

Inoculación de bacterias lácticas para inducir la fermentación maloláctica

En un ensayo realizado por el CIDA se observa una estimulación en el proceso y un menor crecimiento bacteriano. Los resultados más favorables se obtienen a bajas temperaturas (16 °C)

La fermentación maloláctica mejora la estabilidad biológica del vino. / Fernando Díaz

Texto: **Pilar Santamaría, Carmen Sota, Carmen Tenorio y Rosa López**
Sección de Viticultura y Enología. CIDA.

Introducción

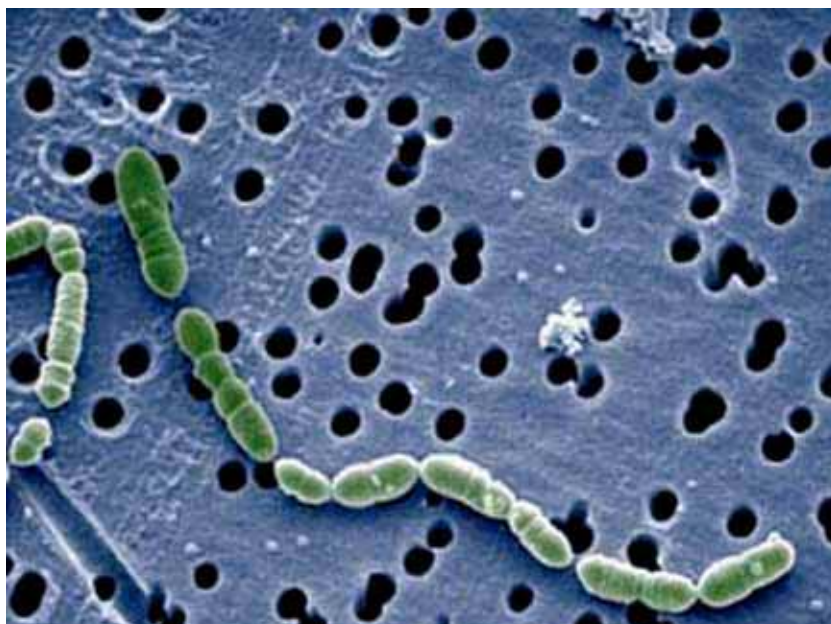
La calidad de los vinos está condicionada fundamentalmente por tres factores: la materia prima, los microorganismos que intervienen y las condiciones tecnológicas de elaboración. En los vinos de Rioja, su calidad se ha forjado a lo largo de la historia a través de un riguroso control de las técnicas de cultivo y una infraestructura de transformación de la materia prima de un alto nivel. Sin embargo, y al igual que en otras zonas vitivinícolas mundiales, la inquietud en materia de microbiología es mucho más reciente.

El vino es producto de una serie de transformaciones complejas tanto químicas como biológicas. La evolución de mosto a vino se lleva a cabo a través de la fermentación alcohólica, proceso mediante el cual los azúcares de la uva se transforman en etanol y otros productos secundarios debido a la acción de las levaduras. A esta primera transformación le sigue la llamada fermentación maloláctica (FML), producida por las bacterias lácticas. Durante la misma, se produce la descarboxilación del ácido L-málico, dando lugar básicamente a ácido L(+)-láctico y CO_2 . Ambos procesos microbiológicos son una contribución importante a la calidad final del producto.

