

CULTIVOS INICIADORES MALOLÁCTICOS EN FORMA SECA ACTIVA – UN ENFOQUE RENTABLE Y EFICIENTE PARA EL CONTROL DE LAS FERMENTACIONES MALOLÁCTICAS

Sibylle Krieger-Weber¹, Magali Délérís-Bou², Jose María Heras³

¹ Lallemand, Korntal-Münchingen – Alemania

² Lallemand SAS Blagnac – Francia

³ Lallemand España-Portugal – jmheras@lallemand.com

En el pasado, los productores dejaban que la naturaleza siguiera su curso y se limitaban a esperar a que la fermentación maloláctica (FML) se produjera de forma espontánea. “Pero esto significa que es una bacteria láctica presente en el medio, y no el enólogo, la que ejerce todo el control sobre la calidad del producto acabado” (R. Morenzoni 2005). Los primeros cultivos iniciadores malolácticos (ML) liofilizados comercializados requerían una fase de aclimatación/reactivación efectuada en condiciones controladas. Pero la reactivación exigía mucho trabajo y tiempo y frecuentemente se efectuaba en mosto de uva sin SO₂ que era diluido con agua y/o vino en una proporción 1:1. La reactivación generalmente requería un mínimo de 48 horas.

Se investigó un protocolo más fácil rehidratando las bacterias en agua, con una formulación activadora específica, y vino en una proporción 1:1. Tras 24 horas de aclimatación, el cultivo está listo para ser introducido en el volumen final de vino. Gracias a la presencia de ácido málico en la fracción adicionada de vino, la activación del sistema metabólico bacteriano da lugar a una fase de latencia muy corta, consiguiendo una dominancia temprana de la cepa seleccionada y una rápida degradación del ácido málico incluso con unos niveles iniciales de ácido málico bajos o muy altos. También se investigó la aplicación de este tipo de cultivo iniciador utilizando estrategias de coinoculación (inoculación del cultivo iniciador de bacterias 24 horas después de la adición del cultivo de levaduras) y para vinos con pH elevado utilizando un protocolo simplificado.

Introducción

El vino, por su propia naturaleza, no se presta al crecimiento natural de microorganismos. Posee una acidez total y un grado alcohólico relativamente altos, un pH bajo y, por lo general, anhídrido sulfuroso. El crecimiento de *Oenococcus oeni* es lento con valores de pH por debajo de 3,1 y, dependiendo de otros factores inhibidores del crecimiento y de la densidad celular inicial, el inicio y la finalización de la FML pueden sufrir retrasos considerables. Por otro lado, en condiciones más favorables para el crecimiento de *Oenococcus*, con valores de pH por encima de 3,5, especies de *Lactobacillus* y *Pediococcus* podrían conducir la FML. La inoculación con cultivos iniciadores seleccionados, aislados cuidadosamente de la naturaleza, reduce la posibilidad de contaminación por parte de otras bacterias lácticas, garantizando así un rápido inicio de la FML y un mejor control sobre la producción de compuestos del aroma y del gusto del vino (Bauer et al. 2004). En el mercado podemos encontrar varios cultivos iniciadores de bacterias malolácticas (BML) diferentes, muchos de los cuales son producidos en forma liofilizada o congelada, aunque también se encuentran disponibles cultivos en forma líquida. Estas cepas han sido seleccionadas a partir de fermentaciones malolácticas espontáneas debido a sus buenas cinéticas de fermentación, a su comportamiento en condiciones extremas del vino y a sus específicas propiedades sensoriales así como a su capacidad para evitar la producción de metabolitos negativos. En el pasado, muchos de estos cultivos iniciadores requerían una fase de aclimatación/reactivación realizada en condiciones muy controladas. La reactivación generalmente se efectuaba en mosto de uva sin SO₂ que era diluido con agua o vino en una proporción 1:1. El pH del mosto diluido era corregido hasta obtener un pH de 3,6 o superior, y se adicionaban nutrientes bacterianos a una concentración de 0,05% p/v. La fase de reactivación generalmente requería un mínimo de 48 horas y, para evitar el choque térmico durante la inoculación, el crecimiento de las células bacterianas se efectuaba a una temperatura que no difería en más de 10 °C de la temperatura del vino a inocular.

