FACTORS DE PRODUCCIÓ DE CARBAMAT D'ETIL

27 de Enero de 2011 Silvana Romero Tissera Lallemand BIO







1.1 LAS BACTERIAS LÁCTICAS (BL) DEL VINO Y LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA (FML)

La Fermentación Malolactica (FML) es considerada generalmente una simple degradación del ácido málico en los vinos tintos y en algunos vinos blancos, con la consiguiente liberación de CO2, formación de ácido láctico y reducción de la acidez total contenida en el vino en cuestión. Si bien esto es un hecho que realmente sucede, podría ser considerado como una simplificación del proceso en general.



1.1 LAS BL DEL VINO Y LA FML

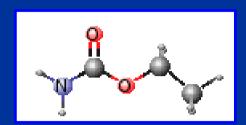
© EFECTOS BENEFICIOSOS DE LA FML:

- ♣ Disminución de la acidez: sobre todo, en vinos producidos en regiones de climas fríos.
- Mejora del perfil organoléptico: la calidad sensorial del vino se ve afectada por los componentes que son consumidos y producidos en el vino por el crecimiento bacteriano.
- Estabilidad microbiológica: una FML completa proporciona una cierta estabilidad microbiológica al eliminar del vino el ácido málico y algunos azúcares, y al producir compuestos antimicrobianos.

1.1 LAS BL DEL VINO Y LA FML

- **® EFECTOS INDESEABLES DE LA FML:**
- # Elevación de la acidez volátil
- Reducción de aromas varietales
- # Reducción del color
- Alteraciones durante la FML que pueden afectar a la seguridad alimentaria:
 - Formación de aminas biógenas
 - Producción de carbamato de etilo (CE)

1.2 EL CARBAMATO DE ETILO CARACTERÍSTICAS



- # El CE es el éster etílico del ácido carbámico
- ♣ Se encuentra de forma natural en muchos alimentos y bebidas fermentados.
- Es bien absorbido por el tracto gastrointestinal. Sus metabolitos activos son capaces de interaccionar con el ADN.
- ♣ En 2007 el IARC aumentó el CE del grupo 2B al grupo 2A ("probablemente carcinógeno para el ser humano")
- Dosis diaria "sin efectos" para el hombre 0,3 mg/kg/día.

(persona 80 kg: 24 mg/día → 1600 L/día!)

- Máximo en vinos:
 - Health Protection Branch (Canadá): 30 μg/L
 - FDA-USA: 15 μg/L

1.2 EL CARBAMATO DE ETILO

ORIGEN EN VINO

Pirocarbonato de etilo

- Acido cianhídrico: compuestos aldehídicos y cetónicos propios de los destilados pueden formar peróxidos por acción de la luz, que por una reacción de tipo radical transforman el ácido cianhídrico y el etanol en CE.
- Compuestos carbamílicos

1.2 EL CARBAMATO DE ETILO

ORIGEN EN VINO

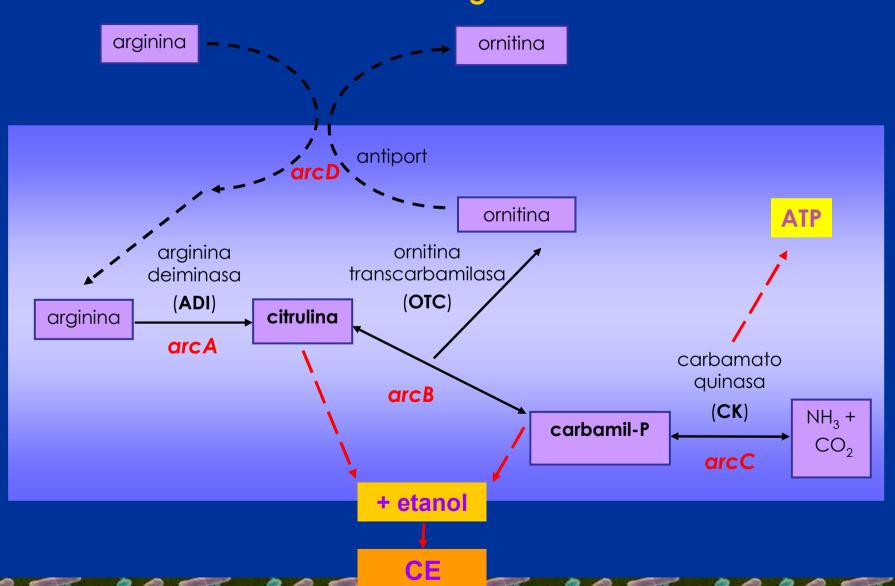
$$CH_3 - CH_2 - OH + R - C - NH_2 \longrightarrow CH_3 - CH_2 - O - C - NH_2$$

Etanol Compuesto carbamílico:

principal — urea
$$H_2N - CO - NH_2$$
precursor
citrulina $H_2N - CO - NH - (CH_2)_3 - CH (-NH_2) - COOH$
carbamil fosfato $H_2N - CO - O - PO_3^=$

CE

1.2 EL CARBAMATO DE ETILO - Origen



1.2 EL CARBAMATO DE ETILO

INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE VINIFICACIÓN

- Viticultura
- Estatus nitrogenado del mosto/adiciones
- Cepas de levaduras
- **4** Bacterias lácticas
- Aplicación de ureasa
- Envejecimiento sobre lías
- Transporte y almacenamiento