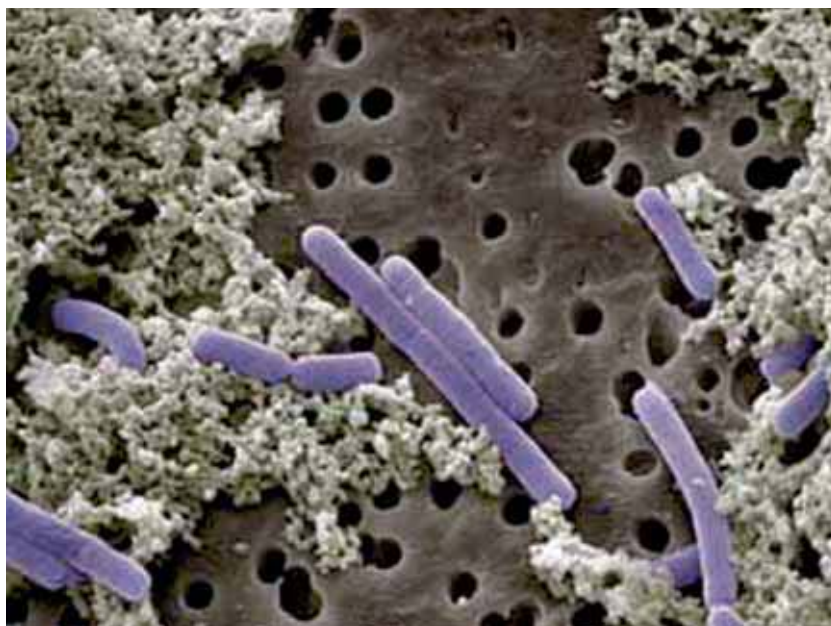
Los vinos de Rioja, en su mayoría tintos, habitualmente realizan la FML, ya que tiene varios efectos beneficiosos: proporciona suavidad al vino; mejora su *bouquet*, por contribuir a la formación de diacetilo, acetoina y 2,3-butanodiol y mejora su estabilidad biológica. Pero también ocasiona efectos indeseables: formación de aminas biógenas (histamina), incremento de pH, pérdida de color y aumento de la acidez volátil.

Las bacterias lácticas son los microorganismos responsables de que se lleve a cabo la fermentación maloláctica de los vinos. Pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Oenococcus*, fundamentalmente éstos últimos.

Finalizada la fermentación alcohólica, la FML puede suceder espontáneamente; sin embargo, este desarrollo espontáneo es impredecible. El proceso no siempre se lleva a cabo, o no se hace en el momento adecuado ni en condiciones óptimas, ya que son muchos los



Oenococcus (arriba) y *Lactobacillus* (abajo).



factores que influyen en el crecimiento y desarrollo de las bacterias lácticas del vino y, como consecuencia, en la transformación maloláctica.

Existen varias estrategias para gestionar la FML de forma adecuada, controlando el proceso microbiológico y evitando la formación de compuestos tóxicos. Una de ellas consiste en la inducción de la FML con inoculación de bacterias lácticas seleccionadas. Se trata de aportar al vino una elevada población de bacterias

lácticas en fase activa, 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. La aparición en 1993 de cultivos de siembra directa, de manejo sencillo, ha favorecido su utilización. El problema de esta práctica es que a veces la flora bacteriana adicionada al vino no se implanta y siguen siendo las bacterias autóctonas las que llevan a cabo la FML.

Puede haber distintas alternativas para intentar resolver los problemas de implantación: FML a bajas temperaturas, empleo de lisozima e inoculación antes de finalizar la fermentación alcohólica.

Teniendo en cuenta estos aspectos, el objetivo de este trabajo, que se desarrolló durante la campaña de 2002, fue el estudio de distintas condiciones de desarrollo de la fermentación maloláctica (FML) y su influencia en la implantación de bacterias lácticas seleccionadas y en la calidad de los vinos obtenidos.

Material y métodos

Se partió de 1.600 kg de uva de la variedad Tempranillo, procedente de la finca de La Grajera de la Comunidad Autónoma de La Rioja, que después del despallado, estrujado y sulfitado se repartió homogéneamente en dos depósitos de acero inoxidable. En uno de ellos se añadió 25 g/hl de lisozima, dosis que se repitió al finalizar la fermentación alcohólica, una vez descubado el vino (Vino A). En el otro depósito no se realizó ningún tratamiento (Vino B).

A partir de estos dos vinos se realizaron los siguientes ensayos:

- Siembra convencional de bacterias al final de la fermentación alcohólica a 22° C (vino B).
- Siembra al final de fermentación alcohólica a 16° C (vino B).
- Siembra antes de finalizar la fermentación alcohólica a 22° C (vino B).
- Siembra a las 48 horas después de la última adición de lisozima del vino A.

Para cada ensayo se contó con un testigo que llevó a cabo la FML en las mismas condiciones, pero de forma espontánea sin inoculación de bacterias. Se hicieron tres repeticiones por tratamiento.