Más recientemente, la inoculación directa de cultivos iniciadores se ha empezado a convertir en una práctica ampliamente utilizada por los enólogos. Estos preparados de bacterias malolácticas pueden ser adicionados directamente al vino o bien pueden ser rehidratados durante un corto periodo de tiempo en agua antes de ser adicionados al vino con el fin de conseguir una mejor distribución de las bacterias en el vino.

Cultivos iniciadores de la FML de inoculación directa (MBR®):

Para sobrevivir a la “re-introducción” dentro de un ambiente hostil como el del vino sin una reducción del número de células viables y sin la consiguiente pérdida de actividad maloláctica, las bacterias iniciadoras deben ser sometidas a una fase de aclimatación durante su proceso de producción. Esta adaptación consiste fundamentalmente en la adquisición de mecanismos de resistencia, que permiten a los microorganismos regular el pH intracelular para mantener la maquinaria celular (Alexandre et al. 2008). La adaptación implica también una modificación de la estructura de la membrana, una modificación de la fluidez de la membrana y la síntesis de las denominadas proteínas de estrés o HSP (heat shock proteins). La forma MBR® de las bacterias malolácticas disponibles comercialmente representa un procedimiento que somete las células a diversos estreses ambientales y químicos y aumenta su capacidad para soportar los rigores de la adición directa al vino. No todas las cepas son capaces de soportar este procedimiento. De hecho, solo el 60% de las cepas *Oenococcus oeni* pueden ser producidas utilizando este proceso. Las cepas pueden ser eliminadas de este programa a causa de un crecimiento lento, una baja o nula expresión de la enzima maloláctica o por su incapacidad para sobrevivir al proceso. Las cepas que sobreviven son robustas, poseen la capacidad de sobrevivir a la adición directa en el vino y llevar a cabo una FML fiable y son capaces de producir un vino de elevada calidad.

Cultivos iniciadores fáciles de elaborar (1-Step®):

A diferencia de los cultivos MBR® de inoculación directa, los cultivos 1-Step® son sometidos a un estrés más “suave” durante la producción. Por tanto, estos cultivos han sido menos preacondicionados y por consiguiente requieren una fase de aclimatación antes de ser inoculados en el vino.

Resultados

Aclimatación 1-Step®

Se investigó un procedimiento de aclimatación mediante rehidratación de las bacterias en agua y vino (1:1) con la adición de una específica formulación activadora y una corta fase de aclimatación para “despertar” a las bacterias y activar su metabolismo. Se estudió la mejor combinación de cultivo iniciador 1-Step® y de procedimiento de aclimatación en diversos laboratorios y se efectuaron ensayos en campo con condiciones más limitantes en el vino utilizando diferentes estrategias de inoculación: inoculación secuencial vs. co-inoculación.

En laboratorio se estudiaron, en situaciones reales de vino, condiciones para la aclimatación / activación del kit 1-Step®, constituido por una cepa ML iniciadora conocida producida en condiciones de estrés suave y una formulación activadora. La inoculación directa del cultivo iniciador “suave” dio lugar a una pérdida de viabilidad y a una degradación solamente parcial del ácido málico (Fig. 1). Los mejores resultados se obtuvieron aclimatando la bacteria de 18 a 24 horas a 28° – 25° C en agua y vino (1:1) con la adición del activador. Una aclimatación más corta (8 horas) dio lugar a una fermentación maloláctica más lenta.

