

GESTIÓN DE LA CALIDAD DEL VINO CON UNA BACTERIA ENOLÓGICA, ROBUSTA Y ORIGINAL

**Magali DELERIS-BOU¹, Sibylle KRIEGER-WEBER², Vincent GERBAUX³,
Carole BRIFFOX³, José María Heras¹ and Anthony SILVANO¹**

¹ Lallemand SAS France, 19, rue des Briquetiers, 31702, Blagnac, Francia

² Lallemand, In den Seiten, 53, Korntal-Münchingen D-70825 Alemania

³ IFV Beaune, Beaune - Borgoñ, Francia

1. Introducción

La calidad del vino es el principal objetivo de los enólogos. El uso de bacterias enológicas seleccionadas es una herramienta que les permite controlar el proceso de fermentación maloláctica (FML). Durante cuatro años, el Instituto Francés de la Viña y el Vino (IFV), en colaboración con Lallemand, ha seleccionado una bacterias láctica robusta y versátil, que, una vez integrada en el proceso de elaboración del vino, refuerzan la labor cualitativa de la FML. Esta bacteria enológica seleccionada recientemente, O-MEGA[®], es muy resistente y aumenta la certeza de tener una FML segura y completa, ofreciendo numerosas ventajas en lo que a efectividad e impacto sensorial se refiere.

Se presentan las principales fases del proceso de selección, seguidas de los beneficios enológicos y sensoriales de esta nueva selección de bacteria.

2. Metodología: Proceso de selección

2.1 SELECCIÓN DE LA BACTERIA CON CRITERIOS ESPECÍFICOS

El objetivo del proceso es la selección de una nueva bacteria enológica que cumpla los siguientes requisitos:

- Rápido comienzo y realización de la FML en una amplia variedad de condiciones fisicoquímicas, incluidos pH y alcohol
- Baja producción de acidez volátil (AV), asociada a la degradación limitada de ácido cítrico
- Capacidad de ser producida en forma liofilizada, para su uso en inoculación directa sin rehidratación.

2.2 CREACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE CEPAS DE BACTERIAS ENOLÓGICAS.

En primer lugar, el IFV en Beaune reunió una colección de bacterias lácticas. Siguiendo las indicaciones que se acordaron inicialmente con Lallemand, se tomaron muestras de las bacterias durante la FML en vinos blancos, rosados y tintos, en varias regiones de Francia y en diferentes añadas. Para evitar duplicidades, solo se aislaron una o dos cepas de los depósitos que se tomaron como muestras. Las muestras se almacenaron a -80 °C. Esta colección fue la base de la investigación e incluyó 208 cepas de bacterias lácticas de las especies *Oenococcus oeni*.

2.3 SELECCIÓN DE LAS CINCO CEPAS GENÉTICAMENTE DIFERENTES QUE OFRECERON LOS MEJORES RESULTADOS

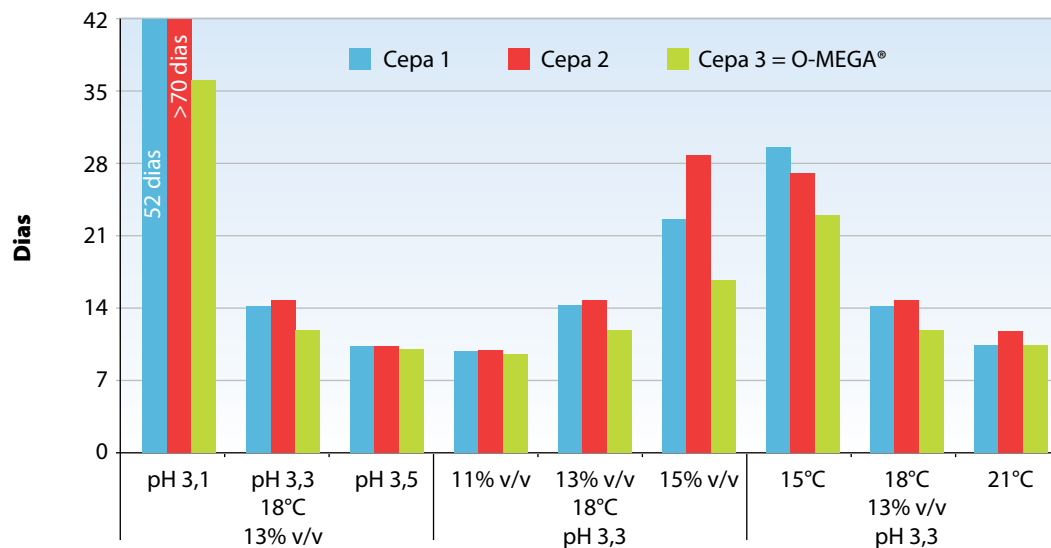
El proceso de selección se realizó en laboratorio en vino rosado con un pH ajustado a 3,2. Este vino se enfrió tras la fermentación alcohólica (FA), se dividió después en partes proporcionales de 125 ml y se inoculó con bacteria láctica. Con fines comparativos, se determinó la actividad de la FML de cada una de las 208 bacterias seleccionadas así como para cuatro bacterias seleccionadas comercialmente que sirvieron de control. Al finalizar la FML, se analizaron los parámetros clave, incluidos el nivel de ácido acético, el color y el aroma. En combinación con la cinética de la FML, estos análisis condujeron a la selección de las seis cepas *O.oeni* con mejores resultados de la

