

# Vinificaciones orgánicas espontáneas del Sur Mendocino: parámetros enológicos y microbiológicos

## Spontaneous organic winemaking south of Mendoza: enological and microbiological parameters

Bruno Thomas Álvarez<sup>1</sup>, Elisa Sepúlveda<sup>1</sup>, Sergio Adrián Sini<sup>1</sup>, Raúl Chernikoff<sup>1</sup>, Néstor Alonso<sup>1,2</sup>, Marcela Johana Villalón Olivares<sup>2</sup>, Cecilia Adriana Flores<sup>1</sup>, María Silvina Cabeza<sup>1,3</sup>

1. Universidad Nacional de Cuyo. Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, Bernardo de Irigoyen 375, San Rafael (5600), Mendoza, Argentina.
2. Solandes S.A, Iriarte S/N, Villa Atuel (5622), Mendoza, Argentina.
3. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Godoy Cruz 2290, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, (C1425FQB), Buenos Aires, Argentina.

E-mail: [mscabeza@fcai.uncu.edu.ar](mailto:mscabeza@fcai.uncu.edu.ar)

### Resumen

El vino orgánico está en auge impulsado porque la población reconoce que distintas prácticas agrícolas influyen en el medio ambiente; y la pandemia actual que generó en los consumidores preocupación por mejorar su salud, eligiendo alimentos saludables sin sustancias nocivas para la salud. Es extensamente conocida la influencia de la microbiota – variable según numerosos factores: ubicación geográfica del viñedo, condiciones climáticas, prácticas vitícolas, variedad e integridad de la uva, entre otros – sobre las características organolépticas finales del vino. En uvas orgánicas, se ha demostrado una baja biodiversidad como consecuencia de tratamientos antifúngicos permitidos (cobre y azufre). Se presenta el estudio de los parámetros enológicos – según metodología INV – y microbiológicos – recuento en cámara y células viables en placa – de vinos orgánicos del sur de Mendoza (Malbec y Cabernet Sauvignon) elaborados mediante fermentación espontánea. Se analizó la evolución de la vinificación espontánea por pérdida de peso y temperatura de fermentación. La fermentación presentó demora en el inicio, la velocidad máxima de fermentación se alcanzó el día 4-5, con mayor velocidad fermentativa en Malbec. Se completó la fermentación entre 14 y 17 días, restando menos de 4 g/L de azúcares reductores. Los parámetros enológicos se mantuvieron por debajo de los límites permitidos por el INV. No se pudieron recuperar levaduras ya que no resistieron el tiempo de congelación de las muestras hasta su evaluación, aunque si sobrevivieron bacterias (mayormente bacilos y algunos cocos). Se concluye que vinos elaborados espontáneamente a partir de uvas orgánicas en buena condición fitosanitaria logran completar la fermentación, alcanzando grado alcohólico elevado y sin alteraciones organolépticas en los mismos.

Palabras clave: vinos orgánicos, vinificación espontánea, microbiota vinica

### Abstract

Organic wine is booming, driven because the population recognizes that different agricultural practices influence the environment; and the current pandemic that generated in consumers concern about improving their health, choosing healthy foods without substances harmful to health. The influence of the microbiota – variable according to numerous factors: geographical location of the vineyard, climatic conditions, viticultural practices, variety and integrity of the grape, among others – on the final organoleptic characteristics of the wine is widely known. In organic grapes, low biodiversity has been shown as a consequence of permitted antifungal treatments (copper and sulfur). The study of the oenological parameters – according to INV methodology – and microbiological – cell count and viable cells on plate – of organic wines from southern Mendoza (Malbec and Cabernet Sauvignon) made by spontaneous fermentation are presented. The evolution of spontaneous vinification was analyzed by weight loss and fermentation temperature. The fermentation was delayed at the beginning, the maximum fermentation speed was reached on day 4-5, with the highest fermentation speed in Malbec. Fermentation was completed between 14 and 17 days, with less than 4 g / L of reducing sugars remaining. The oenological parameters were kept below the limits allowed by the INV. Yeasts could not be recovered since they did not withstand the freezing time of the samples until their evaluation, although bacteria survived (mostly bacilli and some cocci). It is concluded that wines made spontaneously

from organic grapes in good phytosanitary condition manage to complete the fermentation, reaching a high alcoholic degree and without organoleptic alterations in them.

