



# The Wine EXPERT

Información práctica sobre elaboración de vino

## CO-INOCULACIÓN CON BACTERIAS ENOLÓGICAS SELECCIONADAS

¿Qué es la co-inoculación?

La co-inoculación es la práctica de inocular las bacterias enológicas seleccionadas en una fase temprana del proceso de elaboración del vino. Esta técnica está ganando popularidad, ya que no solo asegura la FML, sino que también tiene claras ventajas reconocidas por los enólogos y prescriptores de vino. La fermentación maloláctica (FML), descarboxilación enzimática del ácido L-málico en ácido L-láctico y dióxido de carbono, es la fermentación secundaria realizada por las bacterias (Versari *et al.*, 1999). Existen diferentes momentos en los que se puede realizar la inoculación con bacterias seleccionadas, como la co-inoculación, que se realiza en el mosto al principio de la fermentación alcohólica (FA) y poco después de la adición de la levadura, la inoculación a la 2/3 de la FA la fermentación alcohólica (inoculación temprana) y la inoculación una vez completada la FA (inoculación secuencial).

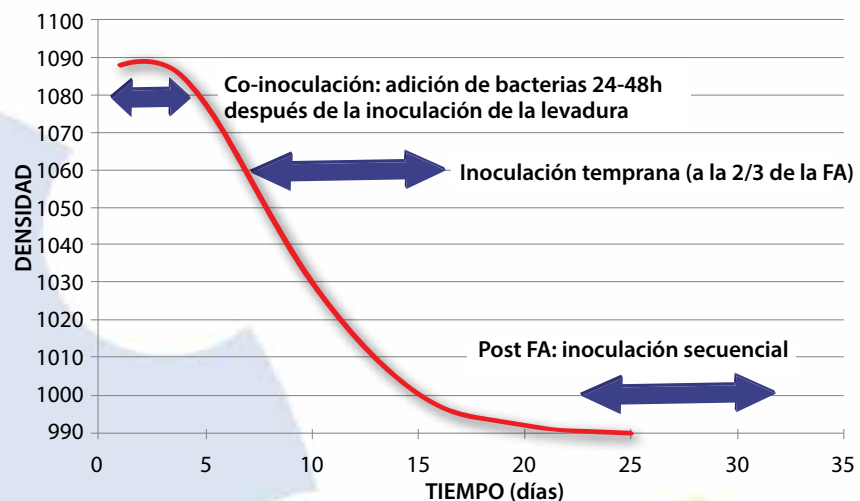


Figura 1: Diferentes momentos para la inoculación de las bacterias enológicas seleccionadas

¿Cómo funciona?

La práctica de la co-inoculación, en la que las bacterias se añaden poco tiempo después de la inoculación de la levadura, proporciona a las bacterias enológicas seleccionadas un medio más favorable, sobre todo en cuanto a concentraciones bajas de etanol y una mayor disponibilidad de nutrientes. Puesto que la levadura crece con más vigor, la actividad de la bacteria ML se verá reprimida durante la FA, pero las bacterias seleccionadas se aclimatarán lentamente a los crecientes niveles de alcohol. La transición de las bacterias de la fase de latencia a la de crecimiento logarítmico en un cultivo mixto con levadura, coincide con el inicio de la fase de declive del ciclo de crecimiento de la levadura. Este fenómeno podría aportar nutrientes bacterianos esenciales al medio, como resultado de la muerte y autólisis de la levadura. La inoculación en mitad de la fermentación alcohólica a menudo tiene como resultado una desaparición en mayor medida de la bacteria ML seleccionada, causada por la producción de compuestos tóxicos derivados de la levadura (distintos del etanol y el  $\text{SO}_2$ ) durante esta fase altamente activa de la FA. En esta fase se pueden dar los niveles más altos de antagonismo inducido por levaduras mediante metabolitos como el ácido decanoico. Sin embargo, bajo condiciones de pH bajo ( $\text{pH} < 3,15$ ), la inoculación a 1/3 de la fermentación alcohólica podría ser más favorable, ya que en esta fase todo el  $\text{SO}_2$  añadido durante la recepción y el prensado estaría limitado y sería menos activo contra las bacterias enológicas seleccionadas. Las cepas de levadura más compatibles para la estrategia de inoculación temprana son las que producen bajos niveles de  $\text{SO}_2$ , con una demanda de nitrógeno de baja a media y una cinética de fermentación moderada.