colección. Todas son genéticamente diferentes, tanto entre sí como con respecto a otras bacterias seleccionadas que ya están en el mercado. En los ensayos de producción (p.ej. test de resistencia a la liofilización, rendimiento, etc.) realizados por Lallemand, se eliminaron dos de las cepas. Las bacterias enológicas 1, 2 y 3 fueron producidas posteriormente de manera liofilizada para comprobar sus capacidades enológicas.

2.4 TEST DE RESULTADOS Y SELECCIÓN FINAL

Después, el IFV realizó pruebas de laboratorio en vino rosado con estas tres nuevas bacterias seleccionadas. El vino se repartió en botellas de 750 ml y se determinaron las distintas propiedades fisicoquímicas (p. ej. pH, alcohol y temperatura). Todas las bacterias se rehidrataron con agua mineral y se inocularon a razón de 2 millones de células por mililitro. Como se muestra en la figura 1, en cada una de las condiciones limitantes, la cepa de la bacteria 3 obtuvo mejores resultados que las cepas 1 y 2. La selección 3 mostró la cinética más rápida con un pH de 3,1 y toleró el mayor grado de alcohol (15 % por volumen) y la temperatura más baja (15° C). Según los análisis, la selección 3 presentó también el nivel más bajo de degradación de ácido cítrico (15 % del nivel inicial) y el nivel más bajo de AV al final de la FML (0,21 g/L de H₂SO₄). Se eligió por tanto para test continuos, y la nueva producción semiindustrial se denominó «O-MEGA®».

FIGURA 1. Tiempo necesario para conseguir la degradación del 90 % de ácido málico



3. El interés enológico de esta nueva selección

3.1 UNA SELECCIÓN ESPECIALMENTE VIGOROSA

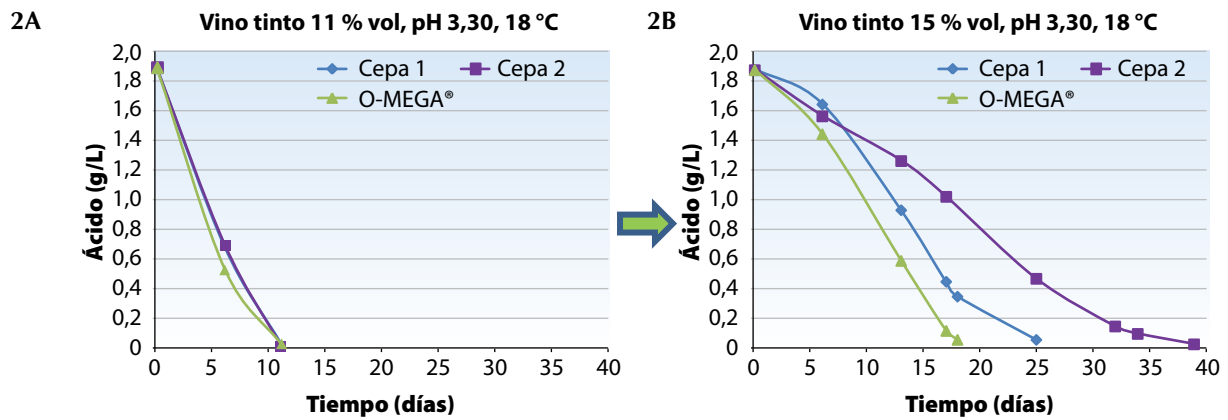
El IFV definió los atributos enológicos de O-MEGA®, primero en laboratorio sobre vino tinto y rosado, adaptados a diferentes condiciones fisicoquímicas (pH, alcohol, temperatura y nivel de SO₂). Para un vino determinado, el único parámetro de variación fue la bacteria enológica utilizada para inocularla tras la FA. Se comparó O-MEGA® con otras cepas finales seleccionadas, selecciones 1 y 2.

