

# SEGUIMIENTO DE LA FLORA MALOLACTICA EN MOSTOS y VINOS ROSADOS DE LA DENOMINACION DE ORIGEN UTIEL-REQUENA

Pardo, I.; García, M. J.; Zúñiga, M.; Rodrigo, J.; Belenguer, P., y Uruburu, F.

Departamento Microbiología.  
Facultad de Ciencias Biológicas.  
Universidad de Valencia.

## RESUMEN

En el presente estudio se ha analizado la evolución del número total de bacterias lácticas así como la sucesión de las distintas especies durante la vinificación. Se tomaron muestras de mostos rosados procedentes de la variedad Bobal y de la variedad Tempranillo.

En ambos casos se observa una disminución del número inicial de bacterias lácticas y luego una posterior recuperación, siendo ésta muy pequeña en el caso de Bobal por contener una dosis más elevada de  $\text{SO}_2$  y mucho mayor en el caso de Tempranillo donde se logra completar la fermentación maloláctica. En mostos frescos se encontró una gran variedad de especies, sin embargo conforme progresa la fermentación se produce una selección, siendo *Leuconostoc oenos* y *Lactobacillus hilgardii* los que se aislaban en vinos terminados con o sin fermentación maloláctica en marcha.

## SUMARY

This study shows the evolution of the lactic acid bacteria population, and the succession of different species throughout the fermentation process. We sampled rosé musts obtained from Bobal and Tempranillo varieties.

In both kinds of fermentation we observed an initial decrease in the numbers of lactic acid bac-

teria, and then an increase. This rise was very little in Bobal fermenting must because its  $\text{SO}_2$  concentration was greater than in the Tempranillo one. However, in Tempranillo the population increase was very high and allowed the malolactic fermentation. There was a species selection during the fermentation. *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus hilgardii* being the only species that we isolated in finished wines with or without malolactic fermentation.

## INTRODUCCION

Las bacterias lácticas son importantes en el proceso de vinificación dado que afectan a la calidad del vino, con las implicaciones económicas que de ello se derivan. Esto se debe especialmente a que son las responsables de que se dé en éste un fenómeno de gran interés: la fermentación maloláctica (F.M.).

La F.M. es un proceso que consiste en la degradación del ácido L-málico a L-láctico y  $\text{CO}_2$ . La fermentación maloláctica se considera beneficiosa por tres razones: descenso de la acidez, aumento de la complejidad organoléptica del vino y mayor estabilidad microbiológica (2).

Las bacterias lácticas forman parte de la microflora natural del mosto, estando presentes inicialmente en baja concentración (3,4,5). Si las circunstancias son favorables para su crecimiento, crecerán en el vino hasta alcanzar una población suficiente para dar lugar a una F.M. espontánea. Sin embargo, en

algunas ocasiones, la F.M. puede tardar considerablemente en producirse (1). Resulta de gran importancia resolver esta incertidumbre en el comienzo de la F.M. debido a las pérdidas económicas que puede ocasionar una mala estabilización microbiológica. Esto ha generado gran interés en la investigación de métodos de inducción de la F.M. por inoculación de cultivos puros seleccionados.

En la región Utiel-Requena se producen vinos de elevada acidez, en los que existen dificultades para que se produzca una F.M. espontánea. De aquí la necesidad de estudiar métodos que permitan controlar y potenciar el proceso.

Con el objeto de intentar una mejora en la calidad de los vinos de la Denominación Origen Utiel-Requena, nuestra línea de trabajo estudió la evolución de la flora maloláctica a lo largo del proceso de vinificación.

## MATERIAL Y METODOS

### Aislamiento y recuento

Se realizaron muestreos a lo largo de la vinificación de un vino rosado procedente de uvas de la variedad Bobal, predominante en esta Denominación de Origen. El muestreo se llevó a cabo a lo largo de la vinificación en las siguientes fases:

Fase I: Densidad de entrada. Mosto sin sulfitar.

Fase II: Densidad relativa a 20 °C 1,040.

Fase III: Densidad relativa a 20 °C 1,020.

Fase IV: Densidad relativa a 20 °C 1,000.