### Control de la producción de ácido acético.

Al hablar de la práctica de la co-inoculación, es importante señalar la posible producción de ácido acético por parte de las bacterias lácticas. La inoculación del vino con cultivos iniciadores malolácticos se realizaba tradicionalmente una vez acabada la fermentación alcohólica, cuando todos los azúcares fermentables han sido consumidos por la levadura y los azúcares residuales se encuentran por debajo de los 2 g/L, a fin de evitar la posible producción de ácido acético y ácido D-láctico, una situación que se denomina "picado láctico" (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1975). Sin embargo, la inoculación de la bacteria enológica con levadura seleccionada tiene más posibilidades de crecer y aclimatarse en ausencia de etanol. La bacteria no sufrirá de escasez de nutrientes ni estará expuesta a los efectos tóxicos del alcohol. En experimentos anteriores (Semon *et al.*, 2001; Rosi *et al.*, 2003; Jussier *et al.*, 2006) se observó que el ácido acético no se produce a partir de los azúcares durante el crecimiento de la BML y la FML activa. Los ensayos llevados a cabo usando la inoculación simultánea de la bacteria con levadura (co-inoculación) no presentaron diferencias significativas en la concentración final de ácido acético. Más recientemente, en un estudio llevado a cabo por Zapparoli *et al.*, (2009) con vinos de alto contenido en alcohol, se observó que en las variedades de Corvina y Rondinella que se usan para la producción de vino Amarone, los niveles de ácido acético eran similares o incluso más bajos en una situación de co-inoculación en comparación con una situación de inoculación secuencial. Por ejemplo, se hallaron 0,19 g/L de ácido acético en la co-inoculación y 0,20 g/L en la inoculación secuencial.

### ¿Cuáles son los beneficios de la co-inoculación? Eficiencia y ahorro de tiempo.

Una de las ventajas más claras de la co-inoculación es el mejor control que ofrece sobre el proceso de elaboración del vino en cuanto a **gestión del tiempo y seguridad de la finalización de la FML**. Jussier *et al.*, (2006) observaron una reducción significativa del tiempo necesario para la eliminación del ácido L-málico de un Chardonnay con un pH de 3,53 y etanol por encima del 13% (v/v) cuando se indujo una FA/FML simultánea con respecto a la FA/FML secuencial. En condiciones de alto contenido de alcohol, un factor de estrés importante en el proceso de elaboración del vino, en el estudio de Zapparoli *et al.*, (2009) no solo se observó que la FML se realizaba con éxito en esas difíciles condiciones, sino que se completó antes que mediante la inoculación secuencial (70 días frente a 112).

### ¿Cuáles son los beneficios de la co-inoculación? Impacto sensorial

En estudios recientes investigando el impacto de la co-inoculación en la **calidad sensorial del vino**, se ha observado (Knoll *et al.*, 2012, Costello *et al.*, 2012, Bartowsky *et al.*, 2011, Azzolini *et al.*, 2010) que las bacterias enológicas seleccionadas pueden influir en el perfil aromático de los vinos a través de la producción de metabolitos secundarios volátiles ó bien por la modificación de los metabolitos derivados de la uva o la levadura, tales como los ésteres etílicos, los ésteres de acetato, los ácidos y los alcoholes. Estos cambios se ven muy influenciados por la cepa de la bacteria enológica usada en la FML, pero la práctica de elaboración, como la co-inoculación, también es muy importante para el aroma y el sabor del vino.