Keywords: organic wine, spontaneous winemaking, wine microbiome

## 1. Introducción

La producción y venta de vino orgánico en todo el mundo ha mostrado una tendencia positiva considerable. Es el producto de tendencia en la industria de bebidas, específicamente en los países bebedores de vino, incluidos Francia, Italia, Australia y Argentina. El pronóstico del mercado global de vino orgánico indica una tasa de crecimiento anual compuesto (CAGR) del 10,6% para un período 2021-2027. La epidemia de COVID-19 tuvo un efecto bastante positivo en el mercado del vino orgánico. La propagación de COVID-19 impulsó la conciencia sobre un estilo de vida saludable que incluye ejercicio físico, una dieta saludable y el cuidado personal entre las personas. Además, la demanda de alimentos y bebidas nutritivos aumentó entre los consumidores para fortalecer su inmunidad. Se cree que los productos químicos artificiales utilizados en alimentos y bebidas tienen efectos negativos sobre la salud. Por lo tanto, los consumidores evitaron los alimentos con productos químicos sintéticos. Muchos consumidores recurrieron a alimentos y bebidas orgánicos debido a la percepción de sus ventajas sobre los productos tradicionales. Además, muchos gobiernos de todo el mundo ofrecieron estímulos monetarios para el sector agrícola durante la pandemia. Esto, a su vez, alentó a los agricultores a cultivar uvas orgánicas, impulsando el mercado del vino orgánico. Por otra parte, varios restaurantes y cafés ofrecen ahora productos orgánicos, aumentando la demanda (Infinium Global Research, 2021).

El área de cultivo de uva orgánica en el mundo aumentó de 87.655 ha en 2004 a 403.047 ha en 2017 (Willer y Lernoud, 2019). Al mismo tiempo, el consumo mundial de vino orgánico aumentó en un 48,3% durante el período de 2012 a 2017 (IWSR, 2018). Los países con el mayor consumo mundial de vino orgánico son Alemania (con una participación del 23,9%), Francia (16,4%) y el Reino Unido (10,2%). Italia ocupa una posición inferior en este ranking con una participación del 2,4%.

Durante 2020, hubo un incremento del 24% de las exportaciones de vinos orgánicos argentinos (SENASA, 2021).

El término vino orgánico no significa lo mismo que elaborado con uvas orgánicas. Para comercializar un vino orgánico hace falta certificar además del cultivo de la uva, el proceso de vinificación. Hay límites en el uso y contenido de anhídrido sulfuroso y en

muchos casos se exige utilizar levaduras autóctonas en vinificación. El uso de productos enológicos está también regulado (Pino Torres, 2013).

La calidad del vino se ve influenciada por las levaduras, que además de transformar el azúcar en alcohol etílico durante la fermentación son las responsables de otorgar al vino características tales como cuerpo, viscosidad, color, flavor y el perfil aromático, entre otros. Se ha estudiado ampliamente que la variedad y proporción de diferentes levaduras en las bayas de uva y en los mostos depende de muchos factores como son ubicación geográfica del viñedo, condiciones climáticas, variedad de uva, tecnología de vinificación e integridad de la uva (Tofalo et al., 2011).

Diferentes estudios han demostrado la baja biodiversidad de levaduras y organismos tipo levadura presentes en los viñedos orgánicos es consecuencia de los tratamientos antifúngicos permitidos a base de cobre y azufre (Grangeteau et al., 2017). Sin embargo, los microorganismos nativos están mejor adaptados a las condiciones químico-ambientales de la uva/mosto del área de proveniencia, por lo que son capaces de dar características distintivas a los vinos (Capozzi et al., 2015). Por otra parte, la microflora nativa también puede jugar un rol de detrimento por acumulación de compuestos indeseables o formación de velo en la interfase líquido-aire. Las técnicas de vinificación también influyen en la aparición de levaduras de deterioro, especialmente en los vinos orgánicos, donde algunas legislaciones establecen usos estrictamente regulados de aditivos y adyuvantes (Perpetuini et al., 2020).