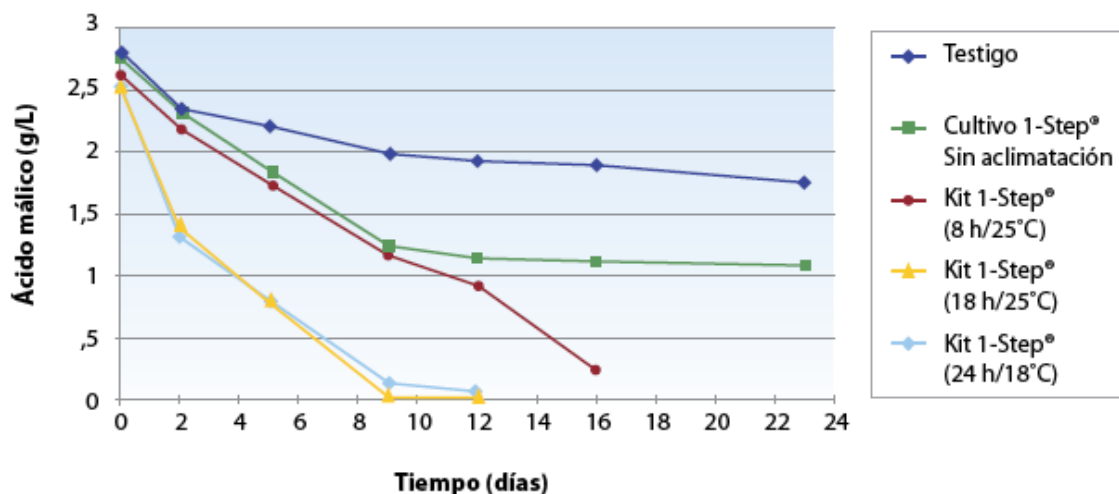


FIGURA 1. Degradación del ácido málico en un Chardonnay 2004 inoculado tras la fermentación alcohólica con un cultivo 1-Step® con y sin aclimatación previa (13.5% vol, pH 3,29, SO₂ total 8 mg/L, temperatura 18 °C)

Empleo de 1-Step® a nivel comercial

La Figura 2 muestra el protocolo 1-Step® que fue utilizado en los ensayos y aplicado en bodega.

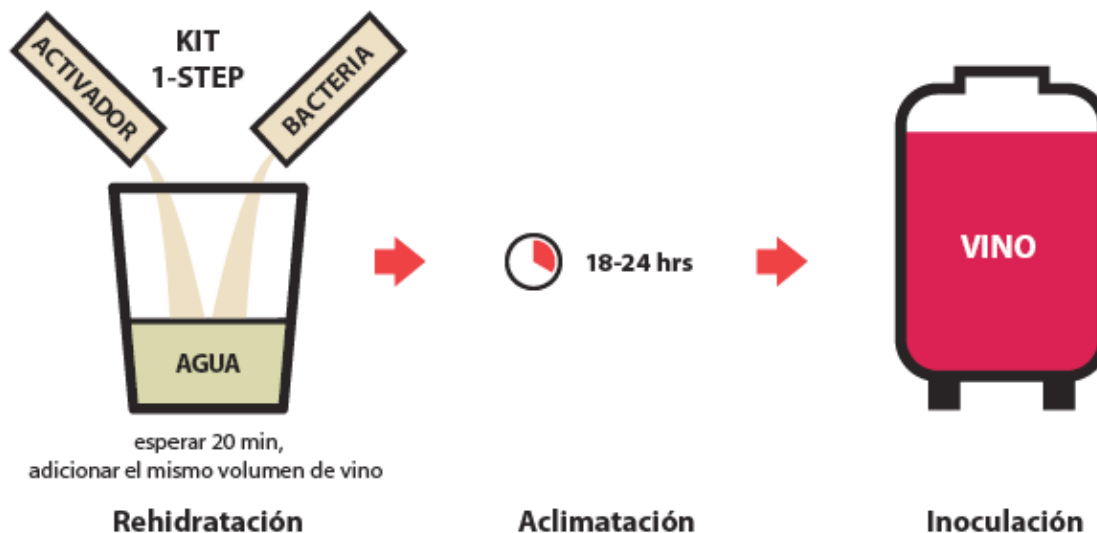


FIGURA 2: Protocolo de aclimatación 1-Step®

Protocolo propuesto que podría ser aprobado: 18 - 24 horas de precultivo son suficientes para una completa aclimatación de las BML. Además, gracias a la presencia de ácido málico durante la aclimatación, la activación del sistema metabólico de las bacterias 1-Step® da lugar a una fase de latencia muy corta (de 1 a 3 días), favoreciendo la dominancia temprana de las bacterias inoculadas y la rápida degradación del ácido málico.

