

# Selección de cepas del género *Lactobacillus* como cultivo iniciador de la fermentación maloláctica en vinos de baja acidez

Olga Lucio\*<sup>1</sup>, Sergi Ferrer<sup>1</sup>, Sibylle Krieger<sup>2</sup>, José María Heras<sup>2</sup>, Isabel Pardo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ENOLAB. Dpto. de Microbiología y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Valencia. Campus de Burjassot, 46100, Valencia. Tf: 963544390. e-mail: olucos@alumni.uv.es

<sup>2</sup> Lallemand España., C/ Zurbano 71, 28010 Madrid

## Resumen

En la actualidad, el cambio climático está dirigiendo a la vendimia de uvas con unos mayores niveles de madurez que dan lugar a mostos y vinos con unos valores elevados de pH. Por otro lado, las condiciones del vino a menudo dificultan la fermentación maloláctica (FML), siendo habitual que con un pH inferior a 3.5 sólo las cepas de *Oenococcus oeni* pueden sobrevivir y expresar actividad maloláctica, mientras que en vinos con un pH superior a 3,5 algunas especies de *Lactobacillus* también muestran buenas capacidades para llevar a cabo la FML. El objetivo de este trabajo ha sido la selección de cepas del género *Lactobacillus* para realizar la fermentación maloláctica en vinos de pH 3.5 y poder ser utilizadas como cultivos iniciadores durante la vinificación.

**Palabras clave:** fermentación maloláctica, *Lactobacillus*, cultivo iniciador, bacterias lácticas.

## 1. Introducción

El pH del vino es un factor fuertemente selectivo y generalmente por debajo de un pH de 3.5 sólo las cepas de la especie *Oenococcus oeni* son capaces de sobrevivir y de expresar una actividad maloláctica eficaz, mientras que en vinos con pH superior a este valor también otras especies de bacterias lácticas (BL) tienen la posibilidad de llevar a cabo de forma efectiva la FML [1]. *Oenococcus oeni* es por tanto la especie que mejor se adapta a las difíciles condiciones enológicas y la que normalmente se encuentra presente en los cultivos iniciadores malolácticos presentes en el mercado, aunque ya en el pasado algunas especies de *Lactobacillus* han demostrado una alentadora supervivencia en el vino [2].

Aunque es habitual que la FML ocurra de forma espontánea, puede también suceder que esta tenga lugar de manera muy lenta o incluso que no ocurra, por diversos motivos. En este caso es frecuente recurrir a diversos mecanismos de inducción a objeto de forzar el inicio y desarrollo de la misma como la adición de cultivos iniciadores de BL seleccionadas. Una alternativa muy atractiva al empleo de cultivos de *Oenococcus oeni*, son cepas seleccionadas de *Lactobacillus*, las cuales podrían conducir favorablemente la FML y suponer una alternativa importante por su rapidez de crecimiento, bajos requerimientos nutricionales, y existencia de propiedades tecnológicas y metabólicas interesantes (producción de bacteriocinas, glucosidasas, etc.).

Respecto al momento en que estos cultivos iniciadores deben añadirse los autores difieren en opiniones. Unos autores opinan que es mejor hacerlo durante la FA, ya que así se evita la inhibición de las BAL causada por las altas concentraciones de etanol y la escasez de nutrientes [5]. Otro grupo opina que la forma óptima es una vez terminada la FA, cuando los azúcares ya son residuales [6]. Algunos autores [3,4] recomiendan hacerlo incluso al principio de la vinificación mediante un proceso de coinoculación levadura bacteria, ya que se ha observado que se produce una reducción en la duración de la fermentación.

Por ello, los objetivos de este trabajo fueron conseguir la selección de cepas de bacterias del género *Lactobacillus* que puedan ser utilizadas de manera potencial como cultivos iniciadores para realizar la FML en vinos de baja acidez. Se ha realizado una selección de cepas de la colección ENOLAB realizando una selección según su capacidad de crecimiento en mosto a pH 3.5 y su capacidad realizar la FML, estudiando detalladamente el metabolismo de cada cepa seleccionada y las características del vino final. También se ha determinado el momento adecuado de inoculación del cultivo iniciador durante la vinificación observando el



comportamiento sinérgico o antagonístico que presentan estas bacterias con las levaduras comerciales utilizadas en vinificación. Finalmente, las cepas seleccionadas se sometieron a producción y liofilización industrial para equiparar las propiedades fisiológicas de las bacterias a las de un cultivo iniciador comercial y se hicieron ensayos a nivel de laboratorio y de planta piloto para comprobar la efectividad del producto en comparación con el cultivo fresco de laboratorio.

