad del producto final y una buena preservación. |
| Uvaferm beta® | Esta cepa de BL posee la capacidad de proliferar rápidamente en el vino generando una rápida FML. Le dará mayor volumen en boca y aumenta la expresión frutal del vino, aparte aportará aromas a berries como la grosella roja, y al poseer una gran producción de diacetilo los aromas lácteos estarán muy presentes en el vino. |
| V22® | Cultivo puro de <i>Lactobacillus plantarum</i> recomendado para co-inoculación. Asegura buena implantación con una FML segura. Al ser una BL heterofermentativa facultativa se asegura un nulo aumento en la acidez volátil proveniente de los azúcares. La producción de diacetilo es muy baja, por lo que no tendrá un impacto mantecoso en el vino. Destaca altas notas de frutos rojos y negros, vainilla y chocolate. No produce aminas biógenas. |

Productos comerciales marca Lamothe-abiet. Empresa de origen Francés, que desde 1878 está enfocada en la producción de insumos enológicos. Dentro de sus productos se pueden encontrar levaduras, BL, taninos, enzimas, activadores para levaduras y BL, roble americano y francés (chips y duelas), entre otros (Lamothe-abiet, 2014a). En Chile, la empresa encargada de su distribución es Vínicas.

Cuadro 11: Ficha técnica de los cultivos iniciadores para la FML disponibles en Chile de la empresa Lamothe-abiet (Catálogos comerciales Lamothe-abiet, 2014b).

| Nombre del producto | Bacteria Láctica | Rango de pH | Rango de SO ₂ total | Tolerancia al alcohol | T° | Velocidad de la FML |
|---------------------|------------------|-------------|--------------------------------|-----------------------|-----------|---------------------|
| AF 06 Oeno 1 | <i>O. oeni</i> | >3,3 | <45mg L ⁻¹ | 15% V/v | 16 a 24°C | Rápida |
| AD 08 Oeno 2 | <i>O. oeni</i> | >3,2 | <60mg L ⁻¹ | 15,5% V/v | 16 a 24°C | Rápida |

Cuadro 12: Características enológicas de los cultivos iniciadores para la FML ofrecidos por la empresa Lamothe-abiet (Catálogos comerciales Lamothe-abiet, 2014b).

| Nombre del producto | Características enológicas |
|---------------------|---|
| AF 06 Oeno 1 | Cepa recomendada especialmente para vinos tintos de alta gama. Asegura un arranque rápido y con una menor duración de la FML, con una gestión segura, ya que puede expresar su actividad maloláctica con altas concentraciones de etanol. El proveedor no especifica los caracteres aromáticos ni la producción de compuestos tóxicos aportados por esta bacteria. |
| AD 08 Oeno 2 | Kit que comprende una cepa de <i>O. oeni</i> con un activador, muy flexible lo que permite utilizarla en co-inoculación tardía (al finalizar la FA) o inoculación secuencial (terminada la FA), incluso se puede utilizar para activar fermentaciones paradas. Gracias a su capacidad de soportar medios muy estresantes para la bacteria permite una FML rápida y muy segura. No se especifican aportes aromáticos ni la producción de compuestos tóxicos aportados por esta bacteria. |

Productos comerciales marca Oenofrance. Empresa fundada en 1943, en Paris, Francia. Desde sus inicios ha sido una empresa enfocada en producir insumos y tecnologías que contribuyan a la industria enológica. Oenofrance, fue la empresa que finalizó con el proyecto de BL liofilizadas. Esta empresa, está presente en Chile (Oenofrance, 2015).

Cuadro 13: Ficha técnica de los cultivos iniciadores para la FML disponibles en Chile de la empresa Oenofrance (Catálogos comerciales Oenofrance, 2014).

| Nombre del producto | Bacteria Láctica | Rango de pH | Rango de SO ₂ total | Tolerancia al alcohol | T° | Velocidad de la FML |
|-----------------------|------------------|-------------|--------------------------------|-----------------------|-------|---------------------|
| FML Expertice C | <i>O. oeni</i> | >2,9 | n/e * | <14% V/v | >18°C | Rápida |
| FML Expertice S | <i>O. oeni</i> | >3,3 | <50mg L ⁻¹ | <14,5% V/v | >14°C | Rápida |
| FML Expertice Extreme | <i>O. oeni</i> | >3,1 | <60mg L ⁻¹ | <15,5% V/v | >14°C | Rápida |

Cuadro 14: Características enológicas de los cultivos iniciadores para la FML ofrecido por la empresa Oenofrance (Catálogos comerciales Oenofrance, 2014).

| Nombre del producto | Características enológicas |
|-----------------------|---|
| FML Expertise C | Esta BL posee una gran actividad maloláctica incluso a pH muy bajos y a altas concentraciones de alcohol, lo que garantiza una rápida FML y de forma muy segura. Está recomendada para vinos ácidos de preferencia cepas blancas. En los catálogos no se especifican el impacto en las propiedades organolépticas. |
| FML Expertise S | Cepa de <i>O. oeni</i> de rápida implantación y una gran actividad maloláctica, lo que permite una rápida iniciación de la FML y de corta duración con gran seguridad. Gracias a su gran resistencia a altas concentraciones de etanol es recomendada para un gran número de cepas tintas. Este cultivo respeta los aromas propios de la variedad, aumentando la expresión de frutos rojos, los aromas lácteos no dominan en el producto final. Esta cepa produce bajos niveles de aminas biógenas. |
| FML Expertise Extreme | Este cultivo posee una rápida implantación, con una alta tasa de supervivencia luego de la siembra, permite realizar una FML en condiciones de pH y alcohol extremas, lo que garantiza una rápida y segura FML. Este cultivo logra respetar el carácter afrutado del vino. |

* N/e: No especifica

Cabe destacar que los fabricantes de cultivos comerciales de BL (Chr. Hansen, Laffort y Oenofrance), advierten en las fichas técnicas de los productos, que las tolerancias de estos cultivos interactúan entre sí, por lo cual, no siempre serán exactos estos datos (Cuadros 3, 5, 7, 9, 11 y 13). Estos parámetros influirán en la supervivencia de las bacterias y en consecuencia en la FML. La interacción entre esos parámetros tendrá un mayor impacto en el nivel de estrés para las bacterias, mucho mayor que un factor por sí solo (Knoll *et al.*, 2011). De igual manera, los proveedores especifican que la eficiencia y los cambios sensoriales aportados por las BL (Cuadros 4, 6, 8, 10, 12 y 14) se verán afectados, si no se cumple los protocolos de empleo tales como respetar el volumen de vino indicado para la dosis de bacteria, el momento recomendado de inoculación, utilizar levaduras recomendadas por el fabricante y seguir adecuadamente los pasos de aclimatación si es requerido. Por lo tanto, recomiendan utilizar estos cultivos asociados a distintos kits, tanto de aclimatación como de nutrición, para estas bacterias que disponen las distintas empresas de insumos enológicos.

Comparación de las propiedades enológicas de los cultivos comercializados en Chile

No solo es necesario saber qué tipo de BL es la más idónea para las condiciones enológicas del vino a inocular, sino también, qué resultados se espera de este proceso fermentativo. Se tienen como antecedentes, que la inducción de la FML no solo la agiliza y aporta seguridad alimentaria a ésta. Además, cepas de *O. oeni* aportan complejidad a nivel de sabores y aromas. Es por esto, que resulta útil revisar las distintas ofertas de BL que existen en el mercado y hacer una comparación entre ellas.

En este punto se comparan las características tecnológicas de los cultivos iniciadores para la FML (velocidad de la FML, tipo de inoculación y producción de compuestos nocivos) descritas en los catálogos comerciales (Cuadro 15), y también, los atributos sensoriales producidos por los cultivos iniciadores para la FML (Cuadro 16).