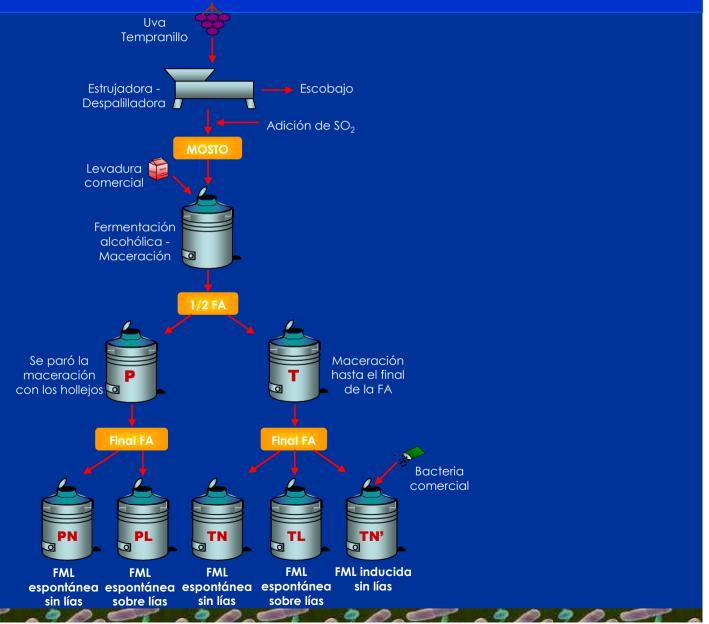
2.1 RESULTADOS: INFLUENCIA DE DIFERENTES CONDICIONES DE VINIFICACIÓN SOBRE LA FORMACIÓN DE CE Antecedentes

Establecer la influencia de distintas condiciones de vinificación sobre la formación de CE.

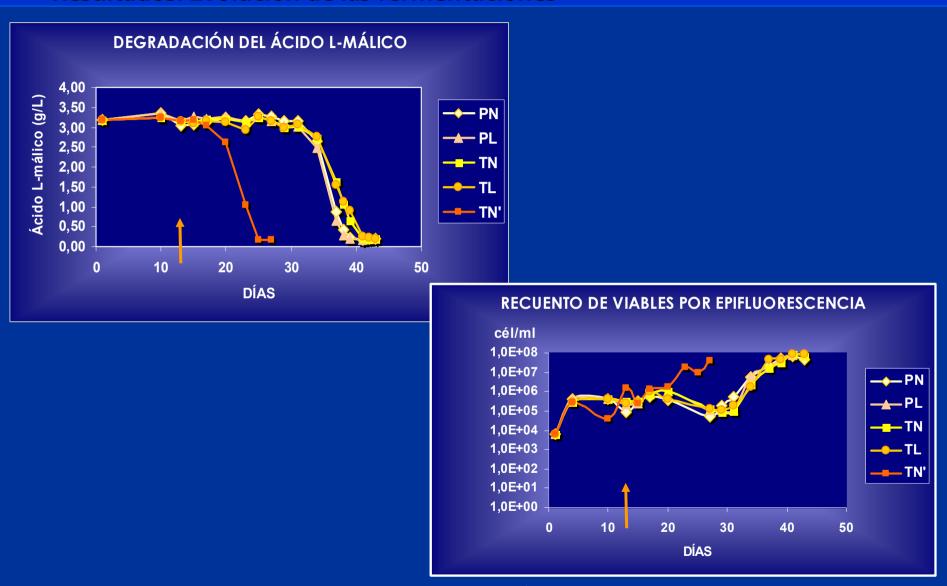
Condiciones de vinificación estudiadas:

- tiempo de maceración con los hollejos durante la fermentación alcohólica (FA)
- FML inducida/espontánea
- FML sobre lías
- conservación