Fase V: Muestra de vino tras el primer trasiego y adición de 20 mg/l SO<sub>2</sub>

Asimismo, se tomaron muestras de la vinificación de otro vino rosado procedente de la variedad de uva Tempranillo. El muestreo se llevó a cabo en las siguientes fases:

Fase I: Densidad de entrada. Mosto sin sulfitar.

Fase II: Densidad relativa a 20 °C 1,040.

Fase III: Densidad relativa a 20 °C 1,000.

Fase IV: Muestra tomada inmediatamente antes del primer trasiego.

Fase V: Muestra de vino tras el primer trasiego y adición de 20 mg/l SO<sub>2</sub>.

Se eligió como sistema de aislamiento el de enriquecimiento en tubo. Para ello se utilizó medio MRS modificado (6) adicionado de pimaricina (7). Dado que interesaba saber la evolución del número de microorganismos a lo largo de la fermentación, y que el enriquecimiento no lo permite, incorporamos a este sistema el recuerdo de microorganismos por la técnica del Número Más Probable (NMP) (8) en medio selectivo. Se prepararon tubos con MRS modificado. Las muestras de mostos y vinos se diluyeron convenientemente y se sembró 1 ml de las diluciones en los tubos con el medio por triplicado. Se incubaron a 28 °C de 3 a 5 días. La presencia de bacterias lácticas se detectó por crecimiento en los tubos. Se confirmó su existencia por observación microscópica y siembra en placa de MRS a 28 °C y en anaerobiosis.

#### Identificación

De todas las colonias obtenidas en cada placa se escogieron aquellas que reunían las siguientes condiciones:

- A) Morfología bacteriana bacilar o cocácea.
- B) Inmovilidad.
- C) Gran positivo.
- D) Catalasa negativo.

Estas bacterias se consideraron bacterias lácticas y se conservaron en agar MRS semisólido (Oxoid) y se liofilizaron.

La clasificación de las cepas aisladas se realizó siguiendo los criterios del «Bergey's Manual of Systematic Bacte-

riology» (9) y de Sharpe (10). Debido al hecho de que las cepas provenían de mostos y vinos, se completó la caracterización de las mismas utilizando aquellas pruebas utilizadas por otros autores que han aislado bacterias lácticas a partir de las mismas fuentes (11,12).

## RESULTADOS Y DISCUSION

La bibliografía consultada nos muestra que a lo largo de la vinificación se produce una evolución del número y de las especies. Las experiencias realizadas por nosotros en las variedades Bobal y Tempranillo han corroborado estas observaciones.

En mostos recién estrujados y sin sulfitar (Fase I), de las dos variedades citadas (Figuras 1 y 2), se encontraron cantidades moderadas de bacterias lácticas. En cuanto a especies, en uno de los tanques muestreados de la variedad Bobal (N2) se encontraron, únicamente, cepas

pertenecientes a la especie *Lactobacillus plantarum*, mientras que en muestras tomadas en la misma fase pero en otro tanque de fermentación (N3), aparecieron solamente lactobacilos heterofermentativos: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus cellobiosus* y una especie todavía no identificada de *Lactobacillus*. De la misma forma, en el mosto de Tempranillo sólo encontramos dos cepas pertenecientes a la especie *Lactobacillus brevis* (Tabla 1). Esto podría ser debido a que el medio de enriquecimiento utilizado favorecía el crecimiento de aquellas especies predominantes, impidiendo así el desarrollo de las restantes.

