

Universidad Católica de Cuyo

*Facultad Don Bosco de Enología y
Ciencias de la Alimentación*

Licenciatura en Enología e Industrias
Frutihortícolas

Puesta a punto de un pie de cuba para bacterias lácticas

María Paula Trejo Simonassi

Asesor: Lic. Daniel Buono

Revisión Formal: Mgter. Elena Caliguli

Tipo de Trabajo: Trabajo final

Lugar y Fecha: Rodeo del Medio, Mendoza, 04 de Agosto del 2022

Defensa Oral

Libro N°: Folio N°: Acta N°:

Fecha: Calificación:

Tribunal Calificador:

RESUMEN

En esta investigación, se aborda la realización de un pie de cuba de bacterias lácticas con el objetivo de adaptarlas gradualmente para lograr una disminución de la acidez total con mejora organoléptica, sumado a la disminución de costos. Para ello, se realiza un marco teórico para dar apoyo a lo realizado y luego se detalla el procedimiento con el cual fue llevado a cabo, además de los controles pertinentes al proceso. Gracias a esto, se logró el consumo total del ácido málico, dando así resultados satisfactorios.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Dios y a la Virgen María bajo la advocación de María Auxiliadora, por la oportunidad de seguir la carrera que elegí desde niña, por la fortaleza y consuelo en momentos difíciles y por la gracia de obtener mi título.

En segundo lugar, a mis padres, sin los cuales nada hubiese sido posible, quienes sin dudar me apoyaron, creyendo siempre en mí y a los que les debo todo por tanta paciencia y sacrificio que hicieron.

Agradezco profundamente también a mi novio Gustavo, quien me enseñó mucho de este camino en la enología, y su ayuda diaria para terminar este trabajo.

Doy gracias también a mi familia y amigos, que siempre tuvieron una palabra de aliento para seguir adelante y se alegran por mí en cada éxito.

También agradezco a quienes me dieron la oportunidad de realizar esta investigación, que me brindaron sus conocimientos y ayuda desinteresada con el objetivo de que crezca como profesional.

INTRODUCCIÓN

En la presente tesina, se describe la realización de un pie de cuba para bacterias lácticas, el cual se utilizó para un vino Chardonnay base de espumante que tenía una elevada acidez total. Lo mismo, fue con el objetivo de disminuir la misma mediante la realización de la fermentación maloláctica. Cabe destacar el problema que esto plantea en cuanto a los caracteres organolépticos por su influencia en el sabor, por lo cual, se vuelve fundamental su corrección ya que implicaría una mejora necesaria.

De manera previa a comenzar la investigación, se realizó un marco teórico donde se profundizó respecto a la información referida a las bacterias lácticas, su metabolismo y necesidades nutricionales, donde se apoya lo que se llevó a cabo en la práctica. Es importante destacar que, si bien se consultaron diversas fuentes bibliográficas para la construcción de dicho marco teórico, hasta el momento no se

ha encontrado bibliografía que trate acerca de la multiplicación de bacterias lácticas como pie de cuba. Pero, con el objetivo de poder lograr un acercamiento a las características morfológicas, necesidades nutricionales y factores de crecimiento, es que se consultan diversas fuentes bibliográficas.

En lo referido al aspecto metodológico, la tesina presenta las siguientes características:

- *Hipótesis:* Demostrar de manera práctica y analítica que, obteniendo un pie de cuba de bacterias lácticas viable, es posible realizar la fermentación maloláctica de manera completa y efectiva en un vino base de espumante.
- *Objetivos:*
 1. Adaptación gradual de fermentos lácticos seleccionados con pie de cuba.
 2. Disminuir la acidez total biológicamente.
 3. Mejora organoléptica.
 4. Disminución de costos en insumos y en tiempo.

Es importante destacar que, si bien hubo limitaciones en cuanto a algunos controles por falta de recursos o de información para realizarlos, el proceso se desarrolló de manera óptima llegando a resultados satisfactorios.

CAPÍTULO 1: Generalidades de las bacterias lácticas

Las bacterias lácticas son otros microorganismos que están presentes en las vendimias y en los vinos, generando en la mayor parte de las ocasiones un buen número de alteraciones; salvo en el caso de la degradación del ácido málico, donde puede ser interesante que ésta se produzca en determinados tipos de vinos. Las mismas especies de bacterias lácticas, son capaces de producir una u otras transformaciones, pudiendo degradar determinados sustratos y dependiendo de las condiciones del medio.

Taxonomía y descripción de las principales bacterias lácticas

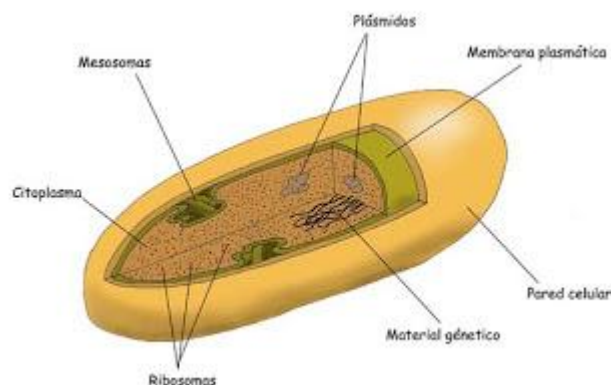
Las bacterias son células procariotas o protistas inferiores, que se diferencian de las levaduras o eucariotas, por su tamaño pequeño y la ausencia de membrana nuclear que forme un verdadero núcleo. Las bacterias lácticas se diferencian de las acéticas por ser catalasa negativa y por presentar una coloración Gram positiva, donde se fija un colorante básico de violeta cristal,

después de tratarlas sucesivamente con una solución de lugol (yodo y yoduro de potasio), alcohol y de un colorante ácido de safranina, método utilizado en este trabajo para la observación y diferenciación de las levaduras.

Estructura celular: la célula bacteriana está constituida por las envolturas celulares, el citoplasma, el material nuclear y los elementos subsidiarios.

Ilustración 1

Estructura de bacteria láctica



Nota: Equipo editorial. (31 de marzo de 2022). Lactobacillus. Lifeder. Recuperado de <https://www.lifeder.com/lactobacillus/>.

Envolturas celulares: están constituidas por la pared celular y la película citoplasmática. La pared celular está formada por una a tres capas superpuestas, según el tipo de bacterias (una en las grampositivas y tres en las gramnegativas). La pared celular desempeña funciones de protección, y siendo más o menos rígida, determina la forma de las bacterias.

- Pared celular externa: está compuesta por un peptidoglicano que no se encuentra en la pared de las levaduras, formado por largas cadenas de ácido N-acetilmurámico (NAM) y de N-acetilglucosamina

(NAG), unidos por un enlace glucosídico β (1-4), por donde se pueden romper las cadenas cuando actúa la enzima lisozima. Contiene, además, otros polímeros de ribitol-fosfato o glicerol-fosfato, llamados ácidos teicoicos, que pueden suponer hasta el 50% del peso de la pared celular. Exteriormente, esta membrana se cubre de una capa proteica "S", la cual a su vez forma una acumulación de un polisacárido que envuelve la totalidad de la célula. En algunas especies de bacterias puede ser muy abundante, haciendo tomar al vino un aspecto viscoso conocido como "ahilado" o enfermedad de la grasa.

La pared celular es rígida, con un espesor de 10 a 20 milimicras, desempeñando funciones de protección, ya que puede llegar a resistir presiones osmóticas internas muy elevadas, del orden de 20 atmósferas. La misma, puede ser fácilmente atravesada por el agua, los iones minerales, así como los nutrientes y metabolitos sintetizados por las bacterias de estructura más compleja.

- Membrana plasmática: se sitúa por debajo de la pared externa, con un espesor diez veces menor, estando separada de ésta por un espacio periplásmico, y presenta mesosomas, que son unos pliegues hacia el interior del citoplasma. Su composición es muy parecida a la membrana homóloga de las levaduras, es decir que también está formada por una doble capa lipídica con una zona hidrófoba central. Esta membrana juega un papel importante en el metabolismo celular.

Realiza numerosas funciones enzimáticas, posee una permeabilidad selectiva entre su interior y el medio exterior, pudiendo incluso transportar sustancias en contra del gradiente osmótico, gracias a la intervención de la ATPasa como “bomba de protones”.

Durante el ciclo de crecimiento, las bacterias pueden adaptarse a las condiciones del medio, en función de la presencia de factores inhibidores, como pueden ser la acidez, la temperatura o la presencia de etanol. Esta adaptación, se logra gracias a las modificaciones de la composición y estructura de la membrana plasmática. Por ejemplo, en condiciones de baja temperatura, donde la membrana tiende a endurecerse, ésta se ablanda modificando la composición de los ácidos grasos que contiene. O bien, en presencia de alcohol etílico sucede lo contrario, la estructura de la membrana se endurece para compensar la excesiva permeabilidad que produce esta sustancia mediante una variación de la relación de los ácidos grasos insaturados/ácidos grasos saturados.

Citoplasma: está formado por una disolución de diversas sustancias, una suspensión de otras macromoléculas y contiene algunas estructuras diferenciadas del resto, como el material nuclear, los ribosomas, cromatóforos¹ y sustancias de reserva. En él se realizan las acciones de catabolismo y anabolismo necesarios para su desarrollo, teniendo un nivel de pH cercano al valor de 7,0.

¹Los cromatóforos son células con pigmentos en su interior que reflejan la luz.(Biblioteca Virtual de la Salud – bvsalud.org)

Las sustancias de reserva son mayormente glúcidos, representando cerca del 30% del peso de la célula, así como también lípidos y algunas sales minerales. La acumulación de sustancias de reserva se realiza para prevenir posibles carencias y sobre todo cuando existe un déficit de sustancias nitrogenadas en el medio.

Los ribosomas son unos pequeños gránulos de tamaño comprendido entre 10 a 30 milimicras, estando compuestos de ARN que son capaces de sintetizar las proteínas según sus códigos genéticos.

Material nuclear: en las bacterias no existe un núcleo totalmente diferenciado del citoplasma, debido a que no se encuentra una membrana nuclear que lo defina, estando el material genético esparcido en el citoplasma, en forma de filamentos cruzados y a veces adheridos a los mesosomas. Por otro lado, el ADN nuclear está constituido por un solo cromosoma circular, de doble hélice, con tamaño variable según las especies; oscilando entre 2400 kilopares de bases (kpb) en *Lactobacillus plantarum*, hasta 1200 kpb en *Pediococcus pentosaceus*. También existen otras pequeñas moléculas de ADN independientes denominados plásmidos, que tienen unos tamaños más reducidos, de 2 a 40 kpb. A los previamente mencionados, se les asignan determinadas funciones específicas, como resistencia a los antibióticos, al hidrólisis de proteínas, etc. Incluso, uno de ellos, es responsable de la síntesis del polisacárido exterior que genera la enfermedad de la grasa en los vinos.

Elementos subsidiarios: se encuentran solamente en determinadas especies de bacterias, y son las cápsulas, las ciliias (órganos de locomoción) y los esporos.

Las bacterias aisladas del vino no poseen cilias, ni producen esporos. La cápsula es un elemento de consistencia viscosa más o menos espeso y consistente, que envuelve a las bacterias. Cuando las bacterias capsuladas se desarrollan juntas, constituyen una zooglea; es decir, un cuerpo gelatinoso que contiene un gran número de células.

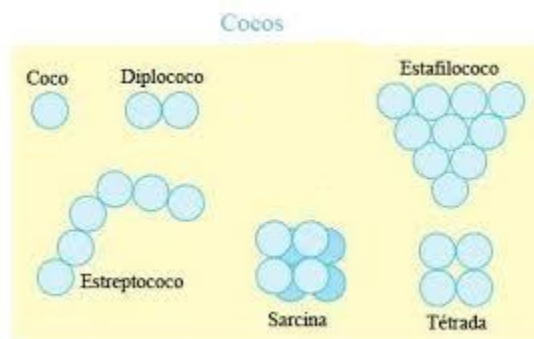
Las cápsulas de las bacterias están constituidas esencialmente por polisacáridos de peso molecular elevado. Pueden ser polímeros de una sola especie química, como la dextrana, tal la zooglea del *Leuconostoc* aislado del vino.

Algunos acetobacter forman una capa coherente² y viscosa, constituida por celulosa.

Morfología de las bacterias

Ilustración 2

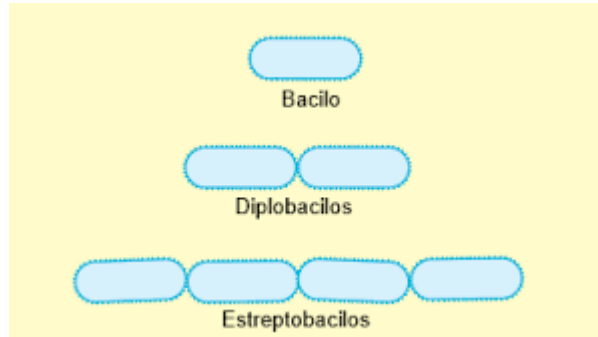
Cocos



Nota: Clasificación de los cocos. Fuente: Wikimedia Commons. Equipo editorial. (2 de marzo de 2022). Cocos gram positivos. Lifeder. Recuperado de <https://www.lifeder.com/cocos-gram-positivos/>.

²Consistente.

Ilustración 3
Bacilos



Nota: Bacilo. Fuente: LadyofHats [Public domain]. Gelambi, Mariana. (13 de septiembre de 2019). **Bacilo: características, tipos, clasificación, ejemplos.** Lifeder. Recuperado de <https://www.lifeder.com/bacilo/>.

1- **Cocos:** se pueden presentar en forma perfectamente esférica, o también más o menos ovoide. En algunas especies de cocos, las células permanecen aisladas; en cambio, en otras se hallan reunidas de diferente manera.

Se tiene las siguientes uniones celulares: de a dos (diplococos), en cadena (estreptococos), en grupos de a cuatro o más células formando un plano (tétradas), en cubos regulares (sarcinas) y en aglomeraciones irregulares (estafilococos o micrococos).

2- **Bacilos:** son células alargadas en forma de bastón derechos y cortos, que pueden permanecer aislados o reunidos luego de la división celular, formando diplobacilos o estreptobacilos, e inclusive en forma de filamentos más o menos largos y sinuosos.

Dimensiones

Las dimensiones de los cocos van de 0,4 a 1 μ (0,001 mm) de diámetro.

Los bacilos tienen $0,5 \mu$ de espesor y de 2 a 5μ de largo.

Reproducción de las bacterias

Las bacterias se propagan por división transversal (escisiparidad/escisión) y por esporos. Se admite la existencia de algunas especies que pueden propagarse por reproducción sexual.

Las bacterias del vino no se multiplican por esporos: solo lo hacen por escisión binaria transversal, dividiéndose en dos células hijas prácticamente de igual tamaño, donde el cromosoma del núcleo se divide en dos fibras, reconstruyendo cada una de ellas una copia exacta por duplicación de los nucleótidos, para formar dos nuevos núcleos, uno para cada individuo por separado. Al mismo tiempo en la parte media de la célula se forma progresivamente un tabique o septum, con la misma constitución que la pared exterior, espacio periplásmico y membrana plasmática, que termina por separar la bacteria en dos partes iguales.

La división del material genético y la de la célula, a veces no se producen al mismo tiempo, siendo más rápida la separación de los cromosomas, por lo que es frecuente que una bacteria tenga dos núcleos, mientras que el septum recién está comenzando a dividir el citoplasma. Los plásmidos también se dividen como el cromosoma principal, aunque a veces estos no resultan bien repartidos entre las dos células, pudiendo ocasionar una determinada carencia o defecto en las generaciones sucesivas.

Las bacterias del vino

Para esto, seguiremos a Oreglia, Francisco (1978), que las clasifica como:

- *Bacterias Lácticas*: se definen por un conjunto de propiedades fisiológicas y estructurales que les son comunes: son grampositivas, inmóviles, no esporulan y toman la energía prácticamente de la fermentación de los azúcares.
- *Bacterias Acéticas*: son gramnegativas, tienen un metabolismo oxidativo y forman, sobre la superficie del vino, un velo blanquecino de aspectos distintos, según las especies.

Bacterias lácticas útiles y nocivas

La única transformación provocada en el vino por las bacterias lácticas, que en determinadas ocasiones no es nociva, es la fermentación láctica del ácido málico.

Hasta el presente, no se ha aislado ninguna bacteria láctica útil e inofensiva (que produzca únicamente la fermentación maloláctica), pero si se ha determinado que hay bacterias lácticas que tienen preferencia para producir ese proceso. Esas bacterias se caracterizan por desarrollar su actividad en zonas de pH bajo, es decir que son resistentes a la acidez.

Estas bacterias, se consideran útiles y no producen daños, a no ser que en el medio haya azúcares reductores residuales. En este caso, se produce la enfermedad llamada picadura láctica.

Todos los demás procesos desatados por las bacterias lácticas en el vino, que no sean la fermentación maloláctica son nocivos y, en consecuencia, lo que son también los gérmenes que los producen. Así, el ataque bacteriano a los azúcares produce, como dijimos, la picadura láctica, con aumento de acidez volátil y fija. El ataque al ácido tartárico y a la glicerina constituye las enfermedades de la Tourne y el Amargo; una transformación especial de la levulosa es la fermentación manítica, con formación de manitol, etc.

En general, los cocos aparecen menos dañinos que los lactobacilos.

Clasificación de las bacterias

- *Bacterias homofermentativas*: son aquellas que convierten alrededor del 95% de la glucosa en ácido láctico, por la vía acostumbrada de la glicólisis, que termina en piruvato.
- *Bacterias heterofermentativas*: son las que, además de ácido láctico, producen alcohol etílico, ácido acético, glicerina, gas carbónico, por el camino de las hexosas – monofosfatos.

Hemos tomado para las bacterias encontradas en el vino las que sigue Ribereau Gayon. Por lo tanto, las bacterias aisladas de los vinos pertenecen a los géneros *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc/Oenococcus*, y *Lactobacillus*.

