



Desarrollo de cultivos iniciadores líquidos para la inducción de la fermentación maloláctica

Carmen Berbegal¹, Isabel Pardo¹, Eva Navascués², Sergi Ferrer¹

¹ENOLAB. Dpto. de Microbiología y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Valencia. Campus de Burjassot, 46100, Valencia, e-mail: carmen.berbegal@uv.es

²Agrovin S.A., Polígono Industrial Alces, 13600, Alcázar de San Juan, Ciudad Real

Resumen

Desde el punto de vista de las propiedades organolépticas, la fermentación maloláctica (FML) puede contribuir a mejorar distintos aspectos de la calidad del vino. Una de las posibles prácticas para desarrollar esta fermentación consiste en inducirla mediante la inoculación de cultivos seleccionados de bacterias lácticas (BL). El objetivo de este proyecto ha sido el desarrollo de un sistema de producción de cultivos líquidos de *Oenococcus oeni* aptos para su aplicación industrial directa. Con este fin se ha realizado una selección de cepas de *O. oeni* y se ha diseñado un medio de cultivo que permita alcanzar la máxima biomasa posible y la actividad maloláctica de las células, teniendo en cuenta las condiciones óptimas de crecimiento. Del mismo modo se han estudiado las condiciones de producción óptimas para *O. oeni* y su empleo en vino, llegando finalmente a la producción a escala industrial.

Palabras clave: cultivo iniciador líquido, selección, fermentación maloláctica, *Oenococcus oeni*, producción industrial.

1. Introducción

La FML es fundamental para la calidad del vino, especialmente en los vinos tintos. En este proceso se produce la transformación del ácido málico, en ácido láctico. Esta fermentación es llevada a cabo por BL [1, 2, 3], pero no siempre se realiza en el momento adecuado ni en condiciones óptimas, ya que son muchos los factores que influyen en su crecimiento y desarrollo [4]. Por ello, existen varias estrategias para controlar la fermentación de forma adecuada. Una de ellas consiste en la inducción de esta con la inoculación de BL seleccionadas, principalmente con cepas de *Oenococcus oeni* [1, 5, 6, 7]. Se trata de aportar al vino una elevada población de bacterias, de forma que se asegure el completo desarrollo de la FML y se controle la calidad a través de la naturaleza y cantidad de los productos secundarios formados por las cepas seleccionadas. Estos cultivos iniciadores pueden presentarse en forma de cultivos líquidos o liofilizados, listos para ser añadidos al vino. La inoculación mediante cultivos iniciadores líquidos presenta numerosas ventajas, ya que de esta forma no es necesario hidratar las células, la adición del cultivo es rápida, fácil y presenta una sencilla homogenización. Además, de esta manera las bacterias están metabólicamente activas, preparadas para desempeñar su papel en el vino y una ventaja muy interesante es la posibilidad que brinda este sistema de realizar producciones de cepas a la carta y de diferentes volúmenes. En el presente proyecto se ha evaluado la viabilidad del empleo de cultivos líquidos de cepas autóctonas de la bacteria *O. oeni* en la inducción de la FML. Para ello es necesario partir de cepas previamente seleccionadas y correctamente identificadas. Una vez seleccionadas las cepas, se deben diseñar los medios de cultivo adecuados para las necesidades de la BL. Además, hay que estudiar las condiciones de producción óptimas para esas células y su empleo en vino, llegando finalmente a la producción a escala industrial.

2. Material y Métodos

2.1 Aislamiento y selección de cepas de *O. oeni* a partir de mostos y vinos con FML espontánea.

Con el fin de aislar y seleccionar cepas de *O. oeni* se analizaron microbiológicamente distintas muestras de vino tinto de calidad con FML espontánea de diferentes Denominaciones de Origen que presentaban interés por sus características particulares, como niveles de pH bajo y alto grado alcohólico. Se procedió a la siembra de diferentes diluciones seriadas de cada muestra de vino en placas de distintos medios de cultivo para BL (MRS de Scharlab, MLO [6]). La identificación de los diferentes aislados fue realizada mediante el análisis 16S-ARDRA [7] y las especies identificadas como *O. oeni* mediante esta técnica fueron caracterizadas a nivel de cepa mediante la técnica RAPD [8]. Las cepas de *O. oeni* obtenidas a partir de los aislados de vino se sometieron a un proceso de selección junto a un grupo de cepas de *O. oeni* pertenecientes a la colección de BL de nuestro laboratorio (ENOLAB). Este proceso se llevó a cabo siguiendo unos criterios para elegir las mejores desde el punto de vista de actividad maloláctica, teniendo en cuenta, entre otros, la capacidad de crecer y desarrollar la FML a bajos niveles de pH y alto grado alcohólico. Con el objetivo de realizar los diferentes ensayos de selección a numerosas cepas simultáneamente se trabajó con cultivos en microplacas y con un lector de microplacas, facilitando así el procesado y análisis de los cultivos.