Se controló el desarrollo de la FML determinando periódicamente el contenido de ácido málico y el recuento de bacterias viables. El control de implantación se realizó mediante PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*) de 10 colonias de bacterias aisladas cuando se había consumido el 60% del ácido málico.

Una vez finalizada la FML, los vinos se trasegaron, se sulfitaron con 30 mg/l

de sulfuroso, se acidificaron mediante adición de 1 g/l de ácido tartárico y se mantuvieron a 16° C. Se analizaron en distintos momentos de elaboración y de conservación: antes de la fermentación maloláctica; después de la FML, antes del sulfitado; transcurridos tres y seis meses de conservación.

Los análisis generales (grado alcohólico, pH, acidez total, acidez volátil, SO₂ libre y total, azúcares reductores, ácidos málico y láctico, ácido cítrico, intensidad de color, índice de color, índice de polifenoles totales) se determinaron por los métodos oficiales de la CEE. Los antocianos se analizaron por el método de Ribéreau-Gayon por decoloración con el SO₂; el índice de ionización, por el método propuesto por Glories en 1984; y el índice de polimerización, según Ruiz, 1999. Los compuestos volátiles se analizaron por cromatografía de gases siguiendo métodos propuestos por Bertrand en 1993. La histamina se analizó por HPLC según Íñiguez, 1998.

El análisis organoléptico lo realizó un comité de catadores con vinos sometidos a un periodo de conservación de 6 meses.

Resultados

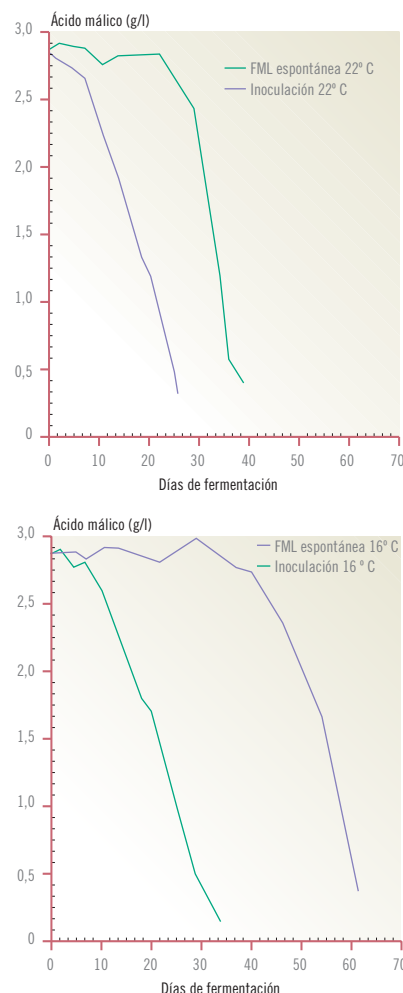
1. Inoculación con bacterias lácticas comerciales a diferentes temperaturas

1.1. Efecto de la inoculación con bacterias lácticas

A pesar del elevado grado alcohólico del vino inicial y de la elevada concentración de ácido málico, la FML espontánea se realizó sin problemas, teniendo lugar en 40 días a 22° C y en 60 días a 16° C. La siembra de bacterias estimuló el desarrollo de la FML, ya que acortó su duración a las dos temperaturas (figura 1), especialmente a 16° C.

Los resultados del control de implantación indicaron que a ambas temperaturas, la siembra con la bacteria comercial fue eficaz, ya que el 100% de las colonias aisladas en los depósitos inoculados coincidieron con el perfil genético de la cepa inoculada.

Figura 1. Evolución del ácido málico durante la FML espontánea e inoculada a 16 y 22° C



Teniendo en cuenta los resultados analíticos de los vinos una vez realizada la FML y antes del sulfitado de los mismos (tabla 1), se observa, como era de esperar, que ésta ha supuesto un incremento de pH, de acidez volátil y una modificación en los parámetros relacionados con el color, con una disminución del contenido en antocianos, principalmente en sus formas coloreadas (antocianos ionizados). Al mismo tiempo, se observa una estabilización del color debido a un incremento del índice de polimerización.

En esta tabla se observa que la acidez volátil fue menor en los vinos inoculados, probablemente como consecuencia de una menor degradación de ácido cítrico.