Cuadro 15: Propiedades técnicas entre los distintos cultivos iniciadores para la FML entre las distintas empresas.

| Empresa | Producto | Dinámica fermentativa | Generación compuestos tóxicos | Tipo de siembra (directa, reactivar o pie de cuba) |
|--------------------------|----------------------------|-----------------------|-------------------------------|--|
| Lamothe-Abiet (a) | AF 06 Oeno 1 | *** | n/e* | Directo |
| | AD 08 Oeno 2 | *** | n/e* | Pie de cuba |
| Lallemand (b) | Lalvin 31® | ** | Muy baja | Directa (MBR®) |
| | Lalvin VP41® | *** | Nula | Directa (MBR®) |
| | Lalvin ICV Elios 1® | *** | Nula | Reactivar o directa |
| | Uvaferm Alpha® | *** | Nula | Directa (MBR®) |
| | Uvaferm Beta ® | *** | Nula | Directa (MBR®) |
| | V22 | * | Nula | Directa (MBR®) |
| Laffort (c) | Lactoenos 450 PreAc® | *** | Nula | Reactivar |
| | Lactoenos 350 PreAc® | ** | Nula | Reactivar |
| | Lactoenos B28 PreAc® | *** | n/e* | Reactivar |
| | Lactoenos SB3 Instant® | * | Nula | Reactivar |
| | Lactoenos B16 standard® | ** | n/e* | Pie de cuba |
| Oenofrance (d) | FML expertise C | *** | n/e* | Pie de cuba |
| | FML expertise S | *** | Bajo | Directa |
| | FML expertise extreme | *** | Nula | Reactivar |
| Anchor Wine Yeast (e) | NT 202 Co-inoculant | *** | Nula | Reactivar |
| CHR-Hansen (f) | Viniflora® CH16 | *** | Nula | Directa |
| | Viniflora® CiNe | *** | Nula | Directa |
| | Viniflora® Oenos | *** | Nula | Directa |

(a): Lamothe-abiet, 2014b; (b): Lallemand, 2014; (c): Laffort, 2014; (d): Oenofrance, 2014; (e): Anchor Wine Yeast, 2014 y (f): Chr. Hansen, 2014.

* Lenta ** moderada *** rápida.

n/e*: No especifica.

En el Cuadro 15, se presentan resumidamente, las principales características técnicas, expuestas en los catálogos comerciales de los inóculos de BL. Todos los productos ofrecen agilizar la FML, a excepción de las cepas Lactoenos SB3 Instant (Laffort) y V22 (Lallemand), donde sus técnicos recomiendan utilizar estos cultivos para FML en barrica. También, se destaca la nula producción de compuestos nocivos para la salud humana. En cuanto a la información entregada por las empresas sobre la velocidad fermentativa de los inóculos comerciales, ésta es imprecisa y se limitan a indicar si la FML ocurre a una velocidad rápida, moderada o lenta, siendo un dato muy ambiguo, tanto a nivel de producción como científico.

En lo que respecta a la siembra de estos cultivos bacterianos, el comercio ofrece dos formas de inoculación: siembra directa o con una fase de reactivación.

- **Inoculación directa:** Este tipo de siembra, consiste en BL liofilizadas que pueden añadirse directamente al vino (Viniflora® CH16, Viniflora® CiNe, Viniflora® Oenos), o solo necesitan ser rehidratadas para ser inoculadas (FML expertise S Lalvin 31®, Lalvin VP41®, Lalvin ICV Elios 1®, Uvaferm Alpha®, Uvaferm Beta®, V22® y AF 06 Oeno 1) (González *et al.*, 2011). Para la rehidratación de estos cultivos, es necesario mezclar el contenido del envase en el equivalente a 10-20 veces su volumen con agua mineral. Con respecto a los cultivos de inoculación directa MBR, es un proceso patentado por Lallemand, en donde las BL durante su aislamiento, son sometidas a diferentes tensiones, como pH bajo (3,0), alta graduación de etanol (12% V/V) y altas temperaturas (42°C) (Prat, 1996; Guzzo *et al.*, 1997). Esto conlleva, a una síntesis de la proteína del estrés específicamente la proteína LO18 (proteína de choque térmico), confiriéndole mayor resistencia en la membrana celular, lo que le permite soportar condiciones más robustas del vino (Coucheney *et al.*, 2005).
- **Siembra con reactivación:** Son cultivos congelados, líquidos y mayormente liofilizados de BL. Debido a su alta tasa de mortalidad que implicaría una siembra directa (alrededor del 80%), necesitan una fase de reactivación antes de inocular en el vino (Hayman y Monk, 1982). En este proceso, las BL son aclimatadas al vino donde será inoculado, con el objetivo de resistir la transferencia al vino (Prat, 1996). Generalmente, el protocolo de reactivación consiste en inocular los cultivos de BL en un medio que contiene 50% agua sin cloro y 50% de vino con muy bajo nivel de SO₂ total (30 a 40 mg L⁻¹) (González *et al.*, 2011). Adicionalmente, los fabricantes de algunos cultivos de BL (FML expertise C, Lactoenos B16 standard® y AD08 oeno2) recomiendan realizar un pie de cuba antes de inocular el vino. El pie de cuba, consiste en inocular con levaduras seleccionadas un mosto sin sulfitar, el cual equivale al 3-5% del volumen total del vino que se quiere inducir la FML. Terminada la FA del pie de cuba, se agrega las BL que recibieron la reactivación, y cuando las BL hayan consumido 2/3 del ácido málico del pie de cuba, se puede sembrar al volumen total del vino (Prat, 1996).

Cuadro 16: Aportes organolépticos otorgados por los cultivos comerciales de BL al vino.

| Empresa | Producto | Características organolépticas | Aumento en la acidez volátil. |
|-----------------------|-------------------------|---|-------------------------------|
| Lamothe-Abiet (a) | AF 06 Oeno 1 | n/e*** | n/e*** |
| | AD 08 Oeno 2 | n/e*** | n/e*** |
| Lallemand (b) | Lalvin 31® | Frutos rojos, mayor intensidad colorante y estructura tánica. | Baja producción |
| | Lalvin VP41® | Frutas tropicales, frutas rojas, chocolate y café | Baja producción |
| | Lalvin ICV Elios 1® | Aromas frescos, pimienta y fruta madura. | Baja producción |
| | Uvaferm Alpha® | Frutas rojas, yogurt y mantequilla. | Baja producción |
| | Uvaferm Beta ® | Berries, grosella y mantequilla. | Baja producción |
| | V22 ® | Frutos rojos y negros, vainilla y chocolate. | No aumenta |
| Laffort (c) | Lactoenos 450 PreAc® | Aromáticamente neutra.* | Baja producción |
| | Lactoenos 350 PreAc® | n/e*** | n/e*** |
| | Lactoenos B28 PreAc® | n/e*** | n/e*** |
| | Lactoenos SB3 Instant® | Aromáticamente neutra* | Baja producción |
| | Lactoenos B16 standard® | n/e*** | n/e*** |
| Oenofrance (d) | FML expertise C | n/e*** | n/e*** |
| | FML expertise S | Frutos rojos | n/e*** |
| | FML expertise extreme | Notas afrutadas y picantes. | Baja producción |
| Anchor Wine Yeast (e) | NT 202 Co-inoculant | Mejora el perfil aromático** | Baja producción |
| CHR-Hansen (f) | Viniflora® CH16 | n/e*** | Baja producción |
| | Viniflora® CiNe | Frutos primarios y muy poco lácteo. | No aumenta |
| | Viniflora® Oenos | Aumenta complejidad aromática. | Baja producción |

(a): Lamothe-abiet, 2014b; (b): Lallemand, 2014; (c): Laffort, 2014; (d): Oenofrance, 2014; (e): Anchor Wine Yeast, 2014 y (f): Chr. Hansen, 2014.

* Aromáticamente neutra: Conserva las características varietales de la variedad del vino.

** Mejora del perfil aromático: Esta característica hace resaltar las notas afrutadas de la variedad del vino.

*** n/e: no especifica.

El Cuadro 16, muestra los aportes organolépticos de los cultivos iniciadores a los vinos resultantes de la FML. Se enfatiza en el nulo aumento de la acidez volátil. Todas las empresas, destacan que cumplen con todos los parámetros establecidos en el CODEX enológico, como cumplir con lo especifica la etiqueta del envase: "El nombre del género y

de la/las especies, así como la/las referencias de la/las cepa/s en el caso de que exista un registro" (OIV, 2009). Debe poseer una concentración mínima de BL revivificable de 10^{11} UFC mL⁻¹ (OIV, 2012b). "No debe producir aminas biógenas, a menos que sea en cantidades mínimas y no debe transmitir gusto extraño ni producir sustancias nocivas para la salud humana" (OIV, 2009).

En cuanto a la información sobre mejoras organolépticas aportadas por estas bacterias (Cuadro 16), ésta se acota a solo algunos cultivos de BL, y las que proporcionan esta información resaltan descriptores aromáticos tales como frutos rojos y negros, chocolate, café y mantequilla, mientras que otras BL comerciales respetan o resaltan los aromas varietales del vino.