Las figuras 2 y 3 presentan los ensayos en vinos tintos y rosados, donde el único parámetro de variación fue el «grado de alcohol». Aparentemente, O-MEGA®:

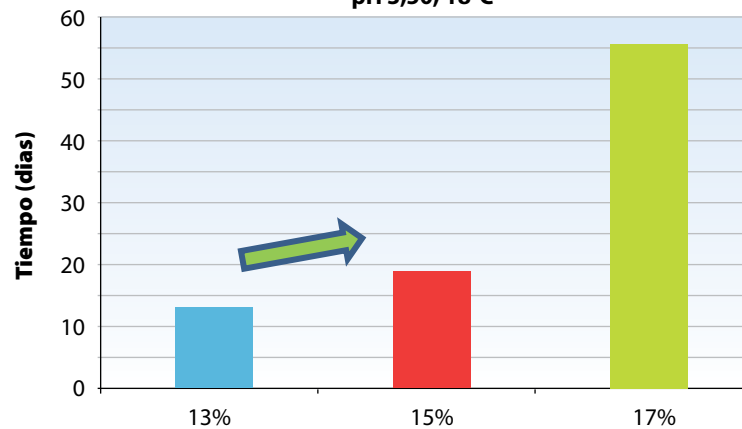
- Resulta poco afectada por concentraciones de etanol en un rango del 11 % al 15 % por volumen
- Es capaz de realizar la FML, incluso con niveles extremos de etanol (17% por volumen).

La figura 3 muestra que la duración de la FML se alargó solo cinco días cuando se aumentó el grado de alcohol de un volumen del 13 al 15 %. Además, O-MEGA® completó la FML en menos de dos meses (56 días) incluso en condiciones que limitan mucho la bacteria láctica (17 % por volumen).

FIGURAS 2A, 2B Y 3. Efecto del contenido de etanol en la realización de la fermentación maloláctica.

