



ENOLAB
ERI-ISIC BioTecMed
MCI IViSoCa
C/ Doctor Moliner, 50
Departamento de Microbiología
Facultad de Biología

D. Sergi Ferrer Soler y Dña. Isabel Pardo Cubillos, Doctores en Biología y Catedráticos del Departamento de Microbiología y Ecología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia y pertenecientes a ERI/ISIC-BioTecMed,

INFORMAN QUE

Dña. Olga Lucio Costa, licenciada en Biología por la Universitat de València, ha realizado bajo su dirección el siguiente trabajo titulado: "ACIDIFICACIÓN BIOLÓGICA DE VINOS DE pH ELEVADO MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS", y que hallándose concluido, autorizan su presentación a fin de que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente y optar así a la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Valencia, dentro del Programa de Doctorado en Biotecnología.

Y para que así conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firmo el presente certificado en:

Valencia, Junio de 2014

Dr. Sergi Ferrer Soler

Dra. Isabel Pardo Cubillos

Esta tesis ha sido financiada por el proyecto “Desarrollo de nuevas estrategias vitícolas y enológicas” CENIT-DEMETER CEN-20021002.

A los que comparten la vida conmigo

Llegando al final de esta etapa de mi vida, en la que finalizo mi Tesis Doctoral, quisiera dar las gracias a todas las personas que la han hecho posible y a las que además han hecho de este periodo uno de los más especiales de mi vida.

En primer lugar, quisiera dar las gracias a mis directores, Sergi Ferrer e Isabel Pardo, por darme la oportunidad de trabajar en su gran equipo, por vuestra formación, vuestra dedicación y por convertirme profesionalmente en la persona que ahora soy.

También a la empresa Lallemand, en especial a Sybille Krieger y a José María Heras, por demostrar vuestra confianza en mí, por vuestra permanente disposición y por lo agradable que resultó trabajar con vosotros.

Quiero agradecer su colaboración en esta Tesis a Antonio Palacios y a Daniel Expósito por su gran ayuda en los ensayos semiindustriales y a M^a José García Esparza por su ayuda en los análisis de cromatografía de gases.

Desde mi incorporación a Enolab como estudiante colaboradora este gran equipo ha hecho de esta etapa de mi vida algo muy especial. Sois unas grandes compañeras y durante todo este tiempo os habéis convertido en unas grandes amigas. Todo este trabajo tiene una parte vuestra de colaboración, ayuda, y a veces de lo más importante, apoyo moral. Gracias Lucía, me acogiste con los brazos abiertos cuando empecé en el laboratorio y desde el principio me enseñaste tu estupenda forma de trabajar, eres una gran profe. ¡Vivan las rubias y de Requena! A Carmen, mi docto-hermanita Zape, me ha encantado compartir toda esta etapa contigo, no podría haber encontrado a otra compañera mejor. Ha sido bonito llegar a la meta casi, casi juntas, aunque ojalá nos quede mucho camino por recorrer. A Yaiza, gracias por contagiarme todos los días de tu alegría y por nunca dejar decaer tu empeño, tus ganas de aprender y de ayudar a todo el mundo. ¡Eres mi pelirrota favorita! A Noelia, muchas gracias por hacernos el trabajo más fácil y por tu gran apoyo. Aunque siempre dices que juegas en otra liga sabes que eres un pilar muy importante. A Vero, que aunque te has incorporado recientemente a las "Fashion" en poco tiempo te has convertido en un gran apoyo. ¡Gracias Portu! Espero hacer tu estancia en el laboratorio tan agradable como ha sido la mía durante este tiempo. También quiero dar las gracias a Liz por su ayuda durante este tiempo, a Sara, a Paco, a Eva y a Ricardo.

Agradecimientos

No puedo olvidar a las personas que han pasado por este laboratorio y que han aportado su gran granito de arena a todo esto: Rosario, Alba, Bárbara, Joe y Lidia. Tampoco a todos los estudiantes colaboradores como Juan Carlos, Andrea, Virgilio, Pablo, Ana..., a los chicos del segundo, Amparo, Paco, Eva, David, Miguel, y a Teresa y Amparo por compartir la experiencia de la Microbiología y la ilusión por llegar a convertirnos en Doctores.