Recientemente Cecconi et al. (2009) llevaron a cabo ensayos en dos vinos diferentes y confirmaron que las células 1-Step® aclimatadas mejoran la fermentación maloláctica. Los resultados mostraron el diferente estadio fisiológico entre las células aclimatadas y no aclimatadas.

Datos procedentes de la vendimia 2006 en Sudáfrica confirmaron la elevada actividad de los cultivos 1-Step® aclimatados: incluso en condiciones extremas como bajos niveles iniciales de ácido málico (1,55 g/l) y elevado grado alcohólico (15,1 %vol) se puede efectuar la FML en 7-21 días.

Estrategias de aclimatación y coinoculación 1-Step® en condiciones difíciles del vino

Incluso en las condiciones más limitantes para las bacterias malolácticas, Zapparoli & Tossi (2009) consiguieron efectuar con éxito la fermentación maloláctica en un vino Amarone, elaborado con uvas corvina secadas parcialmente (pH 3,2, Alcohol 16,5% v/v, SO₂ tot 50 mg/l), utilizando la técnica de coinoculación (inoculación de bacterias 1 día después de las levaduras) y una aclimatación 1-Step® (Fig. 3).

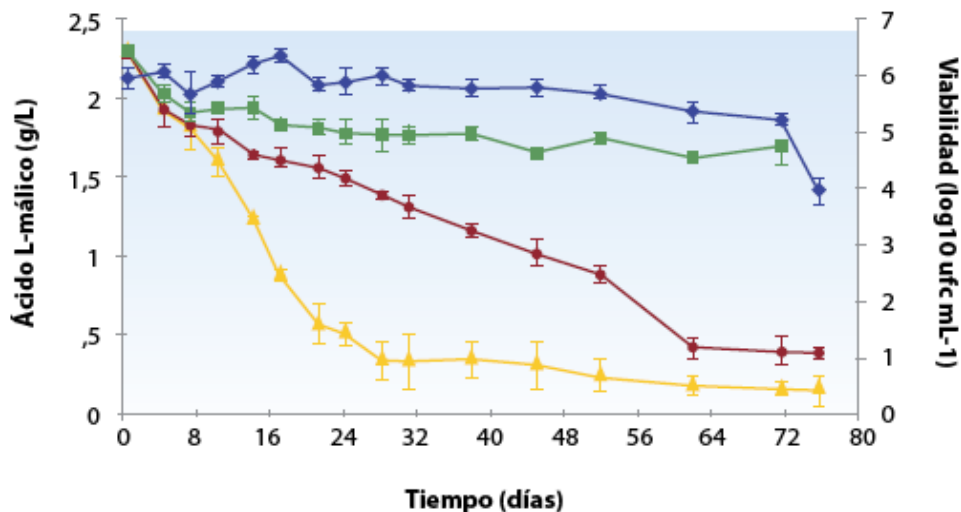


FIGURA 3: Recuento de células de bacterias lácticas (log₁₀ ufc/ml, símbolos blancos) y consumo de ácido L-málico (g/L, símbolos negros) determinados en ensayos inoculados con células aclimatadas 12 h (triángulo) y células aclimatadas 24 h (cuadrados). La flecha indica la inoculación de las bacterias.

Estrategias de aclimatación e inoculación temprana 1-Step® en condiciones fáciles del vino

Combinación de los dos procedimientos de “aclimatación” en condiciones fáciles del vino (pH elevado): la coinoculación y la activación de un cultivo iniciador 1-Step® puede dar lugar a una FML demasiado rápida y a posibles interacciones negativas entre las bacterias y las levaduras, a causa de un cultivo iniciador ML muy potente y activo en el momento de la inoculación. Se evaluó el efecto de diferentes procedimientos de rehidratación / aclimatación de un cultivo 1-Step® sobre las cinéticas de degradación del ácido málico en una situación de coinoculación. Se utilizó el clásico kit 1-Step® en los 5 tratamientos, pero los tiempos de rehidratación y aclimatación variaron como se muestra en la tabla 1.

