# RESOLUCIÓN OIV-OENO 686-2022

# REVISIÓN DEL CÓDIGO DE BUENAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS PARA EVITAR O LIMITAR LA CONTAMINACIÓN POR BRETTANOMYCES

*ADVERTENCIA: Este proyecto de resolución reemplaza a la siguiente resolución:*
*- OIV-OENO 462-2014*

LA ASAMBLEA GENERAL,

VISTO el artículo 2, párrafo 2 iv del Acuerdo del 3 de abril de 2001 por el que se crea la Organización Internacional de la Viña y el Vino,

CONSIDERANDO los trabajos del Grupo de expertos "Microbiología",

CONSIDERANDO que en dicho Código se establecen las medidas que deben implementarse en los viñedos y en las bodegas para contribuir a reducir los riesgos relacionados con la presencia de *Brettanomyces*,

DECIDE reemplazar la Resolución OIV-OENO 462-2014, "Código de buenas prácticas vitivinícolas para evitar o limitar la contaminación por *Brettanomyces*" por el texto siguiente:

# CÓDIGO DE BUENAS PRÁCTICAS VITIVINÍCOLAS PARA EVITAR O LIMITAR LA ALTERACIÓN DEL VINO POR BRETTANOMYCES BRUXELLENSIS

## 1. PREÁMBULO

- De los fenómenos que alteran la calidad del vino, la producción de fenoles volátiles por Brettanomyces bruxellensis es uno de los más extendidos y problemáticos. Estos compuestos se caracterizan fundamentalmente por producir aromas a tinta o pegamento, a sudor de caballo, a cuero o a establo, que pueden enmascarar el carácter afrutado del vino.
- Los fenoles volátiles, principalmente el 4-etilfenol y el 4-etilguayacol, se forman a partir del ácido p-cumárico y del ácido ferúlico, respectivamente, por descarboxilación (cinamato-descarboxilasa, PAD) y reducción (vinilfenol-



Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022

reductasa, VPR) enzimáticas. Estos precursores están presentes de forma natural en los mostos de uva. La etapa de descarboxilación, debida a la actividad cinamato-descarboxilasa (PAD), se ha descrito en muchas especies de bacterias, levaduras y hongos, mientras que la etapa de reducción, debida a la actividad vinilfenol- reductasa (VPR), es más específica de Brettanomyces.

- Las levaduras del género Brettanomyces están presentes en la uva y en los equipos de vinificación, de modo que pueden proliferar en el vino durante o después de las fermentaciones alcohólica y/o maloláctica, durante la crianza del vino o después del envasado.

## 2. INTERVENCIONES EN EL VIÑEDO

No se aplican (según sabemos, no hay estudios disponibles al respecto). No obstante, las levaduras del género *Brettanomyces* se detectan tras las etapas de enriquecimiento en los hollejos de la uva desde las primeras etapas de desarrollo de la baya. La ecología microbiana de la superficie de la uva es muy diversa, con pequeñas poblaciones de cada especie.

Un primer enfoque preventivo, basado en la estricta selección de las uvas sanas, puede contribuir a reducir el riesgo de desarrollo de *Brettanomyces*, que suele estar más presente en las uvas alteradas.

## 3. INTERVENCIONES DURANTE LA VENDIMIA

Tratamiento de la uva:

*Brettanomyces* está presente en la uva, pero no es la especie de levadura mayoritaria (poblaciones pequeñas). Sin embargo, eliminar uvas dañadas o botritizadas podría limitar las alteraciones por *Brettanomyces*.

La recolección de uvas sobremaduras, cada vez más frecuente, exige especial precaución. Estas aportaciones, interesantes desde el punto de vista organoléptico, pueden aumentar el riesgo de producción de fenoles volátiles, ya que las uvas sobremaduras contienen más precursores de fenoles volátiles. Trabajar en estas condiciones no incrementa necesariamente la presencia de *Brettanomyces*, pero aumenta el riesgo de actividad (menor acidez total, pH más elevado que influye directamente en los niveles de $SO_2$ molecular y por ende en la proliferación de *Brettanomyces*).



Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022

# 4. INTERVENCIONES EN LA BODEGA

Debido a varios factores, en particular el incremento de la graduación alcohólica, se observa una disminución de la diversidad microbiana durante la fermentación alcohólica. Sin embargo, como *Brettanomyces* tiene una buena resistencia al etanol, su presencia no disminuye; por lo tanto, es esencial una higiene perfecta en la elaboración del vino (uvas sanas, equipo de vinificación y de almacenamiento, etc.).

Operaciones y tratamientos prefermentativos

- Se recomienda garantizar que se apliquen prácticas de higiene adecuadas en la bodega.
- Los factores más importantes son el sulfitado y la temperatura:
    - El sulfitado es la medida preventiva más eficaz en la fase prefermentativa para limitar el desarrollo de poblaciones de Brettanomyces. No obstante, se recomienda evitar el sulfitado excesivo (>8 g/hL), ya que podría retrasar la fermentación maloláctica.
    - Una maceración prefermentativa a temperatura elevada (por encima de los 65 °C) permite inactivar las levaduras del género Brettanomyces y otros microorganismos en la vinificación. La maceración en frío, a una temperatura cercana o por debajo de los 10 °C, evita su proliferación, pero no las destruye.
- El empleo de ciertas enzimas con actividad cinamil-esterasa puede aumentar el riesgo de producción de fenoles volátiles. En cualquier caso, se puede producir una contaminación en etapas posteriores.

**Operaciones de fermentación**

Fermentación alcohólica (FA):

- Durante la FA, la diversidad microbiana disminuye y Saccharomyces cerevisiae se convierte en la especie mayoritaria. Sin embargo, Brettanomyces, debido a su resistencia al etanol y a su baja necesidad de nutrientes, puede proliferar a medida que la FA ralentiza o se interrumpe. Conviene aplicar las prácticas enológicas que suelen recomendarse para controlar la fermentación alcohólica.
- La inoculación del mosto con levaduras seleccionadas contribuye a una FA más



Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022

estable.

- Las ralentizaciones y paradas de la fermentación alcohólica favorecen la multiplicación de Brettanomyces. Dado el caso, se recomienda aplicar medidas para reactivar la fermentación alcohólica.
- Los azúcares residuales (principalmente glucosa y fructosa) son sustratos para el desarrollo de Brettanomyces. Por lo general, se considera que un vino es seco cuando el nivel de glucosa + fructosa es inferior a 4 g/L. Una concentración de 0,3 g/L de glucosa + fructosa es suficiente para el desarrollo de una biomasa de Brettanomyces. Dicha biomasa puede llegar a producir fenoles volátiles en una concentración que supera los 1000 µg/L.
- Añadir nutrientes para levaduras (que también pueden beneficiar a Brettanomyces) solo cuando sea estrictamente necesario para evitar paradas fermentativas.

Período de latencia antes de la fermentación maloláctica (FML):

- Al final de la FA, las condiciones favorecen tanto a las bacterias lácticas como a Brettanomyces, aunque su proliferación sigue siendo lenta.
- Es importante hacer un seguimiento de la población de Brettanomyces, ya que el medio es relativamente pobre en microorganismos.
- Los factores que favorecen el desarrollo de Brettanomyces en esta fase son las maceraciones finales a temperaturas elevadas (40-45 °C), la microoxigenación y la liberación de azúcares en el caso de uvas no estrujadas y uvas parcialmente pasificadas.
- La coinoculación de levaduras y bacterias lácticas seleccionadas puede contribuir a disminuir el período de latencia entre la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica, y, por consiguiente, el desarrollo de Brettanomyces.

Fermentación maloláctica (FML):

- Los parámetros fisicoquímicos (pH, temperatura, SO2 total) afectan al curso de la FML. Si esta se retrasa, aumenta el riesgo de producción de fenoles volátiles, ya que Brettanomyces puede aprovechar el tiempo para multiplicarse.
- El uso de iniciadores malolácticos es una buena manera de limitar el desarrollo de


Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA
© OIV 2022

Brettanomyces.

