



EL GUSTO DE RATÓN EN EL VINO, UN MÉTODO DE ANÁLISIS EFICAZ Y SUS PERSPECTIVAS

Antonio Palacios¹; Renouf Vincent²; Nicolato Tommaso²; David Carrillo¹

¹Laboratorios Excell Ibérica S.L. - C/ Planillo N°12, 26006 Logroño, La Rioja. ²Laboratoire Excell France, web: www.labexcell.es, tel. 941 451082

Con las nuevas modas de vinos menos intervenidos, es más frecuente evocar al gusto de ratón en los siguientes términos: “defecto sensorial que se está convirtiendo más que nunca en un tema central para la compra de muchas botellas de algunos vinos en particular”, “algunos vinos infectados ya no muestran rastro después de unos años de botella, aunque la mayoría de las veces prevalece lo contrario”. Aquí es donde radica el problema: el gusto a ratón aparece y desaparece de manera impredecible. Las botellas abiertas pueden estar deliciosas, y una hora más tarde, tener un final completamente mutado e inidentificable. Este hecho ilustra perfectamente la imprevisibilidad, difícil de describir con precisión, pero sin embargo cada vez más frecuentemente encontrada, que no es otro que el defecto organoléptico atribuido al gusto de ratón en los vinos. En el laboratorio Excell hemos constatado un aumento considerable del número de solicitudes para el diagnóstico del gusto a ratón, pero en un número muy significativo de casos la alteración organoléptica resultó causada por la presencia de compuestos distintos a los conocidos (ATHP, ETHP y APY) ¿No sería, por lo tanto, la alusión al gusto de ratón una afirmación de moda para describir ciertas alteraciones microbianas que son difíciles de identificar?

El tema no es simple porque incluye muchas interacciones. Lo más esencial es una buena identificación de las moléculas implicadas y sus vías de biosíntesis, y también las tecnologías analíticas implementadas para controlar su aparición. Siendo este último punto el preámbulo imprescindible para llevar a cabo pruebas consistentes. Sin embargo, pocos laboratorios hoy en día tienen técnicas analíticas lo suficientemente robustas como para analizar los compuestos conocidos hasta la fecha como los causantes del defecto en los vinos. De hecho, las propiedades químicas (y en particular los fenómenos de tautomería, y también ciertos aspectos de volatilidad y degradabilidad) hacen que sea particularmente difícil obtener suficiente precisión analítica. Dado que la dosificación de compuestos es delicada, rara vez se correlaciona en paralelo con la degustación. Esta es en parte la causa de las dificultades en torno a este tema.

Por lo tanto, el uso adecuado de la terminología “gusto a ratón” en la degustación sería casi tan delicado como la precisión del análisis de los compuestos por cromatografía, pero sigue siendo necesario un conocimiento sólido, porque en un contexto de limitación en la corrección del SO₂ en las bodegas modernas y la búsqueda de frutalidad y frescura, la existencia de tales defectos plantea problemas reales. El objetivo de este trabajo es recordar los principios fundamentales de esta alteración, describir los avances en términos analíticos y evocar ciertos hallazgos prácticos para tratar de ganar precisión al evocar este problema contemporáneo.

ASPECTOS GENERALES

Relegado durante mucho tiempo a eventos extremadamente raros, el tema del gusto a ratón ha regresado a la vanguardia de la escena enológica para quedarse durante algún tiempo. El fallo se debe probablemente a cambios en las prácticas de vinificación, como la disminución del contenido de sulfitos, pero también la gestión de las condiciones de oxidación-reducción o la evolución de los parámetros de la materia prima de las uvas, como es el pH entre otros factores. Pero antes de discutir todos estos aspectos técnicos, echar una mirada rápida hacia atrás es ciertamente necesario para entender cómo esta noción del gusto a ratón llegó a al mundo de la enología.

El nombre del defecto es controvertido ¿Quién se ha comido alguna vez un ratón? ¿Cómo y por qué apareció esta referencia en la semántica enológica? En 2016, un restaurante chino había hecho sonar el "zumbido público" en Internet al anunciar una receta de ratones vivos en un plato de ensalada que el cliente tenía que mojar con sus palillos en salsa de soja antes de probarla. En Estados Unidos, unos años antes, un estadounidense también había comido un cachorro vivo para impresionar a sus amigos y luego publicó un video en Facebook. ¡Al caer en manos de la policía, el hombre fue condenado por crueldad animal! Debemos ser respetuosos con la causa animal y sobre todo menos imprudentes para familiarizarnos con esta percepción en el caso del vino. Volviendo a sumergirse en los primeros escritos asociando el sabor de los ratones con la cata del vino, algunos trabajos evocaban notas "animales", "grasa ahumada" y otras referencias que se acercan a los olores percibidos durante la cocción del arroz basmati o de la preparación de las palomitas de maíz. Esta referencia es sin duda la más consistente, porque muchos estudios evocan a la presencia de los compuestos incriminados en los vinos en estas matrices y las piridinas que detallaremos a continuación incluso se han convertido en marcadores de control de calidad del arroz basmati en algunos procesos de producción del mismo.