Tabla 1

Clasificación de bacterias lácticas de mostos y vinos

Morfología celular	Naturaleza	Especies	Ácido láctico fermentativo
Bacilos	Heterofermentativo facultativo	<i>Lactobacillus casei</i>	L(+)
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	L(+) D(-)
	Heterofermentativo obligatorio	<i>Lactobacillus brevis</i>	L(+) D(-)
		<i>Lactobacillus hilgardii</i>	L(+) D(-)
		<i>Lactobacillus fructivorans</i>	L(+) D(-)
	<i>Lactobacillus buchneri</i>	L(+) D(-)	
Cocos	Homofermentativo	<i>Pediococcus damnosus</i>	L(+) D(-)
		<i>Pediococcus pentosaceus</i>	L(+) D(-)
		<i>Pediococcus parvulus</i>	L(+) D(-)
		<i>Pediococcus cereviciae</i>	L(+) ³
	Homofermentativo	<i>Oenococcus oeni</i>	D(-)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		D(-)	

Género *Lactobacillus*

Células alargadas en forma de bastón, con dimensiones de (0,5 a 0,7) x (1,0 a 10,0) μm , aunque algunas son de menor tamaño, pudiendo encontrarse agrupadas en parejas o cadenas. Se desarrollan en anaerobiosis facultativa, precisando medios ricos en azúcares. Las mismas pueden ser homofermentativas estrictas (grupo I), heterofermentativas facultativas (grupo II) y heterofermentativas obligatorias (grupo III). Poseen una relación (G+C%)⁴ del 36 a 47%.

³ Nota del profesor Lic. Daniel Buono (dato a verificar).

⁴ Clasificación propuesta por Kreger- Van Rij (1984), que tiene en cuenta la riqueza en el ADN de la suma de las bases Guanina y Citosina (G+C%) para diferenciar a las bacterias. Se clasifican en *Clostridium* si el porcentaje de (G+C) % es menor al 50% y *Actinomicetos* si es mayor al 50%.

Genéticamente pertenecen al grupo de bacterias denominado *Lactobacillus casei*/*Pediococcus*.

Según un estudio realizado por la “Universit  Cattolica del Sacro Cuore”, que tuvo como objetivo verificar la capacidad de ciertos coadyuvantes químicos, levaduras y bacterias enológicas de reducir los contenidos de ocratoxina A (OTA) en los mostos y vinos, se demostró que la cepa *Lactobacillus plantarum* resultó ser la que presentaba mayor capacidad. Recordemos que la OTA es una micotoxina producida por hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium* que tiene efectos terat genos⁵, nefrot xicos⁶, hepatot xicos⁷ y carcin genos⁸. Cabe destacar que el vino es considerado el segundo alimento luego de los cereales en mayor cantidad de OTA.

Género *Leuconostoc* y *Oenococcus*

Células esféricas o ligeramente alargadas, con dimensiones de (0,5 a 0,7) x (0,7 a 1,2) μm , pudiendo encontrarse agrupadas en pareja o en pequeñas cadenas. Se desarrollan en anaerobiosis facultativa, con temperatura óptima de crecimiento entre 20 a 30 C, son homofermentativas, produciendo ácido láctico D (-) a partir de la glucosa, pero para nosotros es de interés la producción de ácido láctico L (+), a partir de ácido málico. Poseen una relación (G+C%) del 38 a 44%. Genéticamente pertenecen al grupo de bacterias llamado *Leuconostoc*,

⁵Terat geno: producto, medicamento, que administrado a una mujer o animal en gestación puede ocasionar malformaciones en el feto.

⁶Nefrot xico: que causa daño en ri n n.

⁷Hepatot xico: que causa daño en hígado.

⁸Carcin genos: que produce cáncer o favorece su aparición.

conteniendo dos subgrupos, el primero con los *Leuconostoc mesenteroides* y el segundo del *Oenococcus oeni* antiguamente llamado *Leuconostoc oenos*.

Género *Pediococcus*

Células esféricas y nunca alargadas, de 1,0 a 2,0 μm de diámetro, agrupadas en parejas o tétradas, jamás en cadenas. Se desarrollan en anaerobiosis facultativa, precisando medios ricos en azúcares. Metabolismo homofermentativo, produciendo ácido láctico L (+) y D (-). Poseen una relación (G+C%) del 34 a 42%. Genéticamente pertenecen al grupo de bacterias llamado *Lactobacillus casei/Pediococcus*.

Influencia de distintos factores sobre el crecimiento y la actividad de las bacterias lácticas

- *La temperatura:* Influye sobre la multiplicación y la evolución de las fermentaciones provocadas por bacterias lácticas. La temperatura óptima de multiplicación de las bacterias lácticas del vino se sitúa entre 25 y 30°C, según las especies. La curva de desarrollo va de 15 a 35°C. La velocidad de fermentación, a igualdad de otros factores es máxima entre 20 y 25°C. Las bacterias lácticas no se propagan a 45°C.
- *El pH:* La concentración de iones hidrógeno en el medio (pH) es uno de los factores esenciales en el desarrollo de las bacterias lácticas. El pH óptimo de desarrollo de las bacterias lácticas del vino está comprendido entre los valores 4,3 y 4,8 pero como en los vinos nunca se llega a ese nivel, el óptimo se encuentra cuanto más alta sea la cifra de pH.

Por el contrario, el valor más bajo de pH, por debajo del cual la actividad bacteriana es imposible, se encuentra entre 2,9 y 3 donde raramente los vinos llegan a esos niveles y ello es debido a una excesiva acidificación de su citoplasma, que impide el transporte de sustancias a través de la membrana plásmica. Se puede decir por lo tanto que las bacterias lácticas son acidófilas, pudiendo adaptarse a las condiciones del medio mejor que otros microorganismos.

El valor de pH límite inferior para la degradación del ácido málico, se sitúa en 3,2 mientras que para el ataque de los azúcares es de 3,5 por lo que las condiciones ideales de una fermentación maloláctica se sitúa entre esos valores. Únicamente, se metabolizará el ácido málico y no los azúcares si existieran, lográndose un nivel reducido de acidez volátil. Los valores de pH bajos producen un retraso en el arranque de la fermentación maloláctica, pero luego el desarrollo de la misma es muy bueno, de carácter homoláctico, produciendo casi exclusivamente ácido láctico.

El género de la bacteria láctica implicada en el medio está influenciado por el pH de éste, de tal manera que puede ser un factor selectivo. Así es que, en los vinos de pH elevado, generalmente se desarrollan los *Lactobacillus*, mientras que en los de pH bajo son los *Leuconostoc* y *Pediococcus*, así como el *Oenococcus oeni* que presenta el máximo de actividad entre pH 3,0 y 3,5 (Wibowo et al, 1985 citado en Suarez Lepe, 2004, p.373).

Oreglia, en su tomo N° 1 de "Enología Teórico Práctica" estableció, luego de un estudio de numerosas cepas de cocos en Bordeaux, como valor de

pH para el ataque del ácido málico por los cocos aún en presencia de azúcares el valor de 3,23. El ataque a los azúcares se produjo a un pH de 3,51.

En el mismo estudio, que realizó con numerosas especies de bacilos, demostró que éstos realizan el ataque al ácido málico a un pH de 3,38 y a los azúcares a un pH de 3,32. (Oreglia, 1978).

En conclusión, podemos decir, que la fermentación maloláctica se vuelve más pura a medida que baja el pH y más segura si se efectúa con cocos.

- *La aireación:* Las bacterias lácticas del vino son anaerobias facultativas; pueden ser influenciadas por la aireación, y a veces les resulta de estímulo. La anaerobiosis absoluta les es desfavorable.

En general, son microaerófilas, por esto, las mejores condiciones para el desarrollo de una FML se consiguen con una anaerobiosis no estricta, es decir con una ligera presencia de oxígeno.

- *La alimentación nitrogenada:* Las bacterias lácticas del vino son exigentes en cuanto a aminoácidos, más los cocos que los bacilos. Para los bacilos son indispensables: ácido glutámico, isoleucina, leucina y valina. La necesidad de otros aminoácidos depende de la especie, lo mismo que la capacidad de sintetizarlos.

La necesidad de los cocos es superior, además de los cuatro señalados, les son indispensables otros siete: arginina, histidina, metionina, fenilalanina,

serina, triptófano y tirosina. Para algunas especies de cocos, la isoleucina y la leucina son solamente estimulantes.

Las bases púricas y pirimidínicas juegan un rol importante como activadores del crecimiento. En ese caso, también las necesidades de adenina, guanina, uracilo, timina y timidina son función de las cepas. No son, sin embargo, forzosamente esenciales.

- *Necesidad de factores de crecimiento:* varía según las bacterias, la composición y las condiciones del medio. Los principales que podemos citar son:

- Tiamina
- Riboflavina
- Nicotinamida
- Ácido pantoténico
- Ácido nicotínico
- Ácido para-amino benzoico
- Mesoinositol
- Ácido fólico
- Biotina
- Cobalamina

El ácido pantoténico y el ácido nicotínico son indispensables o fuertemente estimulantes para todas las bacterias. Las diferencias están en la tiamina y sobre

todo en la riboflavina, para el crecimiento de los bacilos y el efecto estimulante específico del ácido fólico, para los cocos.

Las bacterias lácticas son auxótrofas, es decir que no son capaces de sintetizar estos compuestos por lo que los toman del medio.

En caso de notar una ralentización en el transcurso de la fermentación maloláctica, se puede realizar un agregado de nutrientes.

En este ensayo, se utilizó Optimalo blanc de Lallemand, el cual está constituido por derivados de levaduras como restos de las paredes celulares de las mismas, que aportan las sustancias nitrogenadas necesarias.

- *Elementos minerales:* Son necesarios debido a que están implicados como cofactores de enzimas claves, tal es el caso del Mn^{+2} , necesario para la activación de la enzima maloláctica, Mg^{+2} para activar la multiplicación celular y K^{+} para la descarboxilación del ácido málico.

El vino contiene cantidades suficientes de minerales para permitir un óptimo desarrollo bacteriano.

Inhibición de distintos factores sobre las bacterias lácticas

La acción inhibitoria del etanol

Las bacterias lácticas aisladas del vino son resistentes al alcohol etílico, desde que subsisten y se desarrollan en él. No obstante, conviene tener presente que muy pocas bacterias presentes en el mosto logran desarrollarse en el vino: cierta cantidad subsiste hasta los 11%v/v y más allá, solo sobreviven unas pocas

cepas. Sin embargo, existen algunas que producen la alteración de vinos de a 18 y 20% v/v.

El efecto de inhibición del etanol empieza a manifestarse a partir de los 8 a 10% v/v, siendo los 13 o 14% v/v el límite máximo por encima del cual la actividad bacteriana es imposible. Entre estos límites, las bacterias lácticas se adaptan a las condiciones adversas del medio, modificando la estructura de las paredes celulares.

Los géneros *Pediococcus*, *Oenococcus* y *Leuconostoc* son los más sensibles a la presencia del etanol, mientras que los *Lactobacillus* son bastante más resistentes.

La acción inhibitoria del anhídrido sulfuroso

El anhídrido sulfuroso desarrolla una enérgica acción antiséptica respecto de las bacterias, muy superior a la que efectúa sobre las levaduras. Esta propiedad es aprovechada tecnológicamente para impedir la acción de las bacterias en la fermentación, para gobernar la fermentación maloláctica, ya sea impidiéndola, dirigiéndola o interrumpiéndola, y para contribuir a la estabilización biológica de los vinos con respecto a estos microorganismos, debido a esto es que se dice que el anhídrido sulfuroso es “la llave de la fermentación maloláctica”. Como para las levaduras el anhídrido sulfuroso que despliega la acción antiséptica, es el libre activo.

Togores indica en su *Tratado de Enología* que “las dosis necesarias para frenar la actividad de las bacterias lácticas oscilan entre 10 a 20 mg/l de SO₂ libre

para los vinos de pH bajo y de 20 a 40 mg/l de SO₂ libre para los vinos de pH elevado, ambos equivalentes a 0,5 a 0,8 mg/l de SO₂ activo o molecular, dependiendo de la acción de otros factores como la temperatura y el pH” (Togores, 2003, p.435).

Existe una particularidad digna de mención, y es la siguiente: el anhídrido sulfuroso combinado tiene valor antiséptico con relación a las bacterias. Éste es el mecanismo: existen ciertas bacterias lácticas heterofermentativas capaces de metabolizar el acetaldehído y liberar de esta manera el anhídrido sulfuroso, el cual pasa a ser como en los demás casos, parcialmente activo. Es por este mecanismo que el ácido acetaldehído sulfuroso⁹ posee un efecto antibacteriano, naturalmente, menor que el anhídrido sulfuroso libre. No se conocen levaduras que efectúen la misma transformación.

Compuestos fenólicos

Los polifenoles pueden influir en el desarrollo de las bacterias lácticas. En unos casos tienen efecto inhibitorio, cuando se trata del ácido vanílico, taninos de las pepitas y de la madera de roble, mientras que, en otros, como el ácido gálico y los antocianos, presentan un efecto estimulante. El efecto bactericida de los taninos es conocido por producir una desnaturalización por coagulación de las proteínas de las paredes celulares.

Los compuestos fenólicos, que activan a las bacterias lácticas, pueden ser degradados por hidrólisis de la actividad β-glucosidasa de estos microorganismos,

⁹ Ácido etanal sulfónico.

explicando este fenómeno la pérdida de color en los vinos tintos que realizan la fermentación maloláctica.

Otras sustancias inhibitorias

Entre los antibióticos, los que han demostrado una acción antibacterica más notable son la subtilina y la tirotricina en dosis de 2 mg/l.

Entre los antisépticos, de uso común en la desinfección de las vasijas, tienen importancia los que liberan amonio cuaternario, cloro naciente y yodóforos, siendo el ácido peracético uno de los más utilizados hoy en día debido a su alto potencial oxidante sobre la membrana externa de las bacterias, esporas, hongos, virus y levaduras.

Lisozima

Generalidades

La lisozima es una enzima que cataliza la hidrólisis de los tetrasacáridos de la pared celular de las bacterias Grampositivas, como *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Lactobacillus*, aunque también es capaz, en menor medida, de degradar las paredes celulares de las bacterias Gramnegativas, pero no es eficaz sobre *Acetobacter* debido a su membrana externa protectora. Tampoco tiene acción sobre las levaduras.

Es un polipéptido formado por 129 aminoácidos, es una proteína de carácter básico, con un peso molecular de 14600dalton. Es un polvo blanco que se utiliza en forma de hidrociorato, el cual es muy estable en el tiempo si se almacena en

seco y a temperatura ambiente o refrigerada en contenedores estériles si se encuentra preparada al 10%.

La lisozima se encuentra en numerosos lugares, como las lágrimas, las secreciones nasales, salivas, etc., pero la principal fuente es la clara del huevo de gallina, de donde se obtiene de manera industrial. Se pueden obtener aproximadamente 9 gramos de lisozima por litro de clara de huevo.

Actividad

La eficacia de la lisozima aumenta con el pH y su incidencia organoléptica es nula.

La lisozima se complementa con el anhídrido sulfuroso, pero no puede sustituirlo, solo permite la reducción de las dosis de este. Se aconseja utilizar siempre primero el SO₂ y luego adicionarla.

Se debe tener precaución con el agregado de otras sustancias porque tienen interacción con la lisozima por ser de origen proteico, como: la bentonita, el carbón, el sol de sílice, las virutas de roble, los taninos, el ácido metatartárico etc. Probablemente produzcan opalescencia, primero la precipitación de esta y la reducción su actividad después.

Lisozima en vinos blancos

Existen numerosos estudios dirigidos al bloqueo de la FML en vinos blancos con el uso de lisozima y se ha demostrado que, aunque es efectivo su uso, este bloqueo no es estable en largos periodos de tiempo ya que hay vinos que a pesar de haber agregados de lisozima pueden completar la fermentación maloláctica.

Esto pudo deberse a distintos factores, como el tipo de bacteria, la población presente, el pH del vino y el momento en que se adiciona la lisozima.

Para esto, se requiere una dosis de 250 a 500 mg/l.

Lisozima en vinos tintos

El empleo de lisozima en vinos tintos puede ayudar a retrasar el inicio de la FML para evitar aumentos en la acidez volátil si esta inicia antes del final de la fermentación alcohólica y permite también incrementar los tiempos de maceración sin la adición de SO₂. El tiempo de retraso de la FML puede ser de 1 a 3 semanas. Si se inoculan bacterias lácticas, se recomienda un agregado de bentonita para eliminar restos de lisozima y no afectar el desarrollo de la bacteria.

Se recomienda una dosis de 100 a 200 mg/l antes de la fermentación. Si lo que se quiere es estabilizar el vino luego de la fermentación maloláctica se recomienda una dosis de 125 a 250 mg/l.

Como efectos secundarios, pueden causar una disminución del color por unirse a los taninos y antocianos. Sin embargo, el uso de una menor cantidad de SO₂ o de utilizarlo más tarde, da como resultado una ganancia de color y una estabilidad de este, favoreciendo las uniones tanino-antociano.

Los vinos tratados con lisozima tienen aromas más frutados.

Acción sobre los vinos espumosos

Luego de numerosos estudios, se ha demostrado que los vinos espumantes tratados con lisozima tienen mejor producción de espuma. Esto se debe a que

reacciona con la bentonita utilizada para clarificar y libera las proteínas naturales del vino encargadas del sostén de la espuma.

Se recomienda una dosis de 300 ppm agregada luego de la bentonita u otros clarificantes.

CAPÍTULO 2: Metabolismo de los ácidos orgánicos

Las bacterias lácticas son capaces de metabolizar algunos ácidos del vino procedentes de la uva, siendo los más importantes el ácido málico, cítrico y tartárico. Excepto en la fermentación maloláctica, donde se busca mejorar las características organolépticas del vino, el resto de los casos se producen sustancias indeseables, produciéndose enfermedades o alteraciones en el vino.

Transformación del ácido málico

El ácido láctico en el vino puede proceder de diversos orígenes, el primero, de la fermentación alcohólica de los azúcares por las levaduras, formándose mayoritariamente ácido D (-) láctico, el segundo, también de los azúcares, pero degradados por bacterias lácticas, dando D (-) y L (+) láctico según las especies de bacterias; y el tercero, del ácido málico por las bacterias lácticas, formándose ácido L (+) láctico.

El mecanismo de la transformación es muy simple, el ácido málico pasa directamente a ácido láctico más anhídrido carbónico, siendo la reacción apenas exotérmica gracias a la intervención de la enzima maloláctica. Esta enzima, es producida por las bacterias lácticas, desarrollándose el metabolismo en el interior de la célula, donde la membrana plasmática impide la entrada de sustancias inhibitoras como pueden ser el alcohol, polifenoles, etc. por lo que su síntesis y adición directa al vino es inviable, al degradarse rápidamente en este medio debido a su naturaleza proteica. Pero existen en la actualidad, levaduras modificadas con genes de bacterias lácticas, con las que puede conseguirse al mismo tiempo la fermentación alcohólica de los azúcares, junto a una eliminación del ácido málico si es de interés.