- Después de la fermentación maloláctica, se recomienda eliminar todos los microorganismos, en particular añadiendo SO2. Las cantidades deben ajustarse en función del pH del vino. También pueden emplearse técnicas físicas (HHP o UHPH).

**Operaciones de crianza y clarificación**

La primera medida preventiva indispensable es catar con frecuencia y realizar un análisis microbiológico completo, con recuento de *Brettanomyces*, y/o un análisis de los fenoles volátiles. Este análisis debe repetirse a lo largo de todo el período de crianza.

- El control del SO2 es crucial para limitar el desarrollo de Brettanomyces. La dosis recomendada es de entre 0,5 y 0,8 mg/L de SO2 molecular[1]. Para las cepas Brettanomyces tolerantes/resistentes al etanol o al SO2 , se recomiendan métodos alternativos (quitosano, filtración, tratamiento térmico).
- El envejecimiento sobre lías es otro factor de riesgo, ya que Brettanomyces puede sobrevivir y proliferar en las lías (que liberan nutrientes en el vino).
- La clarificación mediante trasiego, clarificantes y filtración es fundamental para reducir las poblaciones viables y viables pero no cultivables de Brettanomyces, que pueden multiplicarse al metabolizar los azúcares residuales.
- Algunos clarificantes son más efectivos que otros. El tratamiento con proteínas clarificantes puede reducir las poblaciones entre 40 y 2000 veces. La clarificación con caseína o caseinato de potasio permite reducir los niveles de etilfenoles si no son demasiado elevados.
- La adición de quitosano es una alternativa para controlar la proliferación de microorganismos indeseables, en particular Brettanomyces y cepas tolerantes/resistentes al etanol o al SO2.
- Algunas operaciones de vinificación (trasiego, rellenado, filtración, embotellado, etc.) pueden provocar que se disuelva oxígeno en el vino, lo que favorece la proliferación de Brettanomyces.
- Si se aplica microoxigenación, se debe comprobar la ausencia de Brettanomyces mediante los análisis oportunos.
- Es conveniente vigilar la temperatura de la bodega de crianza, sobre todo en



Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022

verano, y evitar períodos largos por encima de los 14 °C, para prevenir el desarrollo de Brettanomyces.

Nota:

1. Al añadir el SO2, la población de Brettanomyces puede pasar (total o parcialmente) de un estado viable a un estado viable no cultivable (VNC). Estos cambios implican una reducción del tamaño de las levaduras, por lo que es necesario adaptar la filtración.
2. También es importante señalar que el recuento del VNC no puede llevarse a cabo por los métodos habituales, como el recuento en placa de Petri, sino que es preciso recurrir a la PCR cuantitativa o la citometría de flujo, que permite contar las formas viables y VNC de Brettanomyces.
3. Se puede evaluar la tolerancia/resistencia de Brettanomyces a los sulfitos mediante PCR.

**Crianza en madera**

La crianza en madera se considera el período más sensible en relación con las alteraciones causadas por *Brettanomyces,* en particular en barricas nuevas.

Durante el muestreo, evitar las contaminaciones cruzadas.

Como en cualquier otro tipo de alteraciones microbianas, el vino que se utilice para el rellenado no debe estar contaminado.

La madera favorece el desarrollo de *Brettanomyces*, que puede formar pseudohifas, colonizar los microporos de la madera y utilizar la celobiosa como fuente de carbono. Las barricas son difíciles de limpiar y desinfectar.

Se sabe que las barricas usadas y poco limpias son una fuente de contaminación por *Brettanomyces.* No obstante, las barricas nuevas también favorecen la multiplicación de la levadura y el desarrollo de fenoles volátiles, debido a que liberan más nutrientes. Además, las barricas nuevas son más permeables al $O_2$, lo que contribuye a que el potencial de oxidorreducción sea relativamente elevado y disminuye la concentración de $SO_2$ (activo o molecular), dos factores que favorecen el desarrollo de *Brettanomyces*.