En general, estos olores no aparecen en la primera olfacción durante la cata de los vinos, sino más bien al final de boca, en la retrolfacción de forma más precisa. La hipótesis más probable de este fenómeno fue rápidamente presentada por los equipos de investigación australianos que trabajan en el tema: los compuestos responsables no son lo suficientemente volátiles al pH del vino. Es necesario esperar hasta que la saliva eleve el pH para que estos compuestos se noten de forma olfativa. De modo que, a diferencia de otros compuestos, donde la diversidad en las percepciones entre catadores está relacionada con especificidades neuronales, la diferencia en la percepción de los gustos a ratón podría ser principalmente el resultado de las diferencias en la composición de la saliva y su pH entre las personas.

Estos aspectos han llevado al desarrollo de métodos para detectar y diagnosticar la contaminación, como poner unas gotas de vino en la mano con el fin de permitir que el pH de la piel permita que los compuestos se volatilicen y así hacer posible sentirlos más fácilmente. La adición de unas gotas de solución alcalina (bicarbonato de potasio) en el vino antes de la degustación también es una técnica practicada por algunos profesionales.

Estas técnicas son relativamente arriesgadas y, en cualquier caso, no sitúan realmente el vino en el contexto original de su cata. Aprovechemos también aquí para indicar que si la percepción de la contaminación no es inmediata durante la cata y que si se requiere de algunos artificios en la preparación de la muestra, también es una valiosa indicación las posibles interacciones con los equilibrios RedOX como fuente de variabilidad.

En este sentido, el reciente trabajo de Sophie Tempère en el ISVV ilustra perfectamente la dificultad relacionada con la percepción de estas moléculas por parte del catador. Al centrarse en el 2-APY, cuyo umbral de percepción indicado en el siguiente trabajo sobre el tema (HENDRICH *et al.* 1995) menciona 0,1 µg/L en agua y 7,1 µg/L en un vino contaminado, el trabajo del ISVV ha puesto de relieve la dificultad para que un panel de catadores se ponga de acuerdo sobre el umbral de percepción. De hecho, sin modificación del vino antes de la cata (pH=3,20), el umbral de percepción del 2-APY es de 55µg/L (50% del panel) pero modificando de forma controlada el pH (tamponado a pH 5,05) el umbral de percepción se reduce a 8,6 µg/L (50% del panel). En general, la degustación y los artificios implementados para facilitar la percepción de estos defectos son relativamente frágiles, por lo tanto, se requiere un método de dosificación preciso y sensible.



LA PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA ROBUSTA PARA CUANTIFICAR LOS COMPUESTOS IMPLICADOS

Desde el año 2018 se ha llevado a cabo un largo trabajo en el laboratorio Excell para desarrollar una tecnología de cuantificación lo suficientemente rigurosa como para comprender estos fenómenos, pero también para garantizar la atribución de la contaminación de estos compuestos. De hecho, encontramos que los vinos que llegaban al laboratorio como afectados por el gusto a ratón presentaban en una gran mayoría de los casos una diversidad microbiana atípica. Asimismo, aprovechamos este trabajo para realizar en estos vinos sospechosos alterados por el gusto a ratón, revisiones analíticas globales de metabolitos susceptibles de ser producidos, pero también parámetros físico-químicos (y en particular electroquímicos).

En la bibliografía, las tres moléculas identificadas como responsables del gusto al ratón son ATHP (acetiltetrahidropiridina), APY (acetilpirrolina) y EHP (etilpirrolina). Pero, desde un punto de vista químico, en realidad no son 3 moléculas sino 6, porque cada una existe en dos formas, una forma de imina y otra de enamina, la abundancia de cada una evoluciona en particular según el pH. Esto significa que el equilibrio tautomérico se desplaza cuando el pH varía, favoreciendo la presencia de una u otra forma. La forma predominante a pH básico es la forma de imina, que también es la más volátil y olorosa.