Y qué decir del grupo Fusión... Sois un gran grupo de personas con las que compartir risas, charlas, almuerzos, vinitos y “fiestukis”. Gracias a todos porque me habéis aportado amistad, alegría y muy buen rollo. Mil gracias a Javi Gilabert, Noelia, Javi Peris, Amparo, Piotr, Fany, Rocío y Josep.

Por último no podía faltar mi eterno agradecimiento a mis padres, a Richard y a mis amigos, en especial a Bea. Gracias por mantener vuestra ilusión, confianza y orgullo en mí.

Índice



ABREVIATURAS.....	IX
INTRODUCCIÓN	1
1. LAS BACTERIAS LÁCTICAS	3
1.1. Las bacterias lácticas	3
1.2. Taxonomía, fisiología y ecología de las bacterias lácticas.....	3
1.3. Las bacterias lácticas en la vinificación.....	8
1.4. Metabolismo de las bacterias lácticas en mostos y vinos.....	9
1.4.1. Metabolismo de los azúcares	9
1.4.2. Metabolismo de los ácidos orgánicos.....	15
1.4.3. Metabolismo de los compuestos nitrogenados.....	19
1.4.4. Degradación del glicerol	22
1.4.5. Transformaciones de sustratos que modifican el aroma del vino	22
1.5. Factores que afectan al crecimiento y a la viabilidad de las bacterias lácticas en el vino	24
1.5.1. Los nutrientes y las fuentes de energía	24
1.5.2. El pH	25
1.5.3. El etanol.....	25
1.5.4. El anhídrido sulfuroso.....	26
1.5.5. La temperatura.....	27
1.5.6. Las interacciones microbianas.....	27
1.5.7. Los polifenoles.....	31
1.5.8. La lisozima	32
1.5.9. Otros factores enológicos.....	33
2. CULTIVOS INICIADORES PARA VINIFICACIÓN.....	33
2.1. Aplicación de cultivos para la inducción de la fermentación maloláctica.....	34

2.1.1. Ventajas de la utilización de cultivos malolácticos	34
2.1.2. Criterios de selección de bacterias malolácticas	35
2.1.3. Especies utilizadas en los cultivos malolácticos	37
2.1.4. Posibles momentos de inoculación del cultivo iniciador	40
2.1.5. Formas de presentación de los cultivos iniciadores.....	42
2.2. Aplicación de cultivos de <i>L. plantarum</i> para evitar el pardeamiento de vinos	44
3. LA PROBLEMÁTICA DE LOS VINOS DE BAJA ACIDEZ.....	45
3.1. Consecuencias del cambio climático en la acidez de los vinos	45
3.2. La importancia de la acidez y del contenido en ácidos del vino	48
3.3. Métodos para aumentar la acidez de los vinos con déficit de ácidos.....	50
3.3.1. Métodos físicos.....	50
3.3.2. Métodos químicos	52
3.3.3. Métodos biológicos	54
OBJETIVOS.....	57
MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS	63
2. MEDIOS DE CULTIVO	63
2.1. Medios generales	63
2.2. MDBmod: medio para la detección y cuantificación de aminas biógenas	66
2.3. Medios basados en mosto para selección de cepas y evaluación del crecimiento, acidificación y consumo/producción de compuestos.....	67
3. TÉCNICAS PARA ESTIMAR EL CRECIMIENTO	69
3.1. Recuento de células totales mediante microscopía	69
3.2. Recuento de células viables en placa	69
3.3. Recuento de células vivas y muertas mediante microscopía de fluorescencia	69