Características de las vinificaciones



Resultados: Evolución de las fermentaciones

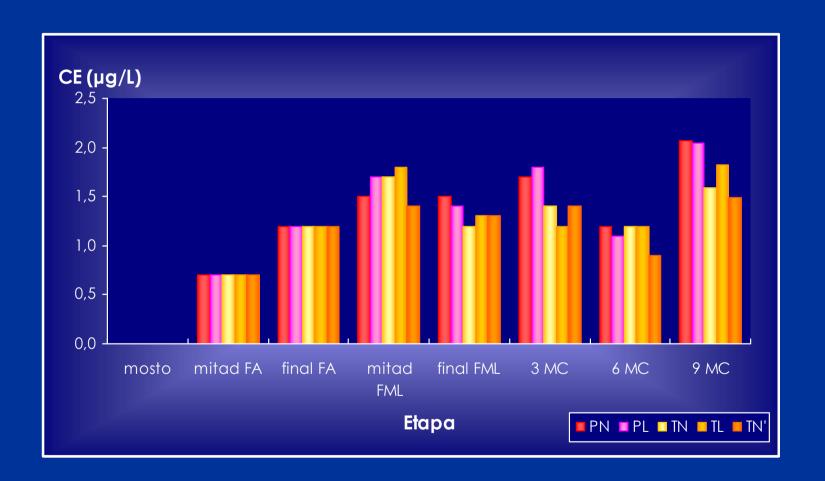


🕇 Inoculación de la cepa comercial

Resultados analíticos de los vinos

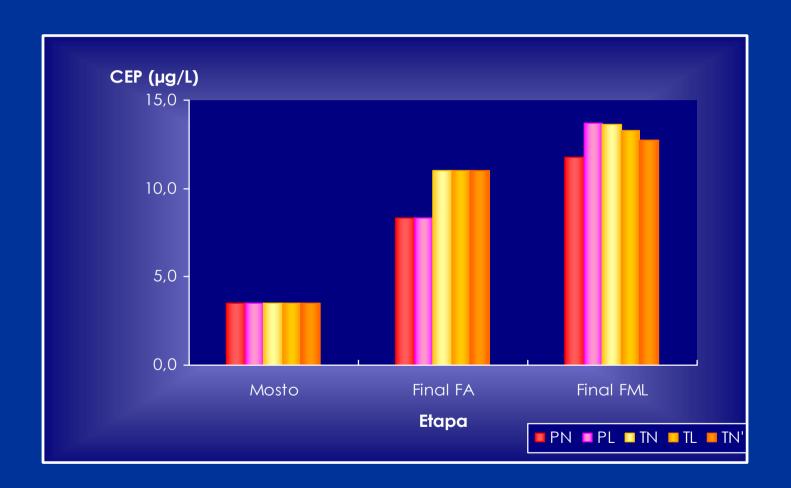
| Vino | Р | PN | PL | Т | TN | TL | TN' |
|--------------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| Etapa | Final FA | Final FML | Final FML | Final FA | Final FML | Final FML | Final FML |
| рН | 3,71 | 3,80 | 3,84 | 3,74 | 3,86 | 3,86 | 3,94 |
| Acidez total (g/L) | 6,85 | 5,10 | 5,50 | 5,50 | 5,35 | 5,20 | 5,10 |
| Acidez volátil (g/L) | 0,36 | 0,70 | 0,69 | 0,39 | 0,76 | 0,74 | 0,62 |
| Ácido málico (g/L) | 2,60 | 0,20 | 0,20 | 2,69 | 0,18 | 0,19 | 0,18 |
| Ácido láctico (g/L) | 0,02 | 1,90 | 1,88 | 0,02 | 1,84 | 1,86 | 1,90 |
| Glucosa/ Fructosa (g/L) | inapr. | inapr. | inapr. | inapr. | inapr. | inapr. | inapr. |
| Ácido cítrico (mg/L) | 316 | 78 | 16 | 344 | 52 | 40 | 208 |
| Ácido tartárico (g/L) | 1,19 | 1,98 | 1,95 | 0,41 | 2,04 | 2,02 | ND |
| Ácido glucónico (mg/L) | 1534 | | | 1515 | - | - | |
| Glicerol (g/L) | 7,9 | | - | 6,5 | - | - | |
| Grado alcohólico (% vol) | 11,90 | - | - | 11,45 | - | - | - |

Resultados analíticos de los vinos



CE determinado por GC/EM

Resultados analíticos de los vinos



CEP determinado por GC/EM luego de calentar 48 hs a 80 °C

- La máxima producción de CE se produce durante la FA.
- No observamos influencia de la FML en las concentraciones de CE, aunque el desarrollo de la FML provocó un aumento del CEP.
- La realización de la FML sobre lías no evidenció elevación de los niveles de CE o de sus precursores en los vinos.
- In tiempo mayor de exposición con los hollejos durante la FA tampoco afectó la producción de CE, pero sí de CEP.
- No se advirtió producción de CE después de la conservación del vino por 12 meses.

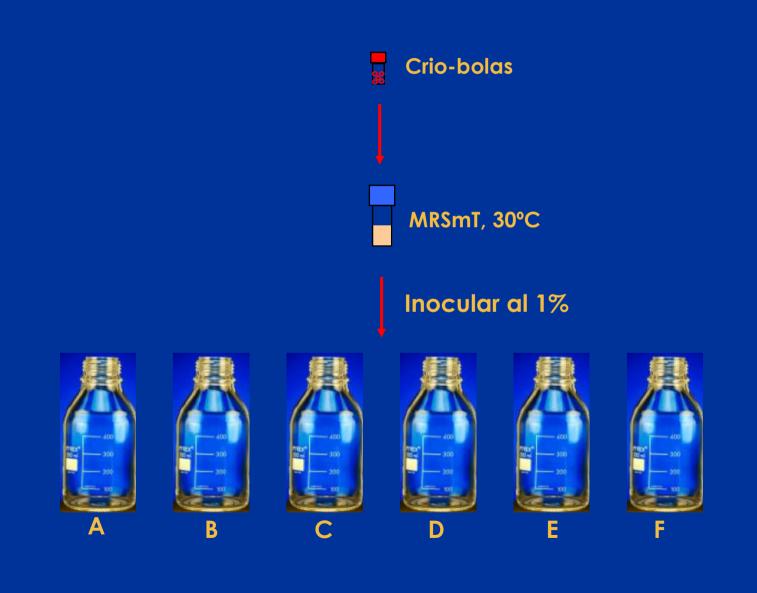
Antecedentes

Se investigó en laboratorio la capacidad potencial de producción de CE y de sus precursores en vino simulado durante la FML por parte de diferentes cepas y especies de BL frente a distintas condiciones de pH, concentración de etanol, temperatura y concentración de ácido málico.

Cepas:

- \square O. oeni \rightarrow 2 cepas:
 - A (aislada de un vino de la variedad Tempranillo)
 - **© CECT 217**[™]
- L. plantarum \rightarrow 1 cepa: CECT 5671 (originalmente aislada de un mosto de la variedad Tempranillo)

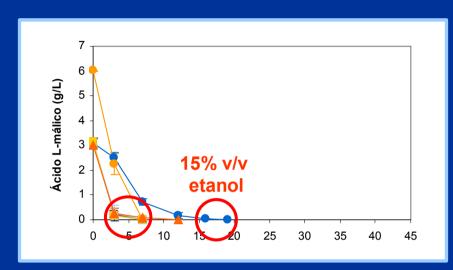
Características de los cultivos

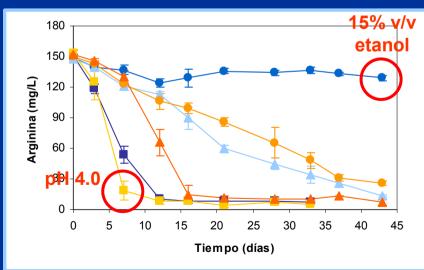


2.2 EFECTO DE DIFERENTES CONDICIONES VÍNICAS SOBRE LA FORMACIÓN DE CE EN VINO SIMULADO Condiciones ensayadas

| Código | Α | В | С | D | E | F |
|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Etanol (%, v/v) | 10 | 15 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| рН | 3.7 | 3.7 | 3.4 | 4.0 | 3.7 | 3.7 |
| Temperatura, °C | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 22 |
| Ácido L- málico (g/L) | 3 | 3 | 3 | 3 | 6 | 3 |

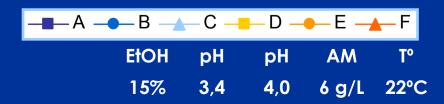
Resultados: Efectos sobre la degradación de ácido L- málico y el metabolismo de la arginina