Impacto del uso de cultivos iniciadores comerciales en las propiedades organolépticas del vino

El rol de las BL durante la vinificación está asociado como las responsables de la conversión del ácido D-málico en ácido D-láctico, reduciendo así la acidez de los vinos tintos (Catania y Avagnina, 1994). Sin embargo, diversos estudios muestran que *O. oeni* puede modular el perfil aromático del vino (Bordons, 1997 y Petri *et al.*, 2013). Esto se asocia a la producción ésteres etílicos, propios del metabolismo (actividad esterasa) de *Oenococcus oeni*, como el acetato de etilo que en pequeñas dosis (<80 mg L⁻¹) acentúan el carácter afrutado del vino (De Revel *et al.*, 1999 y Plata *et al.*, 2003). Existen muchos compuestos volátiles con potencial aromático en la uva tales como monoterpenos, derivados del benceno, norisoprenoides, alcoholes alifáticos, entre otros (asociados a aromas a flores y miel). Sin embargo, éstos suelen estar ligados a una molécula de glucosa, formando un compuesto llamado glicósido (no volátil) (Michlmayr *et al.*, 2012). Grimaldi *et al.* (2005), demostraron, en general, que las cepas comerciales de *Oenococcus oeni*, poseen una gran actividad glucosidasa; enzima responsable de la disociación de los glicósidos, liberando así estos compuestos aromáticos al medio. También, la generación de pequeñas dosis de compuestos como el diacetilo, otorgaría aromas mantecosos al vino (1-4 mg L⁻¹), aportándole complejidad a éste (Bartowsky y Henschke, 2004). Este tipo de aromas son denominados como aromas secundarios (Francis y Newton, 2005). La generación de estos compuestos están influenciados por la genética de la cepa bacteriana (González *et al.*, 2011). Por lo tanto, la expresión aromática del vino dependerá íntimamente de la cepa de BL que se utilice, teniendo como objetivo acentuar el carácter afrutado de la variedad del vino (Bartowsky *et al.*, 2012).

Aportes de los cultivos iniciadores para la Fermentación Maloláctica en las propiedades organolépticas del vino

Existen numerosos estudios, que evalúan el impacto que poseen los cultivos comerciales de BL en el perfil sensorial de los vinos tintos. Sin embargo, terminada la FML, los resultados a nivel organolépticos suelen ser muy variables. Boido (2002) en Uruguay, reportó que en vinos del cv. Tannat inoculados con cepa D-11 Malolactine O (Oenofrance) y DSM 7008

Viniflora (Chr. Hansen), se generaron compuestos aromáticos producidos por estas cepas bacterianas. Se reveló, una concentración de lactato de etilo 20 veces mayor en el vino inoculado con las cepas de BL comerciales, que en vinos con FML espontánea. Este compuesto está relacionado con aromas lácteos y notas a café (Añón *et al.*, 2014). Por otro lado, se presentó una baja concentración de acetatos y ésteres en los vinos inoculados con la cepa Viniflora, compuestos relacionados a aromas frutales. Aunque, estaban en una mayor concentración que en los vinos donde se realizó la FML espontáneamente. Los vinos inoculados con la cepa de Oenofrance, produjeron cantidades significativas de acetato de isoamilo y alcohol β -feniletílico, compuestos relacionados a descriptores de frutas y floral respectivamente (Sumbly *et al.*, 2010). De estos resultados se puede desprender, que la cepa DSM 7008 Viniflora, posee una mayor actividad esterasa, en comparación con la cepa D-11 Malolactine y las BL nativas (Plata *et al.*, 2003). También, se evidenció que la utilización de estas cepas comerciales, proporciona una mejora sustantiva en la calidad organoléptica del vino con respecto a una FML espontánea.

Sumbly *et al.* (2013) en Australia, evaluaron la composición de los ésteres producidos durante la FML en vinos cv. Cabernet Sauvignon, inoculados con las cepas comerciales de *O. oeni* Viniflora (Chr. Hansen), 3X1 Step, Lalvin MT01 y cepa no comercial Nuovo cepi Oo2 (Lallemand). En estos tratamientos, se obtuvieron una mayor cantidad de compuestos aromáticos, como lactato de etilo que otorga notas lácteas, octanoato de etilo y 2-metilpropil de etilo, que se reportan como descriptores afrutados y fruta madura (Sumbly *et al.*, 2010). En general, el vino inoculado logró obtener un 60% más de ésteres relacionados al carácter afrutado del vino, comparados con los que no fueron inoculados.

En contraste, una investigación realizadas en vinos cv. Pinot Noir (Burdeos) por Gerbaux (2006), quién utilizó cepas comerciales Lalvin 31 y Enoferm Alpha (Lallemand), no encontró diferencias en las cualidades organolépticas, con respecto a una FML espontánea.

A nivel nacional, los estudios siguen el mismo patrón. Guzmán (1996), evaluó el impacto en las propiedades organolépticas de las cepas Viniflora (Chr. Hansen), Bitec-D (Bitec) y OSU (Lallemand), en vino cv. Cabernet Sauvignon con alta graduación alcohólica (13,5% V/v) y pH 3,79. Terminada la FML, no se encontraron diferencias entre los tratamientos, en lo que respecta al sabor, aroma y color, comparados con una FML espontánea (tratamiento testigo). Catania y Avagnina (1994) y Jackson (2014b), reportaron que los vinos tintos con pH mayores a 3,8 (los vinos resultantes del estudio de Guzmán (1996), fue de pH 4,0), la hidrólisis de ésteres acetatos (compuestos relacionados con aroma floral y frutal) se hace más rápida, conllevando a vinos menos frutosos y con menor complejidad en boca.

Villarroel (1999), indujo la FML en vinos cv. Cabernet Sauvignon, el cual presentaba un alto grado alcohólico (13,9 % V/v) y muy bajo pH (3,14), con las cepas OSU, EQ 54 y 3x1 Step (Lallemand). Se produjo predominio del carácter aromático “chocolate-chancaca” con los tratamientos 3x1 Step y EQ 54. Ésta última, también, difirió del resto con la presencia de aromas a berries, aunque este descriptor fue muy leve y estadísticamente no fue significativo. Estas notas a frutos rojos se describen en los catálogos comerciales de EQ 54

como uno de los aportes organolépticos que otorga esta cepa al vino. El tratamiento con el cultivo OSU, no tuvo mayor impacto en el perfil aromático del vino, siendo incluso, peor catalogada que el tratamiento testigo (FML espontánea). En la evaluación sensorial realizada en este estudio, los tratamientos con las cepas EQ 54 y 3X1 Step tuvieron una mayor calidad aromática, influyendo positivamente en la composición organoléptica del vino. La ausencia de notas afrutadas en el ensayo de Villarroel (1999), se puede explicar a que el etanol posee un efecto de supresión de los aromas frutales en los vinos (Villamor *et al.*, 2013). También, un alto contenido de etanol (14% V/v), aumenta la solubilidad de los ésteres de etilo, provocando la disociación de estos, reduciendo así la percepción de aromas frutales en el vino (Jackson, 2014b).

Por su lado, Bastías (2000) inoculó un vino del cv. Cabernet Sauvignon con 13,5% V/v de etanol y bajo dos condiciones de pH 3,42 y 3,0, con cepas comerciales EQ 54 y Lalvin 31 de (Lallemant). No logró encontrar diferencias sensoriales muy notorias utilizando los cultivos comerciales, comparadas con una FML espontánea, siendo el tratamiento con la cepa Lalvin 31 a pH 3,42 la que fue mejor catalogada, teniendo mayor cuerpo y una mayor intensidad aromática, resaltando aromas como vainilla, madera quemada y mentol (diferencia no significativa). A pesar que estos cultivos de BL, en sus respectivos catálogos, destacan aumentar el carácter afrutado del vino, la ausencia de este atributo, el autor lo atribuye al tiempo de almacenamiento (datos no mostrados) que estuvieron sometidos los vinos antes de ser analizados. Durante el almacenamiento, existe la liberación de compuestos C13 norisoprenoides como el 4,5-Dihidrovomifoliol (aroma a menta) y fenoles volátiles como la vainillina (aroma a vainilla) y el Hidroxipropiosiringona (aroma a madera tostada) (Catania y Avagnina, 1994; Boido, 2002; Cedrón, 2004 y Izquierdo *et al.*, 2008b). Esto explica, en parte, la aparición de estos aromas en el vino inoculado con Lalvin 31, en el estudio de Bastías (2000).

Silva (2008), inoculó vinos del cv. Carménère con 13,9% V/v de etanol y pH 3,5, con las cepas PN4, 49A1, V22, Lalvin VP41, Lalvin 31, Lalvin ICV Elios Blanc, Lalvin ICV Elios 1, Uvaferm Alpha y Uvaferm Beta (Lallemant). Los vinos inoculados con Uvaferm Alpha, Lalvin ICV Elios 1 y 49A1, fueron los que se diferenciaron significativamente del resto, presentando carácter a pimentón. La cepa Lalvin ICV Elios 1, es la única que en su catalogo comercial promociona este tipo de aromas. Los demás tratamientos no difirieron del tratamiento testigo (FML espontánea). El aroma proporcionado por el compuesto 2-isobutil-3-metoxipirazina (pimentón), es deseado en muy pequeñas concentraciones en el vino (0,6 - 15 $ng L^{-1}$) (Boido, 2002), debido a que le aporta complejidad y volumen en boca al vino, teniendo un efecto positivo en la composición organoléptica del vino (Catania y Avagnina, 1994; Ortega-Heras *et al.*, 2002; Ferreira, 2007 y Jackson, 2014b).

