



Ensayos de inoculación de bacterias lácticas

en diferentes fases de la elaboración de vinos tintos de Rioja

En este trabajo se ha estudiado la incidencia del momento de inducción de la fermentación maloláctica en las características de un vino tinto elaborado a partir de uva de la variedad Tempranillo. La inoculación de bacterias al inicio de la fermentación alcohólica –36 horas después de la siembra de levaduras– proporcionó los vinos con menor intensidad de color. No obstante, no tuvieron problemas de producción de acidez volátil y fueron los vinos aromáticamente mejor valorados. La menor duración de la elaboración, junto con sus características analíticas y organolépticas, apoyarían la vocación de estos vinos para su comercialización como vinos jóvenes. Por el contrario, la siembra de los cultivos de bacterias un tiempo después del final de la fermentación alcohólica dio lugar a vinos con un color más estable y, por tanto, con mayor aptitud para la crianza. Por su parte, los vinos inoculados momentos antes del fin de la fermentación alcohólica y al final de la misma se encontraron en una situación intermedia.

**Pilar Santamaría, Carmen Tenorio,
Patrocinio Garijo y Rosa López**
Servicio de Investigación y Desarrollo
Tecnológico de La Rioja (CIDA)
Ana Rosa Gutiérrez
Universidad de La Rioja

El proceso de elaboración del vino tinto incluye dos etapas fundamentales: la fermentación alcohólica (FA), mediante la cual se transforman los azúcares de la uva en etanol y otros productos secundarios por la acción de las levaduras; y la fermentación maloláctica (FML) que consiste principalmente en la transformación de ácido L-málico en ácido L-láctico, mediante la intervención de bacterias lácticas, especialmente de la especie *Oenococcus oeni*, con una gran influencia en el aroma del vino y en su calidad (Suárez e Íñigo, 2004).

Tradicionalmente, la FML se ha llevado a cabo por la flora espontánea de bacterias que acompaña a la uva y al vino, pero en ocasiones el proceso no siempre se lleva a cabo, o no se hace en el momento adecuado, ni en óptimas condiciones, ya que son muchos los factores que influyen en el crecimiento y desarrollo de las bacterias lácticas del vino. Desde hace años, existen numerosos trabajos sobre cómo realizar un control más eficaz del proceso mediante la utilización de cultivos iniciadores seleccionados, para asegurar de este modo el completo desarrollo de la FML y controlar la calidad a través de la naturaleza y cantidad de los productos secundarios formados.

El mejor momento para llevar a cabo la siembra de bacterias está todavía en discusión (Krieger, 2005). Tradicionalmente se ha recomendado que se realice al finalizar la FA, cuando los azúcares fermentables han sido consumidos por las levaduras y así evitar el riesgo de producción de ácido acético y

ácido D-láctico, y problemas de paradas de fermentación.

Recientemente, la literatura menciona la posibilidad de realizar simultáneamente la inoculación de levaduras y bacterias en el mosto (Sieczkowski, 2004), por entender que las bacterias pueden aclimatarse y crecer mejor en ausencia de etanol, y con mayor cantidad de nutrientes, sin desembocar necesariamente en la producción de excesivas cantidades de ácido acético (Beelman y Kunkee, 1985). En este caso, es necesario tener en cuenta las interacciones entre las levaduras y las bacterias utilizadas (King y Beelman, 1986), y controlar que el pH se encuentre a niveles bajos. Algunos investigadores aconsejan una inoculación precoz antes de que finalice totalmente la FA, ya que en esta fase contaríamos con la ventaja de que la mayoría del SO_2 libre se combina con los compuestos carbonílicos producidos durante el crecimiento de levaduras, y que la concentración de etanol todavía no ha alcanzado niveles tóxicos (Gerbaux y Briffon, 2003). El inconveniente de la adición precoz de bacterias, cuando todavía no ha finalizado completamente la degradación de los azúcares, vendría dado por la inhibición que sobre las bacterias ejercerían los metabolitos tóxicos formados por las levaduras, cuya concentración alcanza su valor máximo en este momento de la FA (Santamaría et al., 1995).