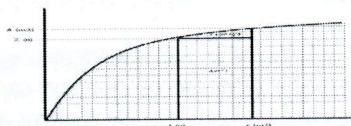
## 2. Material y Métodos

### 2.1. Selección de cepas del género *Lactobacillus*

Se realizó un ensayo de selección con cepas de diferentes especies del género *Lactobacillus* de la colección ENOLAB, previamente aisladas de mostos y vinos en diferentes etapas de fermentación.

La selección de cepas se realizó en base a dos tipos de criterios. Por un lado, un óptimo crecimiento en mosto estéril pH 3.5, que se determinó mediante la monitorización de las curvas de crecimiento en un ensayo miniaturizado en microplaca de 96 pocillos y el posterior cálculo del parámetro ABC (área bajo la curva) para cada cepa (Ec.1). También se consideró la capacidad de realizar la fermentación maloláctica en el mosto analizando por HPLC la degradación del ácido málico.

$$(1) \quad f(x) = \sum_{i=0}^{i=n} \left( (t_{n+1} - t_n)(A_n - A_0) + \frac{A_{n+1} - A_n}{2} \right)$$



### 2.2. Ensayo de diferentes sistemas de inoculación de las bacterias lácticas para la realización del FML.

En primer lugar se planteó la posibilidad de realizar primero la FA al completo, inoculando al principio la levadura y transcurridos siete días aproximadamente inocular el cultivo de bacterias lácticas (Estrategia 1L2B). Otra opción fue inocular en el mosto inicial el cultivo de bacterias lácticas y posteriormente inocular la levadura para realizar la fermentación alcohólica (Estrategia 1B2L). La última estrategia estudiada consistió en coinocular la bacteria y la levadura al mismo tiempo, y por tanto realizar la fermentación maloláctica y alcohólica simultáneamente (Estrategia B+L). Los parámetros analizados durante este ensayo fueron por un lado la dinámica poblacional de levaduras y bacterias para estudiar su posible antagonismo, y por otro la correcta realización de la FML en cada estrategia.

En este ensayo se seleccionaron las bacterias con mejores resultados, la levadura comercial que presentó un antagonismo más débil para usar en combinación con la bacteria en el proceso, y la mejor estrategia de inoculación de ambas.

### 2.3. Estudio de las características cinéticas y metabólicas de las cepas seleccionadas

Aplicando la estrategia y las cepas seleccionadas en el apartado anterior, se realizó una vinificación de laboratorio. Durante el ensayo se realizó un seguimiento de la dinámica poblacional bacteriana y de la levadura por recuento de células viables. Además se realizó un análisis por HPLC del mosto diariamente para observar la dinámica de degradación del ácido málico (y posible variación de otros metabolitos) a lo largo de la vinificación y la repercusión en el producto final de la utilización de esta estrategia en comparación con una FA tradicional.



## 2.4. Obtención del producto liofilizado industrial (cultivo iniciador) y su aplicación en el proceso a nivel de laboratorio y planta piloto. Comparativa con el cultivo fresco.

Se realizaron cultivos paralelos en mosto estéril pH 3.5 inoculados con cultivo fresco y con el cultivo iniciador respectivamente. Durante los ensayos se determinó la viabilidad microbiana y la realización de la FML en cada caso.

## 3. Resultados y Conclusiones

### 3.1. Selección de cepas del género *Lactobacillus*

El análisis de la dinámica poblacional mediante el cálculo del parámetro ABC de las cepas sometidas a selección mostró diferencias entre ellas. En cambio, se comprobó al final del ensayo que la FML se había llevado a cabo completamente por todas las cepas. De entre todas las cepas de la colección ENOLAB ensayadas, se realizó la selección de que presentaban mejor comportamiento global: E10, E02, E07, E23, E03 y E05.

### 3.2. Ensayo de diferentes sistemas de inoculación de las bacterias lácticas para la realización del FML

Se concluyó que la estrategia adecuada para realizar una FML efectiva en el vino era 1B2L, ya que de este modo se conseguían buenos resultados de crecimiento poblacional (Fig. 1a) en las bacterias lácticas y además durante este periodo eran capaces de realizar la FML (Fig. 1b), siendo a continuación desplazadas por la levadura comercial causando una pérdida de viabilidad total de las bacterias lácticas y evitando así un picado láctico que resultaría perjudicial para el producto. Además, mediante los resultados de este ensayo se seleccionaron las cepas de bacterias lácticas E02, E07 y E10, y la levadura comercial VN para su posterior aplicación debido a que generaron los mejores resultados.

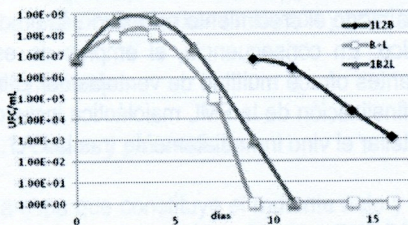


Figura 1a. Curvas de crecimiento de la cepa E10 durante los ensayos de las tres estrategias.