### ¿Cuáles son los beneficios de la co-inoculación? Control de riesgos.

El periodo entre el final de la fermentación alcohólica y el inicio de la fermentación maloláctica es un momento crítico. El vino, que aún no está estabilizado, todavía corre el riesgo de sufrir desviaciones organolépticas. La co-inoculación con *Oenococcus oeni* seleccionada puede contribuir a evitar la **producción de posibles compuestos no deseados** al reducir, en primer lugar, el riesgo de FML espontánea durante la fermentación alcohólica (FA), evitar el desarrollo de las bacterias salvajes y, al mismo tiempo, realizar una FML más controlada. Esto es especialmente importante en vinos tintos con un pH alto, en los que la FML espontánea puede ocurrir durante la FA, causando

¿Cuáles son los beneficios de la co-inoculación?  
Control de riesgos.

paradas de FA y un aumento de la acidez volátil (AV) (Van der Merwe et al., 2006). Durante la co-inoculación, la actividad microbiológica tanto de la levadura como de las bacterias es tal, que hay poco espacio para que los microorganismos contaminantes como las especies heterofermentativas de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, o *Brettanomyces* se desarrollen, evitando de esta forma la producción de fenoles volátiles. En un estudio llevado a cabo por Gerbaux et al., (2009), se observó que la inoculación temprana de la bacteria del vino seleccionada no permitía el crecimiento de *Brettanomyces* aunque se inoculara de forma intencionada en vinos Pinot Noir de Borgoña (Francia).

## Profesora Maret du Toit



La profesora Maret dirige actualmente el Departamento de Viticultura y Enología y el Instituto de Biotecnología del Vino de la Universidad de Stellenbosch (Sud África). También lidera el grupo de investigación que trabaja sobre el rol de las bacterias lácticas (BL) en la elaboración del vino, especialmente el aporte de la fermentación maloláctica (FML) al aroma del vino, usando *Lactobacillus* como cultivos iniciadores, así como ciertos mecanismos de degradación asociados con las BL del vino. Es autora de 62 artículos científicos evaluados por especialistas, 3 capítulos de libros, 190 ponencias en conferencias nacionales e internacionales y ha dirigido a 33 estudiantes de Master y 7 estudiantes de Doctorado.

## PALABRAS DEL EXPERTO

Además de la fermentación alcohólica, la fermentación maloláctica (FML) es una fermentación secundaria que se produce mediante las bacterias lácticas (BL), primero para reducir la acidez del vino y luego para potenciar su aroma.

La *Oenococcus oeni* es aún hoy en día el cultivo iniciador mejor adaptado para la FML, fundamentalmente para bajo pH y altas concentraciones de etanol; además, se comprende bien su aporte al aroma del vino. Los cultivos iniciadores de la FML pueden ser inoculados en dos etapas de fermentación. La más habitual es la inoculación secuencial, donde las concentraciones de alcohol son cada vez más elevadas debido a los cambios climáticos, lo que origina que la presión en las bacterias para actuar en esas condiciones se vuelva cada vez más complicada. Eso ha llevado a que la inoculación se realice en otra etapa, la coinoculación de levaduras y bacterias al inicio de la fermentación alcohólica. Es importante que esta coinoculación se haga dentro de las 24 horas posteriores a la inoculación de las levaduras, sino el alcohol y la competencia de la levadura en fermentación activa afectan a la bacteria enológica inoculada. Es primordial asegurar la compatibilidad de la levadura y la bacteria, por lo que la selección de la primera es un punto muy importante. Hay que tener en cuenta con dicha tecnología la eventual producción de ácido acético debido a la presencia de azúcares en el mosto. Sin embargo, en mis últimos 7 años de investigación sobre coinoculación, no he observado que haya una producción de concentraciones considerablemente más altas de ácido acético.