[Atributos positivos de la fermentación maloláctica](#)

Siempre se ha considerado que los buenos vinos tintos no son producto solamente de una fermentación, son lo que, a la transformación del azúcar en alcohol por parte de las levaduras. A esto, le sigue la fermentación láctica del ácido málico a cargo de las bacterias, con una importante disminución de la acidez fija y suavidad acentuada al realizar el análisis organoléptico.

Según Peynaud, (1993, citado en Suarez Lepe, 2004, p. 385) el vino pasa, al realizar la fermentación maloláctica, de ser duro, firme, acerbo y de elevada acidez a otro gustativamente distinto, suave, tierno, de acidez disminuida y con aroma evolucionado.

Esta transformación, que es una verdadera desacidificación biológica, es muy favorable para la calidad de los vinos por las características sensoriales que aporta, constituyendo así el primer estadio del envejecimiento y crianza de los vinos; además de una garantía de estabilidad en el tiempo. He aquí los atributos más importantes.

Como mejora de las características sensoriales, podemos nombrar la suavidad al paladar, no solo por la producción de ácido láctico, si no por unas cantidades moderadas de diacetilo, que aporta complejidad al sabor del vino con su agradable carácter de manteca, aunque puede resultar rancio e indeseable cuando supera esos niveles.

Gran parte de la mejora gustativa obedece a la sustitución de un ácido diprótico, de sabor muy pronunciado, el ácido málico, por otro monoprótico, el ácido láctico, menos agresivo a las papilas gustativas. El vino pierde así su carácter verde, duro y se torna suave.

Su color también se modifica, se vuelve menos vivaz y hasta el aroma se transforma, alejándose de la fruta fresca y enriqueciéndose en matices complejos; los vinos adquieren de esta manera pastosidad, carnosidad y grosor.

El incremento aromático es gracias a la elevación de ésteres (lactato de etilo, succinato de etilo, etc.) y metabolitos del ciclo diacetil-acetoinico. Los mismos, pueden conseguir igualmente efecto favorable en la reducción de aromas herbáceos o de fenómenos de amargor y astringencia que quedan amortiguados.

La garantía de estabilidad radica en que si la totalidad, o gran parte, del ácido málico se degrada, no se podrá desarrollar una fermentación maloláctica posterior en botella que constituirá una verdadera enfermedad.

A veces, la fermentación maloláctica se detiene después de un breve periodo de frío en bodega, de adición accidental de SO₂ o de una clarificación o trasiego precoz. Para estar seguro de que la misma ha finalizado, se aconseja la comprobación por método enzimático, en el cual el ácido málico debe dar como resultado una cantidad menor a 0,2 g/l. Si bien según otros criterios se podría lograr la estabilidad microbiológica ya con 0,3 g/l, se decide definir este valor ya que es al que se llega normalmente en la bodega en las fermentaciones malolácticas habituales, definido por el método enzimático, posteriormente reemplazado por análisis de Foss.

Atributos negativos y peligros de la fermentación maloláctica

En cuanto a las desventajas o inconvenientes de la realización de la fermentación maloláctica, hay que destacar como primer punto la elevación de la acidez volátil, que representa un carácter negativo organolépticamente. Esto depende del carácter homo o heterofermentativo de la cepa de bacteria láctica y de la temperatura.

En este sentido, la disminución paralela de otros ácidos, como el cítrico o el tartárico también ejercen influencia. Por ejemplo, las bacterias que metabolizan el ácido cítrico como fuente de energía producen diacetilo y elevan la acidez volátil. La degradación del ácido tartárico o enfermedad de la Tourné es muy poco

frecuente y cuando aparece solo tiene lugar en vinos con pH cercano a 4 y proveniente de uvas atacadas por Botrytis, Peronospora, Oidio, etc. pero incrementa también la acidez volátil.

Es interesante notar la diferencia de miradas que hay entre enólogos del hemisferio norte y los del hemisferio sur sobre los efectos de fermentación maloláctica en los vinos. No es nuestro objetivo agotar el tema sino marcar algunos puntos para la reflexión y el debate en todo caso.

Los europeos, consideran la fermentación maloláctica indispensable para la consecución de un buen vino. En el hemisferio sur, puede ser bienvenida en algunos casos, en otros no es buscada y en muchos casos de vinos de pH alto es considerada una verdadera enfermedad por las nefastas consecuencias que trae a los vinos.

Sin embargo, como peligro más destacado hay que recalcar los que pueden tener un efecto negativo en la salud de los consumidores. Tal es el caso de la formación de aminas biógenas o de carbamato de etilo, que dependen de numerosas variables fisicoquímicas y ambientales, pero en los que la naturaleza de la cepa de bacteria láctica y su equipamiento enzimático, sin duda ejercen su influencia. Este criterio puede ser muy importante a la hora de seleccionar la bacteria láctica a utilizar.

Aminas biógenas

Las aminas biógenas son pequeños compuestos nitrogenados que se encuentran principalmente en los alimentos fermentados. Pueden llegar

ocasionalmente en algunos vinos a más de 10 mg/L y su consumo puede comportar varias patologías, desde migrañas hasta trastornos cardíacos. Las principales aminas biógenas asociadas al vino son la putrescina, histamina, tiramina y cadaverina. Son el producto de la descarboxilación de diferentes aminoácidos presentes en el vino, como los que se indican en el esquema.

Ilustración 4

Aminoácidos y aminas biógenas producidas



Nota: Rubes Editorial, S.L., 2021. Extraído de

<https://www.acenologia.com/?s=Amino%C3%A1cidos+y+aminas+bi%C3%B3genas+producidas+>

Se han caracterizado diversas especies de bacterias lácticas como productoras de aminas biógenas, que incluyen *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus brevis* como principales productores de tiramina y *Pediococcus parvulus* como uno de los principales productores de histamina. Dichas especies, son consideradas como contaminantes durante el proceso de vinificación, por lo que generalmente la aparición de aminas biógenas se asocia a falta de higiene en las prácticas enológicas.

Por otro lado, aunque existe un acuerdo en general entre los diversos autores atribuyendo a las bacterias lácticas el principal origen de la formación de aminas biógenas en el vino. No es menor destacar que existen algunos estudios dirigidos a conocer la participación de las levaduras en la formación de estos compuestos.

Como nos centraremos en las bacterias lácticas, dejaremos de lado la producción de aminas biógenas por las levaduras, diremos que algunas cepas de *Oenococcus oeni* también pueden producir ciertas cantidades de aminas biógenas como histamina y, en menor grado, putrescina. La detección de los genes que codifican los enzimas responsables de la producción de aminas biógenas, como el de la histidina descarboxilasa (*hdc*) en el caso de la histamina, puede ser una herramienta para la selección de cepas de *Oenococcus oeni* que carezcan de estos genes.

M. Carmen Polo y M. Victoria Moreno en su trabajo de investigación llegan a la conclusión de que:

“Las bacterias lácticas del vino varían en su capacidad para producir aminas biógenas a partir de aminoácidos. Evidentemente, la amplia distribución observada en la concentración de aminas biógenas en los vinos es atribuible no sólo a la gran variabilidad de las cepas bacterianas en su capacidad de producir estas aminas, sino que también depende de los procesos tecnológicos que emplee el elaborador. Esto indica que la formación de aminas biógenas en el vino, como en otros productos alimentarios, es el resultado de una

compleja interacción de factores que influyen no sólo en la presencia sino también en la actividad de diferentes microorganismos implicados en los procesos fermentativos o incluso contaminantes” (Polo y Moreno, 2005, p.225).

Como efectos negativos en el vino, además del daño a la salud de la población sensible, las aminas biógenas pueden causar una reducción del aroma global del vino, dando como resultado vinos sin carácter varietal. Los altos niveles de aminas biógenas pueden derivar en la formación de aromas metálicos, cárnicos o pútridos (fruta podrida, rancio, sucio, carne en mal estado). Esto se demostró en una investigación realizada en la Universidad de La Rioja, España (Palacios et al., 2004), donde añadieron putrescina y cadaverina al vino.

Factores que influyen y control

La fertilización nitrogenada, un estado de salud deficiente de las uvas, presencia de moho, pH alto, el desarrollo de ciertas levaduras durante la fermentación alcohólica favorecen la presencia de un nivel moderado de aminas biógenas, pero al realizar la FML puede aumentar notablemente la presencia de estas siendo más frecuente su presencia en los vinos tintos que en los blancos.

En general, los niveles de aminas biógenas en los vinos pueden ser superiores en los vinos de pH alto debido a la presencia de microorganismos contaminantes. Pero incluso con pH bajo pueden encontrarse en los casos donde la FML sea llevada a cabo por bacterias lácticas con capacidad de producir aminas biógenas. También se pueden encontrar mostos con cantidades

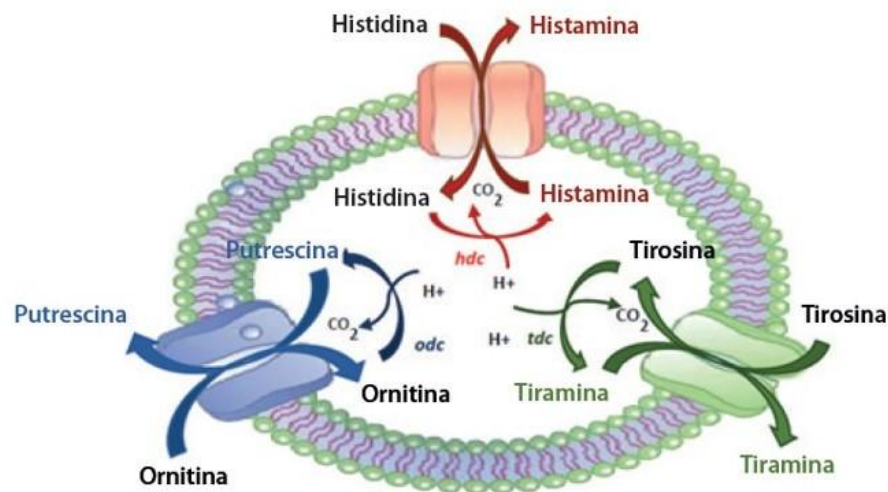
significativas de estos compuestos dependiendo de la añada, el varietal, el terroir y el clima.

Una de las formas más efectivas de controlar la producción de aminas biógenas es la utilización de bacterias lácticas seleccionadas para la realización de la fermentación maloláctica que dentro de sus características tenga certificada la no formación de estos compuestos. Las utilizadas en el ensayo lo indican en su ficha técnica. Todo esto en conjunto con el uso de SO_2 y la regulación del pH.

Otra forma puede ser el uso de quitosanos (compuestos derivados del hongo *Aspergillus niger*) que puede reducir el número de bacterias lácticas indígenas que producen aminas biógenas.

Ilustración 5

Formación de amina biógena a partir de sus precursores aminoácidos y de su consumo/absorción por el antiporte¹⁰ de la membrana.



Nota: ¿Cómo controlar el exceso de aminas biógenas en el vino?, 2021. Extraído de: <https://enolife.com.ar/es/como-controlar-el-exceso-de-aminas-biogenas-en-el-vino/>

¹⁰Antiporte: Proteína transportadora de membrana celular, que transporta en direcciones opuestas dos o más solutos a través de la membrana.

El mecanismo de formación de las aminas biógenas en el interior de las bacterias, como ya se mencionó, se puede resumir en una descarboxilación directa del aminoácido precursor gracias a la acción de la enzima específica para cada uno de estos.

Queda pendiente de investigación la forma en que se seleccionan las bacterias lácticas en laboratorios para que no produzcan este tipo de compuestos negativos para la salud de los consumidores.

Carbamato de etilo

El carbamato de etilo, es un éster del ácido carbámico resultante de la esterificación de éste con el alcohol etílico. Es un compuesto cancerígeno de carácter genotóxico, el cual es detectado en algunos vinos en concentraciones muy bajas (unos 20 µg/L).

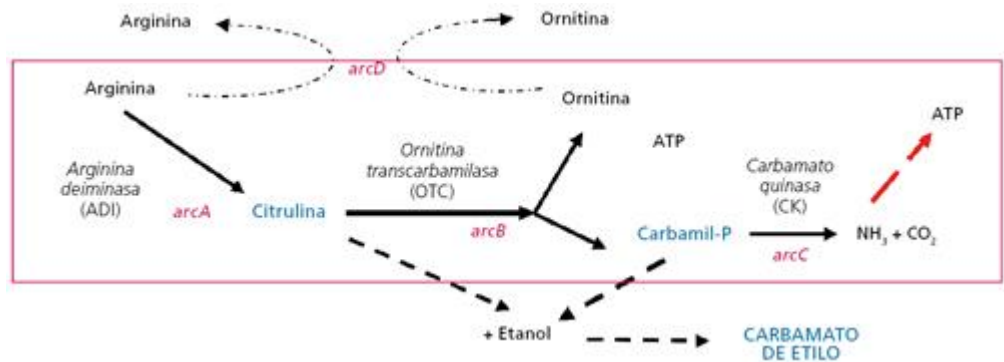
Aunque el principal precursor del carbamato de etilo en el vino, por reacción con el etanol, es la urea excretada por levaduras, otros precursores del carbamato de etilo que también reaccionan con el mismo, son los productos de degradación de la arginina (como la citrulina) por parte de diversas especies de bacterias lácticas, mediante la vía de la **arginina deiminasa(ADI)**.

Oenococcus oeni presenta una capacidad variable de degradación de arginina y los genes de la ruta ADI se encuentran en gran cantidad de sus cepas. Sin embargo, algunas cepas de especies consideradas contaminantes, como *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus buchneri*, acumulan mayores cantidades de citrulina que *Oenococcus oeni*.

Por otra parte, se ha comprobado que el ácido L-málico inhibe el consumo de arginina. Así pues, un buen control del momento de finalización de la FML e inmediata estabilización del vino es clave para evitar el consumo de arginina y la posible acumulación de precursores de carbamato de etilo.

Ilustración 6

Formación del carbamato de etilo



Nota: Rubes Editorial, S.L., 2021. Extraído de:

https://www.acenologia.com/bioquimica_bacterias_lacticas_vino_cienc1213/

La vía de la arginina deiminasa (ADI) comprende la actuación de tres enzimas:

- ADI (arginina deiminasa): Cataliza la conversión de arginina a citrulina y amonio, con un ligero aumento del pH.
- OTC (ornitina transcarbamilasa): Cataliza la fosforólisis de citrulina a ornitina y carbamifosfato. Muchos organismos degradan arginina por vía ADI y poseen 2 OTC diferentes, una catabólica y una anabólica.
- CK (carbamato quinasa): cataliza la conversión del carbamil fosfato a CO₂ y NH₃, generando ATP.

La vía ADI incluye además una proteína presente en la membrana plasmática, que cataliza uno a uno el cambio de la arginina a ornitina, asegurando que las concentraciones de arginina intracelular se mantengan a niveles bajos.

Como se puede observar en el gráfico, las siglas **arcA**, **arcB**, **arcC** y **arcD**, hacen referencia a los genes involucrados en esta vía metabólica, cada uno codificando a una enzima en particular: **arcA** codifica la enzima arginina deiminasa (**ADI**), **arcB** codifica la ornitina transcarbamilasa (**OTC**), **arcC** codifica la carbamato kinasa (**CK**)y **arcD** que codifica el transporte de las sustancias a través de la membrana.

En el balance global de la reacción se produce 1 mol de Ornitina y CO₂, 2 mol de amonio, y 1 mol de ATP por mol de arginina metabolizada.

Podríamos decir que este proceso puede ser justificado en la necesidad de obtener amonio por parte de las bacterias.

Efectos de la fermentación maloláctica en los caracteres organolépticos

Fermentación maloláctica y aromas

La fermentación maloláctica provoca modificaciones en el perfil aromático de los vinos: se cambia la fruta y frescura del aroma varietal y de fermentación por aromas que recuerdan a sensaciones dulces, lácticas. Se puede decir que se cambia juventud por complejidad.

De diversos trabajos publicados, se deduce que los efectos de la fermentación maloláctica sobre el aroma, son apreciados muy diferentemente: las apreciaciones positivas o neutras son las más numerosas, pero a veces los juicios

son negativos (Davis et al, 1985, citado en Flanzy, Claude y Colaboradores, 2003, p. 156). Parece, sin embargo, que cuando esta fermentación es llevada a cabo al final de la fermentación alcohólica, es decir, cuando casi la totalidad de los azúcares fermentables han sido consumidos, y cuando es conducida de manera que no se favorezca el desarrollo de bacterias heterofermentativas, teniendo cuidado de bloquear todo desarrollo bacteriano posterior a la fermentación maloláctica, el aroma no será afectado negativamente. La utilización de bacterias lácticas seleccionadas, liofilizadas, debería permitir controlar mejor la fermentación maloláctica y contribuir así a suprimir la aparición de defectos de aroma que puedan estar ligados a esta transformación.

En los casos más favorables, se ha constatado, que el aroma del vino joven se enriquece de notas aromáticas nuevas, mientras que van desapareciendo las notas vegetales excesivas, la sensación en boca mejora y el vino se suaviza. Sin embargo, ciertas notas olfativas aportadas por esta fermentación (manteca, láctica, etc.) pueden no ser apreciadas.

Desgraciadamente, nuestros conocimientos actuales no permiten explicar los cambios que afectan a los compuestos de manera tan detallada. Sin embargo, se han descubierto algunos productos volátiles cuyos contenidos están muy influenciados por las bacterias lácticas enológicas y que podrían intervenir sobre el aroma. En efecto, las bacterias lácticas enológicas no transforman solo el ácido málico en ácido láctico, como veremos enseguida, pueden igualmente metabolizar otros compuestos presentes en el medio y producir así metabolitos volátiles que conforman los aromas característicos.

Los alcoholes

“La fermentación maloláctica no modifica generalmente los contenidos en alcoholes del vino joven”(Davis et al, 1985 citado en Flanzy, Claude y Colaboradores, 2003, p. 156). Sin embargo, Laurent (Laurent et al, 1994 citado en Flanzy, Claude y Colaboradores, 2003, p. 157) han constatado la desaparición de 1-octanol y de octano-1-en-3-ol durante la fermentación maloláctica, verificando su impacto sobre el aroma.

También ciertas bacterias del género *Lactobacillus* pueden deshidratar el propano-1,2-diol, el glicerol y el butano-2,3-diol gracias a una dioldehidrasa. Los compuestos carbonilados así formados pueden ser reducidos durante la fermentación maloláctica. “Esta vía explica la formación de propano-1,3-diol a partir del glicerol, y del 2-butanol a partir de butano-2,3-diol. En cuanto a la acroleína, formada por esta vía a partir del glicerol” (Dietrich, 1987, citado en Flanzy, Claude y colaboradores, 2003, p.157), sería el origen del 3-etoxipropanol y de compuestos de gusto amargo obtenidos por la acción sobre unos compuestos polifenólicos. El aroma de estos compuestos se toma generalmente como desagradables, pero *Oenococcus oeni* no produce estos compuestos.