Tabla 1. Parámetros analíticos de los vinos antes y después de FML

| Parámetros | Antes de FML | Después de FML | | | |
|--------------------------|--------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| | | Vino sin inocular 22° C | Vino inoculado 22° C | Vino sin inocular 16° C | Vino inoculado 16° C |
| Grado alcohólico | 15,3 | - | - | - | - |
| pH | 3,65 | 3,88 | 3,81 | 3,83 | 3,96 |
| Acidez volátil | 0,43 | 0,68 | 0,55 | 0,67 | 0,54 |
| Ácido Málico (g/l) | 2,88 | 0,17 | 0,35 | 0,15 | 0,13 |
| Ácido Cítrico (mg/l) | 411,00 | 23,72 | 248,53 | 87,63 | 229,00 |
| IPT | 69,30 | 69,82 | 65,96 | 68,72 | 68,46 |
| I.C. | 15,95 | 14,02 | 14,02 | 14,44 | 13,58 |
| Antocianos (mg/l) | 779,55 | 568,34 | 637,37 | 559,71 | 657,48 |
| Índice de ionización (%) | 40,56 | 31,39 | 30,98 | 35,05 | 35,48 |
| Índice de polimerización | 2,14 | 3,16 | 2,88 | 3,24 | 2,72 |
| Histamina (mg/l) | 0,13 | 3,74 | 0,10 | 1,87 | 0,09 |

Estos tuvieron mayor concentración en antocianos, quizá debido a una menor duración del proceso. No obstante, esta diferencia a favor de los vinos inoculados se igualó a lo largo del proceso de estabilización del vino, como se puede observar en la figura 2.

El estudio de la evolución de los parámetros analíticos a lo largo de 6 meses mostró que la inoculación con bacterias dio lugar a vinos con características favorables en cuanto a acidez volátil y a concentración de histamina y ligeramente desfavorables respecto a la estabilidad de color (figura 2).

En los resultados del análisis organoléptico (datos no mostrados) no se encontraron diferencias entre los vinos, quizá debido a que las características de los vinos en cuanto a grado alcohólico, color... impidan que se aprecien las pequeñas diferencias analíticas existentes.

Por los resultados obtenidos en esta campaña de 2002, concluimos que la inoculación con bacterias para inducir la FML es eficaz tanto desde el punto de vista de la duración del proceso, como de la calidad de los vinos obtenidos. Aunque incide negativamente en los parámetros relacionados con el color, su variación no fue tan importante como para obtener vinos con menor intensidad de color.