1.2 Diseño de un medio de cultivo adecuado para *O. oeni*

Una vez seleccionadas las mejores cepas de *O. oeni* desde el punto de vista de actividad maloláctica, se procedió al diseño de un medio de cultivo con el fin de conseguir el mayor rendimiento alcanzando los máximos niveles de biomasa posibles con una óptima actividad metabólica y viabilidad en vino. Con este objetivo se analizaron distintas composiciones de medios de cultivo, diferentes pH, niveles de etanol y temperaturas de incubación.

1.3 Escalado del proceso

Una vez diseñado el medio de cultivo apropiado, se procedió al escalado del proceso para obtener cantidades de biomasa suficientes para probar su viabilidad en grandes volúmenes. Con este objetivo se elaboró un cultivo madre con el fin de acomodar las bacterias a las condiciones óptimas, activarlas y que actúen como primer inóculo en el escalado industrial de la producción de biomasa de *O. oeni*. Para ello se utilizó un volumen de 50 mL de medio de cultivo. En él, se cultivó la cepa de *O. oeni* seleccionada a 28 °C hasta alcanzar una población pura de 2×10^9 ufc/ mL. Alcanzada esa concentración se realizó un pase a un volumen de 625 mL de medio de cultivo. Este precultivo se incubó durante 96 horas a 28° C, sin agitación. Transcurrido este tiempo se inoculó el cultivo de 625 mL en 12.5 L de medio estéril presente en un biorreactor de 22 L (Biostat, B.Braun Biotech) y se incubaron durante 72 horas a 28° C con una agitación mínima de 25 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación se inocularon los 12.5 L en un biorreactor de 250 L (Biostat, B.Braun Biotech) que contenía 250 L de medio y se incubó durante 53 horas.

Con el fin de llevar un control de del proceso, se llevó a cabo un examen de esterilidad de los medios de cultivo de los diferentes fermentadores en medios sólidos MLO [6], NA [9], MRS de Scharlab y GPYA [9] y un seguimiento de la viabilidad y pureza del cultivo tras cada etapa de producción en medio sólido MLO [6].

1.4 Inoculación en vino

Con el fin de comprobar la capacidad de implantación de la cepa seleccionada y la viabilidad de ésta tras la producción de biomasa a gran escala, se inoculó el cultivo iniciador líquido producido en vinos de las Denominaciones de Origen Penedés, Bierzo y Cambados. Tras la FML se estudió si la cepa seleccionada había sido capaz de implantarse en este vino, analizando las muestras mediante la técnica molecular de RAPD [8].

3. Resultados y Conclusiones

3.1 Aislamiento y selección de cepas de *O. oeni* a partir de mostos y vinos con FML espontánea

Se consiguieron identificar y tipificar mediante las técnicas 16S-ARDRA [7] y RAPD [8] un grupo heterogéneo de cepas de *O. oeni* procedentes de diferentes muestras de vino para ser caracterizadas y sometidas a los ensayos de selección.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

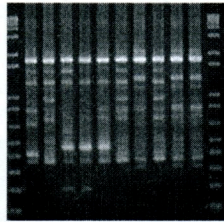


Fig. 1 RAPD de diferentes aislados de *O. oeni*. Carreras 1 y 12: 1 KB plus ladder (Invitrogen). Carreras 2-11: aislados de *O. oeni* procedentes de distintas muestras de vino.

La utilización de microplacas ha permitido de una forma sencilla, a través de la medición de la variación de la absorbancia (A_{600}) a lo largo del tiempo, caracterizar todas las cepas y descartar aquéllas que no presentaban las características de interés para ser utilizadas como cultivos iniciadores.

3.2 Diseño de un medio de cultivo adecuado para *O. oeni*

Tras los diferentes ensayos se consiguió diseñar un medio de cultivo que permitiera la obtención de grandes volúmenes de biomasa de la bacteria *O. oeni* teniendo en cuenta las condiciones óptimas de crecimiento pero sin perder de vista las características que presentan los vinos para que al ser inoculada no pierda viabilidad llegando a un equilibrio entre las condiciones óptimas de crecimiento, metabólicas y viabilidad en vino.

3.3 Escalado del proceso

Los resultados de los controles de esterilidad durante la producción de biomasa, confirmaron la seguridad del proceso ya que ninguno de los medios empleados en la producción de biomasa presentaba contaminación por otros microorganismos (Ver tabla 1).

Tabla 1. Resultados de los recuentos de microorganismos totales y viables presentes en el medio de producción estéril.