Se han estudiado varios enfoques para la higienización de las barricas, pero ninguno de ellos permite la eliminación completa de *Brettanomyces* de la superficie interna de las duelas o la boca de la barrica. De hecho, la microporosidad natural de la madera



Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022

complica su desinfección total, ya que los microorganismos permanecen vivos en las cavidades de capas profundas de la madera. Es fundamental que el tratamiento actúe en profundidad para que sea eficaz y duradero.

No obstante, algunas técnicas de desinfección de barricas reducen de manera considerable las poblaciones de *Brettanomyces* y pueden utilizarse si la legislación vigente lo permite, por ejemplo:

- Tratamiento con vapor: la desinfección profunda requiere un período de tratamiento suficientemente largo (enjuague con agua fría, enjuague con agua caliente a 70 °C y vapor de baja presión durante 10 minutos). Un tratamiento por inmersión en agua caliente a 60 °C durante un tiempo de exposición de 19 minutos permitió eliminar las poblaciones de levadura hasta una reducción logarítmica de 8.
- Esterilización con ozono: con ozono gaseoso, combinado con un tratamiento de agua caliente a 82 °C durante 20 minutos, o con agua ozonizada. El ozono reacciona con los materiales que poseen una carga orgánica elevada y no penetra en capas profundas de la madera.
- Esterilización con SO2: se debe utilizar un mínimo de 5 g de gas SO2 por barrica para desinfectar las barricas vacías y secas. El SO2 es muy eficaz en la superficie y también en profundidad, ya que penetra en los primeros milímetros de madera.
- rascado y retostado de barricas: este tratamiento no desinfecta la madera, pero elimina la fracción más contaminada. El rascado y el retostado producen una disminución del 80 % de fenoles volátiles con respecto a una barrica no tratada,
- ultrasonidos: esta técnica elimina más del 90 % de Brettanomyces viables (hasta 2-4 mm bajo la superficie interna de la duela).

**Operaciones previas al envasado**

Antes de las operaciones de envasado, debe evaluarse el riesgo de producción de fenoles volátiles mediante análisis químicos y microbiológicos. Tras evaluar el riesgo, se deben tomar medidas adecuadas para prevenir el desarrollo de *Brettanomyces* después del envasado:

- esterilización por filtración por membrana (0,45 a 0,65 µm) o filtración tangencial, para una eliminación eficaz de Brettanomyces seguido de envasado estéril,
- uso de DMDC para ofrecer una protección poco duradera,



Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022

- uso de antimicrobianos que proporcionan una protección duradera (ácido sórbico, solo si se han eliminado por completo las bacterias lácticas, control del SO2 en función del pH, el grado alcohólico adquirido y la temperatura). Se puede utilizar una calculadora en línea que tome en cuenta diferentes parámetros (ph, alcohol y temperatura),
- tratamiento térmico,
- también pueden emplearse técnicas físicas (HHP o UHPH).

**Condiciones de conservación**

Para evitar la proliferación de *Brettanomyces* en las botellas durante la conservación (y, en consecuencia, la producción de fenoles volátiles), se recomienda mantener las botellas a una temperatura inferior a 12□°C, especialmente en el caso de los vinos poco filtrados o con bajo contenido de $SO_2$.

# 5. CONCLUSIONES

- Se recomienda realizar análisis frecuentes para detectar de forma temprana cualquier contaminación por *Brettanomyces*. En el proceso de muestreo, se debe ser extremadamente cauteloso para evitar las contaminaciones cruzadas.
- Se recomienda encarecidamente mantener la bodega en las mejores condiciones higiénicas posibles.
- Controlar el sulfitado y el $SO_2$ molecular.
- Controlar la temperatura.
- Las medidas preventivas son preferibles a las correctivas.
- Estas recomendaciones se basan en los conocimientos actuales y pueden actualizarse en función de las investigaciones en curso.
- El control de *Brettanomyces* debe basarse en una estrategia preventiva global que comprenda todo el proceso de vinificación.

---

[1] El producto final deberá cumplir con las regulaciones vigentes aplicables con respecto a los límites de $SO_2$ total.



Certificado conforme Ensenada, 4 de noviembre de 2022
El Director General de la OIV
Secretario de la Asamblea General
Pau ROCA

© OIV 2022