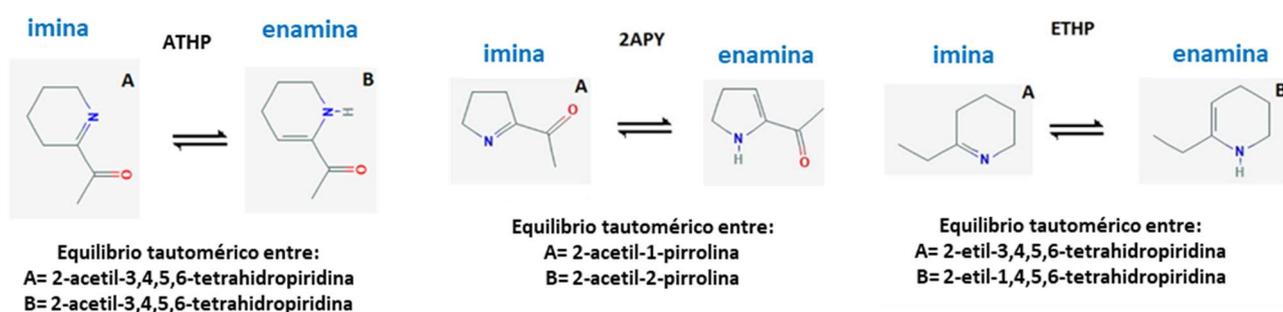


Figura 2. Ilustración de los equilibrios tautoméricos entre las formas imina y enamina de los 3 compuestos implicados.

Los equipos australianos que habían descrito estos fenómenos también habían propuesto un método para analizar estos compuestos por GCMS sin detallar las especificidades y la sensibilidad de la técnica. Más recientemente, se han propuesto otras técnicas apuntando a APY como una prioridad (un compuesto que también se encuentra con mucha frecuencia en el arroz basmati donde es un marcador cualitativo, como se mencionó anteriormente). Estas técnicas se basan en el uso de SPME junto con GCMS. Pero el calentamiento y el ajuste del pH de este método ciertamente influyen en las concentraciones a medir.



Figura 3. LC-ESI-MSMS utilizado para el desarrollo del método analítico Excell de 2APY, EHP y ATHP.

El trabajo más reciente realizado se orienta principalmente hacia el uso de cromatografía líquida acoplada a masas-masas en tándem (LCMSMS). Hayasaka *et al.* (2019) y Jost *et al.* (2019) proponen diferentes técnicas de ionización o derivatización, pero dirigidas a una sola molécula cada vez (respectivamente ATHP y 2APY). Después del trabajo de optimización en separación, ionización y detección logramos analizar cuantitativamente las 3 moléculas en un solo análisis. Asimismo, obtenemos un rendimiento analítico satisfactorio (umbral de detección, dominio de linealidad...) en comparación con los datos de la bibliografía en cuanto a los umbrales de percepción y concentraciones y esto sin modificación del pH de la muestra.

Desde principios de 2019 el laboratorio ya dispone por tanto de un método LC-ESI-MSMS rápido y robusto, sin modificación del pH de la muestra, lo que permite cuantificar de una sola tirada las tres moléculas ATHP, ETHP, 2APY con una buena sensibilidad y linealidad en los rangos de concentraciones relevantes para el análisis de vinos. La siguiente tabla muestra el rendimiento analítico del método de análisis.

	2APY	ATHP	ETHP
LD	0,4	0,4	1
LQ	1	1	3
I (%) a ~5 µg/L	12	12	19
I (%) a ~50 µg/L	5	3	5
Recuperación a ~40 µg/L %	115	117	117

Tabla 1: Funcionamiento analítico de la técnica LC-ESI-MSMS para analizar los compuestos conocidos por estar implicados en el gusto a ratón (2APY, ATHP, ETHP).

RETROALIMENTACIÓN A PARTIR DE LOS CASOS PRÁCTICOS

Una vez que se dispuso de la técnica analítica de los 3 compuestos, pudimos aprender con mayor precisión los casos descritos como contaminaciones por el gusto a ratón. La tabla 2 es una buena ilustración de los fenómenos generalmente observados, a saber:

- i) Una predominancia del ATHP y EHP sobre los 3 compuestos,
- ii) Hay poblaciones significativamente altas de *Brettanomyces bruxellensis*, pero también de *Oenococcus oeni*. Otras levaduras y bacterias estaban poco o nada presentes. Sólo el vino 3 también tenía algunos Lactobacilos de la especie *Lactobacillus plantarum* exclusivamente.
- iii) Niveles relativamente altos de fenoles volátiles, pero con una relación 4-etilfenol/4-etilguaicol diferente de la que generalmente se observa durante la contaminación convencional por parte de *Brettanomyces*. Incluso dependiendo de la variedad de uva, casi siempre es poco elevada y hay una mayor proporción significativa de 4-etilguaicol,
- iv) Notable contenido de nitrógeno asimilable.
- v) La presencia de ácido D-láctico evidencia el desarrollo de bacterias heterofermentativas del ácido láctico (como *Oenococcus oeni*) metabolizando azúcares.

