

Conservación de células de *O. oeni* en lías procedentes de vino tinto

Carmen Berbegal¹, Sergi Ferrer¹, Eva Navascués², Isabel Pardo¹

¹ ENOLAB. Dpto. de Microbiología y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Valencia. Campus de Burjassot, 46100, Valencia. Tf: 963544518. e-mail: carmen.berbegal@uv.es

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

Resumen

Una de las estrategias más utilizadas para llevar a cabo la Fermentación Maloláctica (FML) es mediante la inoculación de bacterias lácticas (BL), principalmente cepas de *Oenococcus oeni*. El objetivo de este trabajo fue el estudio de la supervivencia de las bacterias en las lías procedentes de vino tinto y su conservación en la mismas. Con este fin, se inoculó una cepa de *O. oeni* en tres lías de Tempranillo y se observó la viabilidad al cabo del tiempo y su actividad maloláctica tras su conservación en las lías. El análisis puso de manifiesto que la mayor diferencia de viabilidad en las diferentes lías se debía al contenido en polisacáridos, obteniéndose mejor respuesta en las lías con mayor contenido. Los resultados revelaron que las bacterias conservadas en las lías con mayor proporción de polisacáridos mantenían la actividad maloláctica y la viabilidad en muy buen estado, y fueron capaces de crecer en vino y de realizar la FML.

Palabras clave: *Oenococcus oeni*, conservación, lías, fermentación maloláctica, cultivo iniciador.

1. Introducción

La fermentación maloláctica (FML) es un proceso de interés para la elaboración de distintos tipos de vino realizado por bacterias lácticas (BL) (1, 2, 3); los vinos tintos que se dedican a crianza son los que más beneficiados resultan de este proceso. Desde el punto de vista de propiedades organolépticas, la FML puede contribuir a mejorar distintos aspectos de la calidad de estos vinos. Una de las posibles prácticas para desarrollar la FML consiste en inducirla mediante inoculación de cultivos iniciadores de BL (4, 5, 6, 7), principalmente con cepas de *Oenococcus oeni*. 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.

Las lías de vino se han utilizado tradicionalmente como un sistema de conservación de microorganismos en las bodegas, utilizándose como cultivo madre de un año tras otro. Estas lías contienen nutrientes y un ambiente favorable para la supervivencia de los microorganismos durante largos periodos de tiempo. La utilización de lías de vino como sistema de conservación de BL seleccionadas permitiría mantener los microorganismos deseados a la vez que adaptarlos a las condiciones del vino.

Poco se conoce sin embargo de la supervivencia de los microorganismos en las lías, y en particular de las BL que se emplean como cultivos iniciadores de FML, la cual permitiría su empleo como inductoras de FML en vinos. El objetivo por tanto de este estudio fue determinar la supervivencia y el empleo de técnicas de conservación de cultivos iniciadores en lías procedentes de vino tinto. Con este fin, se inoculó una cepa de *O. oeni* en tres lías de Tempranillo diferentes previamente esterilizadas y se observó la viabilidad al cabo del tiempo. Del mismo modo se estudió la viabilidad y actividad maloláctica de las bacterias en vino tras su conservación en lías.

2. Material y Métodos

2.1 Microorganismo

En el estudio se utilizó la cepa de *O. oeni* E5003, aislada, caracterizada y conservada en el laboratorio ENOLAB. Las bacterias fueron cultivadas en medio líquido MLO a 28°C hasta llegar a una concentración de 2×10^9 ufc/mL para su posterior inoculación en las lías.

2.2 Lías de vino tinto

Se utilizaron tres lías A, B y C procedentes de vino tinto de la Denominación de Origen Utiel-Requena de la variedad Tempranillo. Se esterilizaron mediante autoclave durante 30 minutos a 115°C. Tras la esterilización se sembró 0.1 mL en medio sólido MLO para comprobar que la esterilización se había llevado a cabo correctamente.

2.3 Inoculación y seguimiento de la viabilidad del cultivo en lías

Se inocularon 10 mL de cada una de las lías esterilizadas con 3×10^7 ufc/mL de la cepa de *O. oeni* E5003. La viabilidad se analizó durante un periodo de tiempo de 16 semanas, realizando diluciones decimales seriadas en solución salina estéril y siembra en superficie de 0.1 mL de las respectivas diluciones en medio sólido MLO.

Con el fin de comprobar que la cepa inoculada implantada en las tres lías correspondía a la cepa inoculada, se realizó una comparación de los perfiles moleculares de una muestra de colonias escogidas al azar de cada una de las lías sembradas en medio sólido MLO tras 15 días de conservación con la cepa original inoculada. Para ello se utilizó la técnica molecular de RAPD [8].