La coinoculación conlleva varias ventajas. En primer lugar, el mosto contiene todos los nutrientes que la bacteria necesita, por lo que no requiere la adición de nutrientes adicionales. En segundo lugar, la realización de la FML es más rápida en comparación con la inoculación secuencial, por lo que se puede estabilizar el vino más temprano, reduciendo así eventuales contaminaciones microbianas. Es más, la coinoculación conlleva una mejor implantación sin competencia con la flora indígena de las BL, lo que da lugar a una dominancia completa durante toda la FML. El otro factor crucial es que hay poco o nada de alcohol presente en el mosto, lo que asegura tasas de supervivencia y viabilidad más altas de las cepas inoculadas. Los vinos elaborados mediante una estrategia de coinoculación tienen un perfil aromático distinto al de los vinos elaborados con inoculación secuencial, se perciben como más afrutados, equilibrados y con más cuerpo. Después de la FML, los vinos muestran una mejor integración y armonía incluso en una etapa tan temprana.

La coinoculación es una herramienta que puede usarse para evitar los problemas normalmente asociados con ciertas inoculaciones secuenciales y para diversificar el estilo de vuestros vinos con la producción de diferentes compuestos aromáticos o índices de aromas en el producto final. Esta tecnología también ofrece la posibilidad de usar otros BL de vino, como *Lactobacillus plantarum* que puede ser empleada en un futuro como cultivo iniciador de FML, pues las condiciones en esta etapa son mucho menos complejas que con la inoculación secuencial.

## LOS RESULTADOS

### 1. Duración y fiabilidad de la FML

La co-inoculación acorta de forma significativa la duración de la FML en comparación con la FML secuencial o, aún más, en comparación con la FML espontánea. En varios estudios, estos resultados se repiten de forma constante. Por ejemplo, la figura 2 muestra los resultados de varios ensayos llevados a cabo en diferentes variedades, vendimias y condiciones, así como con diferentes bacterias enológicas seleccionadas comparando la co-inoculación con la FML espontánea. En todos los casos la duración se redujo de forma significativa. No sólo la co-inoculación acorta la FML, sino que también es muy fiable en una gran variedad de situaciones.

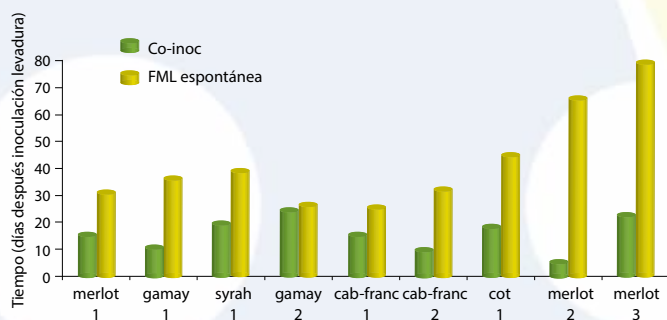


Figura 2: Duración de la FML en diferentes variedades de diferentes vendimias con co-inoculación con bacterias enológicas seleccionadas

La figura 3 muestra los resultados de la duración y la finalización de la FML bajo condiciones limitantes en un vino Amarone de 2006 elaborado parcialmente a partir de uvas pasificadas (pH 3,3, alcohol 15,5% v/v, SO<sub>2</sub> total 50 mg/L). Zapparoli y Tossi (2006) consiguieron efectuar con éxito la fermentación maloláctica mediante técnicas de co-inoculación (inoculación de bacterias un día después de la levadura) mediante el cultivo de la cepa de bacteria VP41 MBR® en comparación con la inoculación secuencial y la FML espontánea, que no empezó hasta transcurridos 90 días.

En experimentos realizados en colaboración con la Universidad Católica de Chile sobre el interés de la técnica de co-inoculación en mostos de pH y grado alcohólico potencial elevados de la vendimia de 2005 de Chile, se comparó la co-inoculación con bacterias 24 horas después de la inoculación con levadura con vinos control sin inoculación con bacterias. Para ello se utilizaron 8 lotes diferentes de las variedades Carmenere, Syrah, Merlot, Cabernet Sauvignon y Petit Verdot, con pHs de 3,5 a 3,9 y con GAP de entre 14 y 15% vol.