Los puntos i), iii) y v) se confirman en la gran mayoría de los vinos analizados en el laboratorio, si no en todos. Además de los fenoles volátiles, en muchos vinos "mouseizados" se han detectado ácidos grasos de cadena corta, incluidos el ácido isovalérico y el isobutírico a niveles significativos (≥ 8 mg/L). A veces también se analizan aminas biogénicas y en este caso, no se trataba de histamina la principal amina que se suele encontrar en el vino, sino trazas de putrescina y cadaverina.

	Concentraciones moleculares de alteración ($\mu\text{g/L}$)					Nass (mg/L)	Ácido D-Láctico (g/L)	<i>B. bruxellensis</i> (Eq. UFC/ mL)	<i>O. oeni</i> (Eq. UFC/mL)
	2API	AYPH	ETPH	E4P	E4G				
Vino I	nd	4	22,6	273	181	47	0,22	$1,8 \cdot 10^4$	$4,2 \cdot 10^5$
Vino II	nd	7,5	136,7	350	141	64	0,26	$1,8 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^5$
Vino III	nd	1,1	46,5	27	5	41	0,27	$6,8 \cdot 10^2$	$1,8 \cdot 10^5$
Vino IV	nd	6,1	137,1	236	145	103	0,38	$6,3 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^6$

Tabla 2. Ejemplos de resultados obtenidos sobre una serie de vinos de Cabernet franc del Val de Loire de 3 productores diferentes de la uva 2018.

En cuanto a los microorganismos, su detección no siempre ha sido concomitante con el análisis, pero este es a menudo el caso durante el análisis de muchos defectos de origen microbiano. El análisis se realiza cuando el defecto ha alertado al catador, pero la producción podría haberse producido mucho antes bajo el efecto de microorganismos, que en el momento de la cata y a posteriori del análisis ya han desaparecido. Cuando se detectaron microorganismos, fue *Oenococcus oeni* en el 70% de los casos y *Brettanomyces* en el 60% (en el 30% de los casos convivían las dos poblaciones, así es en el vino 4 de la tabla). En cuanto a *Brettanomyces*, en varios casos se ha realizado el análisis conocido por el nombre del test TYP\Brett 2.0, un análisis para cuantificar específicamente las *Brettanomyces* resistentes al SO_2 (es decir, capaces de desarrollarse incluso cuando el SO_2 activo es superior a 0,4 mg/L). Mientras que en promedio el porcentaje representado por las cepas triploides de *Brettanomyces* resistentes al SO_2 es de aproximadamente del 55% del total de las muestras analizadas en el laboratorio. Los vinos afectados por ATHP y EHP y con poblaciones significativas de *Brettanomyces* tienen más del 80% de cepas sensibles al SO_2 .

La mayoría de estos análisis se realizan en vinos en proceso de envejecimiento o incluso en vinos embotellados. Sin embargo, el hecho de encontrar ácido D-láctico y/o ácidos grasos de cadena corta, aunque a veces no se detectó población microbiana en el momento del análisis, sugiere que la contaminación puede haber tenido lugar aguas arriba, especialmente cuando había trazas de azúcares residuales.

Es posible prever que es durante las fermentaciones, tal vez incluso cuando son un poco caóticas o lánguidas, cuando las bacterias del ácido láctico y/o *Brettanomyces* pueden hacer aparecer en estos momentos ATHP y EHP. De hecho, estos microorganismos que producen ácido D-láctico y ácidos grasos se beneficiarían de un exceso relativo del nitrógeno asimilable residual. Entre los compuestos nitrogenados, lisina, ornitina y prolina, son 3 aminoácidos que intervienen aguas arriba de las vías de biosíntesis, también (lisina y ornitina) son conocidos precursores de la cadaverina, una amina biógena a veces detectada en vinos con "gusto a ratón" como se indicó anteriormente. Todo sucedería en un entorno relativamente reductor, que podría enmascarar la percepción de los compuestos en la cata y solo sería más tarde, con un aumento en el potencial RedOX de los vinos, cuando la percepción se volvería significativa. Esta hipótesis basada en una relativa inestabilidad oxidativa de los vinos afectados se ve confirmada por el hecho de que durante las mediciones electroquímicas por voltamperometría lineal realizadas en estas muestras, el potencial de resistencia a la oxidación de los vinos con "gusto a ratón" resultó ser muy bajo en comparación con los valores habituales. En este razonamiento, el hecho de que los vinos sin SO₂ sean los más frecuentemente incriminados, resulta no solo de la ausencia del efecto antimicrobiano y, por lo tanto, protector del SO₂ sobre los microorganismos productores, sino también del efecto amortiguador del SO₂ sobre el potencial RedOX de los vinos (mantenimiento de un poder reductor). También es posible que durante la vinificación, debido a la presencia de compuestos de azufre producidos por levaduras fermentativas, se puedan formar aductos con los compuestos que luego aparecerán (con SO₂ también), limitando así su percepción organoléptica.