Los ácidos y ésteres

Las bacterias heterofermentativas, como ya se ha dicho, generan como uno de sus metabolitos, el ácido láctico y acético, así mismo las bacterias homofermentativas forman igualmente ácido acético, pero a partir de los ácidos cítrico y pirúvico. Las concentraciones formadas no exceden generalmente a las

producidas por las levaduras si las condiciones son controladas. Así los contenidos totales en ácido acético del vino no alcanzan para provocar defectos de aroma.

Los otros ácidos formados por las bacterias, el ácido pirúvico, succínico, ácido 4-hidroxibutírico, los cuales no tienen influencia sobre el aroma.

En cuanto a los ésteres, la literatura menciona un aumento en el acetato de etilo (aroma frutado), lactato de etilo (aroma a leche agria, no agradable) y de succinato de etilo por la fermentación maloláctica (Davis et al, 1985, citado en Flanzky, Claude y colaboradores, 2003, p.157). Sin embargo, la formación de estos ésteres por las bacterias lácticas no ha sido demostrada, resultarían simplemente de la esterificación química de los ácidos correspondientes, formados a su vez por las bacterias lácticas. Además, su impacto sobre el aroma no ha sido demostrado, salvo en el caso del acetato de isoamilo (Laurent et al, 1994, citado en Flanzky, Claude y colaboradores, 2003, p.157), dando aroma a banana.

Compuestos carbonilados

De todos los compuestos procedentes de la fermentación maloláctica, son los compuestos carbonilados los más implicados a menudo en las modificaciones del aroma: el diacetilo y su producto de semi reducción, la acetoína (Davis et al, 1985 citado en Flanzky, Claude y colaboradores, 2003, p.158). Pero las bacterias lácticas producen igualmente su producto de reducción, el butano-2,3-diol, que es inodoro, así como sus análogos de 3 carbonos, piruvaldehído, acetol y propano-1,2-diol. Todos estos compuestos en C3 y C4 no son constituyentes específicos

de la etapa maloláctica puesto que son productos normales de la fermentación alcohólica. Las cantidades producidas son próximas a las aportadas por las levaduras, pero sus contenidos acumulados dan lugar a notas de mantequilla, lácticas, que son citadas para describir a los vinos en los cuales se ha desarrollado la fermentación maloláctica.

Contrariamente a la levadura, las bacterias lácticas forman el diacetilo y la acetoína esencialmente a partir del ácido cítrico, vía ácido pirúvico. Este último, constituyente del primer estado fermentativo es, en efecto, un producto intermedio en esta biosíntesis. La enzima esencial de esta vía es el citrato liasa, que forma el ácido acético y el ácido oxalacético, descarboxilado en ácido pirúvico. El ácido pirúvico es rápidamente metabolizado o bien en ácido acético o en diacetilo y acetoína vía α -cetolactato, por una vía análoga a la descrita para la levadura. Como las levaduras, las bacterias reducen irreversiblemente el diacetilo en acetoína y después en butano-2,3-diol (Shimazu et al, 1985 citado en Flanzy, Claude y colaboradores, 2003, p.157). Estos datos muestran que es posible controlar la producción de diacetilo en los niveles organolépticos deseados, puesto que el butano-2,3-diol es inodoro.

Las bacterias lácticas, concretamente *Oenococcus oeni*, son igualmente susceptibles de reducir el etanal en etanol, lo que permite en particular limitar los contenidos de este compuesto en los vinos jóvenes (Galy et al, 1985; Wibowo et al, 1985 citados en Flanzy, Claude y colaboradores, 2003, p.158).

Compuestos azufrados

La influencia de la fermentación maloláctica sobre los compuestos azufrados no es conocida, aunque se pueda ver la asociación en numerosa bibliografía de las notas tipo chucrut a ciertos derivados azufrado, el aroma de ciertos vinos de fermentación maloláctica. Sin embargo, la disminución de los contenidos globales en derivados carbonilados entraña la liberación del SO₂ ligado a estos compuestos bajo la forma de ácidos 2-hidroxisulfónicos. Esto no constituye una desventaja organoléptica, al contrario, este fenómeno permite limitar las dosis enológicas de este compuesto.

Los compuestos nitrogenados

Las aminas del vino producidas en la etapa fermentativa provienen de la fermentación maloláctica (Wibowo et al, 1995; Ingargiola, 1992; Lehtonen, 1996 citados en Flanzky, Claude y colaboradores, 2003, p.158). Esta producción tiene lugar por descarboxilación enzimática de los aminoácidos presentes en el medio o liberados por la autólisis de las levaduras y las actividades peptidásicas de las bacterias lácticas. Esta producción de aminas fue atribuida al desarrollo de *Pediococcus* pero recientemente se ha demostrado que *Oenococcus oeni* también posee esta facultad. Recalcamos la producción probable de aminas biógenas, con sus respectivos aromas ya desarrollados.

Estas aminas no presentan interés para el aroma, pero ciertas cepas del género *Lactobacillus*, igual que las levaduras del género *Brettanomyces*, forman a

partir de la lisina y del etanol, la 2-acetil-3,4,5,6-tetrahidropirina, responsable de defectos de aroma como el gusto de ratón.

Lactonas

La mayor parte de las cepas de *Oenococcus oeni* metabolizan el ácido 2-oxoglutámico formado por la levadura en ácidos 4-hidroxibutírico y succínico, mientras que otras bacterias lácticas lo reducen en ácido 2-hidroxi-glutámico. El producto intermedio en esta vía sería el ácido 4-oxobutírico que origina la formación de una serie de γ -butirolactonas por la levadura, pero no han sido identificados como productos de *Oenococcus oeni*, excepto la γ -butirolactonas (Radler y Brohl, 1984 citados en Flanzy, Claude y colaboradores, 2003, p.158), con aroma a nuez, coco.

Fenoles volátiles

La mayor parte de las bacterias lácticas tienen, como las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, la facultad de producir 4-vinilfenoles por descarboxilación enzimática de los ácidos fenoles cinámicos correspondientes. Por el contrario, solo algunas bacterias lácticas enológicas de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus* son susceptibles de producir los 4-etilfenol y 4-etilguayacol a partir de los mismos precursores, contrariamente a *Oenococcus oeni* que no lo producen prácticamente. Esto, podría ser la explicación de los contenidos relativamente débiles de estos compuestos en algunos vinos. Como es conocido, la formación de cantidades elevadas de estos derivados podría tener su origen también en una contaminación por levaduras *Brettanomyces/Dekkera*,

produciendo aromas animales, de sudor de caballo, establo, etc. Los cuales pueden considerarse desagradables o agradables para ciertos vinos donde para sus consumidores son aromas apreciados.

Fermentación maloláctica y sabores

La fermentación maloláctica logra transformar las sensaciones ásperas, propias del ácido málico, por las suaves y aterciopeladas del ácido láctico.

Fermentación maloláctica y color

La fermentación maloláctica, provoca un indiscutible incremento del pH de los vinos y con esto se logra una disminución de la tonalidad y de la intensidad colorante de los vinos. Este mismo hecho es interpretado:

- a) Positivamente, por enólogos europeos, pues ayuda a que sus vinos adquieran las características finales buscadas por ellos en los vinos (donde la intensidad colorante y el matiz no son atributos necesariamente importantes pues lo tienen y en abundancia)
- b) Negativamente, por enólogos del cono sur, donde el pH es más elevado las noches más calientes y por tanto el color en las uvas es más escaso.

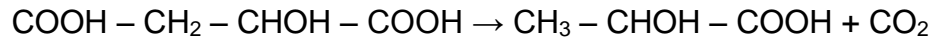
Seguramente estas posturas enológicas irán mudando en el tiempo sobre todo debido al fenómeno del cambio climático.

Esto suele deberse también a los niveles de SO_2 y adsorción de antocianos por las paredes celulares bacterianas, particularmente de los metoxilados. Aunque, por otro lado, la pequeña subida de pH hace que los antocianos como la malvidina, evolucionen hacia tonalidades menos intensas y no tan rojas, lo que los

hace más interesantes visualmente, siempre dependiendo del varietal, como afirma Suárez Lepe refiriéndose a los vinos europeos.

Bioquímica de la fermentación maloláctica (por Suarez Lepe)

La reacción global de la transformación originada en el vino por las bacterias lácticas fue indicada por Seifert (1901) con la siguiente ecuación:

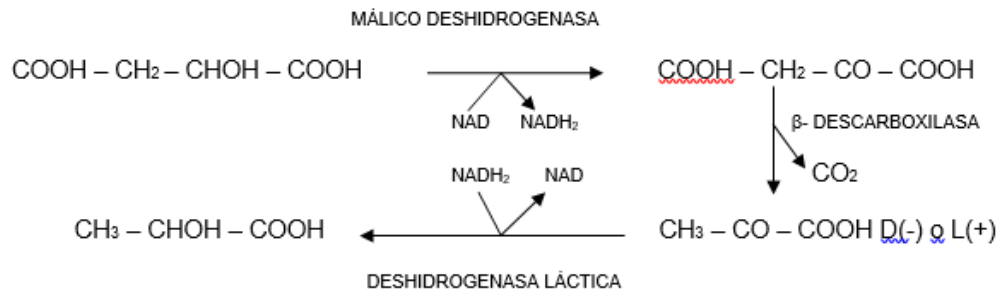


En la que cuantitativamente 134 gramos de ácido málico producen 90 g de ácido láctico y 44 gramos de anhídrido carbónico; por lo tanto, la fermentación de 1 gramo de ácido málico forma 0.67 gramos de ácido láctico y alrededor de 167 cm³ de CO₂. (Suarez, 2004)

La reacción se presenta, así como una simple descarboxilación del ácido málico, pero el mecanismo no es tan simple. Existen tres vías posibles

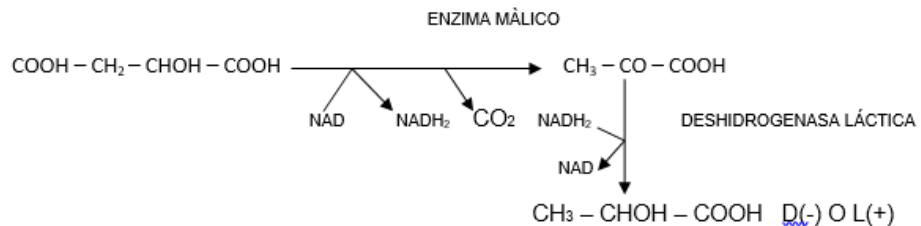
Vía 1

Para Charpentie (Charpentie, 1954 citado en Suarez Lepe, 2004, p.366), la forma más probable es en primer lugar una deshidrogenación que conduce al ácido oxalacético. Este ácido luego es descarboxilado y el ácido pirúvico formado es reducido a ácido láctico por el H⁺ liberado primero.



Vía 2

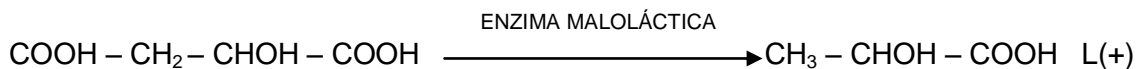
Ochoa en 1950 aisló del hígado de las palomas y de células de *Lactobacillus arabinosus* un enzima que purificaron y llamaron enzima málico que provoca la reacción. Con este enzima, la reacción se lleva a cabo en presencia de NAD e iones Mn^{++} . Dicha reacción no consistiría en una simple descarboxilación si no en un proceso redox, pasando por una etapa intermedia con formación de ácido pirúvico.



Jerchel en 1956, Peynaud en 1968 y Lafon–Lafourcade en 1970 afirman que los dos mecanismos anteriores son válidos, puesto que las bacterias malolácticas del vino poseen la deshidrogenasa láctica, así como el enzima málico de Ochoa (Suarez Lepe, 2004).

Vía 3

Radler en 1973 postula una tercera vía de degradación gracias a un enzima *maloláctico* que transforma directamente el ácido málico en L(+) láctico, pero no se conocen actualmente las reacciones o pasos intermedios de dicha reacción (Radler, 1973 citado en Suarez Lepe, 2004, p.368).

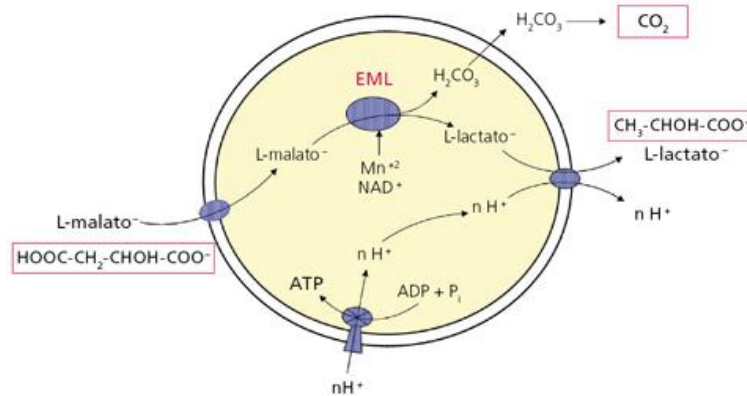


Dicho enzima, con un peso molecular de 235.000 kilopares de bases (kpb) aproximadamente y punto isoeléctrico 4,35 es constitutivo del 60% de las bacterias lácticas heterofermentativas e inducible en otras. Los ácidos tartárico, succínico y láctico pueden actuar como inhibidores competitivos.

De las tres vías posibles para la fermentación maloláctica, la catalizada por el Enzima Maloláctica es para algunos investigadores, como Lafon – Lafourcade, la casi absolutamente predominante en las bacterias lácticas del vino.

Ilustración 7

Bioquímica de la FML por la enzima maloláctica



Nota: Rubes Editorial, S.L., 2021. Extraído de:

https://www.acenologia.com/bioquimica_bacterias_lacticas_vino_cienc1213/

Cualquiera sea la vía bioquímica seguida por las bacterias lácticas, la biotransformación del ácido L (-) málico en ácido L (+) láctico y CO₂, se acompaña de una fuerte subida de la población hasta 10⁶-10⁸ ufc/ml, provocando junto a la liberación de gas una disminución de la acidez reflejada en un incremento de pH de 0,3 (mínimamente).

En realidad, la disminución de la acidez total es mayor porque la degradación del ácido málico provoca una disminución de la acidez debido al ácido tartárico por precipitación del bitartrato de potasio. Esto se debe a:

- 1) La fermentación maloláctica se extiende inclusive a las sales del ácido málico. Los malatos, al ser descompuestos, dejan en libertad los cationes que entraban en su constitución, los cuales naturalmente se unen a los ácidos libres, y entre ellos a los más disociados, cuyo primer lugar lo ocupa el ácido tartárico. Ahora bien, el vino generalmente está saturado de bitartrato de potasio, de modo que esta nueva formación provoca la insolubilización de todo el bitartrato de potasio, que sobrepasa su producto de solubilidad en las condiciones actuales de alcohol, temperatura, etc, del vino.
- 2) Como la presencia del ácido málico en el vino aumenta la solubilidad del bitartrato de potasio, al desaparecer provoca la insolubilización de cierta cantidad de este.

La funcionalidad de todos los elementos celulares que permiten la realización de la fermentación maloláctica es necesaria para la síntesis del ATP: permeabilidad al malato, al lactato y al CO_2 .

cítrico, el ácido pirúvico y el ácido α -cetoglutámico¹¹. La actividad metabólica está claramente influenciada por el pH (Wibowo et al, 1985 citado en Flanzly, Claude y colaboradores, 2003, p. 327). El transporte del malato es favorecido a pH bajo, sin embargo, con la glucosa ocurre, al contrario. Según Henick-Kling (1995), el metabolismo de los azúcares está regulado por el transporte del malato (Henick – Kling citado en Flanzly, Claude y colaboradores, 2003, p. 327).

Desde el punto de vista metabólico, la fermentación maloláctica no es una fermentación clásica como la misma láctica donde se utilizan azúcares como sustratos y obtienen ATP por fosforilación a nivel de sustrato en las reacciones del glucólisis. Solamente es una descarboxilación que no parece que conlleve, en principio, ningún beneficio energético a las células que la realizan, y donde el único beneficio aparente sería la subida del pH externo. Sin embargo, se ha descubierto que la FML es una de las fermentaciones peculiares con ATP sintasa, ya que la salida del L-láctico de las células se efectúa mediante un simport con protones, y que paralelamente hay una entrada de protones a favor de gradiente (el pH externo es 3-4 y el interior es superior a 6), mediante una ATP sintasa, que lo acopla a la síntesis del ATP.

Pero se ha descubierto que *Oenococcus oeni* puede obtener algunos ATP por la descarboxilación del málico en un medio como el vino donde prácticamente no hay azúcares gracias a la presencia de una enzima ATP sintasa que favorece la entrada y salida de protones de la célula que influye en la formación del ATP.

¹¹ Esta formación de ácido α -cetoglutámico deja abierta la posibilidad de ampliar su estudio, ya que, de poder encontrar una forma de controlarlo, se limitaría la combinación de este con el anhídrido sulfuroso, con el interesante beneficio que traería en la disminución de las dosis a utilizar.

Estos ATP, junto con algunos nutrientes remanentes de los restos de las levaduras, pueden permitir un ligero crecimiento de estas bacterias en el vino.

Factores que influyen en el proceso

Cualquiera sea el mecanismo bioquímico que suceda, de los señalados anteriormente, hay factores que influyen notoriamente sobre el desarrollo y crecimiento de las bacterias lácticas en el vino, y como consecuencia, en el transcurso de la fermentación maloláctica. Transformación, como ya se ha dicho, que puede ser beneficiosa, pero en algunos casos contraproducente. “De ahí surge la necesidad de estimular, moderar o impedir la actividad de estos microorganismos” (Suarez Lepe, 2004).

Estos factores son:

Factores ampelográficos

La variedad vinífera empleada tiene una importancia considerable, ya que cada cepa al llegar a la madurez tiene una relación Tartárico/Málico que le es propia.

Por esto, la degradación málica ha sido considerada siempre como un fenómeno indispensable para el afinamiento de vinos de zonas frías, ya que las uvas poseen bajo contenido en azúcares y elevada acidez.

Las técnicas de cultivo (poda, poda en verde, laboreo y fertilización) también ejercen su influencia sobre el logro de la fermentación maloláctica debido al poder bactericida de los anticriptogámicos y a su influencia en la dosificación de SO₂.