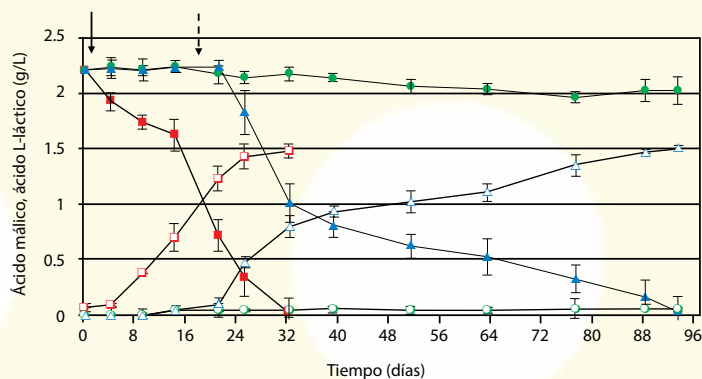


Figura 3: Consumo de ácido málico (símbolos llenos) y producción de ácido L- láctico (símbolos vacuos) determinados en ensayos de co-inoculación con levaduras y bacterias (■ □), inoculación con bacterias post FA (▲ △) y sin inoculación con bacterias (● ○). Las flechas continuas y de puntos indican los momentos de la inoculación de bacterias antes y después de la FA respectivamente. Los valores son la  $\pm$  desviación estándar media (barras) de tres ensayos independientes

De nuevo, la duración total de la fermentación maloláctica se redujo con la co-inoculación, mostrando claramente el predominio de las bacterias seleccionadas. La duración total de la FML desde el momento de la inoculación fue cerca de dos veces más rápida en los depósitos co-inoculados que en los vinos control con fermentación espontánea.

La reducción del tiempo de la FML y la fiabilidad de su realización es una ventaja importante, ya que reduce de forma significativa la necesidad de calentar las bodegas, algo que es necesario en la inoculación secuencial, dado que ésta se da más avanzada la temporada y requiere, por tanto, que las bodegas (y los vinos) estén calientes para empezar la FML. Otra ventaja es la posibilidad de obtener vinos que se estabilizan antes, por lo que están listos para su comercialización en un periodo de tiempo más corto en comparación con aquellos en los que se realiza la FML secuencial o espontánea.

### 2. Impacto sensorial

Se ha observado que los vinos sometidos a una FA/FML simultánea tienden a ser menos mantecosos y más afrutados (Henick-Kling 1993; Bartowsky *et al.*, 2002; Jussier *et al.*, 2006; Massera *et al.*, 2009; Bartowsky *et al.*, 2011).

En un estudio realizado por Knoll *et al.*, (2012) se demostró que los vinos Riesling con FML secuencial tenían las menores concentraciones de ésteres de acetato y ésteres etílicos relacionados con el carácter afrutado. Los vinos co-inoculados, por otro lado, tenían las mayores concentraciones

## LOS RESULTADOS

de ésteres etílicos afrutados. Además, los cambios en las concentraciones de estos ésteres, también dependieron de la cepa de bacterias utilizada. La *O. oeni* VP41® produjo mayores concentraciones de varios ésteres afrutados, como el propionato de etilo o el lactato de etilo, relacionados respectivamente con la frutuosidad, notas lácteas, y con la sensación en boca (figura 4).