A pesar del dominio de cepas de *S. cerevisiae* durante la vinificación, en las fermentaciones espontáneas se desarrollan típicamente levaduras no-*Saccharomyces* durante la vinificación, lo que implica una diversidad de levaduras más alta, un incremento del aroma, determinándose perfiles de flavor diferentes a los vinos convencionales por la síntesis de metabolitos de interés. Sin embargo, un crecimiento excesivo, incontrolado o por parte de determinadas cepas de estas especies no-*Saccharomyces*, puede suponer claramente una alteración del vino y la producción de aromas desagradables como excesiva producción de acidez volátil (Guillamón, 2016).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la calidad enológica y la biodiversidad de microorganismos de

vinos orgánicos elaborados por fermentación espontánea.

## 2. Materiales y métodos

### *Uvas y fermentación espontánea*

Las uvas tintas empleadas en este estudio fueron cosechadas en 2019 de viñedos orgánicos certificados desde 2010 por la Organización Internacional Agropecuaria (OIA), pertenecientes a la empresa Solandes S.A., ubicados en Villa Atuel, San Rafael, al sur de la provincia vitivinícola de Mendoza, Argentina. Estos viñedos cumplen los estándares de la Federación Internacional de Movimientos de Agricultura Orgánica (IFOAM). Las variedades elegidas fueron: Malbec y Cabernet Sauvignon.

Se molió la uva en la bodega, se adicionó nutriente complejo (100% componentes naturales derivados de levadura) y metabisulfito de potasio (12 mg/L). Se prosiguió con la fermentación espontánea, en tanques de 20 L, en la Bodega Solandes S.A., dedicada a producir vinos orgánicos (certificada bajo Norma Orgánica Argentina / Unión Europea + IFOAM (NOA), National Organic Program (NOP), Japanese Agricultural Standard (JAS) y Canada Organic), según sus protocolos de vinificación. Se realizaron 3 ensayos en paralelo para cada variedad.

Se estudió la evolución de la fermentación por pérdida de peso diaria, controlándose a su vez, la temperatura.

En vino terminado, se estudiaron los siguientes parámetros fisicoquímicos: densidad, alcohol, extracto seco, azúcares reductores, acidez total y volátil y SO<sub>2</sub> total, según metodología oficial del INV. Todas las mediciones fueron tomadas por triplicado.

Para el ensayo microbiológico, se tomaron muestras todos los días durante la fermentación, y se congelaron para ser analizadas en conjunto posteriormente. Se utilizó el método de extensión en placa en agar YEPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa, 2% agar) para el recuento de células viables en placa y cámara de Neubauer y azul de metileno para distinguir las levaduras muertas con microscopio (aumento: 400 x) para el recuento directo de levaduras vivas.

Los datos se analizaron estadísticamente para determinar si existen diferencias significativas entre las variedades (ANOVA).

## 3. Resultados y Discusión

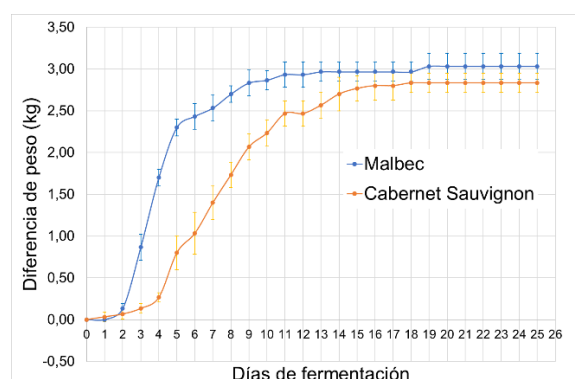
La Figura 1 muestra los tanques en donde se realizaron las fermentaciones espontáneas, cuya evolución fue medida por diferencia de peso provocado por la pérdida de CO<sub>2</sub>, producto de la fermentación alcohólica.



