

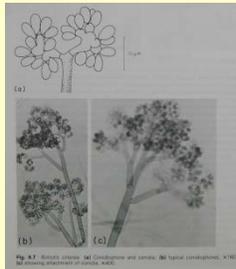
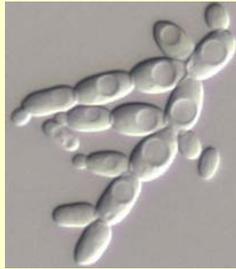
Microbiología Enológica



Manuel Ramírez Fernández
Departamento de Ciencias Biomédicas
Área de Microbiología
Facultad de Ciencias
UEX. 06071-Badajoz
E-mail: mramirez@unex.es

BODEGUERO
INTAEX (CICYTEX)
Badajoz 31 de Mayo de 2018

Vino = colaboración hombre microorganismos



- Historia de la Microbiología Enológica
- Microorganismos necesarios en la elaboración de vino.
- Microorganismos perjudiciales.
- ¿Puede ser beneficioso y perjudicial el mismo microorganismo?
- ¿Podemos evitar los microorganismos perjudiciales y potenciar la actividad de los beneficiosos?
- Selección, mejora genética y reprogramación.
- Producción de levaduras y utilización en bodega.

Alteraciones producidas por mohos

Microorganismo	Alteración	Origen	Solución
<i>Botrytis cinerea</i> (moho gris)	Podredumbre noble. Podredumbre agria, ácida o gris	Ubicuo	Fitosanitarios. Prácticas culturales que disminuyen la humedad y aumenten la aireación
<i>Penicillium</i> (mohos verde-azules, patógenos secundarios)	Podredumbre. Olores y sabores desagradables. Micotoxinas (toxina patulina)	Ubicuo	Fitosanitarios. Prácticas culturales que disminuyen la humedad y aumenten la aireación
<i>Aspergillus</i> (moho negro)	Podredumbre negra de verano. Micotoxinas (aflatoxinas, ochratoxina)	Ubicuo	Fitosanitarios. Prácticas culturales que disminuyen la humedad y aumenten la aireación
<i>Mucor y Rizopus</i> (mohos rosas, patógenos secundarios)	Podredumbre	Ubicuo	Fitosanitarios. Prácticas culturales que disminuyen la humedad y aumenten la aireación

Alteraciones producidas por levaduras

Microorganismo	Alteración	Origen	Solución
<p><i>Candida</i> <i>C. vini</i>, <i>C. stellata</i> y <i>C. pulcherrima</i></p>	<p>Flor. ↓ Etanol, glicerol, ac. fija ↑ Ac.volátil, acetaldehido</p>	<p>Mosto (fungicidas), aire</p>	<p>Llenar depósitos y cierre hermético, alcohol, bajar temperatura, gas (SO₂, N₂)</p>
<p><i>Pichia</i> <i>P. membranifaciens</i>, <i>P. vini</i> y <i>P. farinosa</i></p>	<p>Flor. ↓ Etanol, glicerol, ac. fija ↑ Ac.volátil, acetaldehído</p>	<p>Mosto (fungicidas), aire</p>	<p>Llenar depósitos y cierre hermético, alcohol, bajar temperatura, gas (SO₂, N₂)</p>
<p><i>Hansenula</i> <i>H. anomala</i></p>	<p>Flor. ↓ Etanol, glicerol, ac. fija. ↑ Ac.volátil, acetaldehído.</p>	<p>Mosto (fungicidas), aire</p>	<p>Llenar depósitos y cierre hermético, alcohol, bajar temperatura, gas (SO₂, N₂)</p>
<p><i>Kloeckera/Hanseniaspora</i> <i>K. apiculata/ H. uvarum</i></p>	<p>↑ Acético y acetato de etilo. Killer</p>	<p>Mosto</p>	<p>SO₂</p>
<p><i>Zygosaccharomyces</i> <i>Z. baillii</i>, <i>Z. bisporus</i></p>	<p>↑ Succínico, acético, turbidez, sedimentos. ↓ L-málico, altera concentraciones de ésteres</p>	<p>Mosto concentrado o sulfitado (osmófila)</p>	<p>CO a 420 mg/l</p>

Alteraciones producidas por levaduras (continuación)

Microorganismo	Alteración	Origen	Solución
<i>Torulaspota</i> <i>T. delbrueckii</i>	¿?	Mosto	----
<i>Brettanomyces/Dekkera</i> <i>B. intermedius</i> , <i>B. lambicus</i> , <i>B. custeri</i> y <i>D. intermedia</i>	↑ 4-etil fenol, ácidos grasos: isobutírico, isovalérico, 2- metilbutírico. Aroma “Bretty”: sidra, clavo, picante, humo, medicinal, ratón, animal mojado, sudor de caballo, cuero húmedo y plástico quemado	Miel y exudados azucarados de plantas, insectos, madera de los toneles	Difíciles de eliminar. Múltiples lavados con agua caliente (65,5 °C), dimetildicarbonato, previene la reinfeción. Filtración o Velcorin en embotellado
<i>Saccharomyces</i> <i>S. cerevisiae</i>	¿? Flor, refermentaciones. Killer	Bodega	Llenar depósitos y cierre hermético, alcohol, bajar temperatura, gas (SO ₂ , N ₂)
<i>Saccharomycodes</i> <i>S. lugwigii</i>	↑ Acetaldehído Vinos envejeciendo y embotellados		
<i>Schizosaccharomyces</i> <i>pombe/japónicus</i>	↓ L-málico. Propiedades sensoriales desagradables		

Alteraciones producidas por bacterias lácticas

Alteración	Microorganismo	Origen	Solución
Formación de acético Más soportable porque no existe acetato de etilo. Aparición de Aminas biógenas	Heterofermentativos. Homofermentativos a partir de pentosas	Mosto, bodega	Añadir SO ₂ y acidificar, pH <3.5. Tartárico o fumárico (nunca málico, cítrico o sorbico)
Refermentación	Varias. <i>L. fructivorans</i> , bacilo algodonoso en vinos dulces	Mosto, bodega	Añadir SO ₂ y acidificar, pH <3.5. Tartárico o fumárico (nunca málico, cítrico o sorbico)
Olor a geranio Sorbico a sorbyl alcohol, al pH del Vino reordenamiento a 2,4- hexadien-1-ol que reacciona con el Etanol para producir el eter 2- ethoxihexa-3,5-dieno	<i>Leuconostoc/Oenococcus</i>	Mosto, bodega	Añadir SO ₂ y acidificar, pH <3.5. Tartárico o fumárico (nunca málico, cítrico o sorbico)
Olor a ratón 2-acetil-1,4,5,6-tetra hydroxipiridina y 2-acetil-3,4,5,6- Tetra hydroxipiridina. Su formación requiere etanol	<i>L. brevis</i> , <i>L. cellobiosus</i> y <i>L. hilgardii</i> . <i>Brettanomyces sp</i>	Mosto, bodega	Añadir SO ₂ y acidificar, pH <3.5. Tartárico o fumárico (nunca málico, cítrico o sorbico)
Olor a diacetilo (mantequilla) Cítrico → diacetilo, acetoína, y acético	↑Lactobacilos y Pediococos. <i>Leuconostoc/Oenococcus</i> produce muy poco	Mosto, bodega	Añadir SO ₂ y acidificar, pH <3.5. Tartárico o fumárico (nunca málico, cítrico o sorbico)