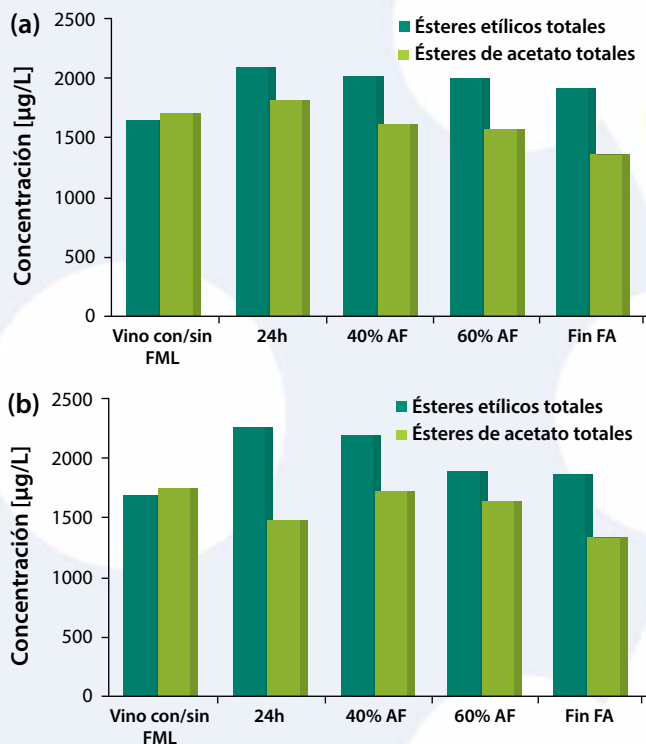


Figura 4: Concentración media de éster etílico y ésteres de acetato totales en vinos (a) inoculados con VP41® y (b) R1124 con diferentes momentos de inoculación para la FML

La co-inoculación de levadura seleccionada y BML también tiene una importante implicación estilística en términos de producción de diacetilo. Nuestros estudios han mostrado que a menudo la co-inoculación da lugar a vinos más afrutados en oposición a los estilos lácteos, mantecosos, con sabor a frutos secos, que resultan cuando la FML empieza una vez completada la fermentación alcohólica (inoculación secuencial).

Por ejemplo, la figura 4 muestra las concentraciones de diacetilo en un Chardonnay de 2010 del Valle del Loira (Francia). La bacteria seleccionada Beta® produce considerablemente menos diacetilo en co-inoculación (48h) que en la inoculación temprana (2/3 FA) o en inoculación secuencial (post FA). El impacto de la cepa ML en la producción de diacetilo no es tan notorio en la co-inoculación, ya que los vinos presentan de forma repetida bajos niveles de diacetilo con esta técnica, independientemente de la bacteria usada.

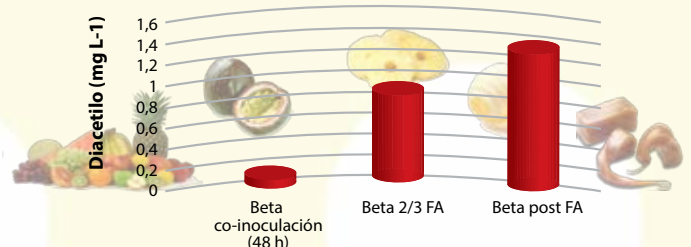


Figura 5: Concentración de diacetilo en un Chardonnay de 2010 (Valle del Loira) con diferentes momentos de inoculación para la FML con Beta®.

### 3. Gestión de compuestos y flora indígena no deseados.

En un ensayo realizado en colaboración con la Stellenbosch University (du Toit *et al.*, 2007, van der Merwe *et al.*, 2006), se descubrió que con las estrategias de co-inoculación los niveles de aminas biógenas fueron menores y no se produjeron histamina ni tiramina en comparación con la inoculación realizada una vez acabada la fermentación alcohólica (Figura 6). Las bajas concentraciones de putrescina y cadaverina encontradas igualmente en los vinos con coinoculación provienen del mosto.

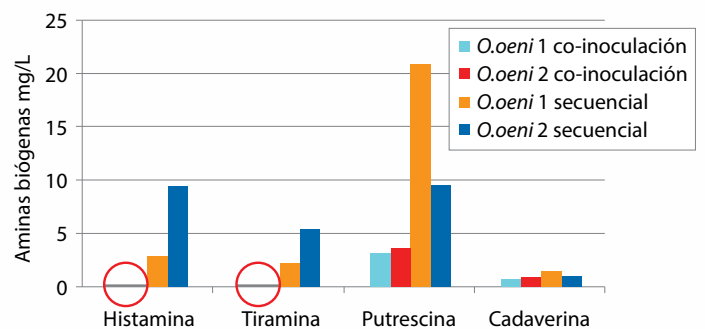


Figura 6: Niveles de aminas biógenas en un Cabernet Sauvignon de 2006 (Suráfrica) fermentado con levadura Lalvin ICV D254® comparando la co-inoculación con la inoculación tras la FA

Las bacterias seleccionadas, han sido caracterizados durante los procesos de selección, usando técnicas genéticas para asegurar que los genes que codifican las enzimas histidina descarboxilasa y ornitina descarboxilasa, ambas responsables de la formación de aminas biogénicas, no se expresen. Se presumió que en las inoculaciones después de la fermentación alcohólica, la flora bacteriana espontánea era la responsable de la producción de mayores niveles de aminas biogénicas hallada en estos tratamientos.