**Figura 1.** Tanques de fermentación espontánea de uvas orgánicas, variedad Cabernet Sauvignon.

Como se puede observar en la Figura 2, las fermentaciones espontáneas se extendieron 14 y 17 días, para Malbec y Cabernet Sauvignon, respectivamente. La velocidad máxima de fermentación se observó al día 4 en el caso de Malbec y 5 en Cabernet Sauvignon, siendo un 50% mayor para Malbec. Sin embargo, la velocidad de fermentación en Cabernet Sauvignon fue más sostenida.

Al ser una fermentación espontánea, no se inocularon levaduras, y por ello es notable el comienzo retrasado de la fermentación (Figura 2), presentando una mayor fase de latencia de las levaduras fermentativas, donde no se evidenció prácticamente diferencia de peso por pérdida de CO<sub>2</sub>.



**Figura 2.** Evolución de la fermentación espontánea de uvas orgánicas.

Las temperaturas de fermentación variaron entre 17 y 18°C de mínima, y 24°C y 23,5°C de máxima, para Malbec y Cabernet Sauvignon, respectivamente.

De acuerdo a los parámetros fisicoquímicos obtenidos (Tabla 1), ambas variedades pudieron

completar la vinificación, obteniendo vinos secos (con azúcares reductores residuales inferiores a 4 g/L), partiendo de 24,8 y 25°Bx, para Malbec y Cabernet Sauvignon, respectivamente. Se alcanzó un grado alcohólico proporcional a los azúcares iniciales, lo que indica que no se produjeron desviaciones durante la fermentación alcohólica.

El extracto seco determinado en ambos varietales es alto, con valores similares a los encontrados en vinos elaborados con producción orgánica de los Valles Calchaquíes de Salta, Argentina (Pérez et al., 2015).

**Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de vinos orgánicos.**

Parámetro	Malbec	Cabernet Sauvignon
Densidad (g/L, 20°C)	0,9943 ± 0,0002 <sup>a</sup>	0,9957 ± 0,0003 <sup>b</sup>
Alcohol (% vol, 20°C)	14,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	14,8 ± 0,2 <sup>a</sup>
Extracto seco (g/L)	33,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	37,5 ± 0,1 <sup>b</sup>
Azúcares reductores (g/L)	3,05 ± 0,09 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,05 <sup>b</sup>
Acidez total, en ácido tartárico (g/L)	4,5 ± 0,16 <sup>a</sup>	5,3 ± 0,1 <sup>b</sup>
Acidez volátil, en ácido acético (g/L)	0,65 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,79 ± 0,03 <sup>b</sup>
SO <sub>2</sub> total (mg/L)	30 ± 0,5 <sup>a</sup>	30 ± 0,3 <sup>a</sup>

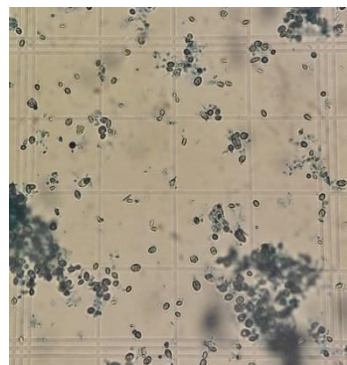
<sup>a, b</sup> – letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos en las filas ( $p < 0,05$ ).

El ácido acético tiene un impacto negativo en la performance fermentativa, es inductor fisiológico de la apoptosis de *S. cerevisiae* y afecta la calidad de ciertos tipos de vino cuando se encuentra presente en un nivel dado. Este ácido puede tener diversos orígenes en el vino. Puede provenir del mosto: bacterias acéticas (*Gluconobacter* y *Acetobacter*) especialmente en uvas afectadas con hongos; bacterias ácido lácticas, particularmente en uvas maltratadas pueden crecer rápidamente Lactobacilos; y levaduras contaminantes como *Hansenula*, en uvas sin sulfitar o mosto no inoculado. Durante la fermentación alcohólica: algunas bacterias acéticas pueden sobrevivir y causar daño; algunos *Oenococcus* pueden producirlo incluso con pequeña cantidad de azúcares residuales; *S. cerevisiae* produce 0,1-0,3 g/L en uvas sanas con concentración moderada de azúcar (<220 g/L), algunas cepas producen más de 1 g/L, y se conoce que desvía su metabolismo hacia mayor generación ante condiciones de estrés; levaduras de deterioro como *Pichia anomala*, *Candida krusei*, *Candida stellata*, *Hanseniaspora uvarum*/*Kloeckera apiculata*, *Saccharomycodes ludwigii* producen altos niveles de acético antes y durante el inicio de la fermentación. En la fermentación maloláctica también se puede incrementar la acidez volátil. Ya en la etapa de vino,