Alteraciones producidas por bacterias lácticas (continuación)

Alteración	Microorganismo	Origen	Solución
<p>Utilización de tartárico (vuelta o rebote). Asociado a la degradación de málico, cítrico, pirúvico y glicerol. Se genera láctico, acético y CO₂</p>	<p><i>Lactobacillus brevis</i> (hetero) y <i>L. plantarum</i> (homo)</p>	<p>Mosto, bodega</p>	<p>Añadir SO₂ y acidificar, pH <3.5. Tartárico o fumárico (nunca málico, cítrico o sórbico)</p>
<p>Formación de manitol. (Fermentación manítica o vino agridulce). Reducción de fructosa → manitol</p>	<p><i>Heterofermentativos</i></p>	<p>Mosto, bodega</p>	<p>Evitar paradas, secar vino. Añadir SO₂ y acidificar, pH <3.5. Tartárico o fumárico (nunca málico, cítrico o sórbico)</p>
<p>Grasa (ahilado). Formación de polisacáridos (bacterias se rodean de dextrano)</p>	<p><i>Pediococcus sp</i> y <i>Leuconostoc sp</i> <i>P.damnus</i> (antes <i>P. cerevisiae</i>)</p>	<p>Mosto, bodega</p>	<p>Añadir SO₂ y acidificar, pH <3.5. Tartárico o fumárico (nunca málico, cítrico o sórbico)</p>
<p>Formación de acroleína a partir de glicerol (amargor y olor a col fermentada)</p>	<p><i>Lactobacilos</i> y <i>pediococos</i>, muy pocas cepas de <i>Leuconostoc</i></p>	<p>Mosto, bodega</p>	<p>Añadir SO₂ y acidificar, pH <3.5. Tartárico o fumárico (nunca málico, cítrico o sórbico)</p>

Alteraciones producidas por bacterias acéticas

Alteración	Microorganismo	Origen	Solución
Picado acético o avinagrado	<i>Acetobacter</i> y <i>Gluconobacter</i>	Mosto, bodega, insectos	Añadir SO ₂ y acidificar, pH <3.5. Evitar aire
Etil acetato	<i>Acetobacter</i> y <i>Gluconobacter</i>	Mosto, bodega, insectos	Añadir SO ₂ y acidificar, pH <3.5. Evitar aire
Acetaldehído	<i>Acetobacter</i>	Mosto, bodega, insectos	Añadir SO ₂ y acidificar, pH <3.5. Evitar aire
Acetoína	<i>Acetobacter</i> y <i>Gluconobacter</i>	Mosto, bodega, insectos	Añadir SO ₂ y acidificar, pH <3.5. Evitar aire
Glicerol y dihidroxiacetona (Dulzor y viscosidad) Dihidroxiacetona + prolina = olor a pan	<i>Acetobacter</i> y <i>Gluconobacter</i>	Mosto, bodega, insectos	Añadir SO ₂ y acidificar, pH <3.5. Evitar aire

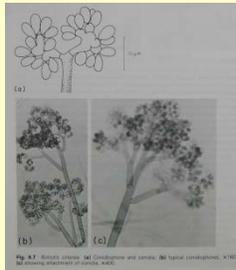
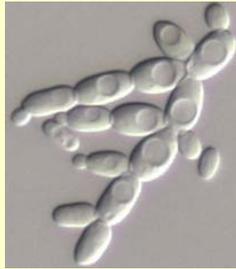
Microbiología Enológica



Manuel Ramírez Fernández
Departamento de Ciencias Biomédicas
Área de Microbiología
Facultad de Ciencias
UEX. 06071-Badajoz
E-mail: mramirez@unex.es

BODEGUERO
INTAEX (CICYTEX)
Badajoz 31 de Mayo de 2018

Vino = colaboración hombre microorganismos



- Historia de la Microbiología Enológica
- Microorganismos necesarios en la elaboración de vino.
- Microorganismos perjudiciales.
- ¿Puede ser beneficioso y perjudicial el mismo microorganismo?
- ¿Podemos evitar los microorganismos perjudiciales y potenciar la actividad de los beneficiosos?
- Selección, mejora genética y reprogramación.
- Producción de levaduras y utilización en bodega.

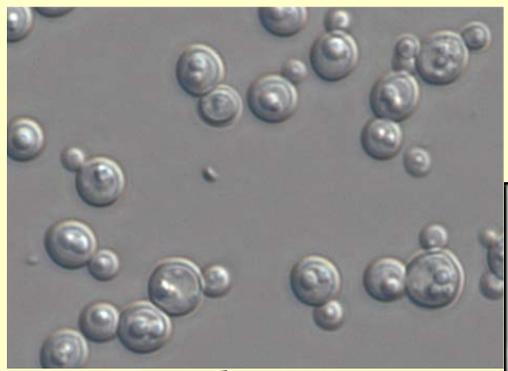
Fermentación dirigida con levaduras seleccionadas

Ventajas

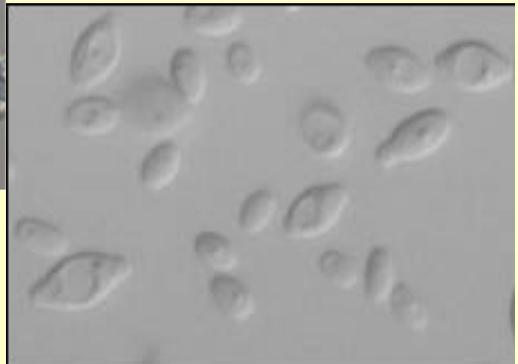
- 1.- Mayor velocidad de fermentación. Especialmente cuando se usan mostos con pocas levaduras fermentativas.**
- 2.- Máximo consumo de los azúcares reductores.**
- 3.- Mayor reproducibilidad en la calidad de los vinos. Se puede mantener una cierta calidad del vino de una campaña a otra muy distinta.**
- 4.- Reducción de los problemas causados por levaduras silvestres.**
- 5.- Mayor flexibilidad en el control de la calidad sensorial del vino. Uso de cepas que produzcan menor cantidad de compuestos desagradables y mayor cantidad de compuestos agradables.**