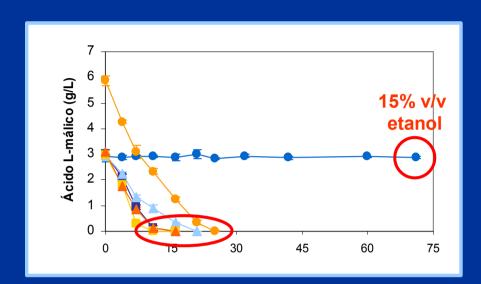


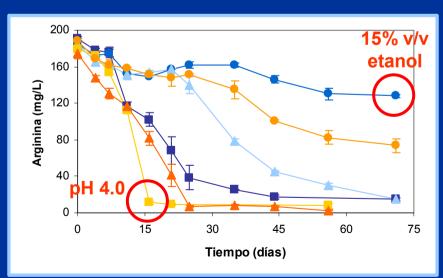
Oenococcus oeni A

- arginina degradada: 91%
- proporción de conversión arginina a citrulina:
 15% (p/p)



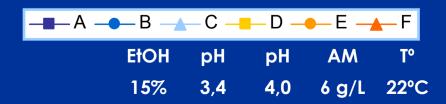
Resultados: Efectos sobre la degradación de ácido L- málico y el metabolismo de la arginina



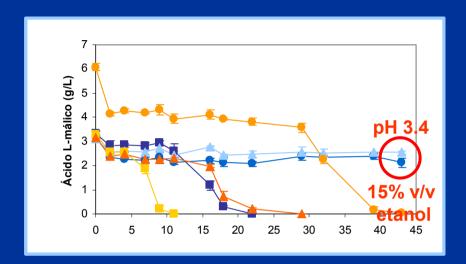


Oenococcus oeni CECT 217^T

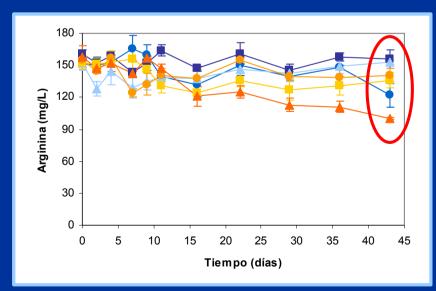
- arginina degradada: 94%
- proporción de conversión arginina a citrulina:
 16% (p/p)



Resultados: Efectos sobre la degradación de ácido L- málico y el metabolismo de la arginina

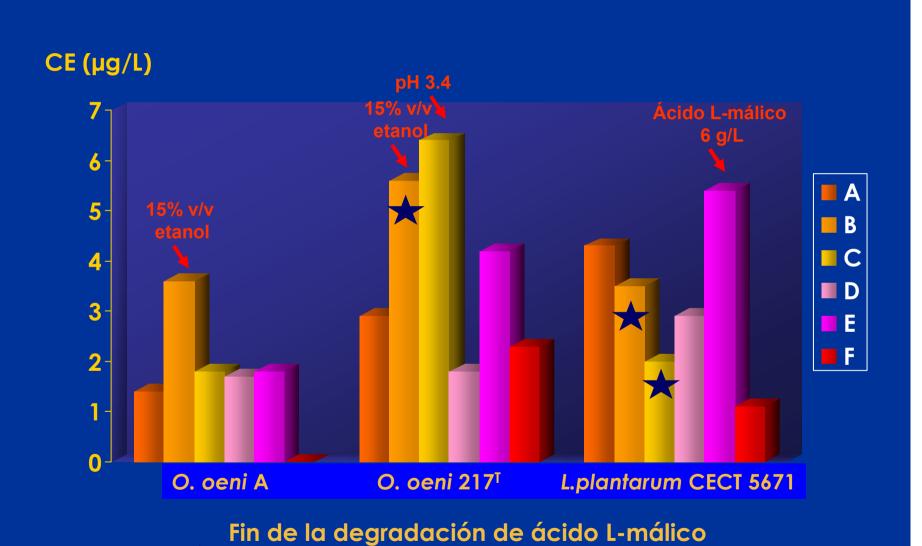


Lactobacillus plantarum CECT 5671



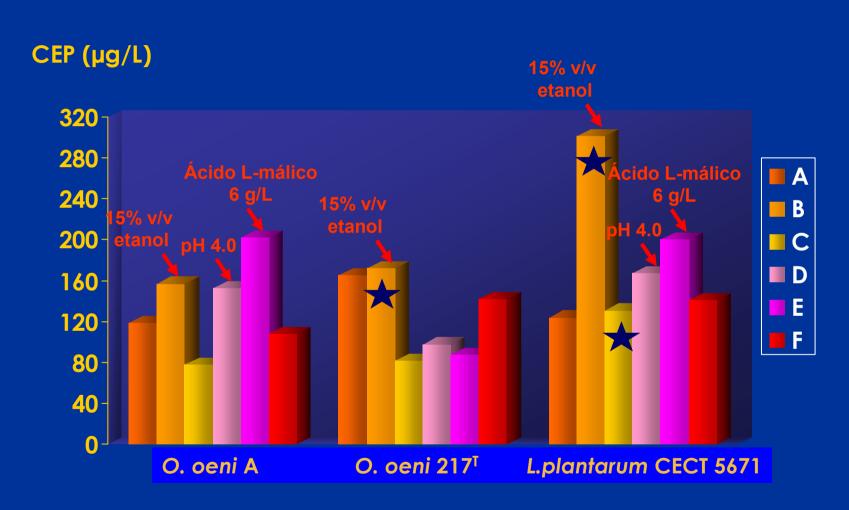


Resultados: Formación de CE



El consumo de ácido L- málico no fue completo

Resultados: Formación de CEP



Fin de la degradación de ácido L-málico

El consumo de ácido L- málico no fue completo

- La degradación de la arginina siempre fue retrasada con respecto a la degradación del ácido L-málico. No se observó degradación de arginina en los casos en que no se realizó la FML.
- Para las cepas de O. oeni la formación de CE fue mayor cuando la concentración de etanol era más elevada y el pH más bajo. Pero el CE potencial resultó mayor a pHs más altos.
- En el caso de *L. plantarum*, las condiciones que más favorecen la producción de CE y de CEP durante la FML fueron los niveles más elevados de etanol y de ácido L-málico.
- La cepa estudiada de *L. plantarum* no fue capaz de degradar la arginina y no excretó citrulina en las diferentes condiciones estudiadas, aunque los niveles obtenidos de CE fueron similares a los alcanzados por las cepas de *O. oeni*.