Con excepción de los estudios de Guzmán (1996) y Bastías (2000), en los cuales la evaluación sensorial de los vinos obtenidos con inóculos comerciales de BL, no presentaron diferencia significativa con el vino sin inocular (tratamiento testigo). Los vinos inoculados con BL comerciales estudiados en esta monografía, incluyendo los ensayos realizados en Chile por Villarroel (1999) y Silva (2008), la FML conducida por inóculos comerciales se

diferenció significativamente con el tratamiento testigo (FML espontánea), en donde hubo una menor acidez y una disminución en las sensaciones herbáceas en los vinos resultantes de una FML inducida, como lo ha reportado Muñoz *et al.* (2011) y López *et al.* (2012). Sin embargo, en los catálogos comerciales de BL especifican que resaltan el carácter frutal de la variedad y contribuyen a la complejidad organoléptica, siendo relativa la evidencia en los vinos resultantes. En la mayoría de los vinos analizados, luego de finalizada la FML, no presentaron un carácter afrutado como se especifica en los catálogos comerciales de BL, a excepción de los ensayos realizados en Chile por Villarroel (1999), en Uruguay por Boido (2002) y en Australia por Sumbly *et al.* (2013). Knoll *et al.* (2007), señalan que una inoculación tardía con BL, proporcionaría menores concentraciones de compuestos relacionados con aromas frutales como esteres etílicos (35% menor), esteres acetatos (datos no presentados), 1-hexanol (10% menor), alcohol bencílico (20% menor), entre otros. Por otro lado, Escudero *et al.* (2007); Knoll *et al.* (2011); Bartowsky *et al.* (2012) e Izquierdo *et al.* (2012), señalan que la proporción de los compuestos que derivan los aromas frutales y florales, es mayor cuando la FML se efectúa a menor pH (<3,3), lo que concuerda con el estudio de Villarroel (1999).

Disminución en la intensidad colorante del vino, producto de la Fermentación Maloláctica

El color de los vinos tintos está directamente relacionado con la concentración de antocianos y el pH del vino (Araque, 2010). Los antocianos, son compuestos que presentan distintas formas en función del pH del vino, condicionando así su coloración (Sánchez *et al.*, 2014). Generalmente, en valores de pH cercanos a 3,5, los antocianos presentan su equilibrio químico hacia el catión flavilio, cuya coloración es roja (Peña, 2006). A medida que aumenta el pH (0,1 a 0,3 unidades de pH), el equilibrio químico de los antocianos es desplazado a la forma quinónica y la pseudobase carbinol, generando coloración azul-violeta o incolora respectivamente (Boido, 2002; Moreno-Arribas *et al.*, 2008 y Araque, 2010). Lo anterior, explicaría la disminución en la intensidad colorante en los vinos obtenidos en los estudios de Guzmán (1996), Villarroel (1999), Bastías (2000) y Silva (2008), en donde el pH, producto de la FML, tuvo un alza promedio de 0,13 unidades de pH. En cada estudio, la disminución de tonos rojos entre la FML inducida y espontánea, fue estadísticamente igual. Esto se debe a que una vez terminada la FML, el pH de los vinos, no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos, lo que coincide con lo reportado por Boido (2002) y Araque (2010).

Generación de olores indeseables por parte de inóculos comerciales de Bacterias Lácticas

De todos los estudios analizados en esta monografía, la única cepa que generó defectos fue Lalvin VP41, en el reporte de Silva (2008). En este estudio, se presentaron olores a reducción, los cuales están relacionados con compuestos azufrados volátiles, tales como el sulfuro de hidrogeno o mercaptanos (Sumbly *et al.*, 2010). Este defecto, se puede deber a que esta cepa bacteriana, en particular puede producir altos niveles de sulfuros otorgándole

al vino este tipo de aromas (Ulloa, 1996 y Jackowetz y Mira de Orduña, 2012).

Incremento en la acidez volátil producto de la inoculación de Bacterias Lácticas

Una de las características que promocionan los cultivos seleccionados de BL, es su mínimo aumento en la acidez volátil. Los estudios realizados por Guzmán (1996), Villarroel (1999), Bastías (2000) y Silva (2008), encontraron niveles más altos de la acidez volátil en los vinos inoculados que en los testigos. El alza en la acidez volátil de todos los tratamientos fluctuó entre los 0,1 y 0,25 g L⁻¹. Según Henschke (1993) nombrado por Guzmán (1996), hay un incremento normal en la acidez volátil de 0,2 - 0,3 g L⁻¹ cuando *Oenococcus oeni* realiza la FML, por lo que esta alza en la acidez volátil fue esperada por estos autores. Las cepas que lograron concentraciones menores de ácido acético (0,07 g L⁻¹ promedio), fueron Lalvin VP41 y Uvaferm Alpha en el ensayo de Silva (2008).

El aumento en la acidez volátil se produce durante la fase de crecimiento de las BL. Éstas consumen los azúcares presentes, produciendo pequeñas cantidades de ácido acético y ácido D-Láctico, terminada esta fase, comienza el consumo del ácido málico (Shimazu *et al.*, 1985 y Osborne y Edwards, 2005). El pH y el etanol son altamente influyentes en la composición de la acidez volátil final de un vino. A pH bajo (<3,5) y en presencia de etanol, se activan los genes implicados en la vía del citrato en *O. oeni*, y se consume una proporción del ácido cítrico, transformándolo en acetato (Olguín *et al.*, 2009).

CONCLUSIONES

De acuerdo a los antecedentes recopilados en esta monografía se puede concluir:

- Los cultivos de BL comercializados en Chile por las distintas empresas, no presentan diferencias en las propiedades enológicas declaradas. Se destaca que los aportes organolépticos otorgados por el uso de las cepas son similares entre ellos, especialmente, aromas a frutos rojos y notas lácteas. La mayoría ofrece un indetectable aumento en la acidez volátil, una corta duración de la FML y la nula contribución de compuestos tóxicos para el humano como las aminas biógenas.
- En general, los estudios respaldan el uso de los cultivos comerciales de bacterias lácticas, debido a los buenos resultados que se han obtenido, como la indetectable generación de aminas biógenas y acidez volátil que generan estos inóculos. También, existió una disminución en la duración de la FML, producto del uso de BL seleccionadas. Aunque en Chile, ésta disminución en el tiempo, no fue tan sustancial. En los estudios extranjeros, los vinos inoculados con BL seleccionadas alcanzaron una mayor proporción de ésteres etílicos y ésteres acetatos, que se describen como aromas afrutados. No fue así el caso de Chile, donde los 4 reportes estudiados en este aspecto, las notas afrutadas estaban ausentes en los vinos resultantes de la FML inducida por las BL comerciales.

BIBLIOGRAFÍA

Alberto, M.; M. Manca de Nadra and M. Arenas. 2012. influence of phenolic compounds on the growth and arginine deiminase system in a wine lactic acid bacterium. *Brazilian Journal of Microbiology*. 43(1): 167-176.

Alcaide, J.; M. Moreno-Arribas; P. Martín and M. Polo. 2007. Influence of malolactic fermentation, postfermentative treatments and ageing with lees on nitrogen compounds of red wines. *Food Chemistry*. 103(2): 572-581.

Alegría, E.; I. López; J. Ruiz; J. Sáenz; E. Fernández; M. Zarazaga. et al. 2004. High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiology Letters*. 230(1): 53-61.

Álvarez, M. and M. Moreno-Arribas. 2014. Review. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science & Technology*. 2014: 1-10.

Anchor Wine Yeast. 2013. [en línea]. Johannesburgo, Sudáfrica. Recuperado en: <<http://www.anchor.co.za/about/group-profile/>>. Consultado el: 29 de abril de 2015.

Anchor Wine Yeast. 2014. MLF starter cultures. [en línea]. Montpellier, Francia. Recuperado en: <http://www.oenobrand.com/files/PDF/Anchor/Web_EnglishCo_Inoc.pdf>. Consultado el: 24 de abril de 2014.

Añón, A.; J. López; D. Hernando; I. Orriols; E. Revilla and M. Losada. 2014. Effect of five enological practices and of the general phenolic composition on fermentation related aroma compound in Mencia young red wines. *Food Chemistry*. 148: 268-275.

Araque, I. 2010. Estudio bioquímico y molecular de la producción de carbamato de etilo por bacterias lácticas asociadas al proceso de vinificación. Tesis Doctoral. Tarragona, España. Universitat Rovira i Virgili. 261 h.