Tiempo de aclimatación	Rehidratación/Aclimatación	Planificación de la inoculación
0,5 h	Agua	24 h después de las levaduras
2,0 h	Agua	24 h después de las levaduras
8,0 h	Agua	24 h después de las levaduras
12 h	Agua + Zumo de uva (1:1)	24 h después de las levaduras
24 h	Agua + Vino (1:1)	Final de la fermentación alcohólica

TABLA 1: Tratamientos de aclimatación con un Cabernet Sauvignon 2008 (Chile) 23,2° Brix (alcohol potencial 13,6 %vol), pH 3,5, AT 4,9 g/l H₂SO₄). (E. Bordeaux, U. Católica de Chile)

La fermentación alcohólica no se vio afectada por ninguno de los tratamientos y acabó a los 11 días en todos los lotes. La duración de la fermentación maloláctica fue muy consistente y comparable en todos los tratamientos de coinoculación, siendo ligeramente más rápida que en el tratamiento inoculado tras la fermentación alcohólica (tabla 2). El tiempo total empleado para la realización de la fermentación alcohólica y maloláctica fue de 12 días más para el tratamiento de inoculación secuencial que para el de coinoculación.

Tratamiento	FA (días)	FML (días)	FA y FML (días)
Co-inoculación (24 hrs después de las levaduras)			
Rehidratación/aclimatación			
30 min.; 2 hrs.; 8 hrs.; 12 hrs.	11	14	15
Inoculación del vino Protocolo clásico 1-Step®	11	16	27

TABLA 2: Duración de la fermentación alcohólica (FA) y de la fermentación maloláctica (FML)

Se observó un 100% de implantación en los lotes coinoculados, lo que demuestra las ventajas de una dominancia temprana de la cepa seleccionada.

Tras estos resultados de investigación, se han a cabo numerosas experiencias a nivel industrial.

Durante la vendimia 2009, en la zona del Alentejo (Portugal) trabajando con uvas de la variedad Trincadeira (pH: 3,8 y Alcohol Probable de 14,60%) se realizaron vinificaciones a gran escala llevando a cabo la práctica de coinoculación (24hrs después de las levaduras) con un cultivo 1-Step® rehidratado en agua durante 30 min. En estos ensayos, aparte de constatar la no influencia de la inoculación temprana del cultivo maloláctico sobre el desarrollo de la fermentación alcohólica, otro punto interesante fue la ganancia de tiempo (fermentación alcohólica + fermentación maloláctica) de 10 días sobre el proceso habitual (sin inoculación de bacterias) lo que permitió estabilizar microbiológicamente el vino de forma temprana evitando la inmovilización del vino desprotegido de SO₂ durante largos periodos de tiempo.

Del mismo modo, se realizó un análisis completo de los vinos una vez finalizada la FML para determinar la influencia de esta práctica en cuanto al nivel de compuestos aromáticos principales. En este sentido cabe destacar el menor nivel de compuestos relacionados con percepciones lácticas, como el lactato de etilo, que en altas concentraciones pueden enmascarar el carácter afrutado del vino.

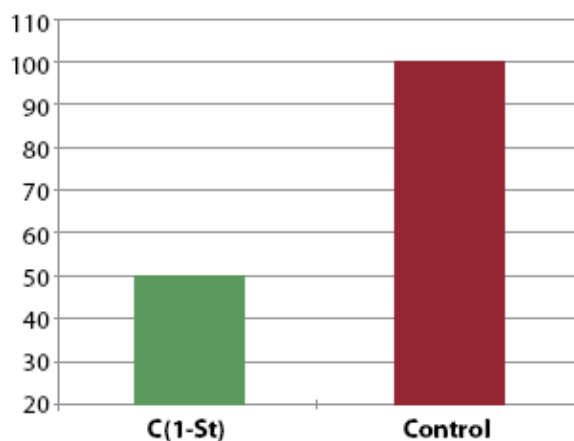


FIGURA 4: Contenido en lactato de etilo después de FML. C1S Coinoculación levadura-bacteria, frente a control sin inoculación de bacterias seleccionadas.

Estos vinos fueron sometidos a un panel profesional de cata formado por 7 catadores cualificados. Se realizó un análisis sensorial mediante el sistema normalizado ISO11035. Los resultados se expresan según la fase de cata. (Fig. 5A y 5B).