Por otra parte, la rapidez con que la FML se puede desarrollar cuando el vino se inocula con cultivos iniciadores es contraria a las técnicas de vinifica-

ción tradicionales en ciertas zonas vitivinícolas, en las que esta fermentación se llevaba a cabo de forma espontánea cuando la temperatura alcanzaba valores suficientes para el crecimiento de bacterias. Esta separación en el tiempo entre las dos fermentaciones permite lograr una mayor estabilidad del color de los vinos (Gerbaux y Briffon, 2003). Una forma de llevarlo a cabo de forma controlada sería parar inicialmente el desarrollo espontáneo e inducirla después de algún tiempo, mediante la inoculación de cultivos seleccionados de bacterias.

El objetivo de este trabajo ha sido comparar la influencia de cuatro momentos de inoculación de bacterias: en el mosto, antes de acabar completamente la FA, al final de la misma y un mes después, en el desarrollo de la fermentación alcohólica y maloláctica y en la calidad de los vinos elaborados con uva de la variedad Tempranillo.

Material y métodos

La uva de c.v. Tempranillo (800 kg) procedente de la Rioja Alta fue recogida en un momento óptimo de maduración (13,7% de grado alcohólico probable, pH de 3,21 y 2,54 g/l de ácido málico). Después del despalillado y estrujado, se distribuyó homogéneamente en dos depósitos de 50 litros y en uno de 600 litros. Se sulfitó a razón de 50 mg de SO_2 /kg de uva y se inoculó con la levadura "Uvaferm VRB". Los dos depósitos de 50 litros se destinaron a realizar el ensayo de coinoculación. Para ello, se sembró la bacteria "Uvaferm VRB" a las 36 horas de la inoculación de levaduras;

Trabajos en laboratorio./ Cámara Oscura



cuando finalizó la fermentación alcohólica, se prensó la uva y el vino obtenido se trasegó a depósitos de 25 litros para que finalizara la FML.

La uva restante contenida en el depósito de 600 litros se prensó cuando el vino contenía 20 g/l de azúcares reductores y se repartió en 6 depósitos de 50 litros. Dos de ellos se inocularon en el momento. En otros dos, se esperó a que finalizara la FA (2 g/l de azúcares) para sembrarlo, mientras que en los dos restantes se mantuvieron un mes en cámara a 10 °C, después de haber añadido 20 mg/l de SO₂. Transcurrido ese tiempo, se procedió a su inoculación con la misma bacteria. La FML se llevó a cabo en todos los casos a 20 °C.

Una vez realizada la FML, se analizaron los vinos, se trasegaron y sulfitaron con 30 mg de SO₂/l. Después de 5 meses de estabilización, se llevó a cabo su cata.

Los parámetros generales se analizaron utilizando los métodos establecidos por el Reglamento de la CEE N° 2676/90 de la Comisión de 17 de septiembre de 1990: "Métodos de análisis comunitarios del sector del vino". Para el análisis de antocianos, se utilizó el método propuesto por Ribereau-Gayon y Stronestreet (1965), basado en la decoloración de antocianos con bisulfito sódico. El porcentaje de antocianos ionizados se determinó según el método de Glories (1978) y el índice de polimerización por el método propuesto por Ruiz (1999).

Los compuestos volátiles se analizaron por cromatografía de gases utilizando el método descrito por Ortega et al. (2001). De este modo, se determinaron acetaldehído, acetato de etilo, alcoholes superiores (propanol, 1 butanol, isobutanol y alcoholes amílicos), 2 fenil etanol, acetatos de alcoholes superiores (acetato de isoamilo, acetato de hexilo, acetato de 2 fenil etilo), ésteres (propionato de etilo, isobutirato de etilo, butirato de etilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo), ácidos (ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico, ácido hexanoico y ácido octanoico), diacetilo, acetoina, lactato de etilo y succinato de dietilo.

Para el análisis sensorial, se utilizó la ficha de cata propuesta en su momento por el INDO, en la que se valoran las fases visual, olfativa (intensidad y calidad), gustativa (intensidad y calidad) y armonía, con puntuaciones decrecientes al aumentar la calidad.