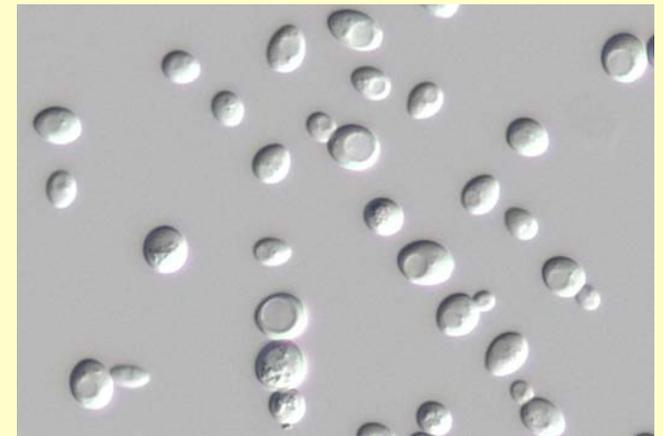
Uso de levaduras seleccionadas



Torulaspora delbrueckii



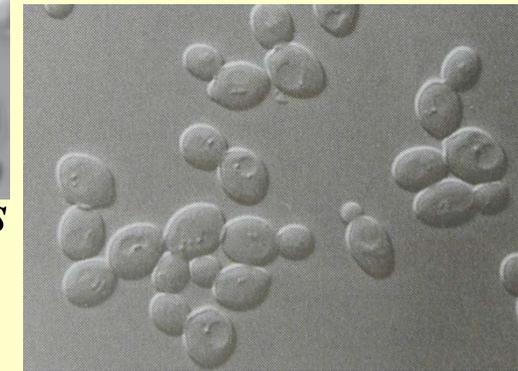
Hanseniaspora uvarum



Saccharomyces cerevisiae



Schizosaccharomyces pombe



Kluyveromyces thermotolerans

No-convencionales

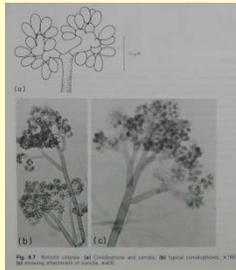
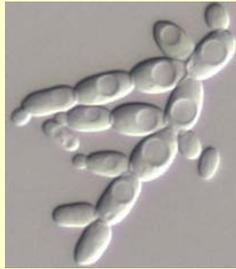
Microbiología Enológica



Manuel Ramírez Fernández
Departamento de Ciencias Biomédicas
Área de Microbiología
Facultad de Ciencias
UEX. 06071-Badajoz
E-mail: mramirez@unex.es

BODEGUERO
INTAEX (CICYTEX)
Badajoz 31 de Mayo de 2018

Vino = colaboración hombre microorganismos



- Historia de la Microbiología Enológica
- Microorganismos necesarios en la elaboración de vino.
- Microorganismos perjudiciales.
- ¿Puede ser beneficioso y perjudicial el mismo microorganismo?
- ¿Podemos evitar los microorganismos perjudiciales y potenciar la actividad de los beneficiosos?
- Selección, mejora genética y reprogramación.
- Producción de levaduras y utilización en bodega.



**Uva de calidad + Buenas levaduras (genes) + Ambiente correcto
(limpieza y procedimientos adecuados)**

=

Vino de calidad

MEJORAR LA CALIDAD:

A) Mejorar la eficacia del proceso fermentativo y disminución del riesgo de paradas de fermentación.

B) Mejora nutricional y organoléptica del producto.



Procedencia de las levaduras seleccionadas

Aislamiento de levaduras de zonas vinícolas prestigiosas.



Selección en base a características enológicas interesantes para cada zona o tipo de vino.



Producción y venta para uso en bodega.

✓ El uso de cultivos puros de levaduras para fermentar comenzó con Pasteur y Hansen (1876-1880) → CERVEZA.

✓ En Europa comienza en vinificación a principios del siglo XX. California 1960s LSA. Extremadura 1990s.

Causa: ¿Filoxera o atomización de un sector vinícola tradicional y autocomplaciente?

Propiedades deseables en las levaduras vínicas

1. Producción mínima de acidez volátil.
2. Producción de etanol según la riqueza azucarada de los mostos.
3. Alto vigor fermentativo.
4. Tolerancia a temperaturas extremas (altas o bajas).
5. Resistencia a anhídrido sulfuroso (SO_2).
6. Baja producción de anhídrido sulfuroso (SO_2).
7. Baja producción de sulfhídrico (H_2S).
8. Alta velocidad de sedimentación y capacidad de flocular.
9. Baja formación de espuma.
10. Presencia de fenotipo asesino (killer).
11. Baja producción de acetaldehído.
12. Producción de glicerol adecuada.
13. Producción adecuada de acetato de etilo y alcoholes superiores.
14. Asimilación de sustancias nitrogenadas. Síntesis y excreción de algunos aminoácidos y derivados amínicos. Etc.....



- Imposible** cumplir con todos los criterios. Se utilizan usualmente según la estrategia de elaboración y la zona.
- Componente **ambiental** + componente **genética** que justifica la selección.
- Regulación metabólica** integral limita la mejora/selección de levaduras con mejores propiedades. Organismos unicelulares.

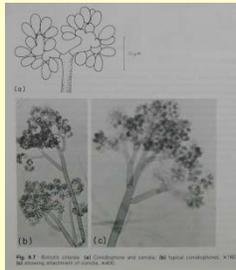
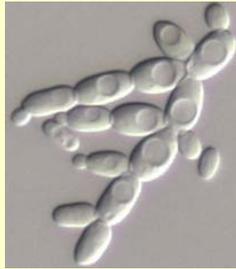
Microbiología Enológica



Manuel Ramírez Fernández
Departamento de Ciencias Biomédicas
Área de Microbiología
Facultad de Ciencias
UEX. 06071-Badajoz
E-mail: mramirez@unex.es

BODEGUERO
INTAEX (CICYTEX)
Badajoz 31 de Mayo de 2018

Vino = colaboración hombre microorganismos



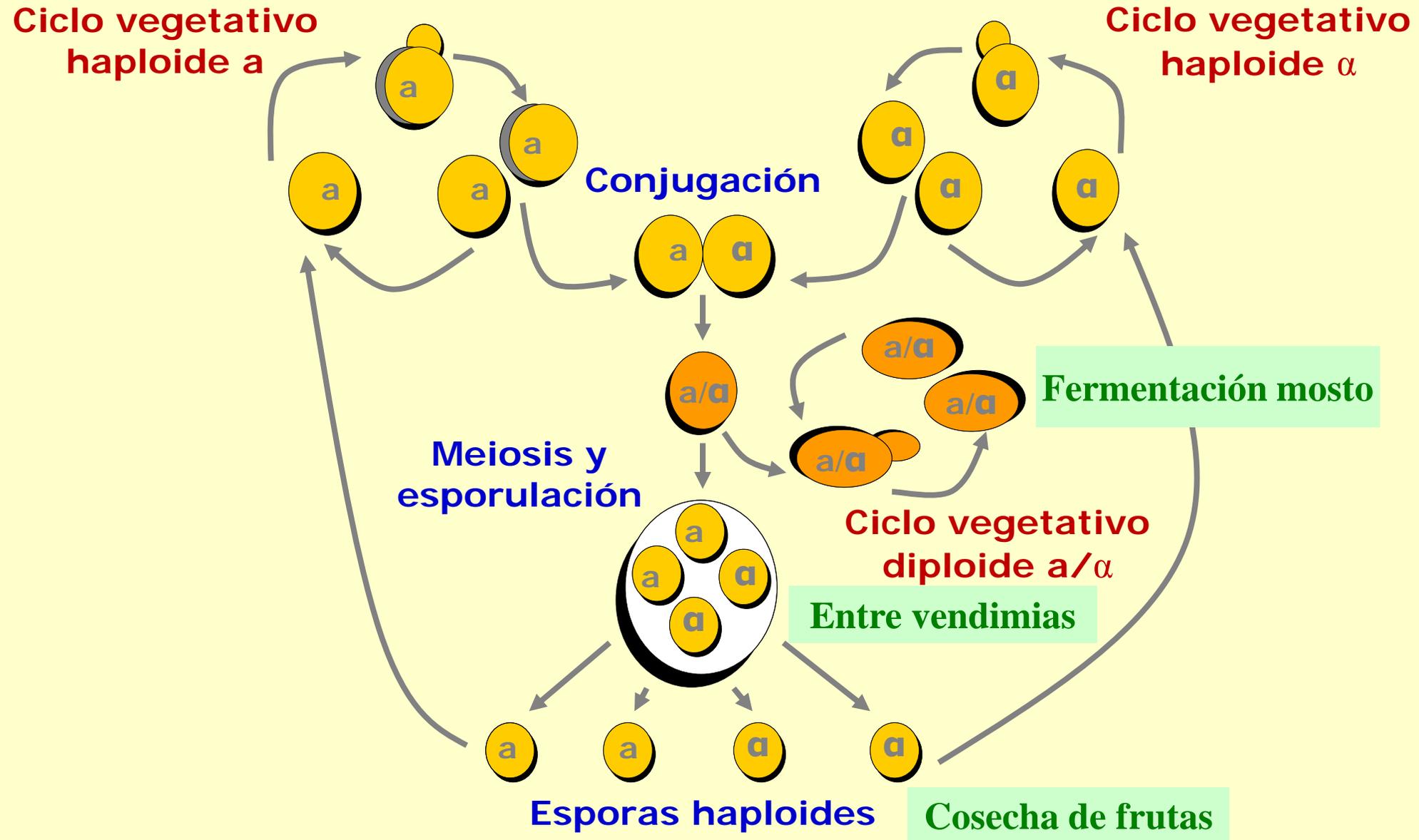
- Historia de la Microbiología Enológica
- Microorganismos necesarios en la elaboración de vino.
- Microorganismos perjudiciales.
- ¿Puede ser beneficioso y perjudicial el mismo microorganismo?
- ¿Podemos evitar los microorganismos perjudiciales y potenciar la actividad de los beneficiosos?
- Selección, mejora genética y reprogramación.
- Producción de levaduras y utilización en bodega.