2.4 Inoculación, viabilidad y actividad maloláctica en vino

Con el objetivo de estudiar el mantenimiento de la actividad maloláctica en vino de las células conservadas en lías, se inoculó vino tinto que contenía 3.3 g/L de ácido L-málico con las lías conservadas durante 15 días. Para ello se inoculó el vino tinto en una proporción de 1/10 y 1/100 con cada una de las 3 lías y se estudió la degradación de ácido málico mediante HPLC a lo largo del tiempo. La viabilidad en vino fue analizada mediante recuento en placa. Se realizaron diluciones decimales seriadas y siembra de 0.1 mL de las correspondientes diluciones en medio sólido MLO.

3. Resultados y Conclusiones

3.1 Esterilización y análisis de las lías

La esterilización de las lías fue satisfactoria, no encontrando ningún microorganismo en el medio sólido MLO tras la esterilización por autoclave.

El análisis de las lías mostró diferencias de composición entre ellas, siendo la diferencia más notable el contenido en polisacáridos (Ver Tabla 1).

Tabla 1. Análisis de lías antes de ser inoculadas con *O. oeni*

| | Lías A | Lías B | Lías C |
|------------------------------|--------|--------|--------|
| Ac. Málico (g/L) | 0,01 | 0,02 | 0 |
| Ac. Láctico (g/L) | 1,52 | 1,32 | 1,79 |
| Glucosa (g/L) | 0,92 | 0,06 | 0,52 |
| Fructosa (g/L) | 0,35 | 0,06 | 0,16 |
| pH | 3,96 | 3,92 | 3,97 |
| Polifenoles totales (IPT) | 27,9 | 13,5 | 34,3 |
| Polisacáridos totales (mg/l) | 1200 | 1350 | 2835 |

3.2 Viabilidad e implantación del cultivo en lías

Como se observa en la tabla 2, las lías en las que *O. oeni* mantuvo la viabilidad e incluso se produjo un aumento de los niveles poblacionales fue en las lías C. En este caso encontramos una población de 7.4×10^7 ufc/ mL tras 3 semanas de conservación. Los datos muestran que la mejor respuesta de viabilidad de la cepa se obtuvo en las lías con mayor contenido de polisacáridos.

Tabla 2. Viabilidad de la cepa de *O. oeni* inoculada en las lías tras 16 semanas de conservación a 28°C

| LÍAS | DÍA 0 UFC/ML | SEMANA 1 UFC/ ML | SEMANA 2 UFC/ ML | SEMANA 3 UFC/ ML | SEMANA 4 UFC/ML | SEMANA 8 UFC/M | SEMANA 12 UFC/M | SEMANA 16 UFC/M |
|------|-----------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| A | 3×10^7 | 8.1×10^6 | 1×10^6 | $<1 \times 10^3$ | $<1 \times 10^3$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| B | 3×10^7 | 1.7×10^7 | 9.8×10^6 | 6×10^5 | 3.2×10^5 | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ | $<1 \times 10^2$ |
| C | 3×10^7 | 4×10^7 | 8×10^7 | 7.4×10^7 | 3.2×10^7 | 2.7×10^7 | 5.2×10^6 | 9×10^3 |

El análisis de las lías mediante la técnica molecular de RAPD reveló que en las 3 lías la cepa inoculada se había implantado satisfactoriamente (Ver figuras 1, 2 y 3).

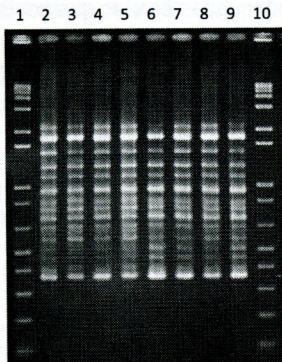


Figura 1. RAPD de diferentes aislados de *O. oeni*. Carreras 1 y 10: 1 KB plus ladder (Invitrogen). Carrera 2: Cepa original inoculada. Carreras 3-9: Aislados de las lías Tempranillo A tras 3 semanas de incubación

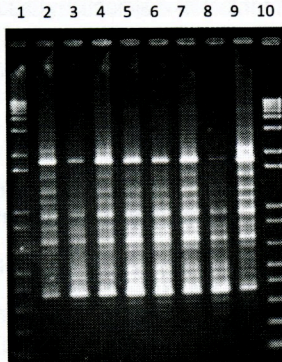


Figura 2. RAPD de diferentes aislados de *O. oeni*. Carreras 1 y 10: 1 KB plus ladder (Invitrogen). Carrera 2: Cepa original inoculada. Carreras 3-9: Aislados de las lías Tempranillo B tras 3 semanas de incubación

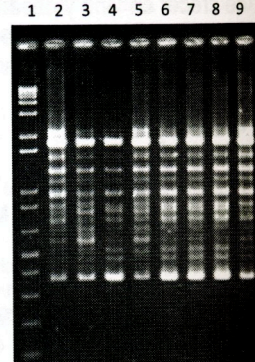


Figura 3. RAPD de diferentes aislados de *O. oeni*. Carrera 1: 1 KB plus ladder (Invitrogen). Carrera 2: Cepa original inoculada. Carreras 3-9: Aislados de las lías Tempranillo C tras 3 semanas de incubación