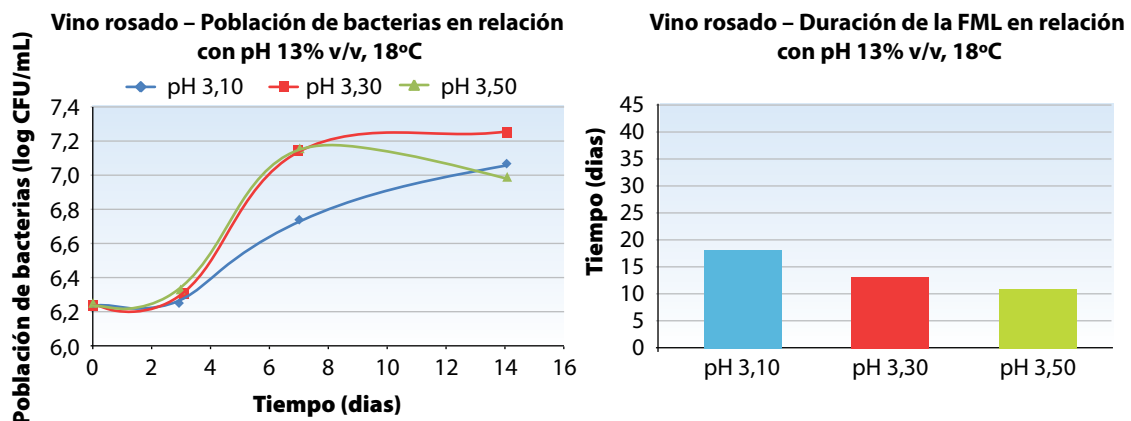


3. Vino tino – Duración de la fermentación maloláctica con O-MEGA® función del contenido de etanol (% vol) pH 3,50, 18°C



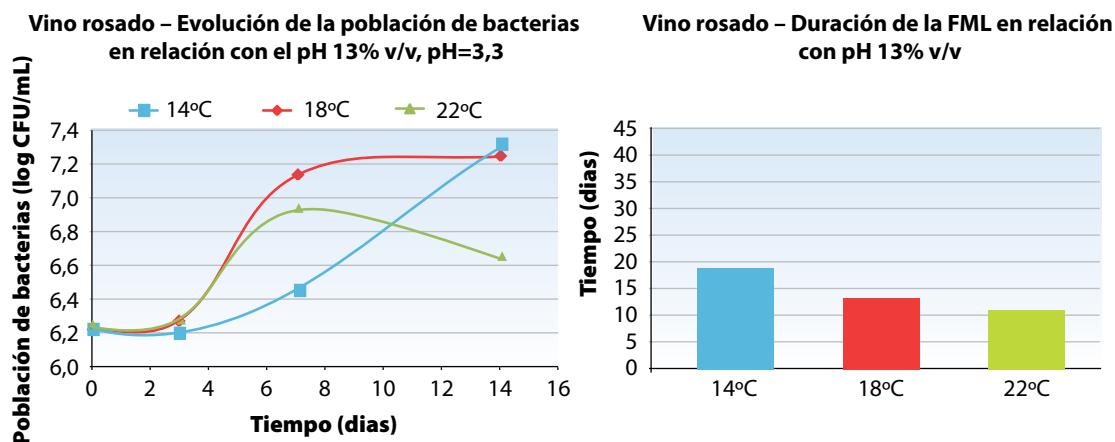
O-MEGA® también **demostró su efectividad en condiciones de bajo pH**, como se muestra en la figura 4. En un ensayo realizado en vino rosado, los resultados muestran la buena implantación de la biomasa, incluso con un pH de 3,1. La cinéticas de la FML también se ven poco afectadas por estas condiciones, completando la FML con O-MEGA® en 18 días, y en 11 días con un pH of 3,5.

FIGURA 4. Efecto del pH en la implantación en la bacteria y en la duración de la fermentación maloláctica en vino rosado.



Esta nueva selección también demostró **muy buena tolerancia a bajas temperaturas**. La figura 5 muestra un ensayo en vino rosado realizado por el IFV a tres temperaturas. O-MEGA® es capaz de multiplicar y realizar la FML en un corto plazo con estas tres variables. A una baja temperatura de 14° C, la FML se realizó en tan solo 19 días.

FIGURA 5. Efecto de la temperatura en la cinética de la fermentación maloláctica en vinos rosados

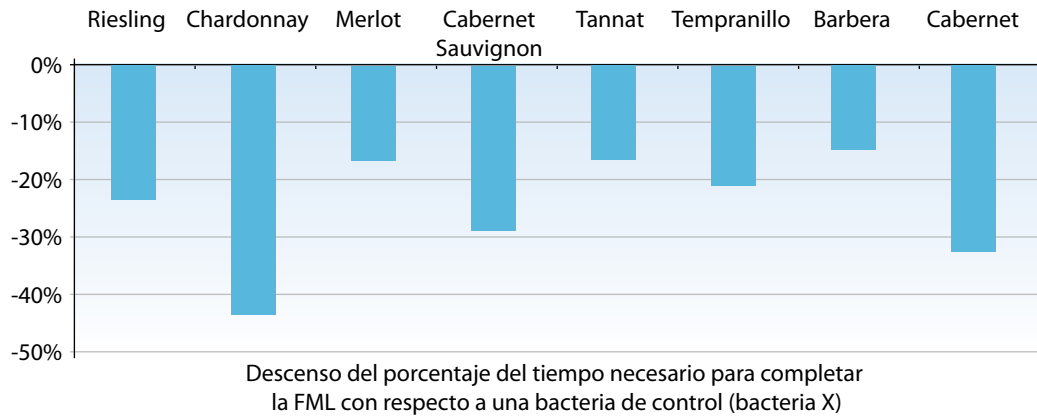


La caracterización de esta cepa en el laboratorio nos permitió observar el comportamiento de la bacteria de vino O-MEGA® en una amplia variedad de condiciones. Lallemand, junto con sus socios, dirigió estos ensayos en bodegas en vinos blancos, rosados y tintos en condiciones variadas y limitantes.