Arenas, M.; M. Manca de Narda and R. Muñoz. 2002. The arginine deiminase pathway in the wine lactic acid bacterium *Lactobacillus hilgardii* X1B: structural and functional study of *arcABC* genes. *Gene*, 301(1-2): 61-66.

Azzolini, M.; E. Tosi; P. Vagnoli; S. Krieger and G. Zapparoli. 2010. Evaluation of technological effects of yeast-bacterial co-inoculation in red table wine production. *Italian Journal of Food Science*. 3(22): 257-263.

Bartowsky, E. 2009. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in Applied Microbiology*. 48: 122-156.

Bartowsky, E.; P. Costello; S. Krieger; A. Markides; L. Francis y B Travis. 2012, Mar. La influencia de *Oenococcus oeni* en la composición de ésteres en Cabernet Sauvignon. [en línea]. *EnoReports*, Marzo del 2012: 1-5. Recuperado en <http://www.enoreports.com/pdf/lallemand_marz12.pdf>. Consultado el: 26 de mayo de 2013.

Bartowsky, E. and P. Henschke. 1995. Malolactic fermentation and wine flavor. The Australian Grapegrower & Winemaker. *Annual technical issue*, 86-97.

Bartowsky, E. and P. Henschke. 2004. The 'butery' attribute of wine -diacetyl- desirability, spoilage and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, 96(3): 235-252.

Bastias, J. 2000. Efectos del uso de dos cepas de bacterias lácticas en la inducción de la fermentación maloláctica (FML) bajo dos condiciones de pH en vino Cabernet Sauvignon. Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Talca, Chile. Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias. 55 h.

Bauer, R. 2004. Control of malolactic fermentation in wine. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 30 (1): 46-53.

Bauer, R.; M. Du Toit and J. Kossmann. 2010. Influence of environmental parameters of the acrolein precursor 3-hydroxypropionaldehyde by *Lactobacillus reuteri* DSMZ 20016 and its accumulation by wine lactobacilli. *International Journal of Food Microbiology*, 137(1): 28-31.

Beelman, R.; R. Keen; M. Banner and S. King. 1982. Interactions between wine yeast and malolactic bacteria under wine conditions. *Developments in Industrial Microbiology*, 23: 107-121.

Boido, E. 2002. Modificaciones producidas por la fermentación maloláctica en la fracción aromática en vinos Tannat. Tesis (Doctor en Química). Montevideo, Uruguay. Universidad de la Republica, Facultad de Química. 294 h.

Bordons, A. 1997. Las bacterias lácticas y la fermentación maloláctica. *Cursos Rioja*, 12: 9-31.

Bordons, A.; J. Gil; I. Araque; C. Carreté; S. Romero y M.C. Masqué. 2004. Estudios para la minimización de producción de carbamato de etilo por las bacterias lácticas. *Revista Tecnología del Vino: Tratamientos y equipos para la viticultura y enología*, 18: 90-97.

Bourdineaud, J. 2006. Both arginine and fructose stimulate pH-independent resistance in the wine bacteria *Oenococcus oeni*. *International Journal of Food Microbiology*, 107(3): 274-280.

Boutou, S. and P. Chatonnet. 2007. Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorant causing off-flavours in wine. *Journal of Chromatography A*, 1141(1): 1-9.

Calandra, P.; D. Ortiz; G. Pozo; y B. Noziglia. 2014. Manual de redacción de referencias bibliográficas. G. Reginato (Ed). Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 72p.

Capucho, I. and M. San Ramão. 1994. Effect of ethanol and fatty acids on malolactic activity of *Leuconostoc oenos*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42: 391-395.

Carrascosa, A; R. Muñoz y R. González. Microbiología del Vino. Madrid, AMV ediciones, 2005. 399p.

Carreté, R.; T. Vidal; A. Bordons and M. Constantí. 2002. Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiology Letters*, 211(2): 155-159.

Carretero, F. 2006. Innovación tecnológica en la industria de bebidas. Tesis para optar al título en ingeniería química. Barcelona, España. Escola Universita d'enginyeria técnica industrial de Barcelona. 283 h.

Catania, C. y S. Avagnina. 1994. Implicancias organolépticas de la fermentación Maloláctica. En: Curso superior de degustación de vinos: 2007. Mendoza, Argentina, INTA. 15 pp.

Cavin, J.; C. Divies y J. Guzzo. Las alteraciones de los vinos debido a las bacterias lácticas. En: Flanzky, C (Ed.). Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. 2^a ed. Francia. AMV ediciones, 2003. pp. 332-334.

Cedron, M. 2004. Estudio analítico de compuestos volátiles en los vinos. Caracterización quimiométrica de distintas denominaciones de origen. Tesis para optar al grado de doctor. La Rioja, España. Departamento de Química, Universidad de La Rioja. 470 h.

Chr. Hansen. 2005. [en línea]. Hoerscholm, Dinamarca. Recuperado en: <<http://www.chr-hansen.es/nuestra-empresa/historia.html>>. Consultado el 29 de abril de 2015.

Chr. Hansen. 2014. La gamme Viniflora. [en línea]. Hoerscholm, Dinamarca. Recuperado en: <http://www.chr-hansen.fr/produits/ingredients-du-vin/telechargements.html>. Consultado el 24 de abril de 2014.

Claisse, O. and A. Lonvaud-Funel. 2000. Assimilation of glycerol by a strain of *Lactobacillus collinoides* isolated from cider. *Food Microbiology*, 17(5): 513-519.

Constantini, A.; R. Pietroniro; F. Doria; E. Pessione; E. García. 2013. Putrescine production from different amino acid precursors by lactic acid bacteria from wine and cider. *International Journal of Food Microbiology*, 165: 11-17.

Costello, P. and P. Henschke. 2002. Mousy off-flavour of wine: Precursors and biosynthesis of the causative N-Heterocycles 2-Ethyltetrahydropyridine, 2-Acetyltetrahydropyridine and 2-Acetyl-1-pyrroline by *Lactobacillus hilgardii* DSM 20176. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(24): 79-87.

Costello, P.; T. Lee and P. Henschke. 2001. Ability of lactic acid bacteria to produce N-heterocycles causing mousy off-flavour in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7: 160-167.

Costello, P.; G. Morrison; T. Lee and G. Fleet. 1985. Numbers and species of lactic acid bacteria in wine during vinification. *Food Technology in Australia*. 35: 14-18.

Coucheney, F.; N. Desroche; M. Bou; R. Tourdot Meréchal; L. Dulau and J. Guzzo. 2005. A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3): 463-470.

De la Rivas, B.; H. Rodríguez; J. Curiel; J. Landete and R. Muñoz. 2009. Molecular screening of wine lactic acid bacteria degrading hydroxycinnamic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 490-494.

De Revel, G.; N. Martín; L. Pripis-Nicolau; A. Lonvaud-Funel and A. Bertrand. 1999. Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43: 3-8.

Du Plessis, H. 2005, April. Malolactic fermentation, a priority at Nietvoorbij. [en línea]. *Wynboer*. Recuperado en: <http://www.wynboer.co.za/recentarticles/200504malo.php3> Consultado el: 21 de mayo de 2014.

Du Toit, M. 2012. Novel lactic acid bacteria for use as malolactic fermentation starter cultures. [en línea] *Acenologia revista de enología científica y profesional*. 30 de abril 2012, N° 130. Recuperado en: http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/nuevas_bacterias_FML_cienc0412.htm. Consultado el: 20 de noviembre 2012.

Du Toit, M.; L. Engelbrecht; E. Lerm and S. Krieger. 2011. *Lactobacillus*: the next generation of malolactic fermentation starter cultures-an overview. *Food and Bioprocess Technology*, 4: 876-906.

Eder, R.; W. Brandes und E. Paar. 2002. Einfluss von Traubenfäulnis und Schönungsmitteln auf Gehalte biogener Amine in Mosten und Weinen. *Mitt Klosterneuburg*, 52: 204-217.

Edwards, C. and R. Beelman. 1989. Inducing malolactic fermentation in wine Review. *Biotechnology advances*, 7(3): 333-360

Epifanio, S. 2005. Influencia de la tecnología de vinificación en la microbiología y el desarrollo de la fermentación alcohólica. Tesis doctoral. La Rioja, España. Universidad de la Rioja. 237 h.

Escudero, A.; E. Campo; L. Fariña; J. Cacho and V. Ferreira. 2007. Analytical characterization of the aroma of five Premium red wines. Insights into the roles of odor families and the concept of fruitiness of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 4501-4510.