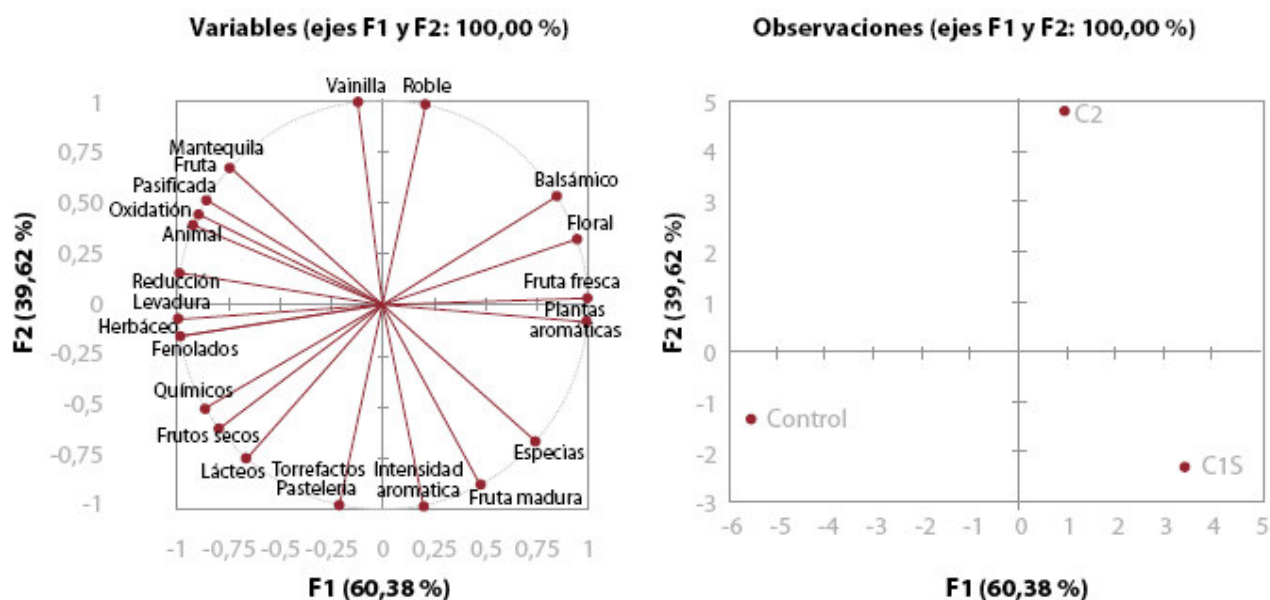


FIGURA 5A. Fase aromática

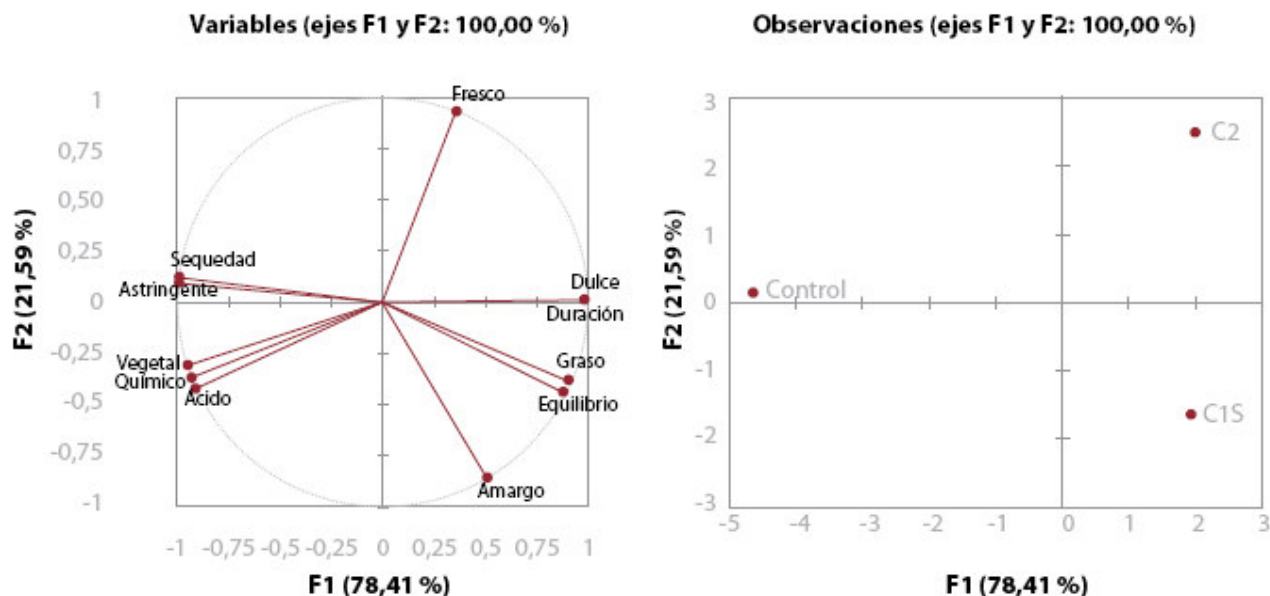


FIGURA 5B. Fase gustativa

El vino donde se realizó la coinoculación fue el mejor valorado por su mayor intensidad aromática, con notas más afrutadas, mientras que el control presentaba notas químicas, fenoladas y, sobre todo lácticas. En la fase gustativa el control fue definido como más astringente, taninos secantes y notas vegetales mientras que el vino donde se realizó la coinoculación se presentaba con sensaciones más grasas y mayor longitud en boca.

Conclusiones

Los cultivos iniciadores 1-Step® han sido desarrollados para ofrecer una solución rentable, gracias a la mayor productividad en condiciones de producción menos estresantes. Por otro lado, la activación del sistema metabólico bacteriano durante la rápida fase de aclimatación proporciona un cultivo muy activo en el momento de la inoculación en el vino, que se ve reflejado en una corta fase de latencia y en un rápido inicio de la FML. Los cultivos 1-Step® han demostrado ser no solo rentables sino también eficaces incluso en condiciones difíciles del vino. La fase de aclimatación no es necesaria cuando se aplican estrategias de coinoculación y cuando las condiciones del vino son fáciles, sobre todo en condiciones de pH más elevado (pH > 3,5). Se necesitará solamente una simple fase de rehidratación de 30 – 120 minutos en agua adicionada del activador, de forma que la aclimatación del cultivo tendrá lugar durante la fermentación alcohólica, obteniendo todas las ventajas relacionadas con una inoculación temprana desde el punto de vista de control del proceso fermentativo y manejo del perfil sensorial del vino.