La figura 6 presenta diferentes ensayos y muestra un descenso del porcentaje de tiempo necesario para completar la FML con respecto a una bacteria de control. La bacteria X (el control) utilizada varía según el ensayo, pero precisamente fue seleccionada por su vigor. En todos los casos, O-MEGA® revela cinéticas más rápidas y la FML finaliza hasta 20 días antes.

TABLA 1 AND FIGURA 6. Resultados de algunos ensayos de campo en Alemania, Sudáfrica, Francia, España, Italia y Estados Unidos.

	Riesling	Merlot	Cabernet Sauvignon	Tannat	Tempranillo	Cabernet
País	Alemania	Francia	Francia	Francia	España	EEUU
Momento de	Coinoculación	Pos FA	Pos FA	Pos FA	Pos FA	Coinoculación
pH	3,25	3,26	3,31	3,67	3,53	3,60
Ácido málico	5,8 g/L	2,0 g/L	2,9 g/L	3,5 g/L	4,6 g/L	3,0 g/L
Etanol	12,1%	12,3%	11,9%	14,9 %	14,9%	13,5%
SO₂ Total	15 / <5 mg/L	30 / <5 mg/L	39 / <5 mg/L	36 / 15 mg/L	25 / <5 mg/L	<20 / <8 mg/L
SO₂ Libre						
Temperatura	17°C hasta 20°C	15°C	15°C	20°C	17°C	23°C
Duración de FML (días) (O-MEGA®)	25	39	48	19	37	4
Acidez volátil (O-MEGA®)	N/A	0,19 g/L	0,32 g/L	N/A	0,39 g/L	0,33 g/L



La diversidad de estos ensayos de bodega:

- Confirma la efectividad de O-MEGA® en **condiciones** limitantes, tales como pH bajo, altos niveles de etanol y baja temperatura
- Completa y define el **vigor de la selección cuando las concentraciones iniciales de ácido málico son altas** (por encima de 5 g/L) y **en variedades con fama de tener FML difíciles** (p.ej., Merlot/Tannat).

Otra característica interesante en esta bacteria de vino reside en la débil degradación del ácido cítrico, lo que da como resultado una baja AV y producción de diacetilo (notas lácteas y de mantequilla).

3.2 BAJA PRODUCCIÓN DE ACIDEZ VOLÁTIL ASOCIADA A LA DEGRADACIÓN LIMITADA DE ÁCIDO CÍTRICO

La producción de ácido acético alcanzada tras la FML está directamente relacionada con el metabolismo de ácido cítrico, igual que la producción de diacetilo. Con la acción de la citrato liasa se inicia esta vía: el ácido oxaloacético producido se decarboxila en piruvato, a partir de lo cual se inician diferentes reacciones (ver figura 7).

- Una pequeña cantidad puede derivar, por medio de la reducción, en D-lactato, pero es débil y necesita nicotinamida adenina dinucleótido (NADH).
- Otra vía, mediante el etanol-tiamina pirofosfato (TPP) y acetyl coenzima A (acetyl Co-A) conduce a la síntesis de ácidos grasos que, a su vez, se utilizan en la formación de la membrana fosfolipídica. Esto predomina en condiciones óptimas de crecimiento (sobre todo cuando el pH y la temperatura son favorables).
- El piruvato también se utiliza en la síntesis de moléculas de acetoína, incluido el diacetilo, las más oxidadas de estas moléculas que se pueden reducir sucesivamente a acetoína y después a butanodiol. En condiciones de crecimiento limitantes, se favorece este escenario puesto que la formación de estas moléculas se considera un proceso de detoxificación de células que debe eliminar el exceso de piruvato. Se presenta en múltiples mecanismos de regulación de pH intracelular.
- Por cada molécula de ácido cítrico consumida, se asume que se forman al menos una media de 1,2 moléculas de ácido acético. Esto es un motivo para el aumento de la AV, que se produce durante la FML. La degradación del ácido cítrico generalmente comienza durante la FML y continúa después de esta; la otra vía para la producción de AV es el metabolismo de los azúcares residuales, que depende del pH y se da solo una vez finalizada la FML (Lonvaud et al. 2010).