Genética clásica

- **Métodos tradicionales:**
 - Aislamiento y selección clonal.
 - Mutación y selección.
 - Cruzamiento y selección de híbridos.

Ciclo celular haplodiplonte de *S. cerevisiae*

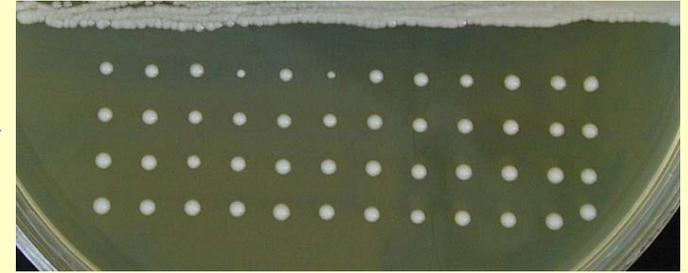
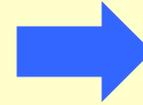


Mejora genética de levaduras seleccionadas

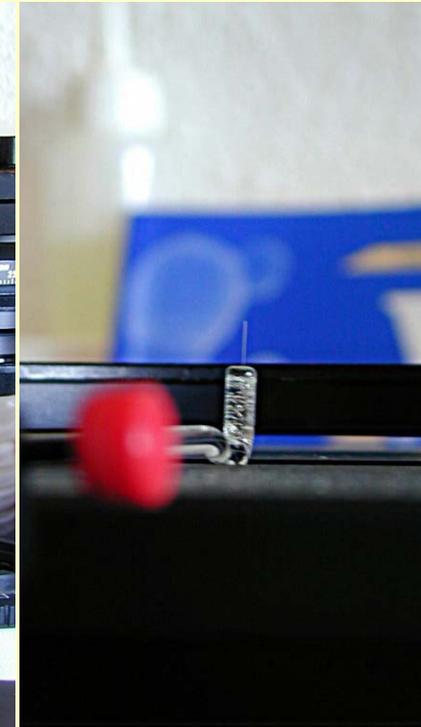
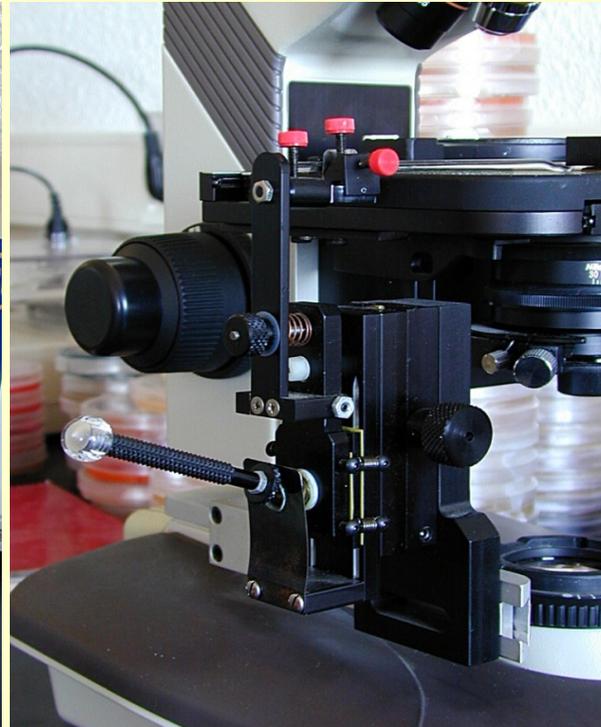