Referencias

Morenzoni, R. (2005). Introduction. Morenzoni, R., Scully Specht, K. (eds.) *Malolactic fermentation in wine*. Lallemand Inc. Montréal, Canada: 2:1-2:2.

Bauer, R., Dicks, L.M.T. (2004). Control of malolactic fermentation in wine. A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 25/2: 74-88.

Alexandre, H., Grandvalet C., Guilloux-Bénatier M., Remize-Barnavon F., Tourdot-Maréchal, R eds. (2008). Chapter 3 : Conditions de croissance et facteurs de stress. In : *Les bactéries lactiques en oenologie*. Lavoisier, Paris: 53-84.

Cecconi D., Milli A., Rinalducci S., Zolla L., Zapparoli G. (2009). Proteomic analysis of *Oenococcus oeni* freeze-dried culture to assess the importance of cell acclimation to conduct malolactic fermentation in wine. *Electrophoresis* 30: 2988-2995.

Zapparoli, G., Tosi E., Azzolini M., Vagnoli P., Krieger-Weber S (2009). Bacterial inoculation strategies for the achievement of malolactic fermentation in high-alcohol wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, Vol. 30, No. 1: 49-55.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento a E. Bordeau y colaboradores (Universidad Católica de Chile), G. Zapparoli (Univ. di Verona, Italia), E. Tosi y colaboradores (“Centro per la Speriment. in Vitivinicoltura” de la Provincia de Verona, Italia), Proenol (Portugal) y A. Palacios (Excell Ibérica, España).