FIGURE 7. Metabolismo del ácido cítrico en *Oenococcus oeni* (Bartowsky 2004)

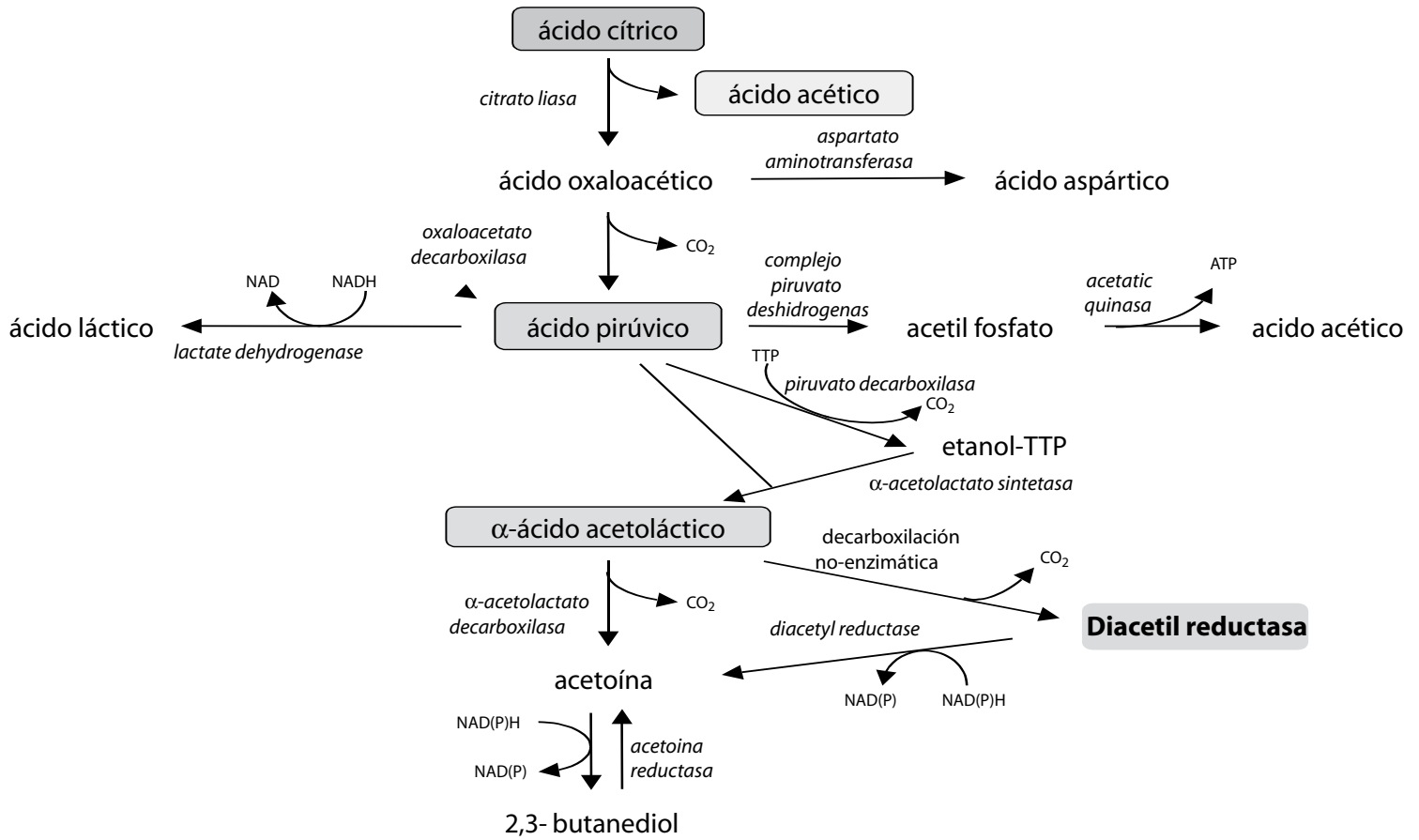
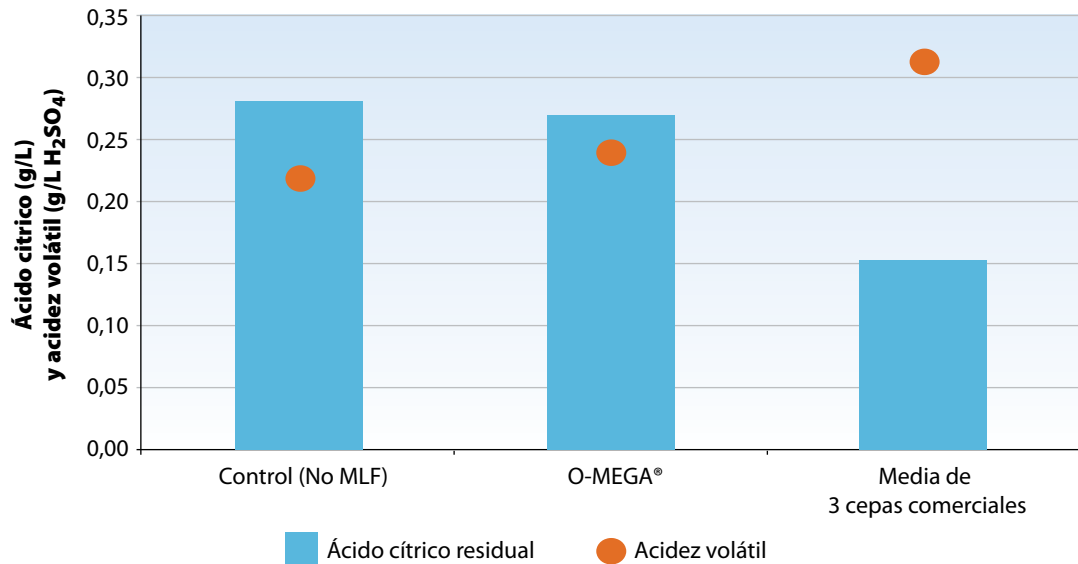