Genética clásica

Esporulación



Disección de tétradas



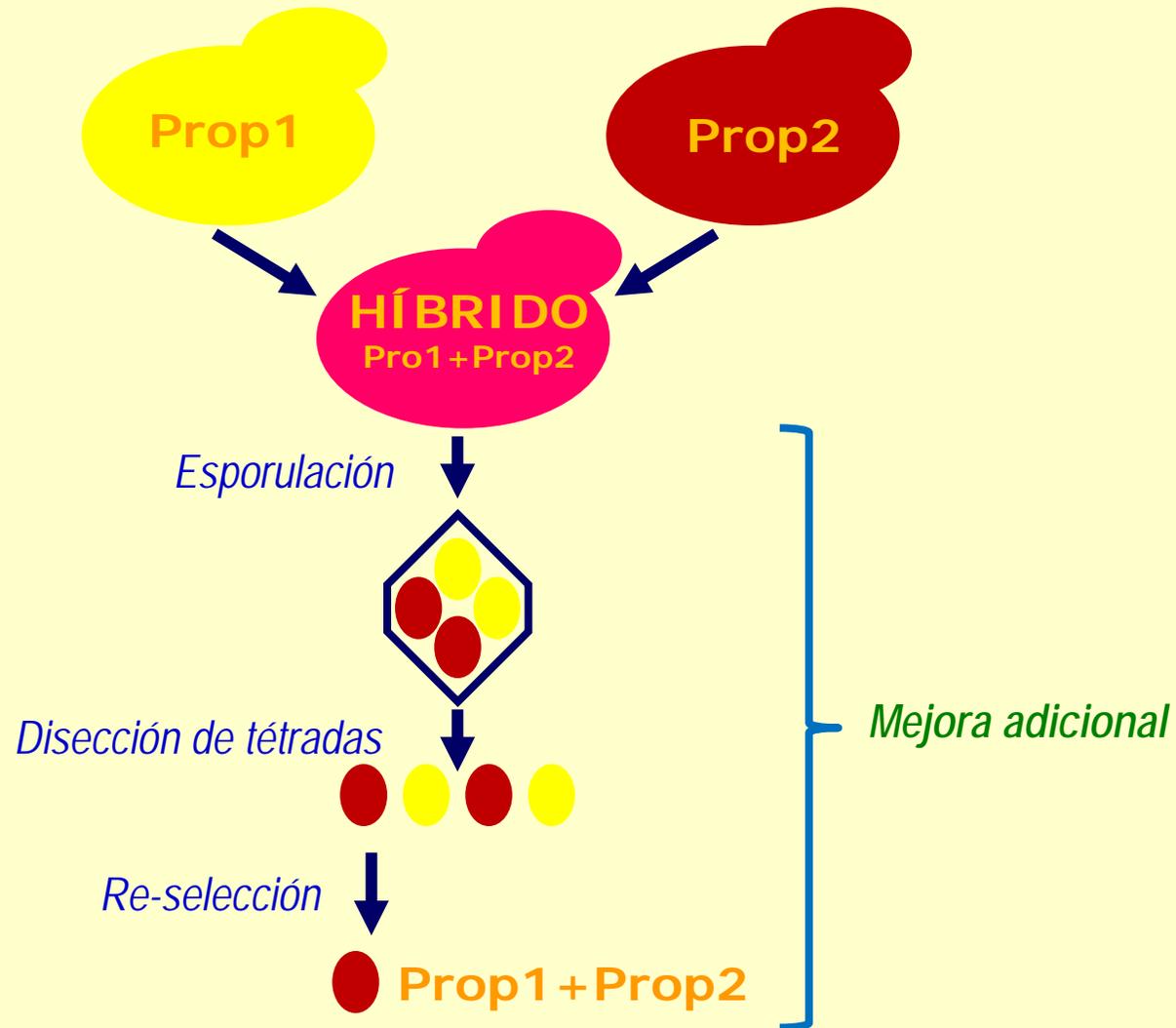
Micromanipulador

Mejora genética de levaduras seleccionadas



Genética clásica

Obtener híbridos con nuevas capacidades



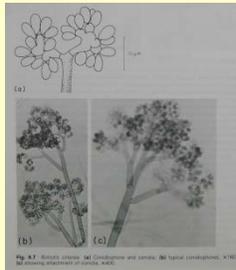
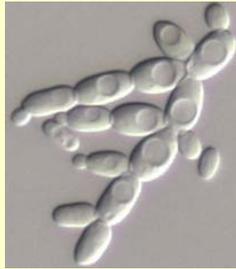
Microbiología Enológica



Manuel Ramírez Fernández
Departamento de Ciencias Biomédicas
Área de Microbiología
Facultad de Ciencias
UEX. 06071-Badajoz
E-mail: mramirez@unex.es

BODEGUERO
INTAEX (CICYTEX)
Badajoz 31 de Mayo de 2018

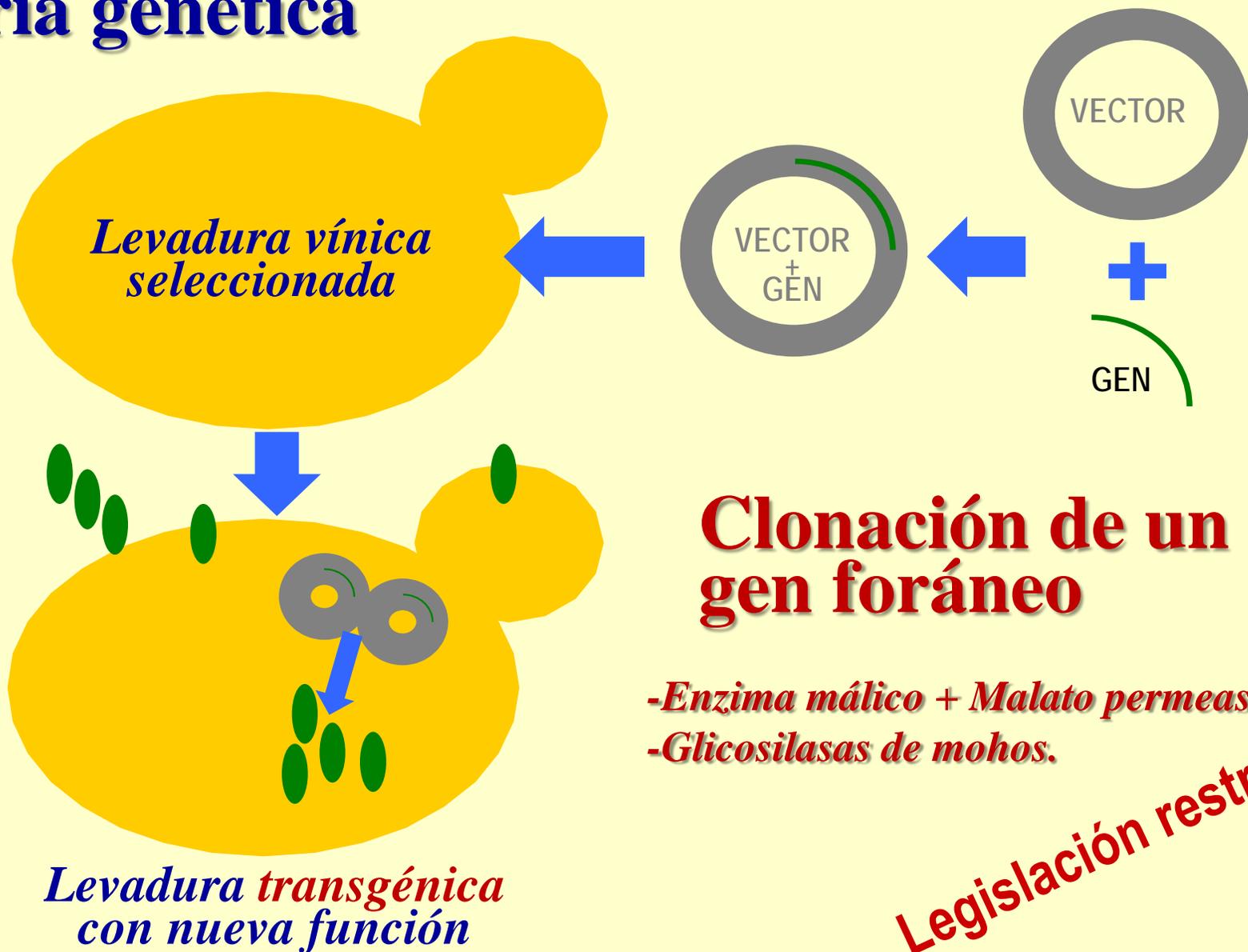
Vino = colaboración hombre microorganismos



- Historia de la Microbiología Enológica
- Microorganismos necesarios en la elaboración de vino.
- Microorganismos perjudiciales.
- ¿Puede ser beneficioso y perjudicial el mismo microorganismo?
- ¿Podemos evitar los microorganismos perjudiciales y potenciar la actividad de los beneficiosos?
- Selección, mejora genética y **reprogramación**.
- Producción de levaduras y utilización en bodega.