Resultados

Fermentación alcohólica y maloláctica

Los resultados obtenidos mostraron que la coinoculación de bacterias en el mosto no afectó al desarrollo de la FA, ya que su duración fue de 12 días, independientemente de que se llevara a cabo con o sin adición simultánea de bacterias (figura 1).

De la misma forma, la FML se realizó sin problemas en los mostos coinoculados con levaduras y bacterias lácticas. El inicio del consumo de ácido málico vino a coincidir con la fase tumultuosa de la fermentación alcohólica y, al final de la misma, se había degradado ya un 40% del ácido málico inicial. La FML finalizó transcurridos 22 días desde el encubado de la uva (figura 2).

La FML de los vinos sembrados con bacterias lácticas una vez finalizada la FA se desarrolló en 34 días, el mismo tiempo que para la inoculación realizada cuando el vino contaba con 20 g/l de azúcar sin fermentar. La duración total de los procesos fermentativos, desde el encubado hasta la finalización de la FML, fue de 48 y 45 días respectivamente, imputándose esta diferencia de tres días al momento de adición de las bacterias.

La FML del vino inoculado con bacterias un mes después de finalizada la FA transcurrió en 44 días. La mayor duración pudo ser debida a la inhibición por el SO₂ adicionado para su conservación, y a la pérdida de nutrientes al mantenerlo a una temperatura de 10 °C, que pudo ejercer un efecto clarificante.

Calidad de los vinos

Los análisis químicos efectuados en los vinos después de la FML mostraron diferencias significativas para la acidez total; ácidos tartárico, cítrico y láctico; intensidad de color, tonalidad,

Figura 1. Evolución de la fermentación alcohólica del mosto inoculado con levaduras y coinoculado con levaduras y bacterias

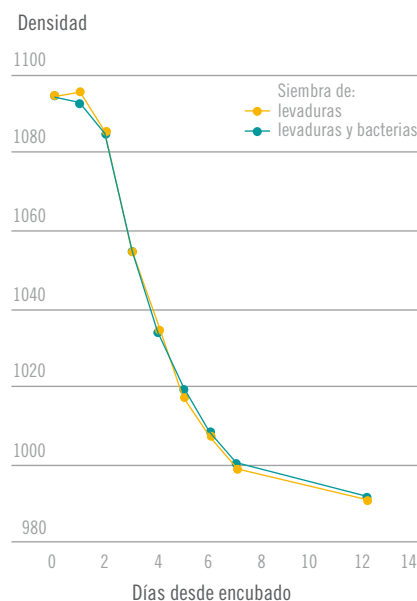
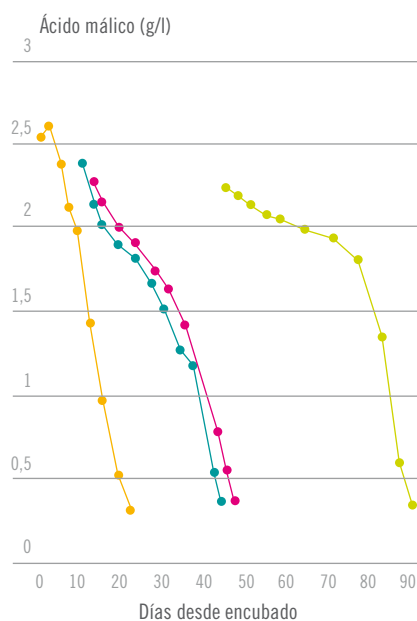


Figura 2. Evolución de la fermentación maloláctica de los vinos inoculados con bacterias en distintos momentos



Evolución de la FML:

- Mosto inoculado con levaduras y bacterias
- Inoculación antes del fin de FA (20 g/l de azúcar)
- Inoculación al final de FA
- Inoculación después de un mes del fin de FA

Tabla 1. Composición analítica de los vinos elaborados mediante inducción de la FML en distintos momentos de la elaboración