Con esto en mente, una de las recomendaciones para los vinos sujetos a problemas no sería asegurar las condiciones al final de la ruta, sino sobre todo gestionar bien el proceso de vinificación completo para evitar que estos microorganismos interfieran en la fermentación alcohólica o maloláctica. Por supuesto, estas son solo hipótesis, pero el hecho de poder tener una técnica de ensayo precisa y asociar con otros indicadores analíticos (diversos compuestos y análisis microbiológicos) y compararlos con los datos que generalmente se encuentran en vinos libres de problemas, proporciona una visión inicial muy válida e interesante (Tabla 3).

	Vinos normales	Vinos con "gusto a ratón"	Interpretación de diferentes hipótesis
Contenido medio de ácido D-láctico	< 0,1 g/L	≥ 0,2 g/L	La deriva microbiológica llega en un momento en el que las bacterias lácticas y <i>Brettanomyces</i> se encuentran con la presencia de azúcares
Contenido medio de ácido isovalérico y isobutírico	< 1 mg/L	Algunas veces > 8 mg/L	
Aminas biógenas	Muy raro. En todo caso histamina	Cadaverina y putrescina	La presencia de nitrógeno asimilable y netamente de ciertos aminoácidos (lisina y ornitina) favorecen el fenómeno
Nitrógeno residual	≤ 30 mg/L	≥ 40 y muchos caspos > 100	
Relación 4-etilfenol/4-etilguaicol	entre 4 y 10	≤ 3	Las cepas de <i>Brettanomyces</i> implicadas pueden ser diferentes de las que están presentes de forma habitual en el vino sin este defecto
% de <i>Brettanomyces</i> resistentes al SO ₂ (TYP/BRETT 2.0)	53%	< 20%	
Índice Global de Oxidabilidad (IGO)	110 µA	≤ 25 µA	Los vinos con "gusto a ratón" son vinos normalmente frágiles frente a la oxidación. La implicación del SO ₂ no estará únicamente relacionado con su efecto antimicrobiano.
Contenido medio de SO ₂ libre	≥ 20 mg/L	≤ 20 mg/L	

Tabla 3. Comparación entre los vinos sin defectos del tipo gusto a ratón y los que si lo tienen de diferentes indicadores analíticos e hipótesis que puedan diferenciarlos. Se trata de datos no exclusivos.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El objetivo de este artículo es incluir algunos datos de la bibliografía científica enológica y especificar los elementos necesarios para una determinación analítica de los tres compuestos conocidos e identificar ciertas posibles interacciones entre estos compuestos u otros metabolitos de alteraciones conocidas, con grupos de microorganismos y con los parámetros químicos de los vinos. Por supuesto, las hipótesis formuladas en el documento deben ser confrontadas por más seguimientos y pruebas adicionales que comienzan más bien antes de la detección sensorial de los posibles defectos. El método de ensayo desarrollado en el laboratorio Excell ahora permite llevar a cabo seguimientos precisos. En perspectiva también, no es improbable que otros compuestos estén involucrados. Por ejemplo, ATHP y 2APY son dos cetonas. Las cetonas son moléculas con una alta reactividad especialmente frente al SO₂ que presentan fenómenos de adición (formación de aductos de bisulfito) u oxidación. Para la ATHP, por ejemplo, la oxidación avanzada (cuando un vino que es altamente sensible a la oxidación y está extremadamente protegido del oxígeno se pone repentinamente en contacto con él) conduce a la formación de 2-acetilpiridina (AP). Esta molécula también parece ser un compuesto involucrado en el fenómeno y para el cual su analítica también está disponible a día de hoy.



Para información adicional

Cécile BERGIA : cbergia@labexcell.com – 33 (0)6 07 38 21 26
Vincent RENOUF : vrenouf@labexcell.com – 33 (0) 7 89 63 65 54
Antonio Tomás PALACIOS GARCÍA: apalacios@labexcell.es – 34 639 219022