Procedimiento:

En la vendimia de 2003 se recogieron muestras de mostos y de vinos al final de la FA (FFA) y al final de la FML (FFML) de 81 vinificaciones llevadas a cabo en la bodega experimental de la Estación Enológica de Reus (INCAVI)

Finalidad:

Evaluar la influencia de diferentes parámetros, como la variedad de la uva, la procedencia y otros parámetros enológicos habituales, sobre el metabolismo de la arginina y la producción de CE y sus precursores.

Encontrar una correlación entre algún parámetro enológico fácil y habitualmente medible en mostos y vinos y el CE, o CEP, para poder utilizarlo como previsor de los niveles finales en los vinos de CE.

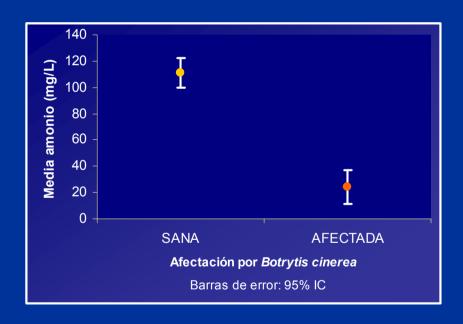
Determinar la posible influencia sobre el metabolismo de la arginina de la infección de la uva por Botrytis cinerea.

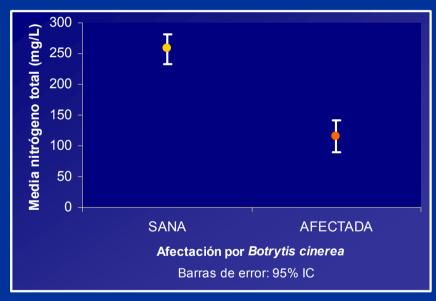
2.3 RELACIÓN ENTRE CARACTERÍSTICAS ENOLÓGICAS DE MOSTOS Y VINOS Y LA FORMACIÓN DE CE Controles analíticos

- Se determinaron parámetros enológicos habituales en mostos y vinos al FFA y al FFML.
- Se determinaron citrulina, arginina, urea, nitrógeno, CE y CEP en mostos, vinos de FFA y vinos de FFML.
- Se realizó el procedimiento de correlaciones bivariadas con el programa SPSS que calcula el coeficiente de correlación de Pearson.

Resultados: Análisis de Correlaciones

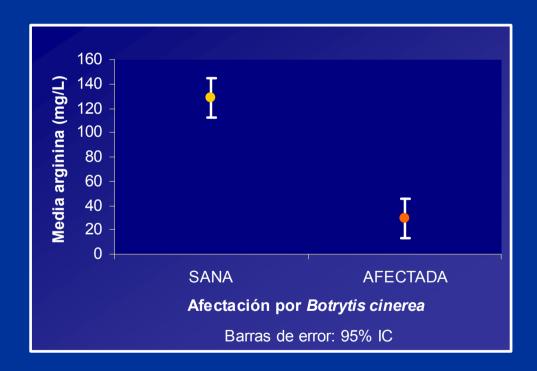
Hubo una correlación negativa entre el nivel de podredumbre de la uva y los niveles de nitrógeno total y amonio en mostos





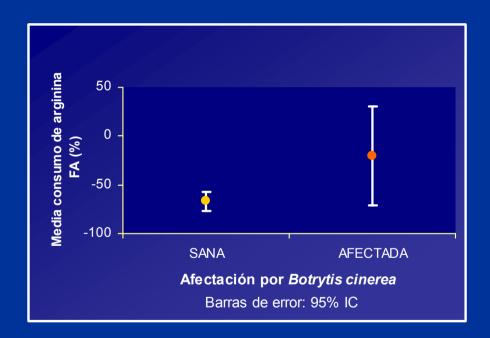
Resultados: Análisis de Correlaciones

La concentración de arginina correlacionó negativamente con el contenido de ácido glucónico y con el nivel de afectación de la uva por B. cinerea.



Resultados: Análisis de Correlaciones

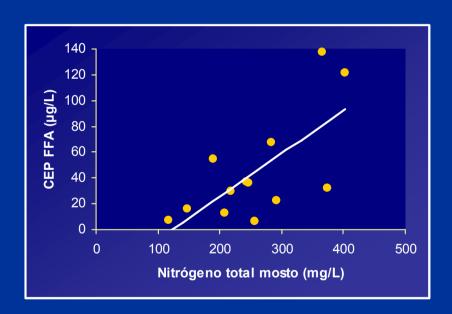
El nivel de afectación de la uva por B. cinerea se correlacionó con el consumo de arginina durante la FA.

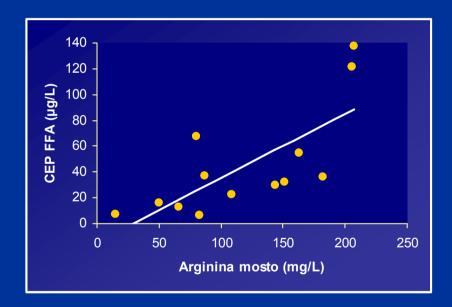


Las medias en los consumos de arginina para uvas sanas y afectadas por el hongo no resultaron significativamente diferentes.