FIGURA 8. Metabolismo del ácido cítrico de O-MEGA® comparado con 3 cepas comerciales en Pinot Noir (nivel inicial de ácido cítrico 0,35 g/L; análisis antes de embotellado)



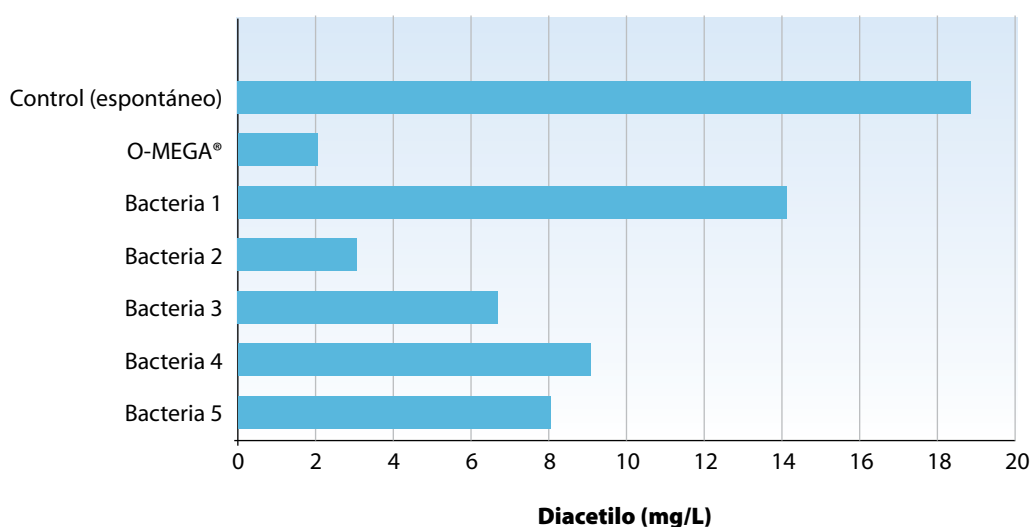
Normalmente, las bacterias de vino seleccionadas pueden consumir más o menos ácido cítrico, y en etapas más o menos tempranas. Esto puede influir en la producción y en la cantidad final de diacetilo y ácido acético. La degradación limitada del ácido cítrico formaba parte de las especificaciones para la nueva selección de IFV/ Lallemand. Esta propiedad enológica se verificó en los distintos ensayos.