## LOS RESULTADOS

La co-inoculación también puede ser una herramienta útil para evitar la formación de los fenoles volátiles no deseados 4-etilfenol y 4-etilguayacol. Si el momento de la fermentación alcohólica y la maloláctica es bueno, evitándose un lapso largo entre el final de la FA y el comienzo de la FML, también se reduce el riesgo de contaminación por *Brettanomyces*, ya que el vino se estabiliza antes. La co-inoculación puede ser una herramienta eficaz para impedir el desarrollo de *Brettanomyces*, por eso cada vez más enólogos utilizan esta técnica para luchar contra esta contaminación. La figura 6 muestra los resultados de un ensayo con un Cabernet Franc de Francia en el que la inoculación con MBL redujo drásticamente la población de *Brettanomyces* y los niveles de fenoles volátiles en los vinos.

Además, la co-inoculación no solo afectaría a la *Brettanomyces*, sino que también limitaría el desarrollo de otras especies no deseadas como *Pediococcus* y *Lactobacillus*, especialmente en vinos con un pH superior a 3,5. Esto disminuiría la producción de metabolitos responsables sabores y aromas desagradables.

En otras palabras, el uso de la co-inoculación permite una estabilización del vino más temprana, evitando el desarrollo de contaminantes y dando lugar a vinos más limpios y más aromáticos.

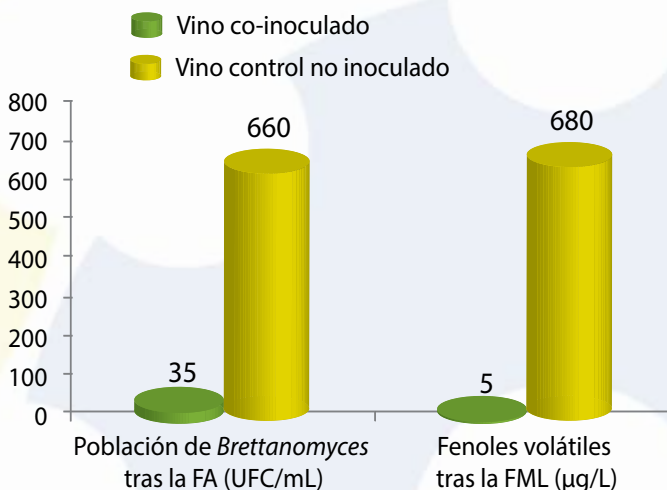


Figura 7: Cabernet Franc de 2006: Análisis de la contaminación con *Brettanomyces* y fenoles volátiles

## UN BREVE RESUMEN

La práctica de la co-inoculación es cada vez más popular. Sus ventajas son numerosas, ya que, además de completar un proceso seguro en un tiempo reducido, es una importante herramienta para definir el perfil sensorial buscado, y ayudar a limitar el desarrollo de microorganismos no deseados y, por lo tanto, la producción de sabores desagradables.

Por ejemplo, con una bacteria seleccionada como Beta®, capaz de producir mayores niveles de diacetilo en inoculación secuencial, pero la co-inoculación reduce diacetilo y en consecuencia refuerza el carácter afrutado y varietal de los vinos. El momento de inoculación, la interacción con levaduras, la presencia de precursores como base de la aparición de moléculas aromáticas, las condiciones de pH y temperatura, son todos factores clave en la futura expresión aromática del vino. La elección de la bacteria enológica se ha convertido en un parámetro a tener en cuenta para el desarrollo del perfil de vino buscado.

En nuestro próximo número: "Manejo del acetaldehído durante la vinificación"