Resultados: Análisis de Correlaciones

Los niveles de CEP al FFA y al FFML correlacionaron con los niveles de amonio y nitrógeno total del mosto y de arginina de mosto y vinos de FFA y de FFML.

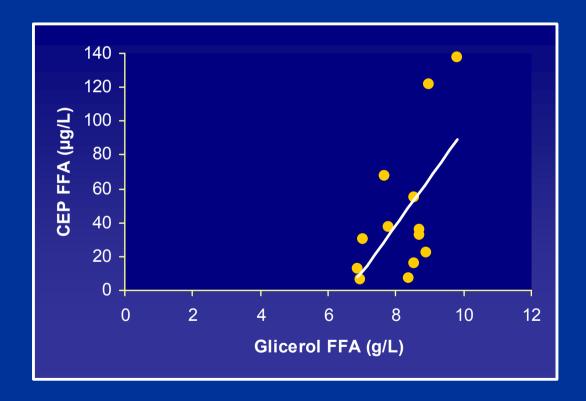




Estos niveles nitrogenados pueden ser buenos indicadores de los niveles finales de CEP en los vinos.

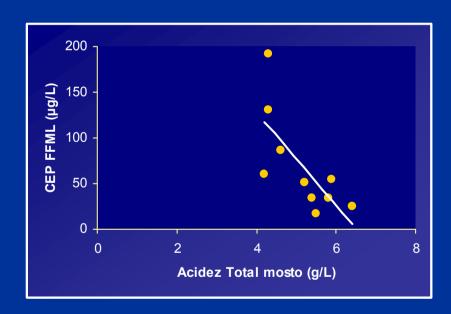
Resultados: Análisis de Correlaciones

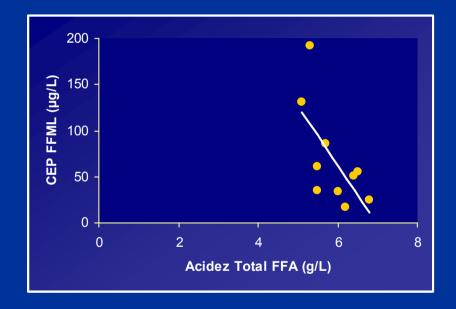
Observamos correlación positiva entre los niveles de glicerol y de CEP al FFA.



Resultados: Análisis de Correlaciones

Observamos correlación negativa entre los niveles de CEP al FFML y los niveles de acidez total de mostos y vinos al FFA.





- Dentro de los parámetros habitualmente determinados en mostos y vinos aquellos que mostraron correlación con el CEP fueron la acidez total y el glicerol.
- Estos parámetros, junto con los niveles nitrogenados (amonio, nitrógeno total y arginina) de mostos y vinos son buenos indicadores de los niveles de CE que podrían desarrollarse en un periodo de almacenamiento en los vinos.

Objetivo:

Determinar cuál es el momento de inoculación en que se observa un mejor desarrollo de la FML y una menor formación de CE y de sus precursores en mostos y vinos de pH elevado.

Método:

Se inocularon mostos Tempranillo y Merlot en distintos momentos de la vinificación con distintas cepas bacterianas.

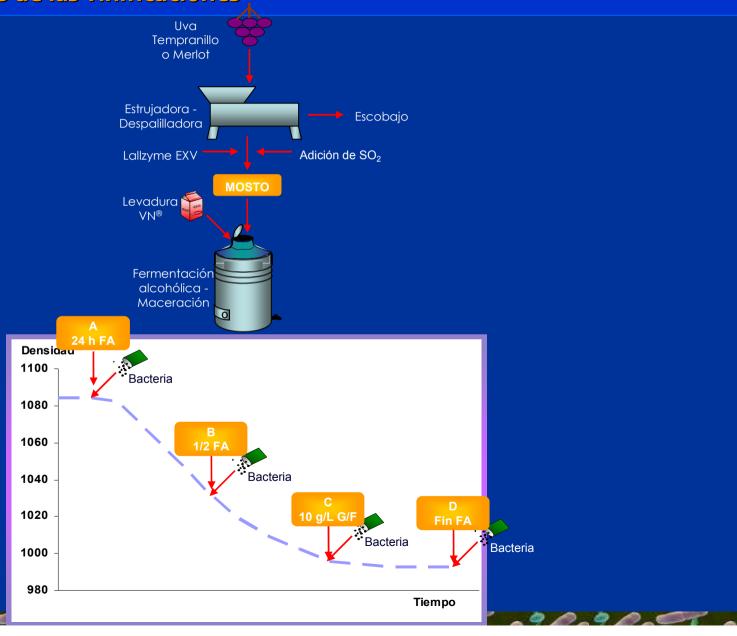
Cepas:

- Lalvin 31[®] (Lallemand)
- Lalvin Elios1® (Lallemand)
- CECT 5671 (L. plantarum, originalmente aislada de un mosto de la variedad Tempranillo)

Características de las vinificaciones

| PARÁMETRO | TEMPRANILLO | MERLOT | |
|-----------------------------------|-------------|--------|--|
| °Brix | 20,3 | 23,7 | |
| Grado alcohólico probable (% vol) | 11,64 | 13,95 | |
| рН | 3,51 | 3,37 | |
| Acidez total (g/L) | 4,0 | 5,3 | |
| Ácido tartárico (g/L) | 4,58 | 4,56 | |
| Ácido málico (g/L) | 2,38 | 2,06 | |
| Ácido cítrico (mg/L) | 209 | 210 | |
| Ácido glucónico (mg/L) | 394 | 768 | |
| Glicerol (g/L) | 0,47 | 0,95 | |
| Nitrógeno total (mg/L) | 120 | 128 | |