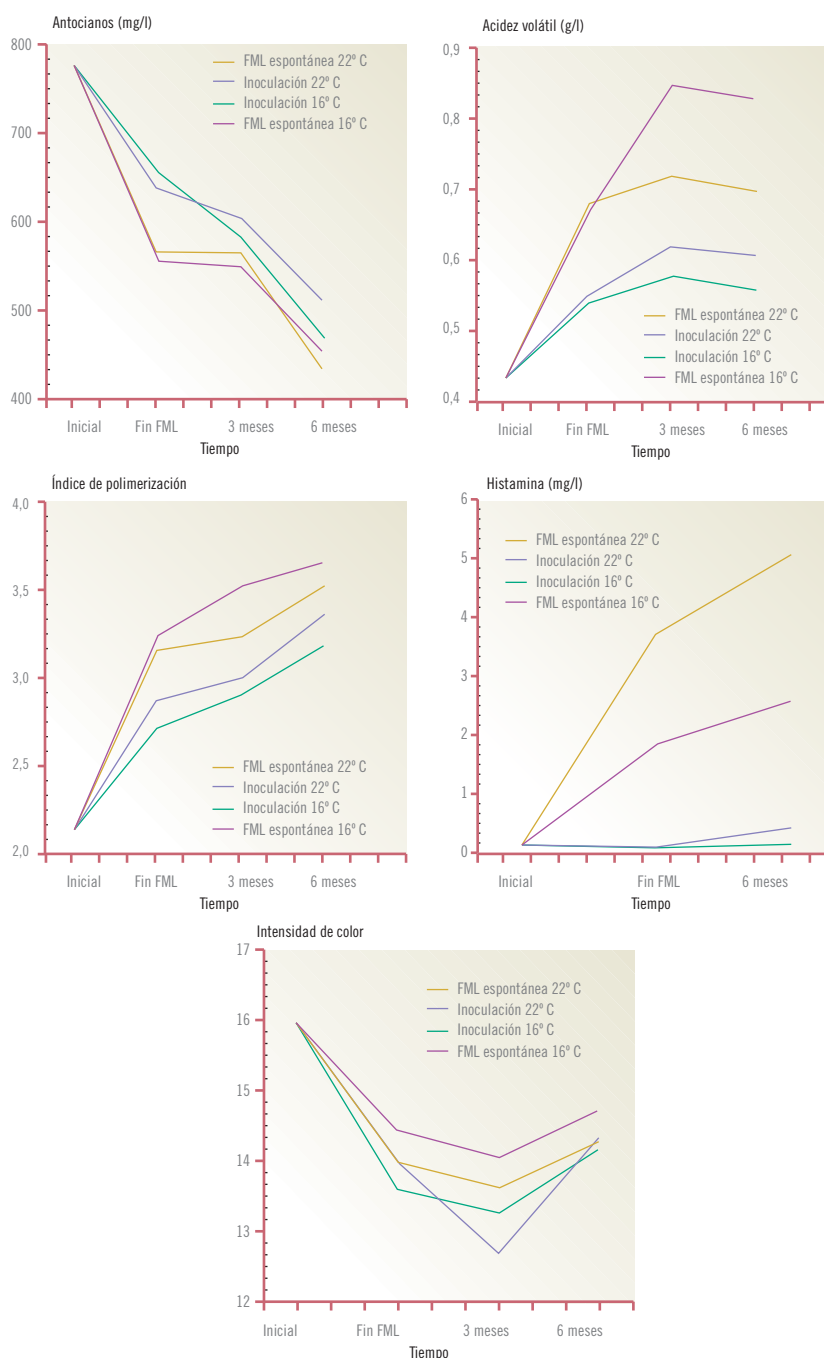
1.2. Efecto de la temperatura

La siembra de bacterias lácticas estimuló el desarrollo de la FML a las dos temperaturas estudiadas (figura 1): fue mayor su efecto a 16 °C, ya que acortó su duración 28 días, frente a 12 días a 22 °C.

El índice de ionización (porcentaje de antocianos en sus formas coloreadas) fue el único parámetro influenciado por la temperatura (tabla 1). El resto de los resultados analíticos estuvo más influenciado por la inoculación que por la temperatura de fermentación utilizada.

La fermentación maloláctica a baja temperatura se desarrolló correctamente cuando se llevó a cabo con inoculación de bacterias, ya que de otro modo se produjo un aumento importante de la acidez volátil y de la concentración de histamina. Es interesante destacar que el hecho de que la inoculación de bacterias seleccionadas para fermentar a bajas temperaturas dé buenos resultados, puede resultar de gran

Figura 2. Evolución de los vinos a lo largo de la estabilización





Recepción de la uva en bodega. / Fernando Díaz

ventaja económica para las bodegas, ya que podría suponer un ahorro importante al no tener que calentar sus instalaciones hasta temperaturas próximas a 22° C.

2/ Momento de inoculación de las bacterias lácticas

La fermentación maloláctica del vino inoculado antes de completar la degradación de los azúcares fue 4 días más corta que la llevada a cabo en condiciones normales. El estudio genético de las cepas de bacterias aisladas en esas condiciones indicó que también en este caso se implantó la bacteria inoculada, siendo por tanto la que llevó a cabo la degradación del ácido málico.

Los vinos obtenidos cuando la inoculación se realizó sin finalizar la fermentación alcohólica tuvieron un ligero incremento de acidez volátil y un mayor contenido en histamina, antocianos y compuestos fenólicos (tabla 2). No obstante, su intensidad de color no fue más alta debido a un menor porcentaje de antocianos ionizados.

Al estudiar la evolución de estos vinos a lo largo de 6 meses (figura 3), se comprueba que la inoculación con bacterias cuando aún queda azúcar en el medio, dio lugar a vinos de peor calidad caracterizados por su alta acidez volátil y su alta producción de histamina.