3.4. Medida del crecimiento mediante lectura de la D.O. 600 nm de cultivos líquidos ..	70
4. TÉCNICAS DE ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO	71
4.1. Medida del pH	71
4.2. Análisis de compuestos mediante HPLC.....	71
4.3. Análisis de compuestos volátiles mediante cromatografía de gases.....	74
5. TÉCNICAS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN	75
5.1. Identificación de bacterias lácticas a nivel de especie mediante 16S-ARDRA	75
5.2. Tipificación de bacterias lácticas mediante RAPD	76
6. EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA DETERMINAR EL CRECIMIENTO DE LAS BL Y SU CAPACIDAD ACIDIFICANTE	77
7. PROGRAMA DE SELECCIÓN DE CEPAS DE BL PARA PROMOVER LA ACIDIFICACIÓN BIOLÓGICA DEL VINO.....	78
7.1. Determinación del crecimiento en medio MC.....	78
7.2. Determinación de la capacidad acidificante	79
7.3. Determinación de la resistencia a la lisozima y al anhídrido sulfuroso.....	80
8. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE BL SELECCIONADAS	80
8.1. Análisis de sustratos consumidos y producidos en medio MC por las BL seleccionadas.....	80
8.2. Determinación de la resistencia a la presión osmótica	81
8.3. Determinación de la resistencia al etanol	81
8.4. Determinación del efecto del mosto en distintas etapas de fermentación.....	82
8.5. Evaluación de la producción de aminas biógenas por las cepas seleccionadas.....	83
9. PUESTA A PUNTO DEL SISTEMA DE ACIDIFICACIÓN BIOLÓGICA DE VINOS MEDIANTE LA INOCULACIÓN DE BL SELECCIONADAS.....	86
9.1. Elección de la estrategia de inoculación del cultivo bacteriano	86

9.2. Determinación del periodo de actuación de las bacterias lácticas para generar la acidificación deseada	87
9.3. Elección de la cepa de levadura encargada de realizar la fermentación alcohólica .	87
9.4. Evaluación del efecto del pH del mosto en la efectividad del proceso de acidificación biológica	88
9.5. Evaluación del efecto sobre la acidificación biológica de la adición de enzimas líticos de levaduras	89
9.6. Efecto de la presencia de microbiota autóctona en el mosto sobre el proceso de acidificación biológica	91
9.7. Evaluación del efecto de la concentración de polifenoles del mosto en el proceso de acidificación biológica	91
9.8. Determinación de la resistencia de las BL a la lisozima	92
9.9. Determinación de la resistencia de las BL al SO ₂	92
10. PRODUCCIÓN INDUSTRIAL Y APLICACIÓN DEL CULTIVO INICIADOR PARA LA INDUCCIÓN DE ACIDIFICACIÓN BIOLÓGICA EN VINOS	93
10.1. Optimización del sistema de producción industrial del cultivo iniciador liofilizado	94
10.2. Producción de los cultivos iniciadores liofilizados y evaluación de sus características	96
10.3. Evaluación del efecto del tipo de rehidratación sobre el crecimiento y la acidificación del cultivo iniciador	97
11. ENSAYOS A NIVEL SEMIINDUSTRIAL	98
11.1. Vinificaciones	98
11.2. Evaluación del comportamiento de los preparados comerciales	104
RESULTADOS	107
1. DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA REALIZAR LOS ENSAYOS A NIVEL DE LABORATORIO	109

2. SELECCIÓN DE BL PARA PROMOVER LA ACIDIFICACIÓN BIOLÓGICA EN VINO	110
3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS	118
3.1. Sustratos consumidos y producidos en medio MC	118
3.2. Producción de aminas biógenas	119
4. PUESTA A PUNTO DEL SISTEMA DE ACIDIFICACIÓN BIOLÓGICA.....	122
4.1. Determinación de la estrategia idónea de inoculación del cultivo bacteriano durante la vinificación	122
4.2. Elección de la levadura fermentativa	126
4.3. Determinación del tiempo de actuación de las BL para promover la acidificación	130
4.4. Evaluación del efecto del pH del mosto sobre el proceso de acidificación biológica	131
4.5. Evaluación del efecto de la adición de enzimas líticos sobre el proceso de acidificación biológica	134
4.6. Efecto de la presencia de microbiota autóctona en el proceso de acidificación biológica	137
4.7. Efecto de la concentración de polifenoles de mosto sobre el proceso de acidificación biológica	141
4.8. Determinación de la resistencia a la lisozima	144
4.9. Determinación de la resistencia al SO ₂	147
5. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS CULTIVOS INICIADORES OBTENIDOS EN CONDICIONES INDUSTRIALES	151
5.1. Evaluación de diferentes sistemas de producción	151
5.2. Evaluación de las características de diferentes preparados industriales liofilizados	156
5.3. Evaluación del efecto del tipo de rehidratación sobre el crecimiento y la capacidad acidificante de los preparados liofilizados	159