se puede generar un aumento sustancial de ácido acético por bacterias acéticas (*A. pastorianus*), bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*) y *Dekkera/Brettanomyces* (Vilela-Moura et al., 2011). En este estudio, la acidez volátil se mantuvo en valores inferiores a lo permitido por el INV (0,80 g/l en ácido acético, vinos tintos para la libre circulación). Podría relacionarse la mayor concentración presente en Cabernet Sauvignon con la demora en el inicio de la fermentación, dando lugar a la posible acción de microorganismos de deterioro hasta la aparición de las levaduras fermentativas y el correspondiente ambiente alcohólico.

El SO<sub>2</sub> total fue ajustado a 30 mg/L finales, según protocolo de vinificación de la empresa para sus vinos orgánicos.

Para determinar la microbiota presente en el mosto/vino orgánico y realizar el recuento de células viables se analizaron las muestras diarias congeladas. Lamentablemente, por la epidemia de COVID-19, las muestras permanecieron congeladas por un largo período (18 meses), lo que provocó que las levaduras que estaban presentes en los mostos-vinos murieran, visualizadas en color azul en la cámara de recuento (Figura 3). En total concordancia con lo observado microscópicamente, no se obtuvo crecimiento de levaduras en las placas de recuento de células viables. Sin embargo, como puede observarse en la Figura 4, algunas bacterias permanecieron viables, gracias a la baja dosificación de SO<sub>2</sub>.

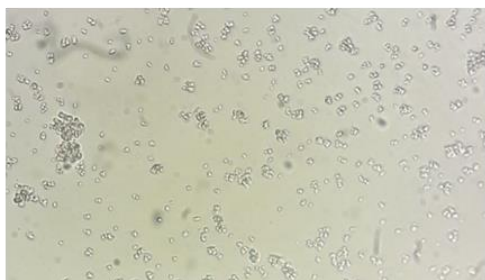
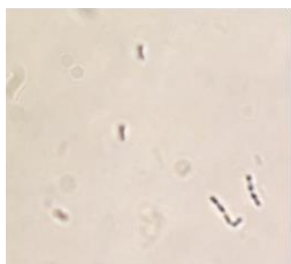
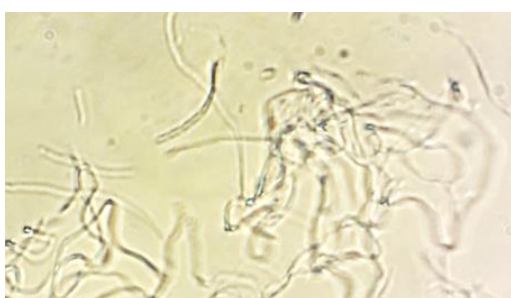


**Figura 3.** Recuento en cámara de Neubauer, muestra teñida con azul de metileno.





**Figura 4.** Recuento de células viables: Día 5 de fermentación, Malbec Orgánico, Dilución  $10^{-1}$ , YEPD.



**Figura 5.** Observación microscópica de microorganismos vínicos: a) y b) Bacilos en cadena; c) cocos en cadena; d) cocos en pares, tétradas y agrupaciones.

Por microscopía, se pudo determinar la presencia de bacilos (Fig. 5) móviles y no móviles, algunos en cadena y en otros casos aislados, de diferente tamaño (largo y ancho). También se encontraron muy pocos cocos o coco-bacilos en cadena o en tétradas.