Tabla 2. Parámetros analíticos de los vinos después de FML

| | Vino inoculado al fin de fermentación alcohólica | Vino inoculado con 5,65 g/l de azúcares |
|--------------------------------|--|---|
| pH | 3,81 | 3,82 |
| Acidez Total | 5,61 | 5,84 |
| Acidez volátil (g/L tartárico) | 0,55 | 0,60 |
| Ácido láctico (g/l) | 1,79 | 1,93 |
| Ácido cítrico (mg/l) | 248,53 | 190,99 |
| Glicerol (g/l) | 9,83 | 10,15 |
| IPT | 65,96 | 69,42 |
| I.C. | 14,02 | 13,44 |
| Antocianos (mg/l) | 637,37 | 660,30 |
| Índice de ionización (%) | 30,98 | 28,05 |
| Índice de polimerización | 2,88 | 2,82 |
| Histamina (mg/l) | 0,10 | 2,79 |

Figura 3. Evolución de los vinos a lo largo de la estabilización

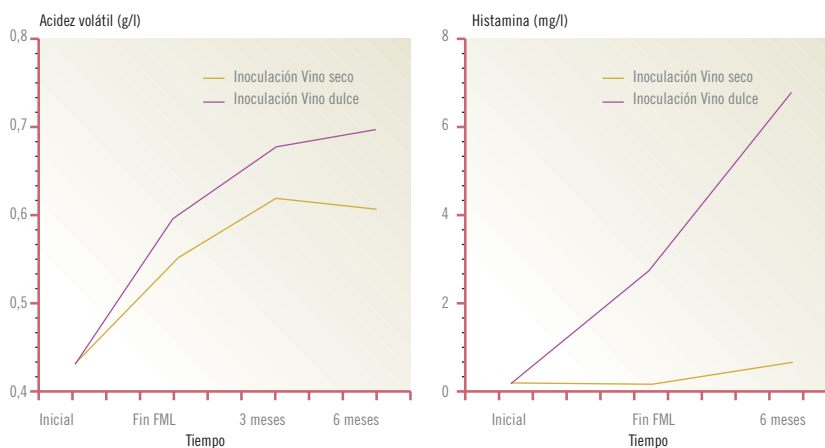
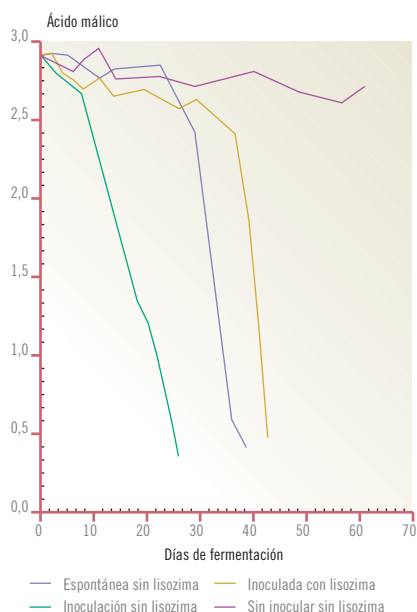


Figura 4. Evolución de la fermentación maloláctica con y sin adición de lisozima



3/ Empleo de lisozima

La adición de lisozima al mosto no influyó en el desarrollo de la fermentación alcohólica. Los resultados de los datos analíticos medios de los vinos después de la misma se encuentran reflejados en la tabla 3.

La aplicación de 25 g/hl de lisozima en el mosto y de 25 g/hl después de la fermentación alcohólica apenas afectó a la composición analítica de los vinos antes de la FML. Tan sólo se observó una disminución del contenido en polifenoles.

La adición de lisozima en las dosis indicadas provocó el bloqueo total del proceso cuando no se realizó inoculación con bacterias, lo que confirma la acción bactericida de esta proteína sobre las bacterias lácticas, y su efecto para bloquearla (figura 4). Al comparar las fermentaciones inoculadas, se observa que se produjo un retraso de 17 días en completar la FML en los vinos tratados con lisozima con respecto a los vinos inoculados sin tratar, lo que demuestra la aplicación de esta enzima para retrasar la FML.

El estudio del control de implantación indicó que en este ensayo no se implantaron las bacterias comerciales sembradas. Esto lleva a pensar que la dosis de lisozima empleada fue elevada, o bien que transcurrió poco tiempo desde el tratamiento a la inoculación. Es necesario, por lo tanto, estudiar otras dosis y otros momentos de aplicación.