La disponibilidad de agua y la climatología fría favorecen el fenotipo acidez alta de muchos varietales de vid.

Pero, la composición del mosto, depende también de las condiciones climáticas en las que se desarrolle la cepa. Es decir, del macroclima (altitud, latitud, proximidad a masas de agua, etc), del mesoclima o clima de la parcela y del microclima o condiciones climáticas que rodean a la propia planta, dentro y fuera de la cubierta vegetal. Estas últimas pueden ser modificadas al variar la geometría de la canopia o bien mediante técnicas culturales.

La disponibilidad de agua, juega un papel fundamental en la actividad fotosintética y en el papel regulador del metabolismo y, en consecuencia, en la composición del mosto y su acidez.

El sistema de conducción elegido, también determina la distribución y orientación del follaje externo e interno. Por tanto, la calidad y cantidad de la radiación recibida, así como las variaciones en la humedad relativa, temperatura de los racimos, tasa de transformación, tasa de asimilación de CO₂, etc. (Lissarague, 2002 citado en Suarez Lepe, 2004, p.370). Los sistemas con vegetación abierta o dividida favorecen una menor acidez total, mientras que los sistemas densos propician mostos de elevada acidez. Todo esto se debe a que el ácido málico está más influenciado por la radiación solar que el ácido tartárico.¹²

Por otro lado, el riego es la técnica que tiene una repercusión mayor en la actividad fisiológica de la planta. Puede ejercer dos modos de acción, aumentando

¹² El ácido málico es destruido por combustión intracelular, ya que es el alimento principal de la respiración, la cual se intensifica y activa con el aumento de la temperatura.

la síntesis de ácidos orgánicos a través de un aumento de la actividad de las hojas durante la primera fase del desarrollo de las bayas (málico y tartárico), o impidiendo su degradación durante la maduración de las bayas. Es decir, que puede aumentar la acidez total retrasando la maduración. Se puede afirmar que el riego incrementa el contenido de ácido málico, inversamente a lo que ocurre con el estrés hídrico, debido al descenso de la temperatura de los racimos.

En conclusión, independientemente de las características ampelográficas de cada varietal, las prácticas culturales, sistema de conducción y riego pueden modificar el contenido en ácidos orgánicos y en particular, del ácido málico.

Factores tecnológicos

Las operaciones enológicas que tienden a eliminar o disminuir el contacto de las partes sólidas de la uva con el mosto tienen como efecto disminuir la posibilidad de que ocurra la fermentación maloláctica. Debido a esto, en tintos hay que tener en cuenta la duración del contacto con los hollejos, ya que las bacterias lácticas se desarrollan sobre todo en el sombrero, por lo que un descube rápido y un trasiego precoz disminuye la población bacteriana. Por esto, en años de madurez insuficiente es aconsejable una maceración post fermentativa o encubado prolongado.

El desfogado previo a la fermentación también influye negativamente, ya que priva al mosto de un alto porcentaje de microorganismos necesarios para esta transformación y de las partículas del turbio que obran como soporte de estos y favorecen los fenómenos de superficie. Desde otro punto de vista, el desfogado

previo a la fermentación favorece el desarrollo y mayor multiplicación de las levaduras durante la fermentación alcohólica y esto tiene como consecuencia un enriquecimiento en nutrientes para las bacterias lácticas luego de producirse la lisis de las levaduras, las cuales aportan aminoácidos y demás compuestos nitrogenados sumado al aporte de macromoléculas provenientes de sus paredes celulares, bajo este punto de vista el desborre previo a la fermentación es positivo al desarrollo de una correcta FML.

Los trasiegos precoces también retardan el proceso, pero no solamente por eliminación de bacterias sino también porque empobrecen a los mostos de vitaminas y sustancias nitrogenadas que provienen de la autólisis de las levaduras. A su vez, estos trasiegos elevan el potencial redox, lo que en teoría debe oponerse a la funcionalidad bacteriana, a su carácter anaeróbico o microaerofílico.

Las clarificaciones habituales para adquirir limpidez en los vinos, al igual que las filtraciones, también tienden a retardar o inhibir la fermentación maloláctica.

Factores físicos y químicos

Estos ya han sido desarrollados en el capítulo anterior, pero se nombrarán a fin de tenerlos en cuenta por su influencia en el transcurso de la fermentación maloláctica, por acción o no sobre las bacterias lácticas.

La temperatura tiene un papel fundamental en el desarrollo del proceso. Los límites extremos pueden ser de 10°C y 32°C, aunque esto depende de la cepa que lleve a cabo la fermentación. Se acepta un margen de 20°C a 25°C. Por esto, en

algunos lugares donde el final de la fermentación alcohólica coincide con la bajada progresiva de la temperatura, se hace necesario el calentamiento ya que a medida que la temperatura se acerca al óptimo del desarrollo de la actividad bacteriana, más rápido es el inicio y más completo el proceso.

En Argentina la temperatura óptima se sitúa entre los 18°C y los 23°C.

También es fundamental destacar la influencia del pH, que se sitúa como óptimo para la multiplicación de las bacterias lácticas entre 4,2 y 4,5, bastante por encima del pH normal de los vinos. Al ser más bajos los pH reales de los vinos, la fermentación maloláctica se desarrolla en mayor tiempo.

Los sustratos que las bacterias son capaces de metabolizar también condicionan el crecimiento de las bacterias lácticas, sobre todo si se relacionan con el desarrollo de otras enfermedades en el vino. Por ello, existe un umbral de pH de consumo de ácido málico y un umbral de pH de consumo de azúcares, ya desarrollado anteriormente.

En cuanto a la aireación, la anaerobiosis estricta es negativa en este proceso, al igual que lo que ocurre con la fermentación alcohólica. Un pequeño aporte de oxígeno facilita la fermentación del ácido málico.

Otro factor condicionante es el grado alcohólico. Como ya se ha dicho, el etanol inhibe el crecimiento de las bacterias por su interacción con los lípidos de la membrana. Su efecto es variable, dependiendo de la cepa, de la temperatura, pH y composición del mosto.

El SO₂ también es un factor determinante de la fermentación maloláctica ya que cocos y bacilos son muy sensibles al mismo, por esto se dice que es la llave

para permitir o impedir la FML. Es sabido que esto depende de la dosis. Ambos estados del SO₂, libre y combinado, tienen acción contra las bacterias lácticas. El estado libre tiene acción directa y el combinado, en el caso de las bacterias lácticas que son capaces de metabolizar el acetaldehído y liberar el anhídrido sulfuroso del ácido etanalsulfónico, del cual, parte quedará libre ejerciendo la misma acción que el primero.

Como valores, podemos decir que para iniciar la fermentación maloláctica sin inconvenientes para las bacterias lácticas, el valor máximo de SO₂ total debe ser de 40 ppm y para impedirla, la dosis de SO₂ libre debe ser mayor a 30 ppm o un SO₂ activo de 0.6ppm.

Influencia de los residuos de pesticidas

Algunas moléculas, generalmente orgánicas, pueden influir en la fisiología de las bacterias lácticas e inhiben su crecimiento.

Vivas (2000), determina que las procianidinas extraídas de las pepitas de uva, los elagitaninos oxidados y el extracto de madera de roble son inhibidores. No así las procianidinas oxidadas, que pierden su efecto (Vivas, 2000, citado en Suarez Lepe, 2004, p.376).

La FML también puede resultar inhibida por el ácido p-cumárico y por altas concentraciones de ácido hidroxicinámico.

Vidal (2001), plantea la incidencia del cobre en el desarrollo de la FML. Demuestra que concentraciones de 5 mg/L de Cu⁺² pueden producir alteraciones en el desarrollo bacteriano, pero sin impedir que acabe la fermentación. El cobre

inhibe la actividad de las enzimas, hexoquinasa, lactato deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa, en sinergismo con el etanol. No obstante, la sensibilidad de las distintas cepas al cobre es diferente (Vidal, 2001, citado en Suarez Lepe, 2004, p.377).

Interacciones microbianas

Como hemos dicho anteriormente haciendo referencia al antagonismo entre levaduras y bacterias, donde casi se impone el desarrollo de las primeras en detrimento de las segundas, siendo motivado por carencias nutricionales, y sobre todo por los efectos tóxicos de las sustancias segregadas por las levaduras, alcohol etílico y ácidos grasos, ácidos hexanoico, octanoico, decanoico y dodecanoico. Cuando se estruja la vendimia se produce un desarrollo en paralelo de las levaduras y bacterias lácticas, llegando a alcanzar las segundas una población de $1 \cdot 10^4$ a $1 \cdot 10^5$ bacterias/ml, hasta que la fermentación alcohólica se inicia y entonces se inhibe el crecimiento bacteriano, disminuyendo su población hasta casi desaparecer ($1 \cdot 10^2$ a $1 \cdot 10^3$ bacterias/ml). Transcurrido un "periodo de latencia" de una a tres semanas, en el cual las levaduras cesan su actividad y mueren, ceden entonces al medio por autólisis determinadas sustancias o factores de crecimiento ya nombrados, vitaminas, aminoácidos, péptidos, etc, produciéndose entonces un importante crecimiento de la población microbiana, llegando a alcanzar $1 \cdot 10^7$ bacterias/ml, e iniciándose entonces el metabolismo del ácido málico. En algunas ocasiones no existe periodo de latencia, llegándose a solapar el final de la fermentación alcohólica con el inicio de la fermentación

maloláctica, ocurriendo esto en aquellas vendimias con valores de pH elevados, y donde se produce un importante incremento de la acidez volátil por el ataque de las bacterias a los azúcares. Una vez terminada la FML, la población bacteriana disminuye, desapareciendo rápidamente los *Oenococcus oeni*, manteniéndose una población residual en el vino de 1.10^2 a 1.10^3 bacterias/ml de las especies *Pediococcus* y *Lactobacillus*.

También existen interacciones entre bacterias lácticas, por la cesión al medio de sustancias tóxicas como el peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos u otras sustancias más complejas llamadas “bacteriocinas”¹³. La presencia en el vino de hongos y bacterias acéticas también dificulta el crecimiento de BAL. Ya se ha demostrado que durante la vinificación existe un crecimiento sucesivo de varias especies (Fleet *et al.* 1984citado en Flanzy, Claude y colaboradores, 2003, p.335). Por ejemplo, en los vinos argentinos, raramente se aísla (por presencia natural) *Leuconostoc oenos* (*Oenococcus oeni*) si ha habido previamente crecimiento de *Lactobacillus hilgardii* o *Pediococcus pentosaceus* (Manca de Nadra y Strasser de Saad, 1987 y 1990citados en Flanzy, Claude y colaboradores, 2003, p.335). A su vez, la multiplicación de *Oenococcus oeni* conduce a una inhibición del crecimiento de *Pediococcus parvulus* por unas bacteriocinas sintetizadas por ella y segregadas al medio (Edwards *et al.* 1994citado en Flanzy, Claude y colaboradores, 2003, p.335).

¹³ Las bacteriocinas son proteínas o toxinas peptídicas sintetizadas por bacterias que inhiben el crecimiento de bacterias similares o de cepas cercanas a las que producen.

Por último, una infección de virus bacteriófagos puede ser capaz de destruir las bacterias lácticas y llegan a ralentizar o impedir el desarrollo de una fermentación maloláctica.

Por último, se tiene en cuenta que todo proceso fermentativo donde intervienen bacterias puede ser propenso a ataques de fagos. En enología, los primeros autores en investigar sobre la presencia de los mismos fueron Sozzi, Cazelles y Gnaegi (1976 y 1982). Estos fagos que fueron aislados del vino, presentan dificultades de fermentación maloláctica por actividad lítica en *Oenococcus oeni*. Estos fagos presentan la siguiente morfología: cabeza hexagonal, cola flexible y larga pero no retráctil.

La destrucción de la población de bacterias que asegura la fermentación maloláctica por ataque de fagos, conduce a un retardo o a una detención de la misma y puede observarse luego de esto, un desarrollo de pediococos no deseados. La presencia de estos virus bacteriófagos puede verse reducida en presencia de compuestos fenólicos, pH menor a 3,5, adición de SO_2 y tratamientos con bentonita.

Se citan a continuación aspectos referentes a su control y prevención (Suarez Lepe, 2004):

- En caso de detectarse problemas con el arranque o desarrollo de la FML, asegurar en primer lugar que no exista uno o varios factores de inhibición, tales como: temperatura, SO_2 , alcohol, etc.

- La presencia de virus bacteriófagos debe ser confirmada mediante cultivos específicos o por la observación en un microscopio electrónico.
- En caso de la parada de la FML, una manera de activarla para que esta finalice consiste en inocular una especie distinta a la utilizada anteriormente.
- No es conveniente utilizar el sistema de siembras de bacterias por adición de vino de un depósito a otro, pues en caso de existir un virus bacteriófago se puede propagar la infección al resto.
- En la industria alimentaria, la técnica que se utiliza se basa en aprovechar la propiedad de la fuerte especificidad de los fagos, que consiste en emplear una sucesión de especies distintas de bacterias. De tal manera, que se comienza por una de ellas, y al cabo de un cierto tiempo, se inocular en el medio otra especie distinta y así sucesivamente. Cuando los posibles fagos que afectan a la primera bacteria sembrada están en fase de virulencia, entonces se les cambia de microorganismo y así estos mueren rápidamente por no poder multiplicarse en la nueva bacteria inoculada. Lo mismo sucede con la segunda y las demás bacterias de la secuencia.

En la fermentación maloláctica, no es posible operar de esta manera, pues su duración es relativamente corta y el sistema está diseñado para fermentaciones continuas. Sin embargo, este método se puede adaptar, estableciendo una rotación de bacterias de un año a otro, o incluso añadir una mezcla de bacterias que impida un ataque simultáneo de los fagos. Otra buena solución es el empleo de cultivos de bacterias lácticas autóctonas,

forzando la fermentación maloláctica de un pequeño volumen de vino y utilizándolo como inóculo para el resto de la bodega. Esto mismo es lo que realizamos con bacterias lácticas secas activas.

Podemos afirmar que, así como se habla de la autenticidad del terroir, en el futuro se podrá hablar de la autenticidad o individualidad de las cepas microbiológicas.

Inhibidores y estimulantes de la fermentación maloláctica

Tabla 2

Inhibidores y estimulantes de la fermentación maloláctica

Inhibidores	Estimulantes
Fermentación alcohólica	Relación Tartárico/Málica (depende del varietal)
Desfangado previo a la fermentación alcohólica	Disponibilidad de agua
Clarificaciones y filtraciones	Clima frío
Procianidinas, elagitaninos oxidados, extracto de madera de roble	Sistemas de conducción de alta densidad
Ácido p-cumárico	Desfangado previo a la fermentación alcohólica
Altas concentraciones de ácido hidroxicinámico	Ácido gálico
Cobre (concentraciones mayores a 5mg/l)	Antocianos
Bacteriocinas	
Virus bacteriófagos	
Etanol	
Anhídrido sulfuroso	

CAPÍTULO 3: Características del vino que se someterá a FML

El vino objeto del ensayo fue de un volumen final de 120000 litros de vino blanco de varietal Chardonnay base de espumante, proveniente del cuartel N° 504 de la Finca El Oasis. La misma se encuentra ubicada a 1050 metros sobre el nivel del mar, en Los Árboles, Tunuyán, Mendoza.

Comenzaron los controles de madurez de los cuarteles el día 20/01/2021. En el momento en que los resultados de estos fueron convenientes, se programó la cosecha de los mismos.

Tabla 3

Indicadores de madurez al momento de la cosecha

CUARTEL	GRADO BRIX	pH	ACIDEZ TOTAL (g/l)	ALCOHOL POTENCIAL (%VOL)
504	15,5	3,10	11,9	8,4

La cosecha de la uva, se realizó en forma mecánica con cosechadora, donde luego fue llevada a la bodega, se obtuvo el mosto y fue sometido al proceso normal de fermentación alcohólica. Esta parte del proceso no es parte de este trabajo de investigación, pero sí lo es la parte analítica final del mismo donde se detecta el problema de acidez total elevada para un vino base de espumante.

A su vez, en el control organoléptico del final de fermentación indicó una marcada acidez en boca, una sensación ácida similar a cuando se ingiere limón que dificulta el tomarlo y el poder diferenciar otros descriptores. En nariz arrojó aromas verdes. En vista se observó amarillo claro, con turbidez normal para el momento fermentativo en que se encontraba.