Características de las vinificaciones



Resultados: Evolución de la FA en las vinificaciones

| СЕРА | Momento de inoculación | Grado alcohólico probable (% vol) | Duración de la FA (días) | Glucosa/ Fructosa (g/L) | Grado alcohólico adquirido (% vol) | Ácido acético (g/L) | Grado alcohólico probable (% vol) | Duración de la FA (días) | Glucosa/ Fructosa (g/L) | Grado alcohólico adquirido (% vol) | Ácido acético (g/L) |
|---------------|------------------------|--|--------------------------------|-------------------------------|---|---------------------------|--|--------------------------------|-------------------------------|---|---------------------------|
| Lalvin 31® | 24 h FA | 11,67 | 14 | 0,00 | 11,00 | 0,46 | 14,01 | 19 | 0,00 | 13,15 | 0,58 |
| | 1/2 FA | 11,60 | 14 | 0,00 | 11,10 | 0,37 | 13,94 | 19 | 0,00 | 13,65 | 0,54 |
| | 10 g/L G/F | 11,60 | 14 | 0,02 | 11,35 | 0,23 | 14,01 | 19 | 0,00 | 13,75 | 0,52 |
| | Fin FA | 11,75 | 14 | 0,22 | 11,15 | 0,15 | 14,01 | 19 | 0,00 | 13,60 | 0,55 |
| Elios 1® | 24 h FA | 11,67 | 14 | 0,13 | 11,40 | 0,26 | 13,94 | 19 | 0,00 | 13,45 | 0,52 |
| | 1/2 FA | 11,75 | 14 | 0,11 | 11,35 | 0,35 | 13,94 | 19 | 0,00 | 13,45 | 0,53 |
| | 10 g/L G/F | 11,54 | 14 | 0,06 | 11,30 | 0,25 | 13,94 | 19 | 0,00 | 13,15 | 0,54 |
| | Fin FA | 11,75 | 14 | 0,06 | 11,15 | 0,20 | 13,80 | 19 | 0,02 | 13,50 | 0,48 |
| CECT 5671 | 24 h FA | 11,60 | 14 | 0,03 | 11,05 | 0,26 | 13,94 | 19 | 0,00 | 13,45 | 0,52 |
| | 1/2 FA | 11,54 | 14 | 0,01 | 11,10 | 0,27 | 14,08 | 19 | 0,02 | 13,45 | 0,54 |
| | 10 g/L G/F | 11,54 | 14 | 0,04 | 11,35 | 0,21 | 13,94 | 19 | 0,00 | 13,55 | 0,54 |
| | Fin FA | 11,67 | 14 | 0,21 | 11,60 | 0,14 | 13,87 | 19 | 0,00 | 13,45 | 0,50 |
| Testigo | Sin inocular | 11,60 | 12 | 0,00 | 11,05 | 0,30 | 14,01 | 19 | 0,00 | 13,65 | 0,49 |

TEMPRANILLO

MERLOT



Resultados: Evolución de la FML en las vinificaciones

| | VARIEDAD | | | MERLOT | | | | | |
|------------|------------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|---------------|---------------|
| CEPA | Momento de inoculación | 24 h FA | 1/2 FA | 10 g/L G/F | Fin FA | 24 h FA | 1/2 FA | 10 g/L G/F | Fin FA |
| Lalvin 31® | Viabilidad | ↑↑ (I) | ↑↑ (I) | ↑ | \rightarrow | ↑ ↑ (I) | ↑ ↑ (I) | ↑ | → (I) |
| | Cinética FML | ++ | ++ | +/- | - | + | + | +/- | - |
| Elios 1® | Viabilidad | ↑ ↑ (I) | ↑↑ (I) | ↑↑ (I) | ↑↑ (I) | ↑(I) | ↑(I) | \rightarrow | \rightarrow |
| | Cinética FML | ++ | ++ | + | + | +/- | +/- | - | - |
| CECT 5671 | Viabilidad | 1 | ↓ | ↓ | ↓ | \downarrow | ↓ | ↓ | ↓ |
| | Cinética FML | + | | | | - | - | - | - |
| W 12 | Viabilidad | | | \rightarrow | | | | | |
| Testigo | Cinética FML | | | - | | | | | |

(I): Hubo imposición

Resultados: Formación de CE

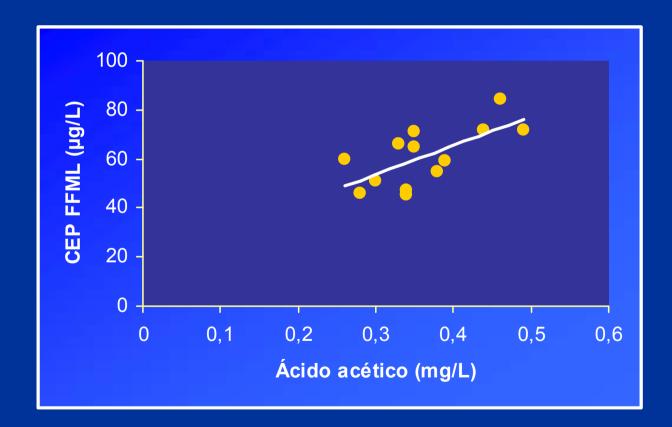
CEP (µg/L)

| | | TEMPRANILLO | MERLOT | | |
|--------------------|------------------------|-------------|--------|--|--|
| CEPA | Momento de inoculación | FFML | FFML | | |
| Lalvin 31® | 24 Hs FA | 84 | 54 | | |
| | 1/2 FA | 45 | 35 | | |
| | 10 g/L G/F | 47 | 21 | | |
| | Fin FA | 46 | 26 | | |
| Lalvin Elios 1® | 24 Hs FA | 60 | 97 | | |
| | 1/2 FA | 66 | 73 | | |
| | 10 g/L G/F | 71 | 80 | | |
| | Fin FA | 71 | 61 | | |
| CECT 5671 | 24 Hs FA | 65 | 91 | | |
| | 1/2 FA | 72 | 62 | | |
| | 10 g/L G/F | 55 | 59 | | |
| | Fin FA | 51 | 52 | | |