Tabla 3. Composición de los vinos antes de realizar la FML

| | Vinos no tratados | Vinos tratados con lisozima |
|------------------------------|-------------------|-----------------------------|
| Grado alcohólico | 15,3 | 14,8 |
| PH | 3,65 | 3,64 |
| Acidez total (g/l) | 7,81 | 7,50 |
| Acidez volátil (g/l acético) | 0,43 | 0,42 |
| Ácido tartárico (g/l) | 2,34 | 2,72 |
| Ácido málico (g/l) | 2,88 | 2,92 |
| Ácido láctico (g/l) | 0,16 | 0,16 |
| Azúcares (g/l) | 4,11 | 4,13 |
| Glicerol (g/l) | 10,59 | 9,82 |
| Ácido cítrico (mg/l) | 411 | 392 |
| Polifenoles totales | 69,30 | 65,40 |
| Intensidad de color | 15,95 | 16,27 |
| Tonalidad | 0,536 | 0,526 |
| Antocianos (mg/l) | 780 | 771 |
| Índice de ionización (%) | 40,56 | 42,30 |
| Índice de polimerización | 2,14 | 2,11 |



La siembra de bacterias para estimular la FML reduce la formación de metabolitos secundarios indeseables. / Fernando Díaz

Tabla 4. Parámetros analíticos de los vinos después de la FML

| | Inoculación sin lisozima | Inoculación con lisozima |
|---|--------------------------|--------------------------|
| Ácido cítrico (mg/l) | 249 | 34 |
| Acidez volátil (g/l en ácido acético) | 0,55 | 0,67 |
| Abs 280 nm | 70 | 66 |
| I.C. | 14,02 | 13,18 |
| Antocianos (mg/l) | 637 | 567 |
| Índice de ionización (%) | 31 | 35 |
| Índice de polimerización | 2,88 | 3,19 |
| Σ alcoholes superiores (mg/l) | 336 | 359 |
| Σ acetatos de alcoholes superiores (mg/l) | 1,269 | 0,665 |
| Σ ésteres de ácidos grasos (mg/l) | 0,311 | 0,293 |
| Σ ácidos grasos (mg/l) | 2,364 | 2,276 |

En la tabla 4 se muestran los resultados de los parámetros analíticos medios de los vinos después de la FML. La concentración de ácido cítrico fue menor en los vinos tratados con lisozima, lo que está de acuerdo con la mayor acidez volátil y la falta de implantación de las bacterias inoculadas, que en el caso de la utilizada en este estudio se caracteriza por una baja degradación de este ácido. Asimismo, el tratamiento con lisozima dio lugar a vinos con menor intensidad de color y menor concentración de compuestos fenólicos y antocianos, debido a la posible combinación de la proteína con estos compuestos durante la FML. Su estabilidad, reflejada por el índice de polimerización, fue mayor, probablemente como consecuencia de una mayor duración del proceso fermentativo. Los vinos no tratados tuvieron mayor concentración en compuestos aromáticos.

Durante el periodo de conservación (figura 5), se observó que las diferencias encontradas en cuanto al contenido en antocianos y polifenoles después de la FML se mantuvieron a favor de los vinos no tratados en los distintos momentos considerados. Sin embargo, al ser mayor el porcentaje de antocianos ionizados y al aumentar en mayor medida el índice de polimerización en los vinos que fueron tratados con lisozima, la intensidad de color fue similar al final del periodo considerado.

Los vinos que fueron tratados con lisozima fueron mejor valorados organolépticamente en lo que se refiere a fase olfativa y a fase gustativa, aunque en la fase visual se decantó ligeramente a favor de los vinos no tratados. El menor contenido en polifenoles podría ser la causa de estos resultados.

Conclusiones

En las distintas modalidades de conducción de la fermentación maloláctica se ha observado una estimulación del proceso cuando se han sembrado bacterias seleccionadas, produciéndose en este caso un menor crecimiento bacteriano, con lo que se disminuye la formación de metabolitos secundarios indeseables, como la acidez volátil y la histamina. En estas condiciones, bajas temperaturas (16 °C) produjeron los resultados más favorables.

Figura 5. Evolución de los vinos a lo largo de la estabilización