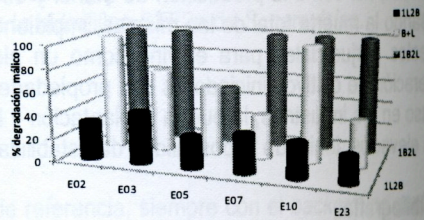


Figura 1b. Porcentaje de ácido málico del mosto degradado por cada cepa de bacteria láctica en cada estrategia de inoculación ensayada

### 3.3. Estudio de las características cinéticas y metabólicas de las cepas seleccionadas

Se ha determinado que la degradación del ácido málico ocurre muy rápidamente durante la fase inicial de crecimiento de la bacteria en el mosto (Fig. 2) y se acaba degradando la totalidad de este ácido en aproximadamente 48 horas. Se ha comprobado que la aplicación de esta técnica no afecta al correcto funcionamiento de la levadura durante la FA, y la totalidad de los azúcares del mosto son degradados completamente. Además no se han apreciado variaciones en metabolitos como glicerol, ácido tartárico o ácido acético. Sí pueden encontrarse variaciones en el ácido cítrico final del producto dependiendo de la cepa que se utilice para realizar la FML, la cual sería una variable a explotar según el interés del enólogo.



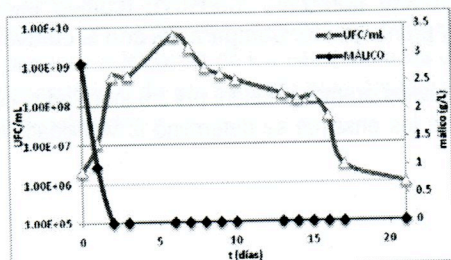


Figura 2. Curva de crecimiento y cinética de degradación del ácido málico durante el ensayo por la cepa E10.

### 3.4. Obtención del producto liofilizado industrial (cultivo iniciador) y su aplicación en el proceso a nivel de laboratorio y planta piloto. Comparativa con el cultivo fresco.

Al realizar la comparativa del proceso (cultivo fresco y cultivo iniciador liofilizado), no se observaron diferencias significativas. El crecimiento poblacional de las bacterias en ambos casos fue muy similar. El consumo de ácido málico también fue total en todos los casos, con lo cual, la FML se llevó a cabo completamente independientemente del estado fisiológico de la cepa bacteriana.

### 3.5. Conclusiones

Se ha desarrollado a nivel de laboratorio y de planta piloto un proceso para realizar la FML en vinos de baja acidez mediante el uso de un cultivo iniciador de bacterias del género *Lactobacillus*. Se han seleccionado las cepas de *Lactobacillus* E02, E07 y E10, ya que proporcionaron los mejores resultados en todos los ensayos, así como la optimización de un sistema de inoculación de las mismas durante la vinificación. El proceso se basa en inocular el cultivo iniciador de *Lactobacillus* en el mosto al inicio de la vinificación, y tras transcurrir el tiempo requerido para un crecimiento óptimo y la realización de la FML, estimado en 48 horas, se inocula la levadura comercial. El tiempo estimado es óptimo para la realización de la FML antes del incremento poblacional de las levaduras autóctonas. El aumento poblacional de la levadura comercial, así como la producción de etanol y otros factores de la FA provocan una inhibición de la bacteria causando la muerte total de las mismas, impidiendo de este modo el crecimiento excesivo y la producción de aspectos perjudiciales para el vino como un picado láctico. En consecuencia, el empleo de esta nueva generación de cultivos iniciadores con propiedades interesantes ofrece multitud de ventajas como la facilidad de uso en las industrias, la buena implantación y la rápida finalización de la FML maloláctica incluso a los pH más elevados, teniendo la posibilidad de estabilizar y embotellar el vino inmediatamente tras la FA.

## 4. Bibliografía

- [1] Fumi, M.D. et al. 2010. Una nueva generación de bacterias malolácticas para vinos con pH elevado. *Enovicultura*. 6 34-38.
- [2] Lallemand Inc. 2005. Malolactic fermentation in wine. 0-9739147-0-X
- [3] Beelman, R. B.; Kunkee, R. E. 1985. Inducing simultaneous malolactic-alcoholic fermentation in red table wines. *Aust. Soc. Vitic. Oenol. Sem.*, 97-112.
- [4] Jussier, D.; Dubé Mornéau, A. & Mira de Orduña, R. 2006. Effect of simultaneous inoculation with yeast and bacteria on fermentation kinetics and key wine parameters of cool-climate chardonnay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (1), 221-227.
- [5] Van Vuuren, H.J.J. & Dicks, L.M.T. 1993. *Leuconostoc oenos*: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 99-112.
- [6] Gallander, J.F. 1979. Effect of time of bacterial inoculation on the stimulation of malolactic fermentation. *Am. J. Enol. Vitic.*, 30, 157-159.

## 5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CENIT-2008 1002 y Lallemand Inc.