6. EVALUACIÓN A NIVEL SEMIINDUSTRIAL DEL COMPORTAMIENTO DE LOS PREPARADOS LIOFILIZADOS	163
6.1. Ensayos realizados en Laboratorios Excell Iberica en el año 2010	163
6.2. Ensayos realizados en la bodega Dominio de la Vega en el año 2011	171
6.3. Ensayos realizados en Enolab en el año 2011	179
6.4. Ensayos realizados en Laboratorios Excell Iberica en el año 2011	184
DISCUSIÓN	195
CONCLUSIONES	201
BIBLIOGRAFÍA.....	205

Abreviaturas

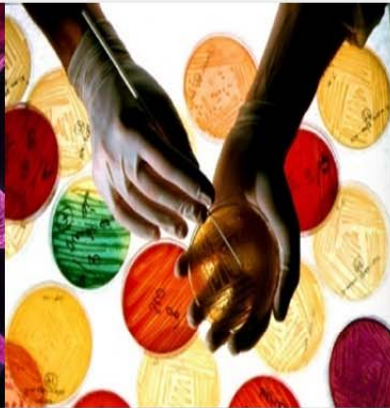


μL	Microlitro	FA	Fermentación alcohólica
μM	Micromolar	FL	Fermentación láctica
μm	Micras	FML	Fermentación maloláctica
ABC	Área Bajo la Curva	g/hL	Gramos por hectolitro
ADH	Alcohol deshidrogenasa	g/L	Gramos por litro
ADN	Ácido desoxirribonucleico	G+C (% mol)	Porcentaje del contenido en Guanina + Citosina genómico
ARDRA	“Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis” o análisis de los fragmentos de restricción del ADN ribosómico amplificado.	GAP (%)	Grado alcohólico probable
ARN	Ácido ribonucleico	GRAS	“Generally Recognized As Safe” o reconocido como seguro para la salud
AT	Acidez total	HPLC	“High Performance Liquid Chromatography” o Cromatografía líquida de alta resolución
ATP	Adenosina trifosfato		
AV	Acidez volátil		
BL	Bacterias lácticas	KDa	Kilodaltons
°C	Grados centígrados	Kg	Kilogramos
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo	L.	<i>Lactobacillus</i>
D.O.	Densidad óptica	Lc.	<i>Leuconostoc</i>
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato	LDH	Lactato deshidrogenasa
DSMZ	“Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH” o colección alemana de microorganismos y cultivos celulares	M	Molar
EDTA	Ácido etilen diaminotetracético	Meq/L	Miliequivalentes por litro
		mg/mL	Miligramos por mililitro
		mL	Mililitro
		mL/min	Mililitros por minuto
		mm	Milímetros
		N	Normal

Abreviaturas

NAD⁺/NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido	rpm	Revoluciones por minuto
NFA	Nitrógeno fácilmente asimilable	SO₂	Anhídrido sulfuroso
nm	Nanómetros	SO₂L	Anhídrido sulfuroso libre
O.	<i>Oenococcus</i>	SO₂T	Anhídrido sulfuroso total
OIV	Organización internacional de la viña y el vino	UFC/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitro
OMG	Organismo modificado genéticamente	UPGMA	“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean” o método de agrupamiento por pares no ponderados con media aritmética.
P.	<i>Pediococcus</i>	V	Voltios
PCR	“Polymerase Chain Reaction” o reacción en cadena de la polimerasa	v/v	Relación volumen por volumen
RAPD	“Randomly Amplified Polymorphic DNA” o análisis de polimorfismos del ADN amplificado con cebadores de secuencia aleatoria	W	watios

Introducción



1. LAS BACTERIAS LÁCTICAS

1.1. Las bacterias lácticas

Desde la antigüedad (3200 a.C.) existen referencias de la existencia de leches fermentadas. La primera descripción de la participación de las bacterias lácticas (BL) en éstas y otras fermentaciones tiene lugar en el año 1857 y la realizó Louis Pasteur, quien también describió el papel de las levaduras en la fermentación alcohólica (FA) y el de las bacterias en el agriado del vino y la cerveza [1, 2].