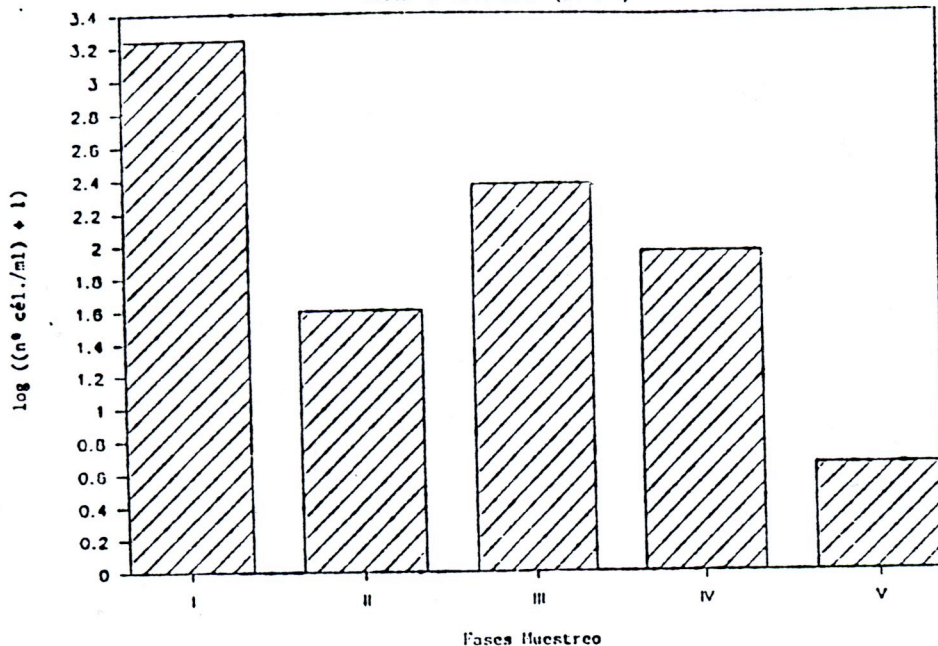
Durante la fermentación alcohólica (Fases II y III) el número de bacterias lácticas descendió notablemente en ambos casos (Figuras 1 y 2). Concretamente, en la Fase II tanto de Bobal como de Tempranillo no fue posible realizar ningún aislamiento en placa ya que el número de bacterias lácticas era

TABLA 1  
Especies halladas en las distintas variedades de uva a lo largo de las diferentes fases de vinificación

Variedad de uva	Cepa	Especie	Fase
Bobal	N2-2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	I
	N2-4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
	N2-5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
	N2-7	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
	N3-1	<i>Lactobacillus sp.</i>	
	N3-2	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	
	N3-3	<i>Lactobacillus brevis</i>	
	N3-4	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	
	N3-5	<i>Lactobacillus brevis</i>	
	N3-6	<i>Lactobacillus brevis</i>	
	N3-7	<i>Lactobacillus brevis</i>	
	N3-8	<i>Lactobacillus brevis</i>	
	N3-9	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	
N9-1	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	III	
N9-3	<i>Lactobacillus hilgardii</i>		
Bobal	N16-1	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	IV
	N16-2	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	
	N16-3	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	
Bobal	N17-1	<i>Leuconostoc oenos</i>	V
	N17-2	<i>Leuconostoc oenos</i>	
Tempranillo	TempI-1	<i>Lactobacillus brevis</i>	I
	TempI-2	<i>Lactobacillus brevis</i>	
	TempIV-6	<i>Leuconostoc oenos</i>	IV
Bobal	G1	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	Vino terminado
	G7	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	
	G6	<i>Leuconostoc oenos</i>	

## EVOLUCION NUMERO DE BACTERIAS LACTICAS

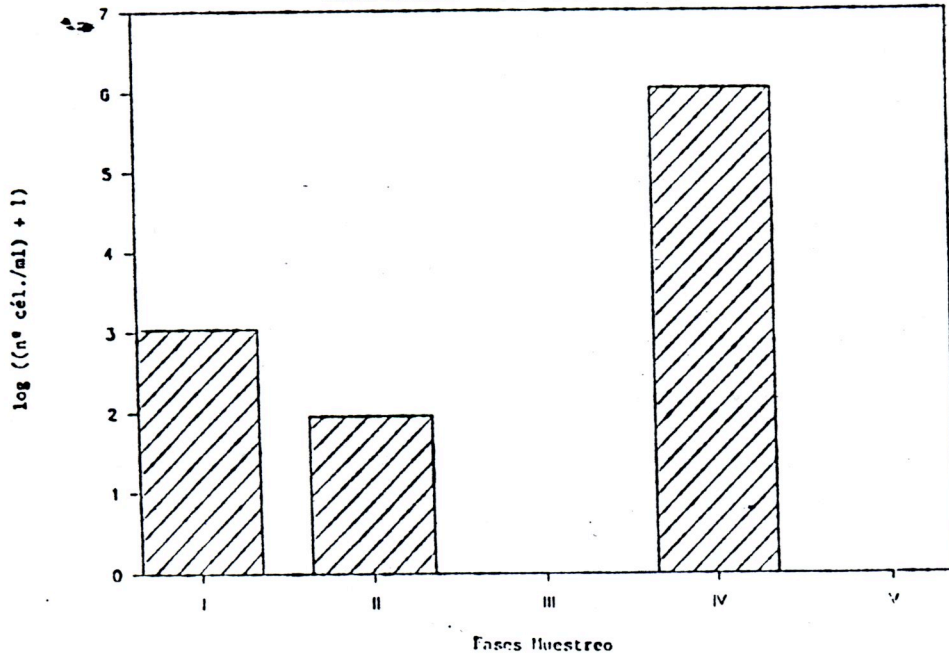
Mosto variedad Bobal (Serie N)