Ferreira, V. 2007. La base química del aroma del vino: un viaje analítico desde las moléculas hasta las sensaciones olfato-gustativas. *Revista Real Academia de Ciencia*. 62: 7-36.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) y WHO (World Health Organization), EEUU, 2009, Marzo. Documento de debate sobre los carbamato de etilo en las bebidas alcohólicas. (Bol. Tec. CX/CF 09/3/13), Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comité del CODEX sobre contaminantes de los alimentos. Róterdam, Países bajos: FAO y OMS. 6p.

FDA (Food and Drug Administration), EE.UU. 2000. Center for Food Safety and Nutrition. Information on ethyl carbamate (Urethane) in food and bevarages. 10 p.

Francis, I. and J. Newton. 2005. Determing wine aroma from compositional data. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11: 114-126.

Garai-Ibabe, G.; I. Ibarburu; I. Berregi; O. Claisse; A. Lonvaud-Funel; A. Irastorza. et al. 2008. Glycerol metabolism and bitterness producing lactic acid bacteria in cidermaking. *International Journal of Food Microbiology*, 121(3): 253-261.

García, A. 2012. Efecto de los polifenoles sobre el crecimiento y metabolismo de bacterias lácticas del vino. Potencial uso como alternativa al empleo de los sulfitos durante la vinificación. Tesis para optar al grado de Doctor en ciencia y tecnología de los alimentos. Madrid, España. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias. 300 h.

García, A.; E. González; B. Bartolomé and M. Moreno-Arribas. 2011. Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines. *International Journal of Food Microbiology*, 148(2): 115-120.

García-Marino, M.; A. Trigueros and T. Escribano-Bailón. 2010. Influence of oenological practices on the formation of biogenic amines in quality red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(5): 455-462.

García-Moruno, E. and R. Muñoz. 2012. Does *Oenococcus oeni* produce histamine? *International Journal of Food Microbiology*, 157(2): 121-129.

Gerbaux, V. 2006. Incidencia cualitativa de la siembra de bacteria en vinos tintos. En: Encuentro Enológico (III): Fermentación Maloláctica: Los tipos de vino y el momento óptimo para la inoculación. Como controlar el proceso. Madrid, España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Bodegas Codorníu, Bodegas Julián Chivite, Bodegas la Rioja Alta S.A., Bodegas Vega Sicilia y Vinos de los Herederos del Marqués de Riscal. 136 pp.

Gockwiak, H. and P. Henschke. 2003. Interaction of pH, ethanol concentration and wine matrix on induction of malolactic fermentation with commercial 'direct inoculation' starter cultures. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9: 200-209.

González-Arenzana, L.; P. Santamaría; R. López and I. López-Alfaro. 2013. Indigenous lactic acid bacteria communities in alcoholic and malolactic fermentation of tempranillo wines elaborated in ten wineries of La Rioja (Spain). *Food Research International*, 50(1): 438-445.

González, R.; R. Muñoz and A. Carrascosa. 2011. Production of wine starter cultures. (chapter 11, pp 279-302) En: Molecular Wine Microbiology. Amsterdam: Academic Press, 372p.

Grimaldi, A.; E. Bartowsky and V. Jiranek. 2005. A survey of glycosidase activities of commercial wine strains of *Oenococcus oeni*. *International Journal of Food Microbiology*. 105(2): 233-244.

Guerrini, S.; A. Bastianini; G. Blaiotta; L. Granchi; G. Moschetti; S. Coppola. et al. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of *Oenococcus oeni* strain isolated from Italian wines. *International Journal of Food Microbiology*, 80(1): 1-14.

Guidone, A.; T. Zotta; R. Ross; C. Stanton; M. Rea; E. Parente. et al. 2014. Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains: a multivariate screening study. *LWT- Food Science and Technology*, 56(1): 69-76.

Guzmán, M. 1996. Efecto de la inoculación de tres razas de bacterias lácticas (*Leuconostoc oenos*) en vino Cabernet Sauvignon. Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo, mención Enología. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 59 h.

Guzzo, F.; F. Delmas; F. Pierre; M. Jobin; B. Samyn; J. Van Beeumen. et al. 1997. A small shock protein from *Leuconostoc oenos* induced by multiple stresses and during stationary growth phase. *Letters in Applied Microbiology*, 24: 393-396.

Guzzo, J and N. Desroche. 2009. Physical and chemical stress factors in yeast. (chap. 15, pp.293-307). En: Köning, H.; G. Uden and J. Fröhlich. (Ed.). *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. Heidelberg, Germany: Springer. 513p.

Hayman, D and P. Monk. 1982. Starter culture preparation for the induction of malolactic fermentation in wine. *Food Technology in Australia*, 34: 14-18.

Henschke, P. 1993. An overview of malolactic fermentation Research. *Wine Industry Journal*, 1993(2): 69-76.

Henick-Kling, T. and Y. Park. 1994. Consideration for the use of yeast and bacterial starter cultures: SO₂ and timing of inoculation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45: 484-469.

Henriquez, K.; M. Vega; S. Prieto and M. Aranda. 2012. Evaluation of biogenic amines content in chilean reserve varietal wines. *Food and Chemical Toxicology*, 50(8): 2742-2750.

Herber, P.; M. Cabrita; N. Ratola; O. Lauretano and A. Alves. 2005. Free amino acids and biogenic amines in wine and musts from Alentejo region. *Journal of Food Engineering*, 66(3): 315-322.

Hervé, A.; P. Costello; F. Remize; J. Guzzo and M. Guilloux-Benatier. 2004. *Saccharomyces cerevisiae*- *Oenococcus oeni* interaction in wine: current knowledge and perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, 93(2): 141-154.

IARC (International Agency for Research on Cancer). 2010. Ethyl Carbamate (pp. 1281-1379). En: IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Volume 96. Alcohol consumption and ethyl carbamate. Lyon, France: World Health Organization (WHO). 1379 p.

Izquierdo, P.; E. García; S. Gómez; M. Fernández and M. Palop. 2008a. Amino acids and biogenic amines during spontaneous malolactic fermentation in Tempranillo red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8): 731-735.

Izquierdo, P.; E. Romero; S. Gómez and M. Palop. 2008b. Changes in the aromatic composition of Tempranillo wine during spontaneous malolactic fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8): 724-730.

Izquierdo, P.; F. Pérez; E. García; S. Seseña and M. Palop. 2012. Influence of inoculation time of an autochthonous selected malolactic bacterium on volatile and sensory profile of Tempranillo and Merlot wines. *International Journal of Food Microbiology*, 156(3): 245-254.

Izquierdo, P.; E. Romero; F. Pérez; S. Seseña; J. Heras and M. Palop. 2013. Behaviour during malolactic fermentation of three strains of *Oenococcus oeni* used as direct inoculation and acclimatization cultures. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 34(1): 1-9.

Jackowetz, J. and R. Mira de Orduña. 2012. Metabolism of SO₂ binding compounds by *Oenococcus oeni* during and after malolactic fermentation in white wine. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3): 153-157.

Jackson, R. 2014a. Fermentation. (chap. 7, pp. 427-534). En: Wine Science. Principles and Applications. Fourth edition. London, United Kingdom: Academic Press. 933p.

Jackson, R. 2014b. Sensory perception and wine assessment. (chap. 11, pp. 831-888). En: Wine Science. Principles and Applications. Fourth edition. London, United Kingdom: Academic Press. 933p.

Jussier, D.; A. Dubé Morneau and R. Mira de Orduña. 2006. Effect of simultaneous inoculation with yeast and bacteria on fermentation kinetics and key wine parameters in cool climate chardonnay. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (1): 221-227.

Knoll, C.; S. Fritsch; S. Schnell; M. Grossmann; D. Rauhut and M. Du Toit. 2011. Influence of pH and ethanol on malolactic fermentation and volatile aroma compound composition in White wines. *LWT – Food Science and Technology*, 44(10): 2077-2086.

Krieger, S.; W. Hammes and T. Henick-Kling. 1992. Effect of medium composition on growth rate, growth yield and malolactic activity of *Leuconostoc oenos* LoZH1-t7-1. *Food Microbiology*, 9: 1-11.

Laffort, 2014. Lactic acid bacteria. [en línea]. Burdeos, Francia. Recuperado en: <<http://www.laffort.com/en/products/lactic-acid-bacteria>>. Consultado el: 24 de abril de 2014.

Laffort, 2015. [en línea]. Burdeos, Francia. Recuperado en <<http://www.laffort.com/en/home/120-ans>>. Consultado el: 28 de abril de 2015.

Lallemmand S.A. 2011. Lallemmand's history. [en línea]. Montreal, Canada. Recuperado en <<http://www.lallemmand.com/wp-content/uploads/2011/07/History-11-en.pdf>>. Consultado el: 26 de abril de 2015.

Lallemmand S.A. 2014. [en línea]. Montreal, Canada. Recuperado en <<http://tools.lallemmandwine.com/wine-bacteria-wheel/us/>>. Consultado el: 24 de abril de 2014.