Se evidenció diferente capacidad para degradar la arginina por parte de las dos cepas comerciales de O. oeni ensayadas, así como diferentes niveles de CEP. Los niveles de CEP de los vinos inoculados con L. plantarum CECT 5671 fueron similares a los que presentaban los vinos inoculados con las cepas de O. oeni

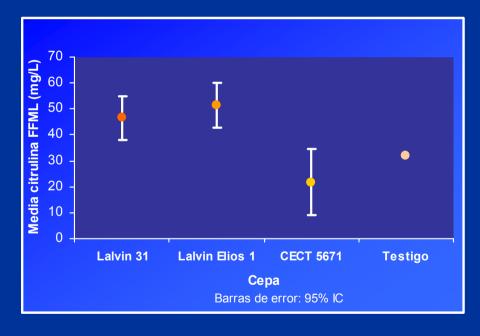
Resultados: Análisis estadístico

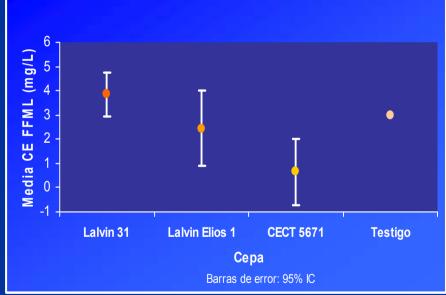
En los vinos Tempranillos se observó correlación entre los niveles de CEP y la concentración de ácido acético.



Resultados: Análisis estadístico

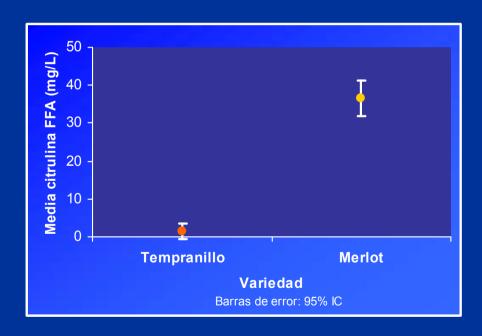
En los vinos Merlot las medias de las concentraciones de citrulina y de CE al FFML fueron diferentes dependiendo de la cepa inoculada.

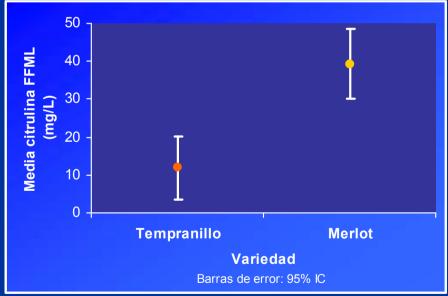




Resultados: Análisis estadístico

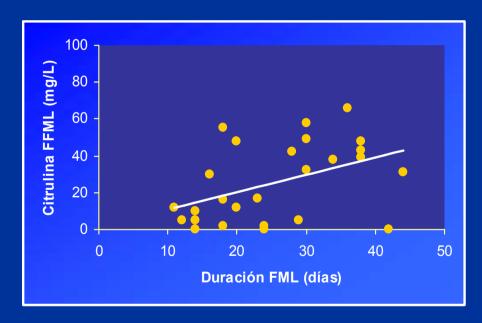
Las concentraciones de citrulina tanto al FFA como al FFML difieren en las variedades de uva ensayadas.

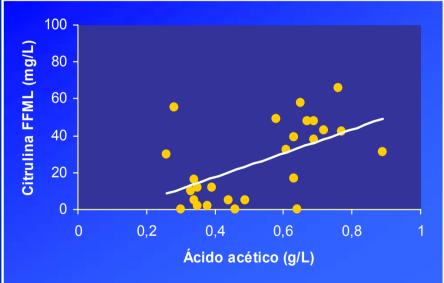




Resultados: Análisis estadístico

Las concentraciones de citrulina presentaron correlación tanto con el tiempo de duración de la FML como con las concentraciones de ácido acético.





- Las dos cepas comerciales ensayadas mostraron diferente capacidad para degradar la arginina y los vinos obtenidos con Lalvin Elios 1[®] presentaron niveles más elevados de CEP que los inoculados con Lalvin 31[®].
- Los niveles de CEP de los vinos inoculados con *L. plantarum* CECT 5671 fueron similares a los que presentaban los vinos inoculados con las cepas de *O. oeni*.
- En los vinos Tempranillo hubo correlación entre los niveles de CEP y la concentración de ácido acético.
- En los vinos Merlot las concentraciones de citrulina y de CE al FFML fueron ligeramente mayores en los vinos inoculados con las cepas comerciales de O. oeni en comparación a aquellos inoculados con la cepa de L. plantarum.

3. CONCLUSIONES GENERALES

- Entre diferentes prácticas de vinificación examinadas, ni la realización de la FML sobre lías ni la conservación del vino por 12 meses afectaron los niveles de CE. Aunque el desarrollo de la FML y un mayor tiempo de exposición con los hollejos no influyeron los niveles de CE, sí provocaron un aumento del CEP.
- La degradación de la arginina aumentó el crecimiento de O. oeni en algunas condiciones y siempre fue retrasada con respecto a la degradación del ácido L-málico. No se observó degradación de arginina en los casos en que no se llevó a cabo la FML.
- Diferentes cepas comerciales de O. oeni mostraron diferente capacidad para degradar la arginina y diferentes niveles de CEP.
- La cepa ensayada de *L. plantarum* no degradó arginina ni excretó citrulina, aunque los niveles de CE fueron similares a los alcanzados con cepas de *O. oeni*.
- Los niveles nitrogenados, de glicerol y de acidez total de mostos y vinos pueden ser buenos indicadores de los niveles de CE que podrían formarse durante la conservación de los vinos.
- Hubo mayor consumo de arginina durante la FA en uvas afectadas por B. cinerea, aunque no diferencias significativas con respecto a uvas sanas.

iMUCHAS GRACIAS!



¿PREGUNTAS?