**Figura 1.** Evolución del número de bacterias lácticas en la vinificación del mosto Bobal. Los muestreos se realizaron en fermentadores diferentes para cada fase, por ello la representación es discontinua.

## EVOLUCION NUMERO DE BACTERIAS LACTICAS

Mosto variedad Tempranillo (Serie Temp)



**Figura 2.** Evolución del número de bacterias lácticas de un tanque de fermentación durante la vinificación del mosto Tempranillo. En la fase III no se pudo realizar muestreo. La FM se dio durante la fase IV.



sumamente bajo. Algo semejante fue observado por Costello *et al.* (5). En la Fase III no se pudo realizar el muestreo de Tempranillo, y en Bobal se dio una predominancia de *Lactobacillus hilgardii*, no apareciendo ninguna cepa de otra especie (Tabla 1).

Al final de la fermentación alcohólica (Fase IV) se encontraron diferencias en cuanto al número y especies halladas en Tempranillo y Bobal. Mientras en Tempranillo el número de bacterias lácticas aumentó considerablemente alcanzándose del orden de  $10^6$  células/ml (Figura 2), en Bobal se encuentran en número muy bajo. En Tempranillo se produjo la F.M. en este momento, mientras en Bobal no se dio. Por otro lado, la especie predominante, y que por tanto, es muy probable que llevara a cabo la F.M. en Tempranillo, era *Leuconostoc oenos*. En Bobal, en cambio, predominaron cepas de *Lactobacillus hilgardii* (Tabla 1).

En el último muestreo realizado, tras el primer trasiego y con una nueva adición de  $SO_2$  (Fase V), en Bobal aparece la especie *Leuconostoc oenos* en muy bajo número (Figura 1), desapareciendo *Lactobacillus hilgardii*. En Tempranillo no se detectó presencia de bacterias lácticas en esta fase (Figura 2).

En vino terminado de la variedad Bobal se aislaron tres cepas, dos de ellas pertenecientes a *Lactobacillus hilgardii* y la restante a *Leuconostoc oenos*.

Al igual que las levaduras, las bacterias lácticas, aunque en menor número que aquéllas, se encuentran representadas en el mosto por una gran variedad de especies con mayor o menor predominancia de organismos homo o heterofermentativos dependiendo del tipo de vino e incluso de la región de origen (14). Según avanza la fermentación alcohólica se produce una selección de especies de bacterias lácticas (15), provocada por las condiciones desfavorables del medio (concentración de etanol,

$SO_2$  añadido, competencia con levaduras, etc.), en favor de las especies que resisten mejor dichas condiciones (*L. hilgardii* y *L. oenos*) (16,2).

La distinta evolución observada en Bobal es atribuible al tratamiento a que se sometió el mosto. Se añadieron 120 mg/l de  $SO_2$ , lo que resultó en un descenso muy considerable del número de células en comparación con el mosto de Tempranillo donde sólo se añadieron 70 mg/l. Esto pone de manifiesto el efecto inhibitorio que ejerce el  $SO_2$  sobre la F.M. (15).