El volumen total de vino ensayo se distribuyó en 4 tanques de 30000 litros respectivamente, a continuación, se detallan los controles analíticos de final de fermentación alcohólica:

Tabla 4

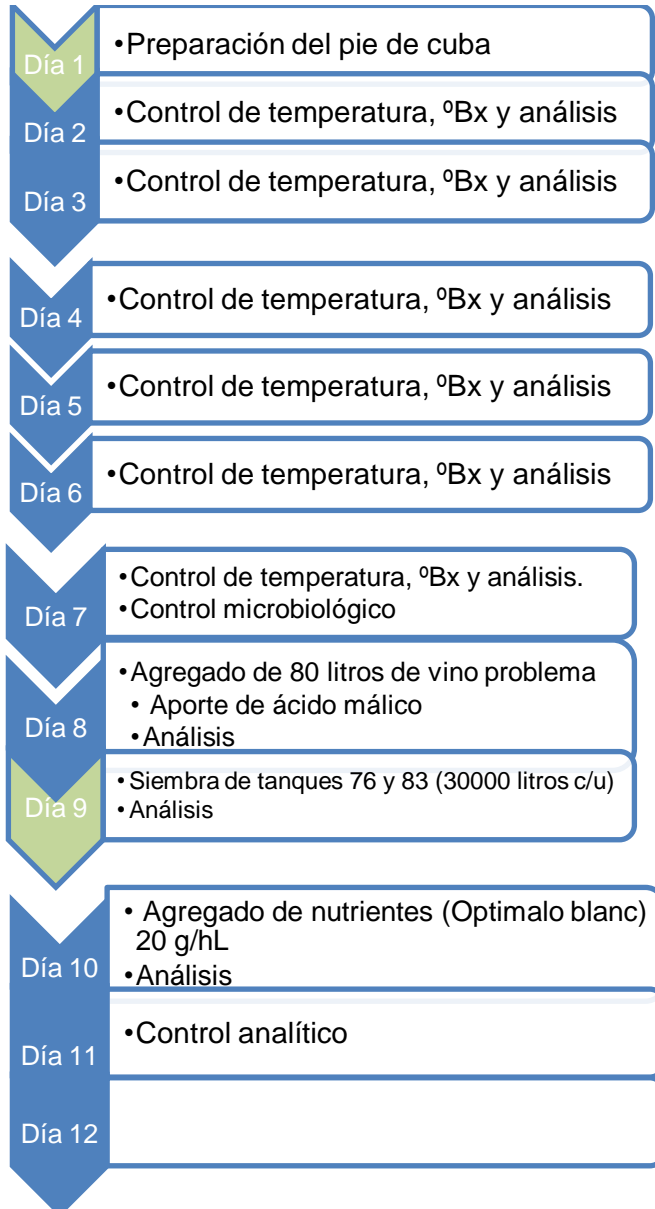
Datos analíticos de los tanques ensayo al inicio del proceso

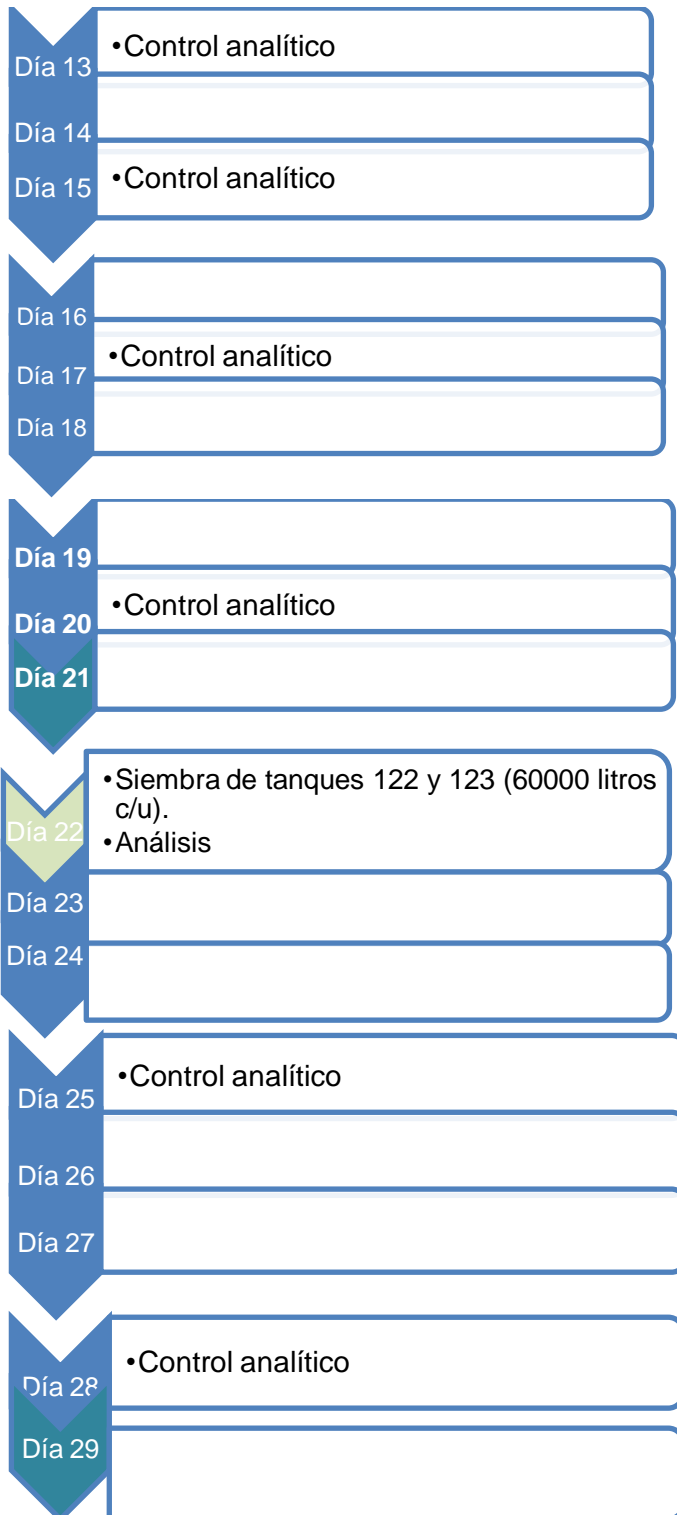
	TANQUE 76	TANQUE 83	TANQUE 66	TANQUE 75
AZUCAR	1,80	1,80	1,80	1,80
A.TOTAL	10,87	12,08	11,62	11,92
PH	3,20	3,15	3,22	3,22
A.VOLATIL	0,14	0,15	0,17	0,21
MH2	5,98	5,97	6,02	6,44
LH	0,00	0,00	0,00	0,00
ALCOHOL	8,8	8,8	8,9	8,9

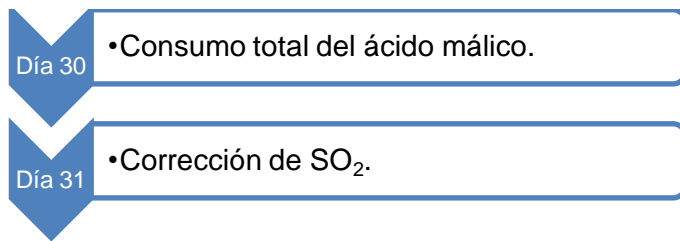
Se comenzó inoculando pie de cuba a dos de estos tanques con objeto de aumentar el volumen progresivamente para asegurar la adaptación de las

bacterias lácticas. Luego, se sumaron los dos tanques restantes, pasando a dos tanques de 60000 litros (tanques 122 y 123).

Línea de tiempo







Preparación del pie de cuba y seguimiento analítico

Preparación del PDC (Día 1):

Una vez terminada la fermentación alcohólica, se comenzó con un pie de cuba de 180 litros, formados por 90 litros de agua sin clorar y 90 litros de mosto virgen. Se realizó esta mezcla de mosto y agua la cual fue inoculada con levaduras, a fin de obtener una adaptación progresiva de las bacterias lácticas a la graduación alcohólica, que como se consigna en el detalle analítico, era de 8,4 %v/v aproximadamente. Por otro lado, las indicaciones del proveedor en cuanto a la hidratación y preparación de las bacterias secas activas también sugieren el uso simultáneo de levaduras y bacterias.

Para el procedimiento, se utilizó mosto de Pinot noir¹⁴, que tuvo que ser sometido a una decoloración con carbón activado (20g/25l, en total: 80g). Luego de esto se analizaron sus valores de SO₂ para cumplir con el valor requerido por las bacterias lácticas, siendo este de 40 ppm de SO₂ total, dando como resultado 52 ppm para total y 25 ppm para libre. Debido a esto se realizó un agregado de 1 ml H₂O₂ cada 25 litros, 4,5 ml en total. Una vez transcurrida una hora de contacto con el carbón activado, se realizó la filtración por filtro de placas, pero se detectó

¹⁴ En el momento en que se realizó el ensayo, no se disponía de mosto virgen de Chardonnay por lo que se debió acudir al uso de mosto de Pinot noir con tratamiento de decoloración previo.

que todavía queda carbón en suspensión por lo que se realizó una segunda filtración en filtro de tierras en laboratorio. Se analizó nuevamente el SO₂ total y arrojó un valor de 36 ppm. Una vez que el mosto estuvo en condiciones, se añadió al agua sin clorar y se enfrió la mezcla a 25°C.

Se realizó la activación de 15g de la levadura EC 1118, en 200 ml de agua a 42°C con 15g de activador y nutriente (Fermaid K). Luego de 15 minutos, se fue agregando de a poco, mezcla de mosto y agua para ir bajando la temperatura a 25°C. Por otro lado, se hidrataron las bacterias lácticas (Lalvin MT 01 Oenococcus oeni), colocando 75 g de bacterias secas activas en 1,5 litros de agua sin clorar a 20°C, se mezcla y se esperó 15 minutos. Luego, se agregaron ambas mezclas al volumen total de agua y mosto, con una diferencia de temperatura menor a 5°C entre el mosto y el preparado. Por los requerimientos de temperatura de las bacterias lácticas, lo ideal hubiese sido añadirlas a la mezcla a 22°C, pero por los tiempos apremiantes se añadieron a 25°C.

Una vez homogeneizado el pie de cuba, se iniciaron los controles analíticos¹⁵, detallados a continuación:

¹⁵ Los datos analíticos serán obtenidos por métodos físicos para grado Brix y temperatura y los químicos por Foss, pudiendo siempre acudir a los métodos analíticos tradicionales para cada determinación.

Tabla 5

Datos analíticos del pie de cuba

																					+80L		
DÍA Nº	1*	1*	1	2	2	2	3	3	3*	4	4	4	5	5*	5	6	6*	6*	7	7*	7*	8	8
T(°C)	24	24	24	24	24	25	24	25,5	25,5	25	25	25	24	24									
°BX	5	5	5	4,5	4,5	3,5	2,8	1,7	1,7	0,9	0,8	0,7	0,2	0,2									
AZ	35,66	35,66	35,66	30,35	29,17	26,5	17,43	13,07	13,03	6,84	4,86	3,55	1,36	1,36	1,1	0,89	0,89	0,89	0,5	0,5	0,5	0,21	0,15
AT	4,06	4,06	4,06	4,31	4,41	4,33	4,32	4,31	4,31	4,27	4,25	4,25	4,14	4,14	4,04	3,89	3,89	3,89	3,54	3,54	3,54	3,38	5,4
pH	2,84	2,84	2,84	2,92	2,91	2,97	3,23	3,36	3,36	3,61	3,69	3,75	3,88	3,88	3,81	3,94	3,94	3,94	3,77	3,77	3,77	3,32	3,24
AV	0	0	0	0	0	0	0,07	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,18	0,18	0,14	0,14	0,14	0,14	0,16	0,16	0,16	0	0,26
MH2	1,88	1,88	1,88	1,79	1,87	1,8	1,63	1,65	1,65	1,65	1,35	1,37	1,24	1,24	1,11	0,91	0,91	0,91	0,86	0,86	0,86	0	1,56
LH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05	0,11	0,15	0,15	0,18	0,2	0,2	0,2	0,31	0,31	0,31	1,07	0,72

Las columnas señaladas con asterisco corresponden a una copia de los datos analíticos de ese control a modo de conservar el formato gráfico.

Gráfico 1

Gráfico de los datos analíticos del pie de cuba (azúcar y grado Brix)

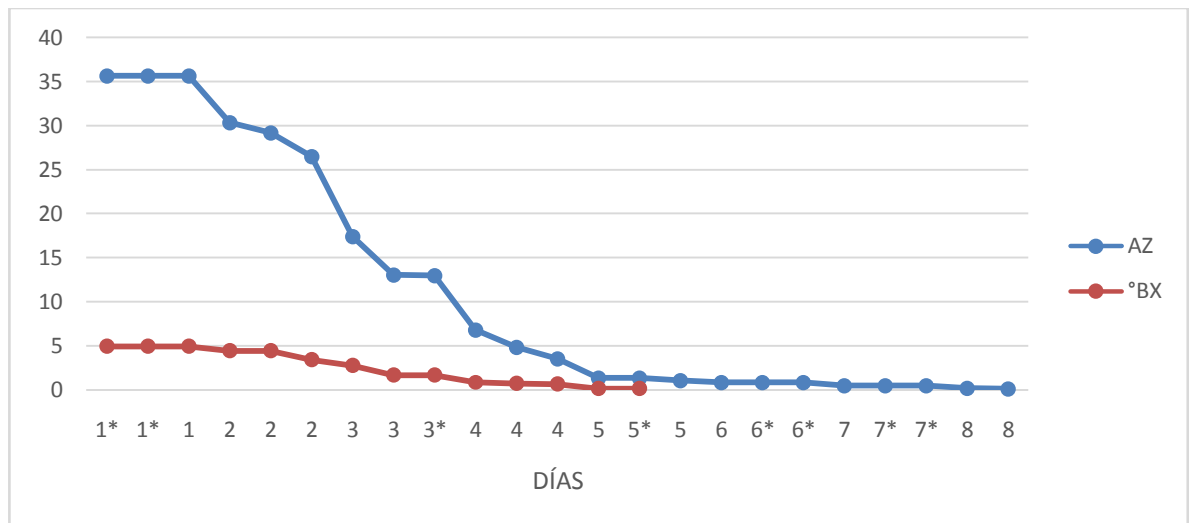
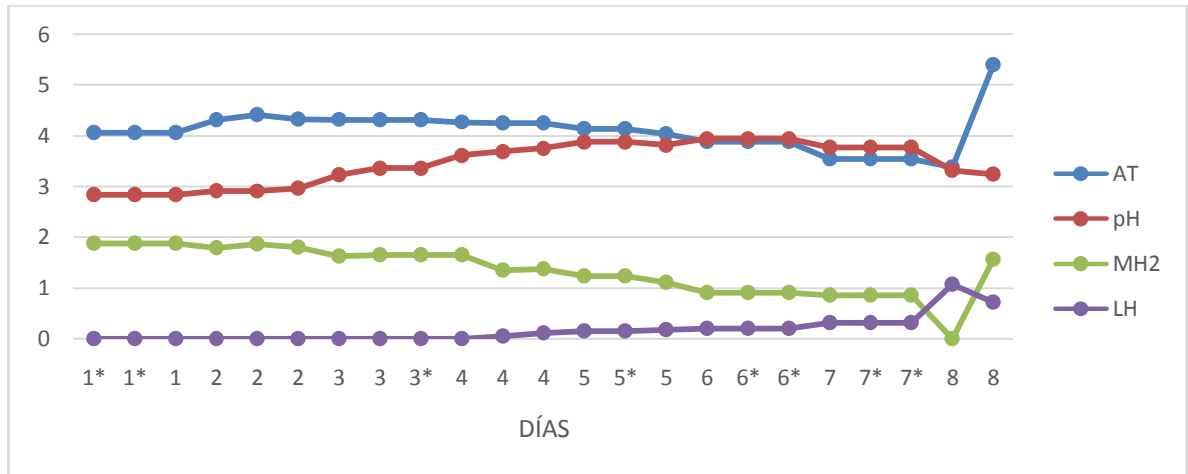


Gráfico 2

Gráfico de datos analíticos del pie de cuba (Acidez Total, pH, ácido málico, ácido láctico)



El día 8 se detecta que el pie de cuba ha llegado a 0 mg/L de ácido málico por lo que se realiza el trasiego de este a un tanque de mayor capacidad y se agregan 80 litros del vino objeto del ensayo. Debido a esto es que se aprecia en el gráfico una suba en todos los valores, excepto el de ácido málico que baja por dilución y el pH por aumento de acidez.

El día 9 se decide hacer la división del pie de cuba inicial en dos, uno de 600 litros y uno de 200 litros. El primer volumen se utilizará en la siembra de los dos primeros tanques de 30000 litros a los cuales se agregarán 300 litros del pie de cuba respectivamente (se inocula un 1% del volumen total). Los 200 litros quedarán como reserva.

Antes de realizar la siembra en los tanques de vino ensayo, el día 7 se realizó un control microbiológico para detectar si existe algún tipo de contaminación con otro tipo de microorganismos.

Se utilizan medios de cultivo específicos para aerobias mesófilas y levaduras *Brettanomyces*, que son los que se utilizan normalmente en los análisis en la bodega. Ambas arrojan resultado negativo (0 UFC/100ml), por lo que se procede a la siembra.

Datos analíticos del pie de cuba previo a la siembra

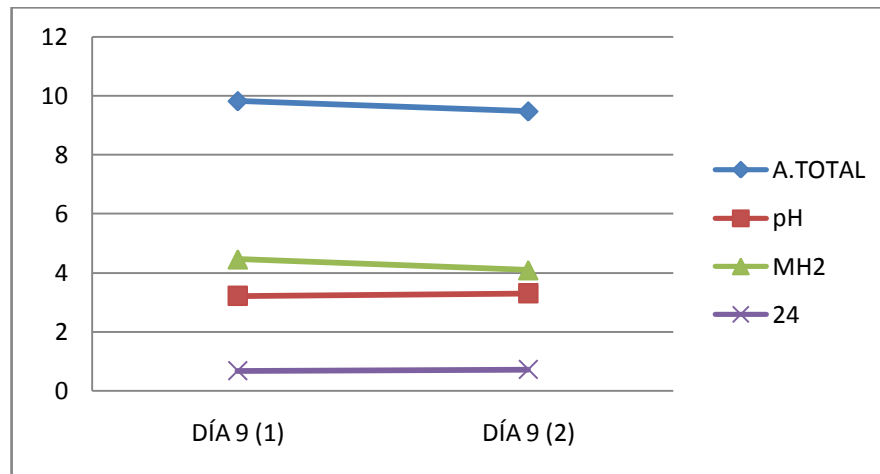
Tabla 6

Datos analíticos del pie de cuba previo a la siembra

DÍA N°	DÍA 9 (1)	DÍA 9 (2)
T (°C)	22	22
°BX	0	0
AZ	0	0
A.TOTAL	9,82	9,47
PH	3,21	3,3
A.VOLATIL	0,15	0,17
MH2	4,46	4,09
LH	0,67	0,71

Gráfico 3

Datos analíticos del pie de cuba previo a la siembra



A continuación, se detalla el seguimiento analítico de los tanques n° 76 y n° 83 los cuales fueron sembrados con un 1% de pie de cuba el día 9.