		7 días/ 28° C				
	Medios producción	Rto. totales (ufc/ mL)	Placa MLO (ufc/ mL)	Placa NA (ufc/ mL)	Placa MRS (ufc/ mL)	Placa GPYA (ufc/ mL)
Control de esterilidad	625 mL	<1x10 ⁻²	<1x10 ⁻²	<1x10 ⁻²	<1x10 ⁻²	<1x10 ⁻²
	12.5 L	<1x10 ⁻²	<1x10 ⁻²	<1x10 ⁻²	<1x10 ⁻²	<1x10 ⁻²
	250 L	<1x10 ⁻²	<1x10 ⁻²	<1x10 ⁻²	<1x10 ⁻²	<1x10 ⁻²

Como muestran los resultados de la tabla 2, la viabilidad en las diferentes etapas del proceso de producción es satisfactoria, presentando siempre valores superiores al 80% respecto al recuento de totales.

Tabla 2. Resultados de los recuentos de bacterias totales y viables presentes en las diferentes etapas de producción.

Medio de producción	Viables (ufc/mL)	R. totales (ufc/mL)	% viabilidad
Cultivo 625 mL	8.5x10 ⁸	1x10 ⁹	85%
Cultivo 12.5 L	8.5x10 ⁸	8.5x10 ⁸	100 %
Cultivo 250 L	8 x10 ⁸	1.1x10 ⁹	80 %

3.4 Inoculación en vino

Los resultados mediante la técnica molecular de RAPD mostraron que la cepa seleccionada se implantó en los tres tipos de vino. Como se observa en la figura 3, en este caso aparece una población de *O. oeni* autóctona (Carreras 10, 11 y 12), pero predomina la cepa inoculada ya que el 80% de los perfiles coinciden con el perfil de la cepa seleccionada (Carrera 2). En los dos otros vinos la cepa inoculada mostró una implantación del 100% ya que todos los perfiles de RAPD de los diferentes aislados coinciden con el perfil de la cepa inoculada (Ver figuras 4 y 5).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

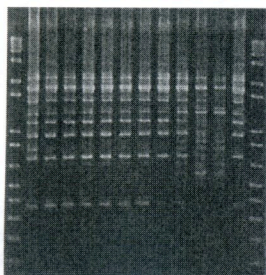


Fig. 3 RAPD de diferentes aislados de *O. oeni*. Carreras 1 y 14: 1 KB plus ladder (Invitrogen). Carrera 2: Cepa control inoculada. Carreras 3-13: aislados de *O. oeni* de vino.

1 2 3 4 5 6 7

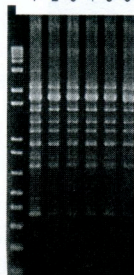


Fig. 4 RAPD de diferentes aislados de *O. oeni*. Carreras 1 y 14: 1 KB plus ladder (Invitrogen). Carrera 2: Cepa control inoculada. Carreras 3-8: aislados de *O. oeni* de vino.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

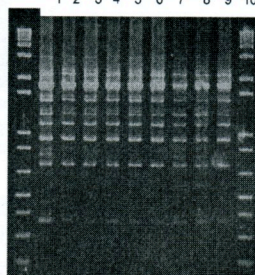


Fig. 5 RAPD de diferentes aislados de *O. oeni*. Carreras 1 y 14: 1 KB plus ladder (Invitrogen). Carrera 2: Cepa control inoculada. Carreras 3-13: aislados de *O. oeni* de vino.

Los estudios mostraron que el proceso diseñado para desarrollar un cultivo iniciador líquido de *O. oeni* permitieron obtener una gran biomasa final y el producto mostró una alta viabilidad. Del mismo modo el proceso de producción permitió a las bacterias estar metabólicamente activas y preparadas para implantarse en el vino, realizando la FML y desplazando a la población autóctona.

4. Bibliografía

- Liu, S.-Q. 2002. Malolactic fermentation in wine- beyond deacidification. *J. Appl. Microbiol.* 92: 589-601
- Lonvaud-Funel, A. 1995. Microbiology of the malolactic fermentation: molecular aspects. *FEMS Microbiol. Lett.* 126: 209-214
- Wibowo, D., Fleet, G.H., Lee, T.H. y Eschenbruch, R.E. 1988. Factors affecting the induction of malolactic fermentation in red wines with *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Microbiol.* 64: 421-428.
- Buckenhüskes, H.J. 1993. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 253-272.
- Maicas, S. 2001. The use of alternative Technologies to develop malolactic fermentation in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:35-39.
- Maicas, S., Natividad, À., Ferrer, S. y Pardo, I. 2000. Malolactic fermentation in wine with high densities of non-proliferating *Oenococcus oeni*. *World J. Microb. Biotechnol.* 16: 805-810.
- Rodas, A. M., Ferrer, S. y Pardo, I. 2003. 16S-ARDRA, a tool for Identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 412-422.
- Zapparoli, G., Reguant, C., Bordons, A., Torriani, S., y Dellaglio, F. 2000. Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNAPCR. *Curr. Microbiol.* 40: 351-355.
- Belloch, C., López, L., Esteve, B., Martínez, P. V., G^a-López, M. D., Uruburu, F. 1998. Catálogo de cepas. CECT.

5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CENIT-2008 1002, una beca V segles Universitat-Empresa de la Universitat de València, y Agrovin S. A.