Reprogramación genética

Ingeniería genética

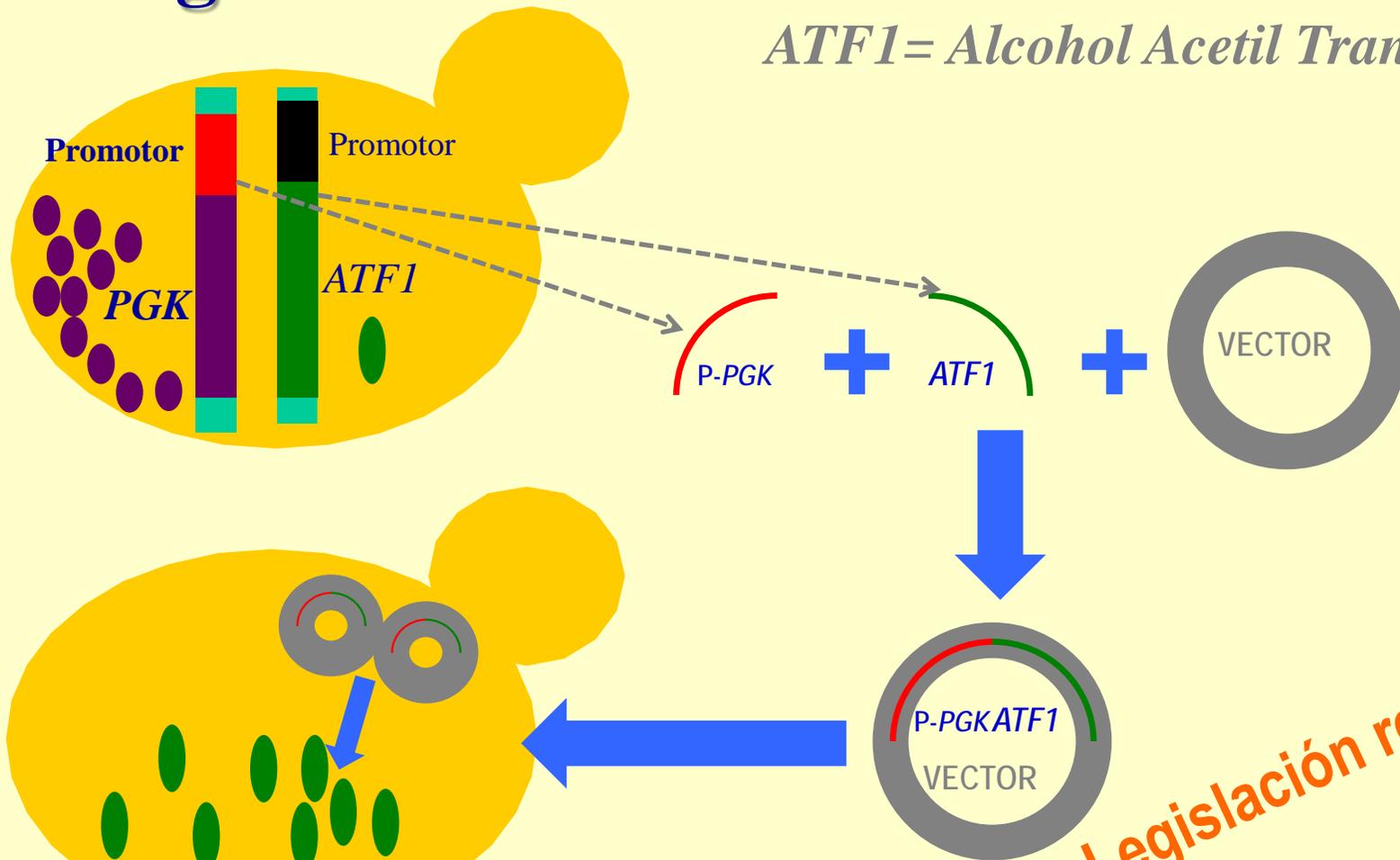


Reprogramación genética



Ingeniería genética

ATF1 = Alcohol Acetil Transferasa



Levadura transgénica: más ésteres etílicos, más aromas.

Reestructuración de genes propios

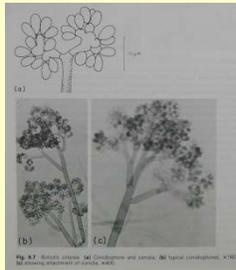
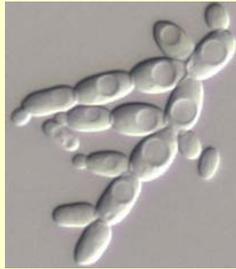
Microbiología Enológica



Manuel Ramírez Fernández
Departamento de Ciencias Biomédicas
Área de Microbiología
Facultad de Ciencias
UEX. 06071-Badajoz
E-mail: mramirez@unex.es

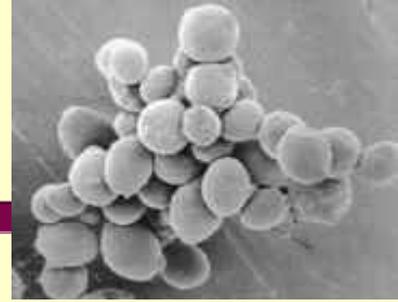
BODEGUERO
INTAEX (CICYTEX)
Badajoz 31 de Mayo de 2018

Vino = colaboración hombre microorganismos



- Historia de la Microbiología Enológica
- Microorganismos necesarios en la elaboración de vino.
- Microorganismos perjudiciales.
- ¿Puede ser beneficioso y perjudicial el mismo microorganismo?
- ¿Podemos evitar los microorganismos perjudiciales y potenciar la actividad de los beneficiosos?
- Selección, mejora genética y reprogramación.
- Producción de levaduras y utilización en bodega.

PROBLEMAS DEL CULTIVO DE *Saccharomyces cerevisiae*



Represión catabólica de respiración por glucosa

Efecto Pasteur (O_2)

Efecto Crabtree (glucosa + O_2)

SOLUCIÓN EN LA INDUSTRIA:

Cultivo fed-bacth

(proceso complejo, equipamiento sofisticado y caro)

CULTIVO INDUSTRIAL DE *Saccharomyces cerevisiae*:

ESTADIOS DE LA PROPAGACIÓN DE LEVADURA

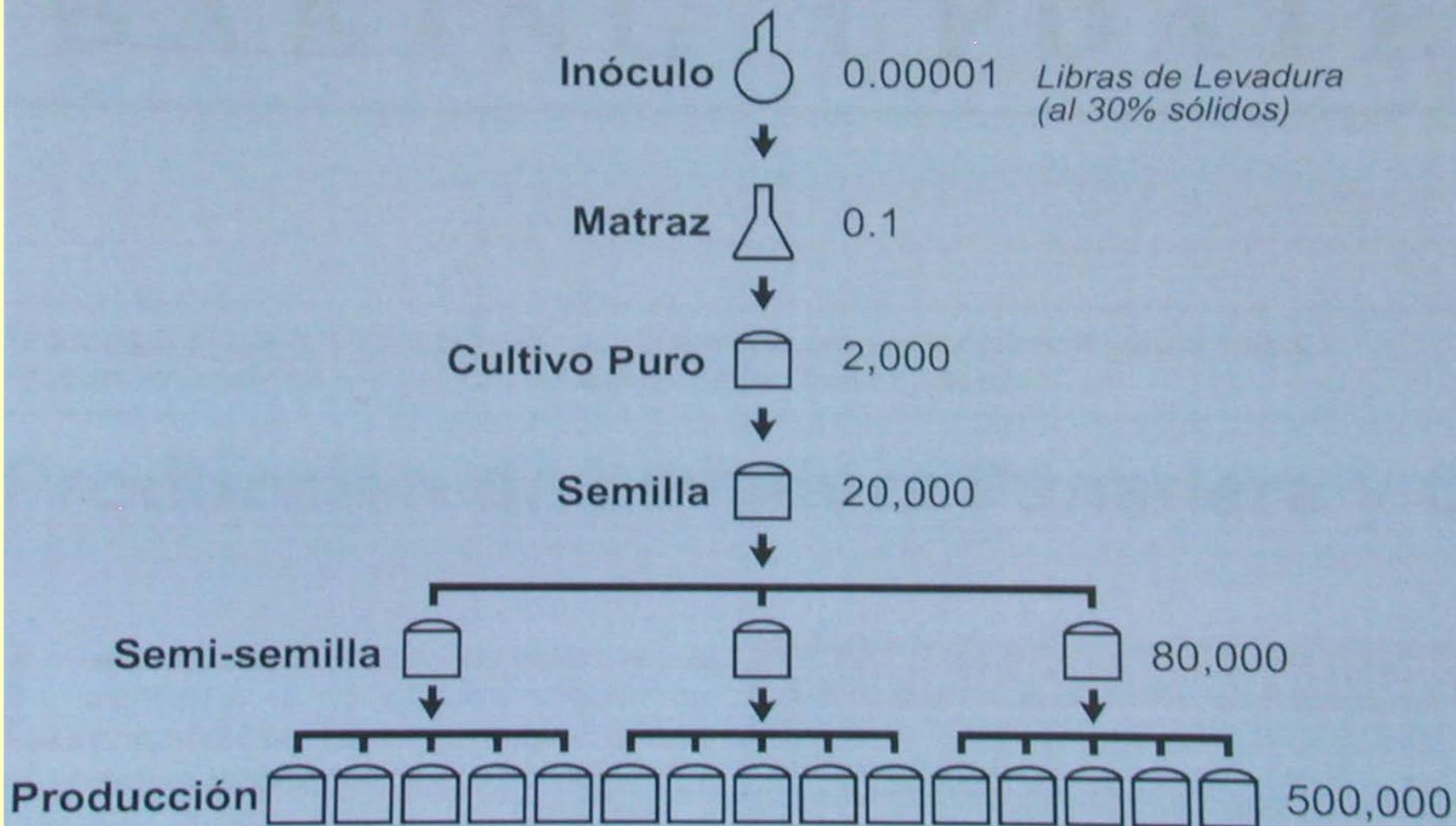
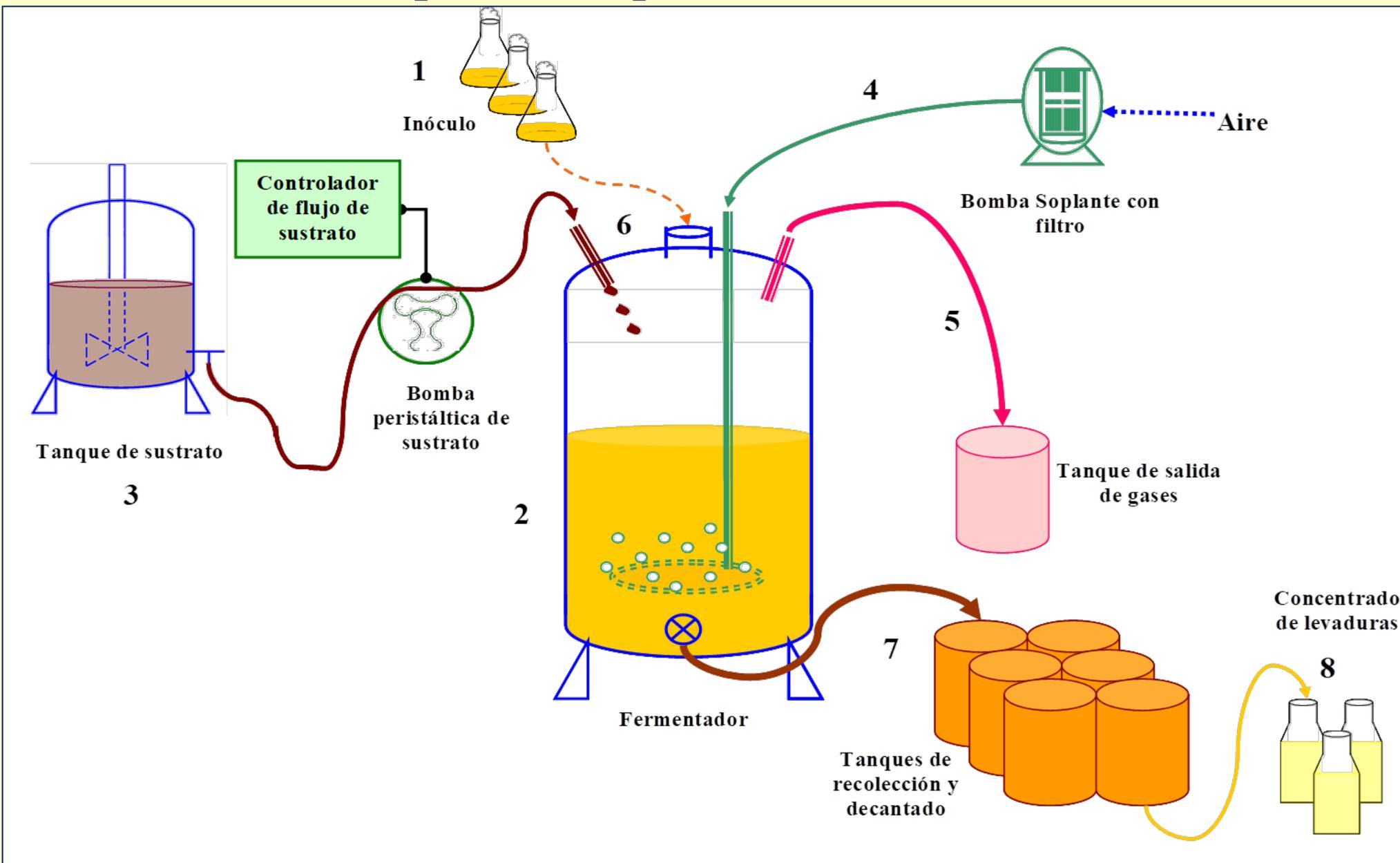


Diagrama del proceso de producción de levadura vínica en planta piloto Grupo MICROENO



Producción de levaduras autóctonas seleccionadas



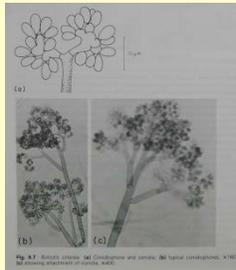
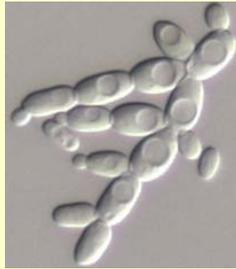
Microbiología Enológica



Manuel Ramírez Fernández
Departamento de Ciencias Biomédicas
Área de Microbiología
Facultad de Ciencias
UEX. 06071-Badajoz
E-mail: mramirez@unex.es