Datos analíticos del tanque 76

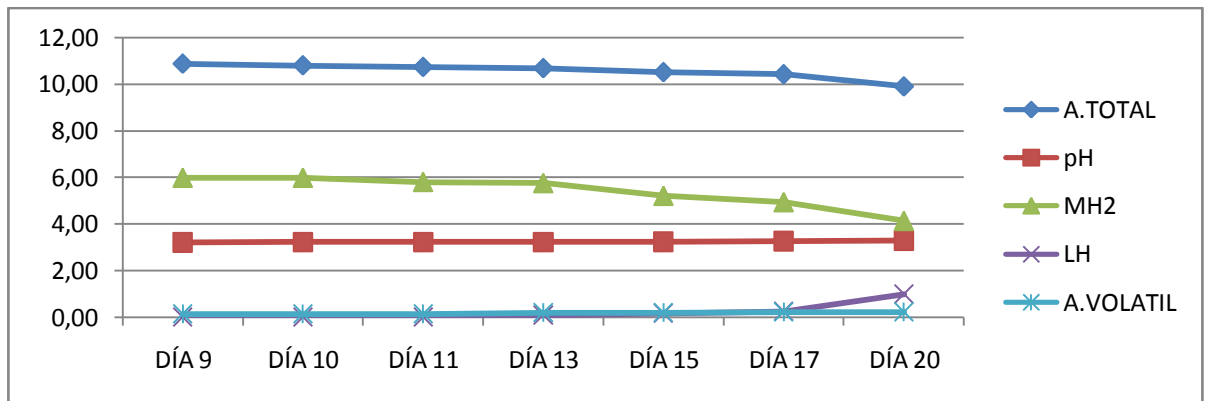
Tabla 7

Datos analíticos del tanque 76

	DÍAN°	DÍA 9	DÍA 10	DÍA 11	DÍA 13	DÍA 15	DÍA 17	DÍA 20
TQ 76	AZUCAR	-1,80						
	A.TOTAL	10,87	10,80	10,73	10,68	10,51	10,42	9,90
	pH	3,20	3,22	3,22	3,22	3,23	3,26	3,29
	A.VOLATIL	0,14	0,14	0,14	0,19	0,20	0,22	0,22
	MH2	5,98	5,98	5,80	5,75	5,21	4,94	4,14
	LH	0,00	0,00	0,00	0,08	0,16	0,24	0,99

Gráfico 4

Datos analíticos del tanque 76



Datos analíticos del tanque 83

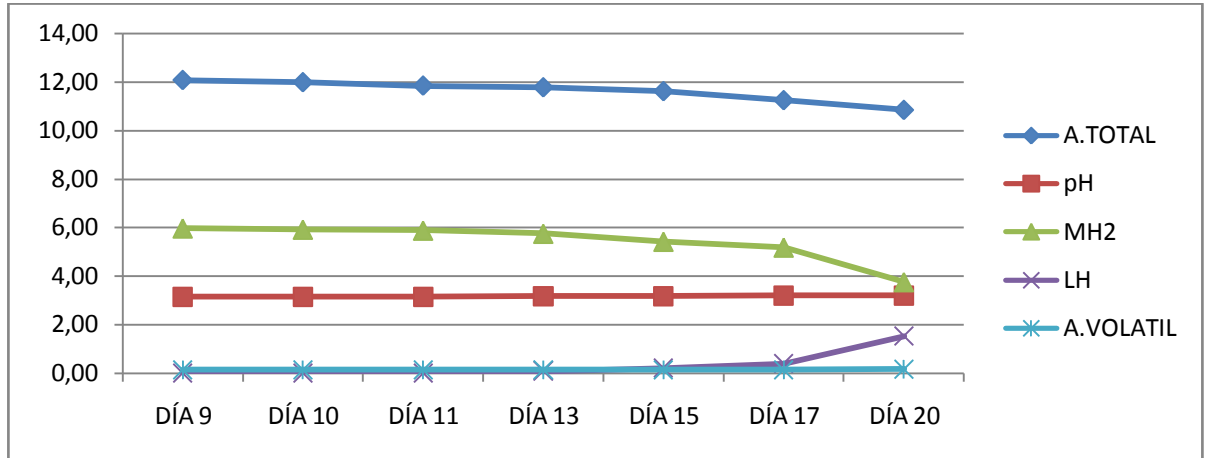
Tabla 8

Datos analíticos del tanque 83

	DÍA N°	DÍA 9	DÍA 10	DÍA 11	DÍA 13	DÍA 15	DÍA 17	DÍA 20
TQ 83	AZUCAR	-1,80						
	A.TOTAL	12,08	11,99	11,85	11,78	11,62	11,25	10,85
	pH	3,15	3,15	3,15	3,17	3,18	3,19	3,20
	A.VOLATIL	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,17
	MH2	5,97	5,92	5,88	5,75	5,42	5,18	3,75
	LH	0,00	0,00	0,00	0,09	0,22	0,40	1,53

Gráfico 5

Datos analíticos del tanque 83



Una vez que se verifica que la fermentación maloláctica se está produciendo de manera activa y el desarrollo de las bacterias lácticas es óptimo, se procede a la siembra de los últimos dos tanques de 30000 litros, dando un volumen total de dos tanques de 60000 litros. La inoculación se realiza en el día N° 21.

A continuación, el seguimiento analítico de los tanques finales n° 122 y n° 123.

Datos analíticos del tanque 122

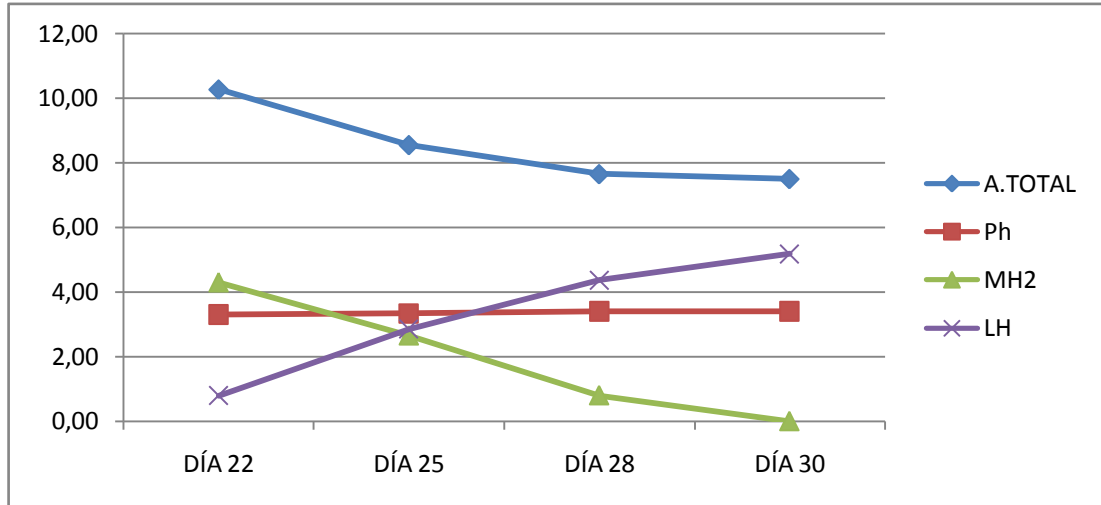
Tabla 9

Datos analíticos del tanque 122

DÍA N°	DÍA 21	DÍA 22	DÍA 25	DÍA 28	DÍA 30
TQ 122	AZUCAR				-1,80
	ALCOHOL				8,90
	A.TOTAL	10,27	8,55	7,65	7,50
	pH	3,30	3,33	3,40	3,40
	A.VOLATIL	0,15	0,15	0,15	0,15
	MH2	4,29	2,65	0,80	0,00
	LH	0,79	2,85	4,37	5,18
	SO2 LIBRE				15
	SO2 TOTAL				27

Gráfico 6

Datos analíticos del tanque 122



Datos analíticos del tanque 123

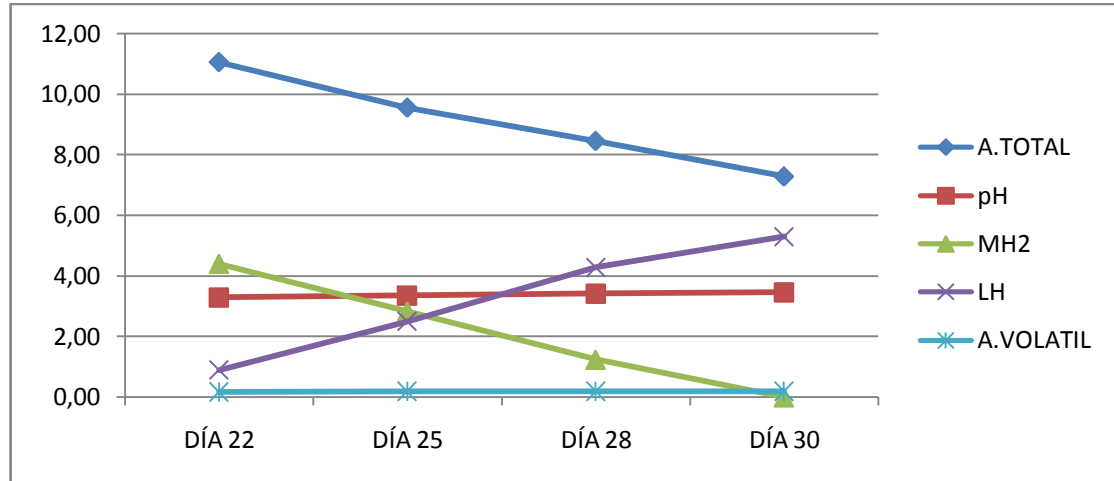
Tabla 10

Datos analíticos del tanque 123

DÍA N°	DÍA 21	DÍA 22	DÍA 25	DÍA 28	DÍA 30
TQ 123	AZUCAR				-1,80
	ALCOHOL				8,80
	A.TOTAL	11,05	9,55	8,45	7,28
	pH	3,29	3,36	3,41	3,46
	A.VOLATIL	0,17	0,19	0,19	0,20
	MH2	4,40	2,83	1,24	0,00
	LH	0,90	2,51	4,28	5,30
	SO2 LIBRE				15
	SO2 TOTAL				28

Gráfico 7

Datos analíticos del tanque 123



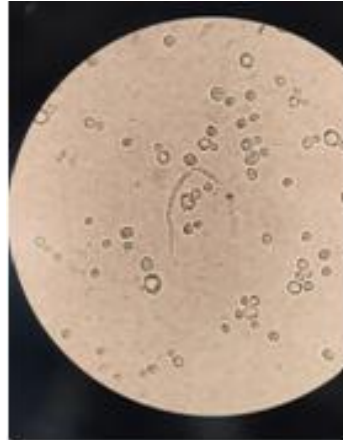
Observaciones microscópicas

Para asegurar el desarrollo del pie de cuba de bacterias lácticas seleccionadas, se realiza en forma anexa al control analítico del vino, una observación microscópica en el microscopio de laboratorio a los seis días de iniciado el pie de cuba. Se utiliza el aumento de 100x, sumado al aumento de 10x del ocular se obtiene un total de 1000x de aumento.

Se coloca 0,1 ml de pie de cuba en un portaobjetos y luego un cubreobjetos. La observación es la siguiente:

Ilustración 9

Bacterias lácticas del pie de cuba



Nota: Trejo Simonassi, María Paula. 2021.

Se observa la presencia de microorganismos, algunos formando diplococos y otras cadenas, pero no podemos diferenciar si los mismos son realmente bacterias lácticas o levaduras residuales presentes en el vino.

Por esto, se consulta bibliografía para encontrar un método de observación con tinción diferencial y se elige la Tinción de Gramm para diferenciar las levaduras (Gram negativos) de las bacterias lácticas (Gram positivo), respectivamente.

La limitación que tiene este trabajo de investigación es la falta de un método con el cual poder realizar un recuento de la población de bacterias lácticas presente.

Tinción de Gramm

Material necesario:

- Mechero bunsen

- Portaobjetos
- Pipeta de 1 ml
- Agua destilada
- Colorantes:
 - Cristal violeta
 - Lugol
 - Alcohol-acetona 1:1
 - Safranina
- Alcohol 96%
- Papel secante
- Microscopio óptico

Procedimiento:

- 1) Encender el mechero Bunsen para conseguir que se forme un ambiente estéril en la zona donde realizaremos el procedimiento.
- 2) Tomar las muestras con la pipeta de 1 ml y colocar sobre el portaobjetos. En este caso tomamos 1 ml de la misma y delimitamos con un papel cuadriculado un área de 2cm^2 para trabajar con un volumen parejo entre muestras. Luego procedemos a realizar la fijación de la muestra, realizando movimientos de zigzag con el portaobjetos sobre la llama, sin dejar demasiado tiempo para no producir la muerte de los microorganismos, hasta que la muestra se observe totalmente seca.

- 3) Realizamos la primera coloración colocando Cristal violeta, cubriendo la totalidad de la muestra. Se deja actuar 1 minuto y se enjuaga con agua destilada.
- 4) Para fijar el colorante anterior se utiliza como mordiente Lugol, se coloca la cantidad suficiente para cubrir la muestra y se deja actuar durante 1 minuto. Luego se lava con agua destilada.
- 5) Para producir la decoloración de los microorganismos gramnegativos, se aplica alcohol al 96% durante 10-15 segundos y se enjuaga con agua destilada.
- 6) Por último, se añade Safranina en la totalidad de la muestra, se deja actuar 1 minuto y se enjuaga con agua destilada.
- 7) Ya se puede proceder a la observación microscópica, en este caso, utilizamos el lente de 100x, sumado al aumento de 10x del ocular, obtenemos en total un aumento de 1000x con el que las bacterias lácticas se observan a la perfección.

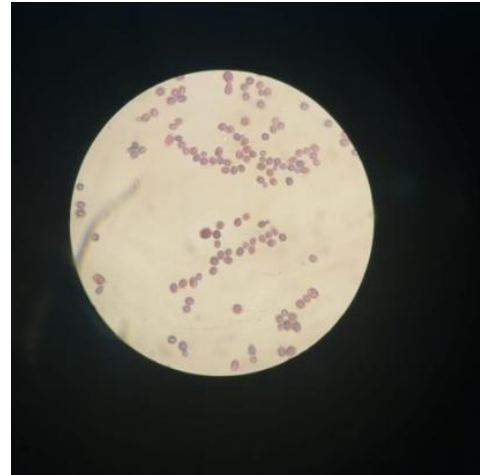
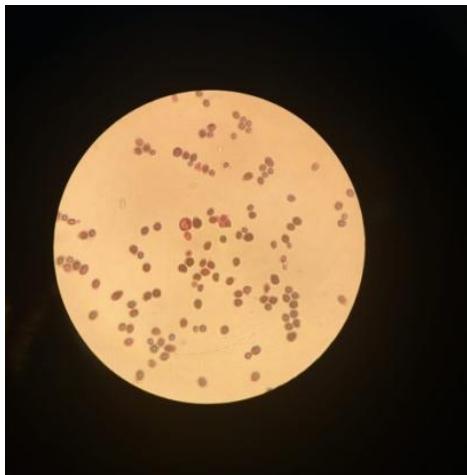
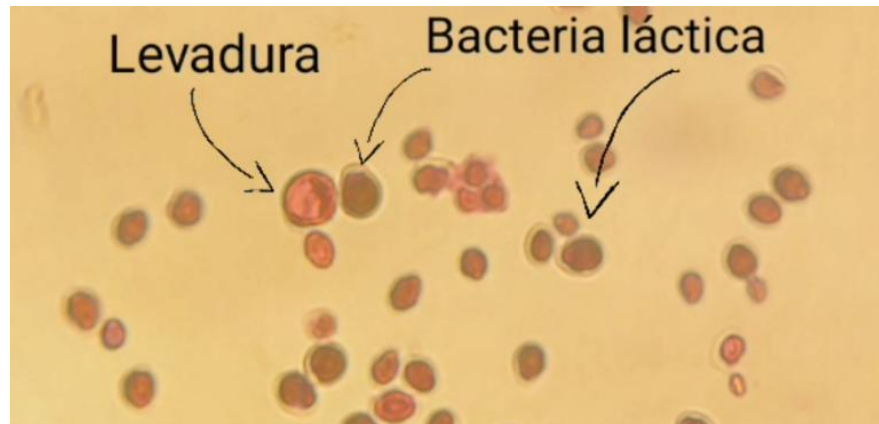
Observaciones día 17 del proceso:

Para este primer ensayo, se disponen de 4 muestras procedentes de ambos tanques de 30000 litros sembrados con el pie de cuba de bacterias lácticas. Dos provenientes del día 15 y dos provenientes del día 17 para observar el crecimiento poblacional de las mismas.

Se toma como referencia la coloración y tamaño de los microorganismos observados, se adjunta una imagen a modo indicativo:

Ilustración 10

Tanque 76, día 15 del proceso y 6 de inoculación en el tanque

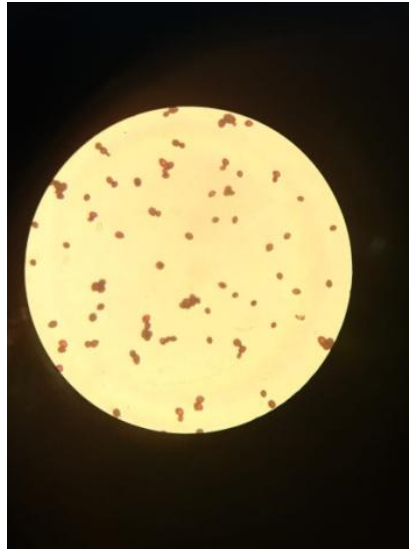


Nota: Trejo Simonassi, María Paula. 2021.

Se observa un buen desarrollo de bacterias lácticas (microorganismos violetas, oscuros) con una pequeña presencia de levaduras. Se detecta formación de cadenas, coincidentes con el aumento del consumo de ácido málico demostrado en los análisis.

Ilustración 11

Tanque 83, día 15 del proceso, día 6 de inoculación

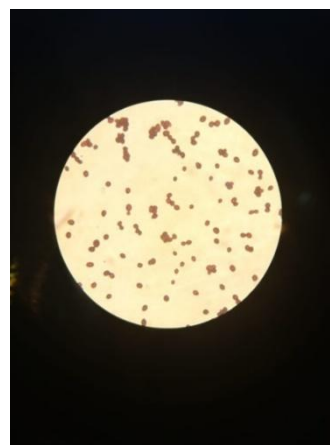
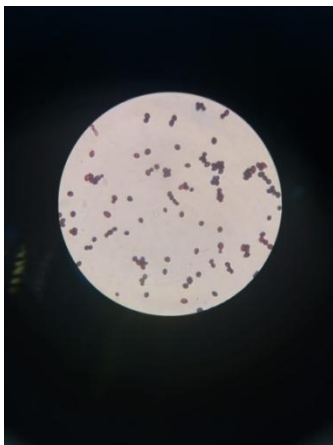


Nota: Trejo Simonassi, María Paula. 2021.

Se detecta presencia de bacterias lácticas netamente, muy pocas levaduras. La baja población puede ser consecuencia de que aún no se observa en los análisis un inicio marcado del consumo de ácido málico, probablemente porque las bacteritas aún estén en proceso de adaptación y reproducción en el medio.

Ilustración 12

Tanque 76, día 17 del proceso, día 8 de inoculación

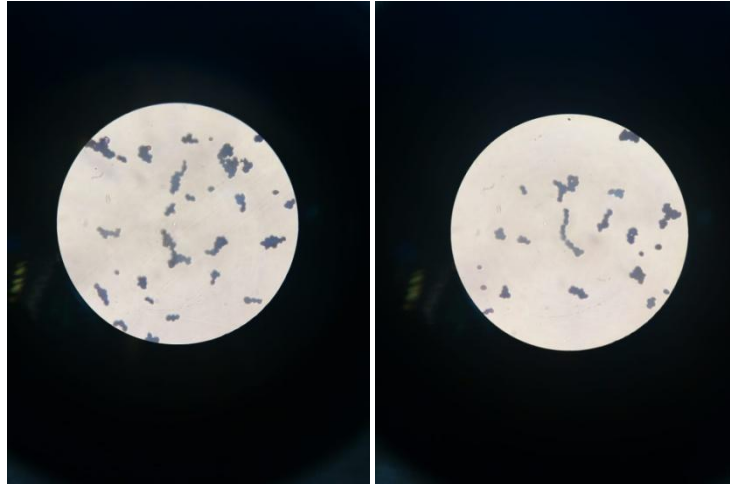


Nota: Trejo Simonassi, María Paula. 2021.