Como podemos observar en la figura 8, el consumo de ácido cítrico por O-MEGA® es casi cero, puesto que el nivel de ácido cítrico residual era equivalente al existente cuando se bloqueó la FML. En lo que se refiere a las bacterias control, consumieron casi la mitad del ácido cítrico presente en el medio: el mismo comportamiento que las otras tres cepas estudiadas (la media se muestra en el gráfico). La consecuencia de que el nivel de degradación de ácido cítrico sea muy bajo es que el nivel de producción de ácido acético es también muy bajo, y por extensión, también los niveles de AV. La figura 8 muestra que el vino que realizó la FML con O-MEGA® tiene un nivel de AV equivalente al vino que no realizó la FML, mientras que los vinos donde la bacteria de vino seleccionada realizó la FML presentan un nivel de AV significativamente más alto.

Los ensayos en bodega confirman esta propiedad en condiciones difíciles. Como se muestra en la figura 6a, los niveles de AV al final de la FML en el vino inoculado con O-MEGA® son bajos en los cuatro ensayos.

Debido a la limitada degradación de ácido cítrico, esta nueva selección produce un escaso volumen de AV y diacetilo. En un ensayo llevado a cabo en Italia con la variedad Barbera, se realizó una comparación de las cinéticas de degradación de ácido málico y producción de diacetilo entre seis cepas de bacterias seleccionadas. En la figura 9 se presentan los resultados de las concentraciones de diacetilo en los vinos embotellados.

FIGURA 9. Resultados de los análisis de diacetilo en el ensayo comparativo entre seis bacterias seleccionadas diferentes y de control (espontáneo) en Barbera. Italia, 2013



En consecuencia, la elección de la bacteria enológica es un parámetro clave para la gestión del contenido de diacetilo en un vino. O-MEGA® permite que el enólogo manejar las notas lácteas y de mantequilla.

El trabajo de caracterización de O-MEGA® también confirmó que esta bacteria enológica no tiene la capacidad de producir ácido p-cumárico, un precursor de etilfenoles. De hecho, Burn y Osborne (2013) ya anunciaron que algunas cepas de *O. oeni* tienen la capacidad de degradar ácidos hidroxicinámicos y sus esteres de tartárico, lo que aumenta la cantidad de precursores de etilfenol en el vino y puede dar lugar a niveles más altos en presencia de *Brettanomyces bruxellensis*. Por lo tanto, es esencial en la selección de una nueva bacteria enológica, asegurarse de que la cepa no tenga la capacidad de aumentar el nivel de los precursores y se pueda calificar de «fenol negativa».

4. Conclusión

O-MEGA® es una nueva bacteria enológica robusta y versátil, capaz de realizar la fermentación maloláctica en un corto periodo de tiempo, en una amplia gama de condiciones. Los numerosos ensayos realizados en laboratorio y en bodega muestran su **notable capacidad en una amplia variedad de elaboraciones, incluidos vinos blancos, rosados y tintos**:

- pH ≥ 3.1
- Grado de alcohol <16 % por volumen, incluso 17 % vol si los demás factores no son limitantes
- Total SO₂ ≤ 50 mg/L
- Temperatura $\geq 14^{\circ}\text{C}$.

Esta nueva bacteria también parece ser resistente a los polifenoles y tiene la capacidad de degradar importantes niveles de ácido málico (6 g/L) así como niveles más bajos (1 g/L).

Fácil de usar, O-MEGA® está disponible para inoculación **directa sin rehidratación** (es una bacteria enológica MBR®) y se implanta sin dificultad en cualquier momento de la inoculación: en coinoculación, inoculación temprana o inoculación secuencial. Ofrece también mayores ventajas sensoriales puesto que degrada muy poco ácido cítrico, por lo que provoca **poca acidez volátil y diacetilo**.

Asimismo, en lo que a vinos rosados y tintos se refiere, O-MEGA® tiene **poco impacto en el color del vino**. Los primeros ensayos han demostrado que la nueva selección de IFV de hecho reduciría la pérdida de color en el vino rosado que se suele observar durante la FML, y en los vinos tintos preservó más el color que otras bacterias seleccionadas.

Referencias

Burns, T., and J. P. Osborne. 2013. Impact of malolactic fermentation on the color and color stability of Pinot noir and Merlot wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 64(3):370–377.

Lonvaud-Funel, A., V. Renouf, and P. Strehiano. 2010. *Microbiologie du vin - Bases fondamentales et applications*. Tec et Doc, Lavoisier.