Lamothe-abiet. 2014a. [en línea]. Burdeos, Francia. Recuperado en <<http://www.lamothe-abiet.com/es/empresa/soluciones-para-el-enologo>>. Consultado el: 26 de abril de 2014.

Lamothe-abiet. 2014b. Bactéries. [en línea]. Burdeos, Francia. Recuperado en <http://www.lamothe-abiet.com/images/stories/telechargement/gammes_produits/FR_table_aux_bacteries.pdf>. Consultado el: 28 de abril de 2015.

Landete, J.M. 2005. Estudio y caracterización molecular de la formación de aminas biógenas por parte de bacterias lácticas de origen enológico. Tesis para optar al grado de Doctor. Valencia, España. Universitat de València, Facultat de Ciències Biològiques. 129h.

Larsen, J.; J. Nielsen; B. Kramp; M. Richelieu; M. Riisager; N. Arneborg. et al. 2003. Impact of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* on malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54: 246-251.

Laurent, M.; T. Acree and T. Hecnick-Kling. 1994. Changes in aroma and odor of Chardonnay due to malolactic fermentation. *Die Wein-Wissenschaft, Viticultural and enological sciences*, 49: 3-10.

Lavarello, P.; G. Gutman y S. Filipetto. 2011. Biotecnología en la industria Vitivinícola en Argentina: ¿Nuevas modalidades de innovación en una actividad tradicional?. *Journal of Technology Management & Innovation*, 6(2): 176-188.

Lee, H.; P. Roehrdanz; M. Ikegami; A. Shepard; M. Shaw; G. Tabor. et al. 2013. Climate changes, wines, and conservation. *Proceedings of the National Academy of Science (PNAS)*, 110(17): 6907-6912.

Lerm, E.; L. Engelbrecht and M. Du Toit. 2011. Selection and characterization of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* South African wine isolates for use as malolactic fermentation starter cultures. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 32(2): 280-295.

- Lonvaud-Funel, A. 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 199(1): 9-13.
- Lonvaud-Funel, A. 2010. Effect of malolactic fermentation on wine quality (chap. 3, pp. 60-92). En: Reynolds, A. (Ed.). *Managing Wine Quality: Oenology and Wine Quality*. Cambridge, U.K. Woodhead Publishing Limited. 651p.
- López, R.; C. Tenorio; A. Gutiérrez; T. Garde-Cerdán; P. Garijo; L. González-Arenzana. et al. 2012. Elaboration of Tempranillo wines at two different pHs. Influence on Biogenic amine contents. *Food Control*, 25(2): 583-590.
- Malherbe, S.; F. Bauer and M. Du Toit. 2007. Understanding problem fermentation - A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 28(2): 169-186.
- Manfroi, L.; P. Silva; L. Rizzon; P. Sabaini and B. Glória. 2009. Influence of alcoholic and malolactic starter cultures on bioactive amines in Merlot wines. *Food Chemistry*, 116(1): 208-213.
- Martínez-Rodríguez, A.; A. Carrascosa and M. Polo. 2001. La liberación de compuestos de nitrógeno al medio extracelular por tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae* durante la autólisis inducida en un sistema de modelo de vino. *International Journal of Food Microbiology*. 68: 155-160.
- Masqué, M.; A. Palacios; S. Romero; S. Rico; X. Elorduy; C. Suarez. et al. 2007a. Inoculación de bacterias lácticas en FML. Vinos de pH elevado (I). *Semana Vitivinícola*, 3158: 556-572.
- Masqué, M.; S. Romero; S. Rico; X. Elorduy; S. Puig; F. Capdevila. et al. 2007b. Co-inoculation of yeasts and lactic acid bacteria for improving wine quality and reduction of biogenic amine production during malo-lactic fermentation. *Bulletin de l'OIV*, 80: 311-320.
- Maygar, L. 2011. Botrytized wines. *Advances in Food and Nutrition Research*, 63: 147-206.
- Mendoza, L.; M. Manca de Nadra and M. Farías. 2010. Antagonistic interaction between yeast and lactic acid bacteria of oenological relevance: Partial characterization of inhibitory compound produced by yeast. *Food Research International*, 43(8): 1990-1998.
- Michlmayr, H.; S. Nauer; W. Brandes; C. Schumann; K. Kulbe; A. Del Hierro. et al. 2012. Release of wine monoterpenes from natural precursors by glycosidases from *Oenococcus oeni*. *Food Chemistry*. 135(1): 80-87.

Mira de Orduña, R. 2010. Climate changes associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*. 43(7): 1844-1855.

Mira de Orduña, R.; S. Lui; M. Patchell and G. Pilone. 2000. Ethyl carbamate precursor citrulline formation from arginine degradation by malolactic wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 183(1): 31-35.

Mira de Orduña, R.; M. Patchett; S. Lui and G. Pilone. 2001. Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* and *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(4): 1657-1662.

Moreno-Arribas, M.; C. Gómez and P. Álvarez. 2008. Evolution of red wine anthocyanins during malolactic fermentation postfermentative treatments and ageing with lees. *Food Chemistry*, 109(1): 149-158.

Moreno-Arribas, M.; A. Smit and M. Du Toit 2010. Biogenic amines and the winemaking process. (chap. 17, pp. 492-522). En: Reynolds, A. (Ed.). *Managing wine quality: Oenology and wine quality*. vol 2. Cambridge, United Kingdom: Woodhead. 651p.

Muñoz, R.; M. Moreno and B. de las Rivas. 2011. Lactic Acid Bacteria (chap. 8, pp. 191-226). En: Carrascosa, A.; R. Muñoz and R. González. (Ed.). *Molecular Wine Microbiology*. Madrid, Spain. Academic Press. 372p.

Mtshali, P.; B. Divol; P. Van Rensburg and M. Du Toit. 2009. Genetic screening of wine-related enzymes in *Lactobacillus* species isolated from South African wines. *Journal of Applied Microbiology*. 108(4): 1389-1397.

Neuenschwander, A. 2010. Definición y situación del cambio climático. (cap. 1, pp. 11-34). En: *El cambio climático en el sector silvoagropecuario de Chile*. Chile: Fundación para la Innovación Agraria (FIA). 126p.

Oenofrance. 2014. [en línea]. Burdeos, Francia. Recuperado en: <http://www.oenofrance.com/oenofrance/index_es.asp?lien=produit&IdCatalogue=42>. Consultado el: 24 de abril de 2014.

Oenofrance. 2015. Historique. [en línea]. Burdeos, Francia. Recuperado en: <http://www.oenofrance.com/oenofrance/index_es.asp?lien=historique>. Consultado el: 28 de abril de 2015.

OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino), Francia. 2005, Junio. *Codex enológico internacional*. Paris, Francia: OIV. 451 p.

OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino), Francia. 2009, Julio. Codex-Bacterias Lácticas-Modificación. (Resolución OIV/OENO 328/2009). Zagreb, Croacia: OIV. 7p.

OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino), Francia. 2012a, Junio. Monografía sobre bacterias lácticas. (Resolución OIV-OENO 494-2012). Paris, Francia: OIV. 2 p.

OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino), Francia. 2012b, Junio. Codex enológico internacional. (Resolución OIV-OENO 494-2012). Paris, Francia: OIV. 318 p.

Olguín, N.; A. Bordons and C. Reguant. 2009. Influence of ethanol and pH on the gene expression of the citrate pathway in *Oenococcus oeni*. *Food Microbiology*, 26(2): 197-203.

Ortega-Heras, M.; M. González and S. Beltrán. 2002. Aroma composition of wine studied by different extraction methods. *Analytica Chimica Acta*. 458(1): 85-93.

Osborne, J. and C. Edwards. 2005. Bacteria important during winemaking. *Advances in Food and Nutrition Research*, 50: 139-177.

Osborne, J. and C. Edwards. 2007. Inhibition of malolactic fermentation by a peptide produced by *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *International Journal of Food and Microbiology*, 118: 27-34.

Palop, M. 2006. Biodiversidad de la microbiota láctica presente en la fermentación maloláctica de vinos tintos Cencibel elaborados en Castilla-La Mancha en dos vendimias consecutivas. Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo, mención enología y vitivinicultura. Castilla-La Mancha, España. Universidad de Castilla-La Mancha, Instituto de la vid y el vino, 2006. 47 h.

Patrignani, F.; M. Ndagijmana; N. Belletti; F. Gardini; R. Vernocchi and R. Lanciotti. 2012. Biogenic amines and ethyl carbamate in primitivo wine: survey of their concentration in commercial products and relationship with the use of malolactic starter. *Journal of Food Protection*, 73: 591-596.