La población se sigue observando en gran cantidad, se siguen formando cadenas de bacterias. Sigue parejo el consumo de ácido málico y la formación de ácido láctico va en aumento.

Ilustración 13

Tanque 83, día 17 del proceso, día 8 de inoculación



Nota: Trejo Simonassi, María Paula. 2021.

Se detecta analíticamente un avance en el consumo de ácido málico por parte de las bacterias lácticas y aumento en la cantidad de ácido láctico, consecuente con el aumento proporcional de la población, aunque no en gran cantidad.

Observaciones día 26 del proceso, día 5 de inoculación

Para este segundo ensayo, se disponen de dos muestras, cada una correspondiente a los tanques finales sometidos a la siembra con pie de cuba (tanque 122 y 123). Cada uno tiene un volumen de 60000 litros.

Como en la primera observación se generaron dudas acerca de la coloración correspondiente a los microorganismos gramnegativos (levaduras) y grampositivos

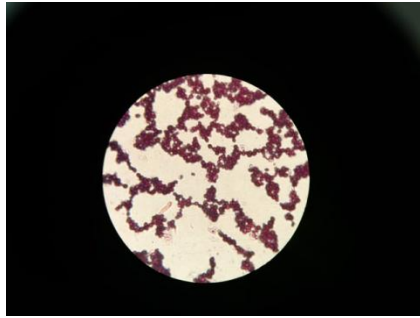
(bacterias lácticas), se lleva también al laboratorio una muestra de pie de cuba de levaduras para realizar la tinción y la observación en una muestra que se sabe existen solamente levaduras.

También se realiza la preparación de una muestra conformada por 1 ml de pie de cuba de levaduras y 1 ml de muestra de tanque 122 para observar una muestra donde se tiene la certeza de que hay presencia tanto de levaduras como de bacterias lácticas.

Los resultados fueron los siguientes:

Ilustración 15

*Pie de cuba de levaduras
(Coloración netamente rosada)*



Nota: Trejo Simonassi, María Paula. 2021.

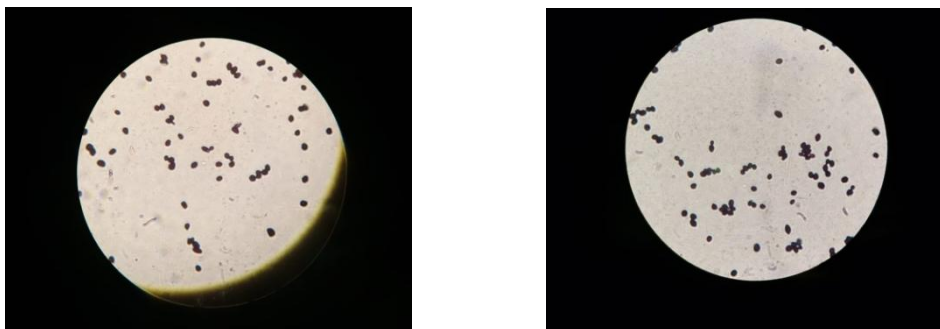
Ilustración 14

*Muestra levaduras y bacterias lácticas
(coloración rosada y violeta)*



Nota: Trejo Simonassi, María Paula. 2021.

Gracias a esta observación, confirmamos también el carácter gramnegativo de las levaduras utilizadas en este pie de cuba.

Ilustración 16*Tanque 122*

Nota: Trejo Simonassi, María Paula. 2021.

Ilustración 17*Tanque 123*

Nota: Trejo Simonassi, María Paula. 2021.

La observación se realizó a los 5 días de inoculado el tanque (día 26), por lo que la formación de cadenas y presencia de bacterias lácticas en ambos tanques está en acuerdo con el avance de la fermentación maloláctica.

Agregados y operaciones en bodega

Previo a la siembra de los tanques objeto del ensayo, se realiza el calentamiento de los mismos a una temperatura entre 20 y 23°C con control permanente de la misma, con una frecuencia de 6 hs entre cada uno

aproximadamente, con especial atención a los mismos una vez que fueron sembrados.

Para favorecer la fermentación maloláctica y la acción de las bacterias lácticas en todo el volumen del tanque, los agitadores se dejaron en funcionamiento de manera permanente, para asegurar la homogeneización del mismo.

Se realizó así mismo, el agregado de nutrientes para favorecer el crecimiento, desarrollo y acción de las bacterias lácticas inoculadas. Se utilizó Optimalo blanc de Lallemand, nutriente específico para vino blanco con el objetivo de compensar la deficiencia de nitrógeno y micronutrientes que puede darse en el medio.

El mismo, está compuesto por levaduras inactivas (incluyendo manoproteínas, productos de la autólisis de las levaduras y paredes celulares de las mismas), es rico en aminoácidos y péptidos específicos además de las vitaminas y minerales que se necesitan para favorecer el crecimiento y reproducción de las bacterias lácticas. Según la ficha de especificaciones técnicas provistas por Lallemand, contiene menos de 9,5% de materia seca (Nitrógeno equivalente), valor que podría utilizarse como guía para establecer dosis en caso de utilizar nutrientes de otros proveedores. Queda abierto a confirmación el contenido en mg/l, u otra unidad, de cada compuesto de este nutriente para hacer más exacta la comparación con otros similares.

La dosis utilizada fue de 20g/hL, siendo esta la dosis recomendada por el proveedor debido a que no se podía determinar cuál era la necesidad real de

nutrientes. Se agregó el segundo día de inoculación de los tanques (día 10) una dosis total de 6 kg por tanque de 30000 litros, realizando la suspensión del mismo en el vino ensayo para luego ser agregado.

Correcciones finales

Una vez que se detecta que el ácido málico en ambos tanques está en 0 mg/l se procede a realizar el agregado de anhídrido sulfuroso a fin de proteger al vino de la acción de otros microorganismos que van en detrimento de la calidad del mismo.

Se corrige el SO_2 libre inicialmente a 15 mg/l y el SO_2 total a 25 mg/l, siendo que en el tanque 123 por agregado de una mayor cantidad arroja un SO_2 total de 27 g/l, siendo estas dosis correspondientes a una primera corrección de protección, aunque lo ideal siempre es corregir una sola vez para evitar el acostumbamiento de los microorganismos al SO_2 .

CAPÍTULO 4: Resultados

Luego de obtener los resultados finales analíticos, de ambos tanques de 60000 litros se demuestra que, mediante la adaptación gradual de las bacterias lácticas gracias al pie de cuba preparado en las condiciones descriptas se logró el consumo total de ácido málico del volumen final de 120000 litros, obteniendo así la estabilidad microbiológica consecuente de la fermentación maloláctica.

También, se logró la disminución de la acidez total elevada inicial, entre 3 y 4g/l, quedando en valores normales para este tipo de vino, o si se considera un poco elevada de todas maneras, realizando un corte con otro vino que tenga acidez total más baja se llegaría al valor deseado.

Resultados analíticos

A continuación, se realiza la comparación de los datos analíticos de los 4 tanques iniciales que conformaron el volumen total del ensayo con los datos analíticos de los 2 tanques con el volumen final.

Tabla 11

Comparación analítica de los resultados iniciales y finales del proceso

	INICIAL				FINAL	
	Tanque 76	Tanque 83	Tanque 66	Tanque 75	Tanque 122	Tanque 123
AZUCAR	-1,80	-1,80	-1,80	-1,80	-1,80	-1,80
ALCOHOL					8,90	8,80
A.TOTAL	10,87	12,08	11,62	11,92	7,50	7,28
PH	3,20	3,15	3,22	3,22	3,40	3,46
A.VOLATIL	0,14	0,15	0,17	0,21	0,15	0,20
MH2	5,98	5,97	6,02	6,44	0,00	0,00
LH	0,00	0,00	0,00	0,00	5,18	5,30
SO2 LIBRE					15	15
SO2 TOTAL					27	28

Se agrega como beneficio del proceso, la mejora organoléptica del vino. El cual en este momento se presenta agradable para el consumo, con acidez notable pero no marcada, la cual le otorga la frescura necesaria. Se encuentran aromas frescos, un poco florales y algunas notas lácticas como manteca suave. A la vista se observa amarillo con leves reflejos dorados.

Por otro lado, se destaca también el beneficio económico del uso de este procedimiento. Para llevarlo a cabo se utilizaron 3 sobres de 25g de bacterias lácticas secas activas con un costo de 55 USD cada uno, 165 USD en total. Con esa cantidad se realizó el proceso completo en 120000 litros, siendo que el fabricante recomienda el uso de 25g/2500 litros. Calculando, según la recomendación del fabricante se necesitarían 1,2 kg de bacterias liofilizadas para la inoculación de los tanques y no se aseguraría la finalización de la fermentación maloláctica en caso de que la bacteria no se adapte al medio, con un costo total

de 2640 USD. Podemos obtener un costo menor en la siembra directa si se adquiere la presentación de 1 kg (recomendada para 100 hL) que tiene un costo de 185 USD.

Por lo tanto, la diferencia económica es de aproximadamente 16 veces (1600%) mayor para el uso de siembra directa en relación al uso de pie de cuba.

Tabla 12

Comparación de costos entre el procedimiento tradicional y el pie de cuba

	Peso	USD	Tiempo estimado
Inoculación directa	1,2 kg	2640 USD	Dependiente del período de latencia
Pie de cuba	75 g	165 USD	31 días

En cuanto al tiempo que conlleva el proceso podemos decir que también se alargaría con el uso de siembra directa. Si bien el procedimiento llevó 30 días en total, este tiempo puede acortarse si en el caso de tener previsto la realización de este asiduamente en bodega, la preparación del pie de cuba se podría hacer con la anticipación adecuada para disminuir los 9 días de adaptación del mismo previa siembra de tanques de manera que coincida con el final de la fermentación alcohólica del vino que quiera someterse a fermentación maloláctica.

CONCLUSIONES

Posterior a la realización de este ensayo en bodega, de la investigación y recopilación de datos sumado a las experiencias compartidas de los enólogos y operarios involucrados en el proceso; se llega a la conclusión de que, siguiendo el procedimiento de preparación del pie de cuba para la adaptación gradual de las bacterias lácticas, teniendo los cuidados necesarios y realizando todos los controles analíticos pertinentes; es posible garantizar la finalización de la fermentación maloláctica en un vino base de espumante, logrando la disminución de la acidez total, la mejora organoléptica y la disminución de costos, lo que significa un cumplimiento de los objetivos planteados y verificación de la hipótesis, ya que esto fue demostrado de manera práctica y analítica.

Se plantea así mismo, una limitación en la investigación que fue la falta de hallazgo de un método de recuento de bacterias lácticas, lo que deja abierta la posibilidad de una mejora en los controles a realizar en el pie de cuba.

BIBLIOGRAFÍA

Apuntes de clase de Microbiología.

Araque Granados, María Isabel. (2010). Tesis doctoral “Estudio bioquímico y molecular de la producción de precursores de carbamato de etilo por bacterias lácticas asociadas al proceso de vinificación”. Tarragona.

Buk, Contreras, Godoy. (2003-2004). Trabajo de recopilación de información “Utilización de la lisozima en enología”.

Flanzy, Claude y colaboradores. (2003). “Enología: fundamentos científicos y tecnológicos” 2ª edición. Ediciones Mundiprensa, España.

García Cazorla, Juan y Xirau Vayreda, María para Panreac S.A. (2005)“Técnicas usuales de análisis en Enología”, Barcelona, España.

Krieger Weber, Sibylle y colaboradores (2015) para Lallemand. “Una nueva generación de bacterias malolácticas”.

Oreglia, Francisco. (1978). "Enología Teórico – Práctica, volumen primero".

Oreglia, Francisco. (1978) "Enología Teórico – Práctica, volumen segundo".

Ediciones Instituto Salesiano de Artes Gráficas.

Polo, M. Carmen y Moreno, M. Victoria. (2005). Artículo "Origen de las aminos biógenas del vino y métodos de cuantificación" para el Instituto de Fermentaciones Industriales, Madrid.

Ribereau Gayon, P, Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2006). "Handbook of Enology Volume 2, The chemistry of wine stabilization and treatments", Inglaterra.

Suarez Lepe, José Antonio. (2004). "Microbiología enológica, Fundamentos de Vinificación. 3ª edición". Ediciones Mundiprensa, España.

Togores, José Hidalgo. (2003). "Tratado de enología Tomo I". Ediciones Mundiprensa, España.

Togores, José Hidalgo. (2003). "Tratado de enología Tomo II", Ediciones Mundiprensa, España.

Urbina vinos blog.Bodega Urbina. <https://www.urbinavinos.com/>

ÍNDICE DE IMÁGENES

Ilustración 1. Imagen de célula.	9
Ilustración 2. Cocos.	13
Ilustración 3. Bacilos.	14
Ilustración 4. Aminoácidos presentes en el vino	36
Ilustración 5. Formación de amina biógena a partir de sus precursores aminoácidos y de su consumo/absorción por el antoporte de la transmembrana. .	39
Ilustración 6. Carbamato de etilo.	41
Ilustración 7. Enzima Maloláctica.	52
Ilustración 8. Mecanismo de generación de energía metabólica a partir de la fermentación maloláctica en <i>O. oenis</i>	54
Ilustración 9. Bacterias lácticas del pie de cuba.	80
Ilustración 10. Tanque 76, día 15 del proceso y 6 de inoculación en el tanque.	83
Ilustración 11. Tanque 83, día 15 del proceso, día 6 de inoculación.	84

Ilustración 12. Tanque 76, día 17 del proceso, día 8 de inoculación.	84
Ilustración 13. Tanque 83, día 17 del proceso, día 8 de inoculación.	85
Ilustración 15. Pie de cuba de levaduras	86
Ilustración 14. Muestra levaduras y bacterias lácticas (coloración rosada y violeta).	86
Ilustración 16. Tanque 122.....	87
Ilustración 17. Tanque 123.....	87

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1	73
Gráfico 2	74
Gráfico 3	75
Gráfico 4	76
Gráfico 5	77
Gráfico 6	78
Gráfico 7	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	18
Tabla 2	66
Tabla 3	67
Tabla 4	68
Tabla 5	73
Tabla 6	75
Tabla 7	76
Tabla 8	76
Tabla 9	77
Tabla 10	78
Tabla 11	91
Tabla 12	92

ÍNDICE ANALÍTICO

RESUMEN	3
AGRADECIMIENTOS	4
INTRODUCCIÓN	6
CAPÍTULO 1: Generalidades de las bacterias lácticas	8
Taxonomía y descripción de las principales bacterias lácticas	8
Morfología de las bacterias	13
Dimensiones	14
Reproducción de las bacterias	15
Las bacterias del vino	16
Bacterias lácticas útiles y nocivas	16

Clasificación de las bacterias	17
Género Lactobacillus.....	18
Género Leuconostoc y Oenococcus	19
Género Pediococcus	20
Influencia de distintos factores sobre el crecimiento y la actividad de las bacterias lácticas	20
Inhibición de distintos factores sobre las bacterias lácticas.....	24
La acción inhibitoria del etanol	24
La acción inhibitoria del anhídrido sulfuroso.....	25
Compuestos fenólicos	26
Otras sustancias inhibitorias.....	27
Lisozima	27
Generalidades	27
Actividad.....	28
Lisozima en vinos blancos.....	28
Lisozima en vinos tintos	29
Acción sobre los vinos espumosos	29
CAPÍTULO 2: Metabolismo de los ácidos orgánicos	31
Transformación del ácido málico	31

Atributos positivos de la fermentación maloláctica	32
Atributos negativos y peligros de la fermentación maloláctica.....	34
Aminas biógenas.....	35
Factores que influyen y control.....	38
Carbamato de etilo	40
Efectos de la fermentación maloláctica en los caracteres organolépticos	42
Fermentación maloláctica y aromas	42
Los alcoholes	44
Los ácidos y ésteres.....	44
Compuestos carbonilados	45
Compuestos azufrados.....	47
Los compuestos nitrogenados.....	47
Lactonas.....	48
Fenoles volátiles.....	48
Fermentación maloláctica y sabores	49
Fermentación maloláctica y color	49
Bioquímica de la fermentación maloláctica (por Suarez Lepe).....	50
Vía 1	50
Vía 2.....	51

Vía 3.....	51
Factores que influyen en el proceso.....	56
Factores ampelográficos	56
Factores tecnológicos.....	58
Factores físicos y químicos	59
Influencia de los residuos de pesticidas	61
Interacciones microbianas.....	62
Inhibidores y estimulantes de la fermentación maloláctica.....	66
CAPÍTULO 3: Características del vino que se someterá a FML	67
Línea de tiempo.....	69
Preparación del pie de cuba y seguimiento analítico.....	71
Preparación del PDC (Día 1):.....	71
Datos analíticos del pie de cuba previo a la siembra	75
<i>Datos analíticos del pie de cuba previo a la siembra</i>	75
<i>Datos analíticos del pie de cuba previo a la siembra</i>	75
Datos analíticos del tanque 76	76
<i>Datos analíticos del tanque 76</i>	76
<i>Datos analíticos del tanque 76</i>	76
Datos analíticos del tanque 83	76

<i>Datos analíticos del tanque 83</i>	76
<i>Datos analíticos del tanque 83</i>	77
Datos analíticos del tanque 122	77
<i>Datos analíticos del tanque 122</i>	77
<i>Datos analíticos del tanque 122</i>	78
Datos analíticos del tanque 123	78
<i>Datos analíticos del tanque 123</i>	78
<i>Datos analíticos del tanque 123</i>	79
Observaciones microscópicas	79
Tinción de Gramm	80
Material necesario:	80
Procedimiento:	81
Observaciones día 17 del proceso:	82
Observaciones día 26 del proceso, día 5 de inoculación	85
Agregados y operaciones en bodega	87
Correcciones finales	89
CAPÍTULO 4:Resultados	90
Resultados analíticos	90
CONCLUSIONES	93

BIBLIOGRAFÍA.....	94
ÍNDICE DE IMÁGENES.....	96
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	98
ÍNDICE DE TABLAS.....	99
ÍNDICE ANALÍTICO.....	100