Años más tarde, Lister aisló y purificó una bacteria a la que denominó "*Bacterium lactis*" a partir de leche ácida. En 1980, los científicos Weigmann y Storch introdujeron, casi simultáneamente, el uso de BL como cultivos iniciadores de la fermentación de la leche en Dinamarca y Alemania, respectivamente [1].

Tradicionalmente, bajo la denominación de BL se han agrupado un extenso número de bacterias con una gran diversidad morfológica y fisiológica, cuya característica principal es su capacidad para producir ácido láctico como metabolito único o mayoritario de la fermentación de los hidratos de carbono [3, 4].

Actualmente, las BL se describen como organismos procariotas Gram positivos pertenecientes al phylum *Firmicutes*. Tienen forma de coco o bacilo, un tamaño de entre 0.4 y 0.5 µm de diámetro y hasta 10 µm de largo, y un contenido en % G+C inferior al 45%. Pueden encontrarse en solitario o agruparse en parejas o en cadenas cortas. Generalmente son inmóviles y no esporulan. Tienen un metabolismo fermentativo, y pueden ser anaerobias estrictas, aerotolerantes, microaerófilas, anaerobias facultativas y anaerobias estrictas. Las BL requieren factores de crecimiento para su desarrollo [5].

1.2. Taxonomía, fisiología y ecología de las bacterias lácticas

Los primeros intentos de clasificación de las BL datan de 1919 y se deben a Orla-Jensen. Esta clasificación se basó en la morfología, la disposición celular y en criterios físico-químicos,

Introducción

tales como el tipo de metabolismo fermentativo de la glucosa, el tipo de isómero del ácido láctico producido y la capacidad para desarrollarse a 10°C y a 45°C. A las bacterias de morfología bacilar las incluyó en los géneros: *Betabacterium*, *Thermobacterium*, *Streptobacterium* y *Microbacterium*, y a las de morfología cocoide en los géneros *Streptococcus*, *Betacoccus* y *Tetracoccus*.

Esta primera clasificación ha sufrido diversas modificaciones con el paso de los años. Así, en la primera edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* del año 1986, las BL aparecen incluidas en los géneros *Lactobacillus*, *Erysipelothrix*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Aerococcus* y *Gemella* [6].

Años más tarde, y como consecuencia de la aplicación de técnicas bioquímicas y moleculares avanzadas, se produjeron importantes cambios en la taxonomía de las BL. La mayoría de estos cambios aparecen reflejados por primera vez en la novena edición del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* [7]. Así por ejemplo, el género *Streptococcus* aparece desdoblado en otros tres géneros filogenéticamente distintos: *Streptococcus sensu stricto*, *Enterococcus* y *Lactococcus*. Los estreptococos móviles, incluidos anteriormente en el género *Lactococcus* aparecen incluidos en el género *Vagococcus* [8]. De igual forma, algunas especies del género *Lactobacillus* aparecen incluidas en el nuevo género *Carnobacterium* [9]. La especie *Pediococcus halophilus* se incluyó en un nuevo género denominado *Tetragenococcus* y *Pediococcus urinaequii* en el género *Aerococcus* [10].

Un caso particular de reclasificación ha sido el correspondiente al antiguo género *Leuconostoc* tal cual se definió en el *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* de 1974. La antigua especie *Leuconostoc paramesenteroides* y algunas especies atípicas de *Lactobacillus* se localizan actualmente en el género *Weissella* [11]. En 1995, la antigua especie *Leuconostoc oenos* se reclasificó como *Oenococcus oeni* [12], dando lugar al nuevo género *Oenococcus* que, actualmente cuenta con dos especies, *Oenococcus oeni* y *Oenococcus kitaharae*. También la especie *Lc. paramesenteroides* se reclasificó como *W. paramesenteroides* mediante el análisis del ADN ribosómico. Cinco lactobacilos heterofermentadores (*L. confusus*, *L. halotolerans*, *L. kandleri*, *L. minor* y *L. viridescens*) también fueron reasignados al género *Weissella*. Entre los años 2002 y 2006, cuatro nuevas especies de *Leuconostoc* fueron descritas: *Leuconostoc*