Momento de la inoculación de bacterias				
	Mosto	Vino con 20g/l azúcar	Vino al fin de FA	1 mes después de FA
Grado (%v/v)	14,0	13,7	13,7	13,9
pH	3,64	3,65	3,65	3,67
Acidez total (g/l)	6,63 b	6,30 b	6,30 b	5,27 a
Ác. tartárico (g/l)	3,04 b	2,74 b	2,73 b	2,09 a
Acidez volátil (g/l)	0,25	0,29	0,30	0,30
Ácido cítrico (mg/l)	120 b	97,0 a	95,0 a	155 b
Ácido láctico (g/l)	1,76 b	1,53 ab	1,46 a	1,47 a
Glicerol (g/l)	8,50	8,11	8,06	8,35
Intensidad de color	15,7 a	17,4 b	17,5 b	19,4 c
Tonalidad	0,456 a	0,478 ab	0,482 ab	0,500 c
IPT. (Abs 280 nm)	63,4	65,7	66,2	65,4
Antocianos (mg/l)	1.124 c	986 b	973 b	764 a
Antocianos ionizados (%)	27,3 a	31,0 b	31,5 b	44,6 c
Índice de polimerización	1,72 a	2,66 b	2,67 b	3,54 c

Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p>0,5$) según el test de Tukey.

Tabla 2. Composición aromática de los vinos elaborados mediante inducción de la FML en distintos momentos de la elaboración

Momento de inoculación de bacterias				
Compuestos aromáticos (mg/l)	Mosto	Vino con 20 g/l de azúcar	Vino al fin de FA	1 mes después de FA
Acetaldehído	3,57 a	4,11 a	3,65 a	28,4 b
Acetato de etilo	54,4 b	40,3 a	36,0 a	32,8 a
Σ Alcoholes superiores	408 b	329 a	307 a	333 a
Σ Acetatos	4,60 b	1,93 a	1,69 a	1,55 a
Σ Esteres	1,92 b	1,26 a	1,09 a	1,11 a
Σ Ácidos	13,26	11,49	10,92	12,25
1 Hexanol	2,36	2,19	2,11	2,21
Cis 3 hexenol	0,44 b	0,25 a	0,24 a	0,25 a
Lactato etilo	29,7 b	23,3 a	20,8 a	24,3 a
Succinato dietilo	2,50 bc	2,00 ab	1,87 a	2,33 b
Metionol	0,36 a	0,80 b	0,52 a	1,57 c
Acetoína	4,63 a	10,5 b	12,2 bc	15,1 c
Diacetilo	1,74	1,99	1,89	1,76
Butirolactona	2,78 a	4,37 b	4,21 b	6,33 c

Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p>0,5$) según el test de Tukey.



Cromatógrafo de gases, utilizado en el ensayo para analizar los compuestos volátiles. / Ch. Díez

antocianos, porcentaje de antocianos ionizados e índice de polimerización (tabla 1). No se observaron diferencias significativas entre los vinos inoculados sin finalizar completamente la fermentación alcohólica y los sembrados cuando el vino estaba seco. Sin embargo, sí se detectaron diferencias importantes en la composición analítica de los vinos si consideramos estos dos momentos con la coinoculación y con la siembra un mes después.

Así, los vinos coinoculados tuvieron mayor acidez total como consecuencia de una menor disminución de ácido tartárico durante el proceso de elaboración y, a pesar de su mayor contenido en antocianos, su intensidad de color fue significativamente la menor como consecuencia de una menor proporción de antocianos coloreados y una menor polimerización (tabla 1), circunstancias relacionadas con la duración del proceso de elaboración del vino.

Por el contrario, los vinos cuya inoculación se llevó a cabo un mes después, se situaron en el extremo opuesto, proporcionando vinos menos ácidos, pero con mayor estabilidad de color. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Gerbaux V. (1995), que mostró la influencia negativa de un rápido desarrollo de la FML en la intensidad de color y en la calidad de los vinos de Pinot Noir. Los vinos inoculados sin finalizar completamente la fermentación alcohólica o una vez finalizada del todo, se encontrarían en una situación intermedia.

Los resultados referentes a la acidez volátil muestran que las cepas de *Oenococcus oeni* pueden conducir la FML sin atacar el azúcar, ya que a pH bajos la bacteria sólo comienza a consumir azúcares cuando la degradación de los ácidos málico y láctico es completa.