A pesar de que muchas especies de bacterias lácticas son capaces de realizar la F.M., y de hecho se ha descrito que la realizan en ciertas regiones, *Leuconostoc oenos* está considerada como la bacteria maloláctica por excelencia, bien porque generalmente es la que lleva a cabo la F.M. (1,6,17,2), bien porque las especies de *Lactobacillus* y *Pediococcus* que en ocasiones la realizan, se encuentran asociadas con enfermedades del vino que se pueden dar después de esta fermentación. Así, en Tempranillo encontramos un elevado número de bacterias lácticas durante la F.M. que corresponden a *L. oenos*: sin embargo, en el muestreo del vino terminado (serie G), encontramos tanto *L. hilgardii* (asociada con enfermedades del vino) como *L. oenos*. Esto está en concordancia con lo establecido por Maret y Sozzi (19). Resultados obtenidos posteriormente en laboratorio nos indican que la cepa de *L. oenos* fue el microorganismo responsable de la F.M. en este vino, ya que resultó ser más activa a la hora de realizar dicha fermentación que las otras dos cepas, que resultaron prácticamente inactivas. Por otra parte, es de señalar que este vino obtuvo el primer premio en un concurso de vinos rosados valencianos, por lo que pensamos que la presencia de *Lactobacillus hilgardii*, en este caso al menos, no ha provocado ninguna enfermedad.

## BIBLIOGRAFIA

- Rankine, B. C. (1977): *Am. J. Enol. Vitic.*, 1:27-33.
- Wibowo, D.; Eschenbruch, R.; Davis, C. R.; Fleet, G. H., y Lee, T. H. (1985): *Am. J. Enol. Vitic.*, 4:302-313.
- Fleet, G. H.; Lafon-Lafourcade, S., y Ribèreau-Gayon, P. (1984): *Appl. Environ. Microbiol.* 11:1034-1038.
- Lafon-Lafourcade, S.; Carre, E., y Ribèreau-Gayon, P. (1983): *Appl. Environ. Microbiol.* 43 (4): 874-80.
- Costello, P. J.; Morrison, G. J.; Lee, T. H., y Fleet, G. H. (1983): *Food Technol. Aust.*, 35 (1): 14-18.
- Ribèreau-Gayon, J.; Peynaud, E.; Sudraud, P., y Ribèreau-Gayon, P. (1975): *Traité d'Oenologie et Techniques du Vin*, tomo 2, Dunod, Paris.
- Lafon-Lafourcade, S., y Joyeux, A. (1979): *Conn. Vigne Vin*, 4:295-310.
- Thatcher, F. S., y Clark, D. S. (1973): *Análisis Microbiológico de los Alimentos*, Ed. Acribia, Zaragoza.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2 (1986), Sneath, P. H.; Mair, N. S., y Sharpe, M. E. (eds.), Williams and Wilkins, Baltimore.
- Sharpe, M. E. (1979): «Identification of Lactic Acid Bacteria», *Identification Methods for Microbiologists*, 2nd Ed. F. A. Skinner and D. W. Lovelock (eds.), págs. 233-59, Academic Press, Londres.
- Chalfan, Y.; Goldberg, I., y Mateles, R. I. (1977): *J. Food Sci.*, 4:939-943.
- Garvie, E. I. (1967): *J. Gen. Microbiol.*, 48:431-438.
- Claus, D.; Lack, P., y Neu, B. (1983): *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen*, Göttingen.
- Benda, I. (1982): «Wine and Brandy», *Prescott Dunnis Industrial Microbiology*, 4th Ed. G. Reed (ed.), págs. 293-402, AVI Publishing Co., Westport, C. T.
- Lafon-Lafourcade, S., y Ribèreau-Gayon, P. (1984): «Developments in the Microbiology of Wine Production», *Progress in Industrial Microbiology*, págs. 1-45, Elsevier Sci. Publish., Amsterdam.
- Kunkee, R. E. (1967): «Malo-lactic Fermentation», *Adv. in Applied Microbiology*, págs. 235-279, Academic Press Inc., N. Y.
- Beelman, R. B., y Gallander, J. F. (1979): *Adv. in Food Research*, 25:1-53.
- Maret, R., Sozzi, T. (1979): *Ann. Technol. Agric.*, 28:31-40.
- Kunkee, R. E.; Ough, C. S., y Amerine, M. A. (1964): *Am. J. Enol. Vitic.*, 15:178-183.
- Castino, M.; Usseglio-Tomasset, L., y Gandini, A. (1975): *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Foods*, J. G. Carr, C. W. Cutting y G. C. Whiting (eds.), Academic Press, Londres, págs. 139-48.
- Davis, C. R.; Wibowo, D.; Eschenbruch, R.; Lee, T. H., y Fleet, G. H. (1985): *Am. J. Enol. Vitic.*, 36:290-301.
- Fornachon, J. C. M. (1963): *J. Sci. Food Agric.*, 14:857-862.