#### 4. Conclusiones

Los vinos elaborados espontáneamente a partir de uvas orgánicas en buena condición fitosanitaria lograron completar la fermentación, alcanzando un grado alcohólico elevado y no detectándose alteraciones organolépticas en los mismos. Todos los parámetros enológicos se encontraron por debajo de los límites establecidos por el INV.

La duración de la fermentación fue más prolongada en comparación con una fermentación inoculada (datos no mostrados), ya que la fase de latencia se extendió y la velocidad de fermentación no es tan elevada.

No se pudieron rescatar las levaduras nativas a partir de las muestras congeladas, posiblemente debido al tiempo que transcurrió entre la toma de las mismas hasta el análisis microbiológico.

Se propone retomar el estudio en una nueva cosecha, a fin de seleccionar levaduras de interés para su estudio enológico y posibilitar una futura inoculación de vinos orgánicos con microorganismos autóctonos adaptados a las condiciones propias de estas uvas.

#### 5. Referencias

Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M.A., Grieco, F., and Spano, G. (2015). *Microbial terroir and food innovation: the case of yeast biodiversity in wine*. *Microbiol Research*, 181, 75-83.

Grangeteau, C., David, V., Hervé, A., Guilloux-Benatier, M., and Rousseaux, S. (2017). *The sensitivity of yeasts and yeasts-like fungi to copper and sulfur could explain lower yeast biodiversity in organic vineyards*. *FEMS Yeast Research*, 17(8).

Guillamón, J. M. (2016). *Diversidad microbiana y alteraciones durante la fermentación alcohólica: el yin y el yang para el enólogo*, ACE: Revista de enología, 154.

Infinium Global Research (2021). *Organic Wine Market: Global Industry Analysis, Trends, Market Size, and Forecasts up to 2027*. <https://www.infiniumglobalresearch.com/food->

[beverage/global-organic-wine-market](#). Acceso:  
8/12/2021.

IWSR (2018). *The global organic wine market 2012-22*.

[https://www.vinavisen.dk/vinavisen/website.nsf/pages/IWSR.pdf/\\$file/IWSR.pdf](https://www.vinavisen.dk/vinavisen/website.nsf/pages/IWSR.pdf/$file/IWSR.pdf). Acceso: 8/12/2021.

Pérez, N., Di Carlo, B., Salomón, R., Moyano, F., Peñaranda, S.S., y Zerpa, G. (2015). *Caracterización físico-química de vinos tintos regionales*. XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Bs. As., Argentina.

Perpetuini, G., Tittarelli, F., Battistelli, N., Suzzi, G., and Tofalo, R. (2020). *Contribution of Pichia manshurica strains to aroma profile of organic wines*. European Food Research Technology, 246(7), 1405-1417.

Pino Torres, C.A. (2013). *Manual de Vitivinicultura Orgánica*. Trama Impresores S.A., Curicó, Región Del Maule, Chile.

SENASA (2021). *Situación de la Producción Orgánica en la Argentina durante el año 2020*. [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/file/1\\_situacion\\_de\\_la\\_po\\_en\\_la\\_argentina\\_ano\\_2020\\_0.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/file/1_situacion_de_la_po_en_la_argentina_ano_2020_0.pdf)  
Acceso: 09/12/2021.

Tofalo, R.; Schirone, M.; Telera, G.C.; Manetta, A.C.; Corsetti, A.; Suzzi, G. (2011). *Influence of organic viticulture on non-Saccharomyces wine yeast populations.*, Ann Microbiol. 61, 57-66.

Vilela-Moura, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., Silva, R. D., Chaves, S. R., Sousa, M. J., & Côrte-Real, M. (2011). *The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and wine quality: reduction of volatile acidity of grape musts and wines*. Applied microbiology and biotechnology, 89(2), 271-280.

Willer, H.; Lernoud, J. (eds) (2019). *The world of organic agriculture. Statics and emerging trends 2019*. Research Institute of Organic Agriculture FiBL, Frick and IFOAM-Organics International, Bonn.