El análisis de los compuestos aromáticos mostró diferencias significativas para la mayoría de los compuestos analizados (tabla 2). Los vinos cuya FML se realizó de forma simultánea a la FA destacaron por su mayor concentración en acetato de etilo, alcoholes superiores, acetatos de alcoholes superiores,



Depósitos de acero inoxidable. / Ch. Díez



Laboratorio del CIDA. / Ch. Díez

y las mayores cantidades de acetoína y butirolactona, presentando un aroma más lácteo y menos afrutado.

Los vinos inoculados sin finalizar completamente la FA o una vez finalizada del todo, se encontrarían en una situación intermedia.

El análisis organoléptico de los vinos a los 5 meses de estabilización mostró preferencias generales por el inoculado al final de la fermentación alcohólica (figura 3, en la que menor puntuación indica mayor valoración), aunque su valoración global se encontraba muy próxima a la obtenida por el vino procedente del ensayo de coinoculación, que resultó el mejor valorado en la fase olfativa. De cualquier manera, y teniendo en cuenta la puntuación total, todos los vinos se posicionaron en la categoría de “bien”.

Conclusiones

El momento de inoculación de bacterias más adecuado para llevar a cabo la FML dependerá de las características de la uva de partida, así como del destino y del tipo de vino que se pretende obtener. Cabe señalar que la uva de partida utilizada en el desarrollo de este ensayo tenía unas condiciones de maduración excelentes en lo que se refiere al grado alcohólico, acidez y carga polifenólica.

La práctica de la inoculación de bacterias en el mosto llevada a cabo durante la fase exponencial de crecimiento de levaduras supuso ventajas en el proceso de elaboración y en la calidad aromática de los vinos. El desarrollo de la FA no se vio afectado por la siembra de bacterias, la FML se realizó sin dificultad y los dos procesos fermentativos tuvieron una duración total de tan sólo 22 días. No se produjo un incremento de acidez volátil, los vinos tuvieron características adecuadas en lo que se refiere a los parámetros de

color y fueron los mejor valorados en cata en el aspecto aromático, lo que estuvo en relación con las diferencias en su composición aromática. Estos resultados indicarían que se trata de vinos que pueden consumirse en un corto periodo de tiempo tras su elaboración.

La gran ventaja de la inoculación de bacterias después de un mes de finalizada la FA vendría dada por la estabilidad de color de los vinos elaborados, ya que presentaron una elevada intensidad de color, como consecuencia de un mayor porcentaje de antocianos ionizados, y una mayor polimerización, por lo que serían aptos para su destino a vinos de crianza.

La inducción de la FML, cuando todavía quedan azúcares reductores en el medio, no supuso ventaja alguna con respecto a la inoculación habitual después de finalizar completamente la FA, siendo estos últimos los mejor valorados organolépticamente, seguidos muy de cerca por los coinoculados.

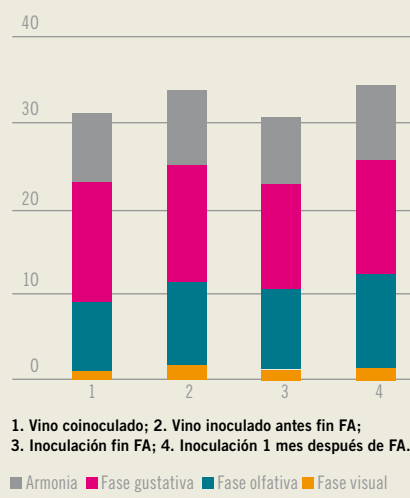
Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el INIA (proyecto VIN03-047) y cofinanciado con fondos FEDER, dentro del Programa Nacional de Alimentación, Acción estratégica “Mejora de la calidad y la competitividad de los vinos”.

Bacteria láctica de la especie *Oenococcus oeni*.



Figura 3. Valoración organoléptica de los vinos



esteres, cis 3 hexenol, lactato de etilo, y por la menor concentración de acetoína. Estos resultados indican que se trata de vinos más afrutados, marcado por las concentraciones de acetatos y ésteres, más complejos y herbáceos, tal y como lo indican las concentraciones de alcoholes superiores y de cis 3 hexenol) y menos lácteos, como puede deducirse por la menor concentración de acetoína.

La mayor concentración de acetaldehído en los vinos cuya inoculación se realizó un mes después, estaría en relación con su mayor estabilidad de color