3.3 Actividad maloláctica y viabilidad en vino tinto

Como se muestra en la Tabla 3, la mejor actividad en vino se observó al inocular en una proporción 1/10 las lías C en el vino tinto. En este caso los niveles poblacionales iniciales fueron 8×10^6 ufc/mL (Tabla 4) permitiendo un consumo completo del ácido málico extremadamente rápido (menos de 6 días). En las otras dos lías al descender la viabilidad durante la conservación, se partió de una

concentración celular baja en vino, lo que dificultó la realización de la FML. Con estos datos se mostró que las lías Tempranillo C eran un buen sistema para conservar *O. oeni*. Además los resultados obtenidos al inocular las lías en vino mostraron que las bacterias conservadas en estas lías mantenían la actividad maloláctica y la viabilidad en muy buen estado, ya que eran capaces de crecer en vino y de consumir todo el ácido málico en 6 días al ser inoculadas en una concentración celular de 8×10^6 ufc/mL.

Tabla 3. Degradación de Ac. Málico en las diferentes lías a lo largo del tiempo

| LÍAS | DÍA 0 | | DÍA 1 | | DÍA 6 | |
|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|
| | MÁLICO | LÁCTICO | MÁLICO | LÁCTICO | MÁLICO | LÁCTICO |
| A 1/10 | 3.3 | 2.9 | 2.93 | 3.00 | 2.90 | 3.03 |
| A 1/100 | 3.3 | 2.9 | 3.16 | 3.03 | 3.15 | 3.03 |
| B 1/10 | 3.3 | 2.9 | 2.87 | 3.02 | 2.83 | 3.10 |
| B 1/100 | 3.3 | 2.9 | 3.15 | 2.98 | 3.13 | 3.00 |
| C 1/10 | 3.3 | 2.9 | 2.52 | 3.52 | 0 | 5.21 |
| C 1/100 | 3.3 | 2.9 | 3.09 | 3.01 | 2.7 | 3.40 |

Tabla 4. Viabilidad de *O. oeni* en vino tras 14 días de incubación a 28°C

| LÍAS | DÍA 0 Ufc/ mL | DÍA 1 Ufc/ mL | DÍA 6 Ufc/ mL | DÍA 14 Ufc/ mL |
|---------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| A 1/10 | 1×10^5 | 3×10^4 | $< 1 \times 10^4$ | $< 1 \times 10^4$ |
| A 1/100 | 1×10^4 | 1×10^3 | $< 1 \times 10^2$ | $< 1 \times 10^2$ |
| B 1/10 | 1×10^6 | 6×10^4 | 1×10^4 | 1×10^4 |
| B 1/100 | 1×10^5 | 4×10^3 | $< 1 \times 10^2$ | $< 1 \times 10^2$ |
| C 1/10 | 8×10^6 | 1.6×10^7 | 2.3×10^7 | 3×10^7 |
| C 1/100 | 8×10^5 | 1.4×10^6 | 9.7×10^5 | 2×10^5 |

3.4 Conclusión

Las bacterias lácticas pertenecientes a la especie *Oenococcus oeni* pueden mantener la viabilidad en lías de Tempranillo durante bastantes semanas, conservando su actividad metabólica y su capacidad de crecer en vino y desarrollar la fermentación maloláctica. Las lías más adecuadas son las que contienen mayores proporciones de polisacáridos totales.

4. Bibliografía

- [1] Liu, S.-Q. 2002. Malolactic fermentation in wine - beyond deacidification. *J. Appl. Microbiol.*, 92,589-601.
- [2] Lonvaud-Funel, A. 1995. Microbiology of the malolactic fermentation: molecular aspects. *FEMS Microbiol. Lett.*, 126, 209-214.
- [3] Wibowo, D.; Eschenbrunch, R.; Davis, C. R.; Fleet, G. H. y Lee T. H. 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 36, 302-313.
- [4] Lonvaud-Funel, A. 1995. Microbiology of the malolactic fermentation: molecular aspects. *FEMS Microbiol. Lett.*, 126, 209-214.
- [5] Maicas, S. 2001. The use of alternative technologies to develop malolactic fermentation in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 35-39.
- [6] Maicas, S. 2001. The use of alternative technologies to develop malolactic fermentation in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 56, 35-39.
- [7] Lonvaud-Funel, A. 1995. Microbiology of the malolactic fermentation: molecular aspects. *FEMS Microbiol. Lett.*, 126, 209-214.
- [8] 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 DNA-PCR. *Curr. Microbiol.*, 40, 351-355.

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.