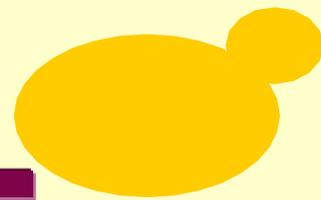
BODEGUERO
INTAEX (CICYTEX)
Badajoz 31 de Mayo de 2018

Vino = colaboración hombre microorganismos



- Historia de la Microbiología Enológica
- Microorganismos necesarios en la elaboración de vino.
- Microorganismos perjudiciales.
- ¿Puede ser beneficioso y perjudicial el mismo microorganismo?
- ¿Podemos evitar los microorganismos perjudiciales y potenciar la actividad de los beneficiosos?
- Selección, mejora genética y reprogramación.
- Producción de levaduras y **utilización en bodega.**

LEVADURAS SECAS ACTIVAS: NORMATIVA DE ETIQUETADO (Resolución OENO 16/2003)



- ✓ El **nombre** del **género** y de la **especie**, la referencia a la **cepa**, atribuida por un organismo oficial de registro de microorganismos o por instancias internacionales, el **origen** y el **seleccionador** de la cepa y eventualmente el **autor** que la aisló.
- ✓ Las **instrucciones** de utilización o el método de reactivación y los eventuales aditivos preconizados por el fabricante.
- ✓ La cantidad de **células revivificables** por gramo (UFC determinado según anexo a la resolución) de polvo garantizada por el fabricante, la pérdida de vitalidad por mes de conservación en las condiciones de temperatura, de humedad y de aireación definidas, el número de lote así como la fecha límite de utilización y las condiciones de conservación.
- ✓ La **indicación** de que las levaduras han sido obtenidas por **modificaciones genéticas** y el carácter que ha sido modificado (si es el caso).



DISPONIBILIDAD DE LAS LEVADURAS SELECCIONADAS

- CULTIVO LÍQUIDO
- CULTIVO SOBRE AGAR
- PASTA-CONCENTRADO



Baratas

No se necesita activación previa
Recomendable para uso regional

- LIOFILIZADAS
- LSA (DESECADAS)



Caras

10-20 g/100 L mosto. Rehidratación a 40°C.
Adecuado para levaduras foráneas y grandes bodegas

Inmovilizadas
(bolas de alginato, cápsulas)

ESTRATEGIAS DE UTILIZACIÓN DE LAS LEVADURAS SELECCIONADAS



-Pie de cuba.

2-10% de mosto estéril inoculado con 10^5 células/mL.

-Inoculación en volumen final.

Recomendado para uso de LSA (2.5×10^{10} células/mL).

Inoculo recomendado para tener $2-5 \times 10^6$ células/mL.

Mejor $1-2 \times 10^7$ células/mL. Crecerá hasta $2-5 \times 10^8$ células/mL.

-Pie de cuba a dosis correspondiente a volumen final.

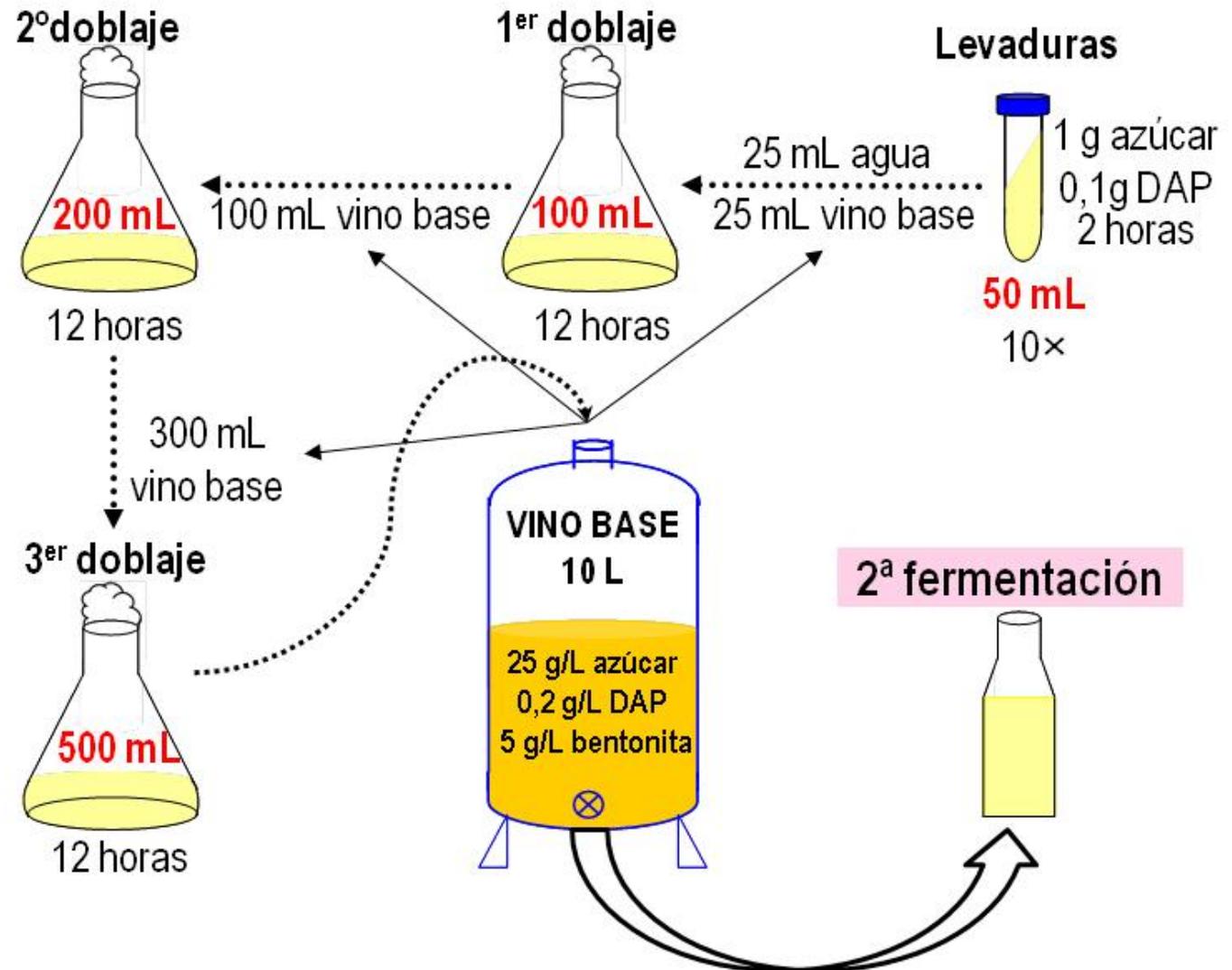
Normalmente 10% con $1-4 \times 10^8$ células/mL.

ELABORACIÓN DEL CAVA (tiraje y 2ª fermentación)



La preparación de la levadura activa es uno de los secretos cuidadosamente vigilados por las empresas, ya que de la levadura depende completamente el buen funcionamiento de la segunda fermentación.

Tiraje: acondicionamiento de las levaduras



*El vino es la bebida dietética más
antigua y el más importante
medicamento en uso continuado
en la historia de la humanidad.*

Muchas gracias