Peña, A. 2006. El color de los vinos (parte II). *Revista Vendimia*, 48: 24-26.

Petri, A.; J. Pfannebecker; J. Fröhlich and H. König. 2013. Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR. *Food Microbiology*, 33(1): 48-54.

Pineda, A.; J. Carrasco; C. Peña; K. Henríquez and M. Aranda. 2012. Preliminary evaluation of biogenic amines content in Chilean Young varietal wines by HPLC. *Food Control*, 23(1): 251-257.

- Plata, C.; C. Millán; J. Mauricio and J. Ortega. 2003. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiology*, 20(2): 217-224.
- Prat, G. 1996. Evaluación de distintos procedimientos de siembra de bacterias lácticas sobre la fermentación maloláctica en el vino. Memoria (Ingeniero Agrónomo). Santiago, Chile. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. 59 h.
- Ramírez, J.; P. Rosas; M. Velázquez; J. Ulloa y F. Arce. 2011. Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 7: 1-18.
- Ribéreau-Gayon, J.; E. Peynaud; P. Ribéreau-Gayon et P. Sudraud. Sciences et Techniques du Vin. Traité d'oenologie tome 3. Paris, Francia. Ed Dunod, 1975. pp. 575-617.
- Romero, S. 2010. Influencia de las condiciones de vinificación y las bacterias lácticas sobre la formación de carbamato de etilo. Tesis para optar al grado de Doctor. Tarragona, España. Universitat Rovira I Virgili, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, 2010. 289 h.
- Romero, S.; A. Bordons; R. Franquer and M. Masqué. 2007. Effect of different conditions in simulated wine on the formation of ethyl carbamate by *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum*. *Bulletin de l'OIV*, 80 (917-919): 437-444.
- Rosi, I.; G. Fia and V. Canuti. 2003. Influence of different pH values and inoculation time on the growth and malolactic activity of a strain of *Oenococcus oeni*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9(3): 194-199.
- Rossi, I.; F. Nannelli and G. Giovani. 2009. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation of wine obtained using different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT - Food Science and Technology*, 42(2): 525-530.
- Ruiz, P.; P.M. Izquierdo; S. Seseña and M. Palop. 2010a. Analysis of lactic acid bacteria populations during spontaneous malolactic fermentation of tempranillo wines at five wineries during two consecutive vintages. *Food Control*, 21(1): 70-75.
- Ruiz, P.; P.M. Izquierdo; S. Seseña and M. Palop. 2010b. Selection of autochthonous *Oenococcus oeni* strains according to their oenological properties and vinification results. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2-3): 230-235.
- Sakano, K.; S. Oikawa; Y. Hiraku and S. Kawanishi. 2002. Metabolism of carcinogenic urethane to nitric oxide in involved in oxidative DNA damage. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(5): 703-714.

Sánchez, M.; C. Sánchez; S. Garmon-Lobato; B. Abad; L. Berrueta; B. Gallo. et al. 2014. Detection of non-coloured anthocyanin-flavanol derivates in Rioja aged red wines by liquid chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 121: 81-88.

Sass-Kiss, A.; J. Kiss; B. Havadi and N. Adányi. 2008. Multivariate statistical analysis of botrytised wine of different origin. *Food Chemistry*, 110: 742-450.

Sauvageot, N.; K. Gouffi; J. Leplace and Y. Auffray. 2000. Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3-Hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. *International Journal of Food Microbiology*. 55(3): 167-170.

Schalatter, J. and W. Lutz. 1990. The carcinogenic potential of ethyl carbamate (urethane): risk assessment at human dietary exposure levels. *Food and Chemistry Toxicology*, 28: 205-211.

Schlatter, J.; M. DiNovi and R. Woodrow. 2010. Application of the margin of exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic: Example Ethyl carbamate (CAS 51-79-6). *Food and Chemical Toxicology*, 48:63-68.

Sepúlveda, A. 2009. Características de vinos tintos Pinot noir, producidos con cepas autoctonas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas del valle del Maule. Memoria para optar al título de Ingeniero en alimentos. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 36 h.

Silva, C. 2008. Evaluación de tres cepas nuevas en comparación con seis cepas comerciales de bacterias Lácticas (*Oenococcus oeni*) en la fermentación maloláctica de un vino Carménère. Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Santiago, Chile. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Fruticultura y Enología. 36 h.

Silva, I.; F. Campos; T. Hogg and J. Couto. 2011. Factors influencing the production of volatile phenols by wine lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 145 (2-3): 471-475.

Silveira, M.; M. Baumgärtner; F. Rombouts and T. Abee. 2004. Effect of adaptation to ethanol on cytoplasmic and membrane protein profiles of *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2147-2157.

Shimazu, Y.; M. Uehara and M. Watanabe. 1985. Transformation of citric acid to acetic acid, acetoin and diacetyl by wine making lactic acid bacteria. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(7): 2147-2157.

Sleczkowski, N. et C. Gerland. 2004. La gestion des flores microbiennes: enjeu important pour l'élaboration de vins. *Revue des Œnologues*, 108: 13-16.

Spano, G. and S. Massa. 2006. Environmental stress response in wine lactic acid bacteria: Beyond *Bacillus subtilis* (Review). *Critical Reviews in Microbiology*, 32(2): 77-86.

Solieri, L.; F. Genova; M. Paola and P. Giudici. 2010. Characterization and technological properties of *Oenococcus oeni* strains from wine spontaneous malolactic fermentation: a framework for selection of new starter cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 108(1): 285-298.

Sumby, K.; P. Grbin and V. Jiranek. 2010. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*, 121(1): 1-16.

Sumby, K.; V. Jiranek and P. Grbin. 2013. Ester synthesis and hydrolysis in an aqueous environment and strain specific changes during malolactic fermentation in wine with *Oenococcus oeni*. *Food Chemistry*, 141(3): 1673-1680.

Stiles, M. and W. Holzapfel. 1997. Review article. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36: 1-29.

Teixeira, H.; N. Gonçalves; N. Rozès; A. Ramos and M. San Romão. 2002. Lactobacillic acid accumulation in the plasma membrane of *Oenococcus oeni*: a response to ethanol stress?. *Microbial Ecology*, 43(1): 146-153.

Tourdot, R.; L. Fortier; J. Guzzo; B. Lee and C. Divies. 1999. Acid sensitivity of neomycin-resistant mutants of *Oenococcus oeni*: a relationship between reduction of ATPase activity and lack of malolactic activity. *FEMS Microbiology Letters*, 178: 319-326.

Ulloa, P. 1996. Efecto de la inoculación de bacterias malolácticas en la calidad del vino Sauvignon blanc, influencia del pH y SO₂ en su desarrollo. Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 57 h.

Uthurry, C.; F. Varela; B. Colomo; J. Suarez; J. Lombardero and J. García Del Hierro. 2004. Ethyl carbamate concentration of typical Spanish red wines. *Food Chemistry*, 88(3): 329-336.

Uthurry, C.; J. Suárez; J. Lombardero and J. García Del Hierro. 2006. Ethyl carbamate production by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine. *Food Chemistry*, 94(2): 262-270.

Van der Westhuizen, L. and L. Loos. 1981. Effect of pH, temperature and SO₂ concentration on the malolactic fermentation abilities of selected bacteria and on wine colour. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 2(2): 61-65.

Vestner, J.; S. Malherbe; M. Du Toit; H. Nieuwoudt; M. Ahmed; T. Górecki. et al. 2011. Investigation of the volatile composition of pinotage wines fermented with different malolactic starter cultures using comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time of flight mass spectrometry (CCxGC-TOF-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (24): 12732-12744.

Villamor, R.; M. Evans; D. Scott Mattinson and C. Ross. 2013. Effects of ethanol, tannin and fructose on the headspace concentration and potential sensory significance of odorants in a model wine. *Food Research International*, 50(1): 38-45

Villarroel, J. 1999. Evaluación de tres cultivos de bacterias lácticas comerciales (*Oenococcus oeni*) en un vino Cabernet sauvignon con dificultades para realizar la fermentación maloláctica. Memoria para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Santiago, Chile. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. 53 h.

WHO (World Health Organization), Suiza. 2006, Junio. Alergias alimentarias. (Nota informativa INFOSAN N° 3/2006). Ginebra, Suiza: INFOSAN. 5p

Wibowo, D.; R. Eschenbruch; C. Davis; G. Fleet and T. Lee. 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36 (4): 302-313.

Zhao, G. and G. Zhang. 2009. influence of freeze-drying conditions on survival of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 135(1): 64-67.

Zhao, X.; G. Du; H. Zou; J. Fu; J. Zhou and J. Chen. 2013. Progress in preventing the accumulation of ethyl carbamate in alcoholic beverages. *Trends in Food Sciences and Technology*, 32 (2): 97-107.