ficulneus, *Lc. fructosum* [13], *Lc. durionis* [14] y *Lc. pseudoficulneus* [15] que fueron posteriormente reclasificados en el nuevo género *Fructobacillus* como *Fructobacillus ficulneus*, *F. fructosum*, *F. durionis* y *F. pseudoficulneus* [16]. Actualmente, los géneros *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Fructobacillus* y *Weissella* están incluidos en la familia *Leuconostocaceae*.

En la actualidad, el grupo de las BL “sensu estricto” está constituido por los géneros: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Fructobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* [7]. La Tabla 1 muestra las principales características fenotípicas de estos géneros [17]. De las diversas BL, las que se encuentran más frecuentemente en mostos y vinos pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* y *Weissella*.

Tabla 1. Características fenotípicas de las bacterias lácticas.

Característica	Bacilos			Cocos							
	1	2	3	Géneros							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 ^b	11
Tétradas	- ^a	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
Tipo metabolismo ^c	ho	ho/he	ho	ho	ho	he	ho	ho	ho	he	he
Crecimiento a 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+	+
Crecimiento a 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-	-
Crecimiento 6.5% NaCl	ND	±	+	+	-	±	±	-	+	±	±
Crecimiento 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Crecimiento a pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±	±
Crecimiento a pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Ácido láctico ^d	L	D, L, DL	L	L	L	D	L, DL	-	L	D, DL	D

1: *Carnobacterium*, 2: *Lactobacillus*, 3: *Aerococcus*, 4: *Enterococcus*, 5: *Lactococcus/Vagococcus*, 6: *Leuconostoc/Oenococcus*, 7: *Pediococcus*, 8: *Streptococcus*, 9: *Tetragenococcus*, 10: *Weissella*, 11: *Fructobacillus*

^a +, positivo; -, negativo; ±, respuesta variables según especies; ND, no determinada

^b *Weissella* también puede tener forma bacilar

^c Homo o heterofermentación de la glucosa: (ho) y (he) indican homofermentación o heterofermentación, respectivamente

^d Producción de los isómeros D-, L- o DL- del ácido láctico a partir de la glucosa

Las bacterias pertenecientes a los géneros *Leuconostoc* y *Oenococcus* tienen forma esférica o ligeramente elongada y están ensambladas en parejas o cadenas cortas. No son móviles ni esporuladas. Su diámetro varía entre 0.5 y 0.7 µm, y su longitud entre 0.7 y 1.2 µm. Su contenido en G+C es del 38-44%, no contienen ácidos teicoicos en su pared celular y su temperatura óptima de crecimiento es 20-30°C. Son microaerófilas o anaerobias facultativas. Son quimiorganotrofas y requieren de medios ricos para su crecimiento. Como producto del

Introducción

metabolismo heterofermentativo de la glucosa, a partir de un mol de este azúcar producen un mol de ácido láctico, un mol de dióxido de carbono y un mol de etanol [5].

Las bacterias del género *Pediococcus* son esféricas e inmóviles, distribuyéndose en el espacio formando tétradas, ya que se dividen en planos rectos perpendiculares. Su diámetro varía entre 1 y 2 μm y tampoco poseen ácidos teicoicos en su pared. Su contenido en G+C es de 34-42% y son anaerobios facultativos. También se trata de microorganismos quimioheterótrofos que requieren un medio rico con azúcares fermentables, produciendo como productos del metabolismo homofermentativo de la glucosa DL- láctico o L-Láctico, pero nunca CO_2 [5].

Las bacterias del género *Weissella* son esféricas, lenticulares o bacilares. Son bacterias heterofermentativas, las cuales producen D y L-láctico, mientras que *W. paramesenteroides* sintetiza únicamente el isómero D-láctico a partir de la glucosa.

Las bacterias que pertenecen al género *Lactobacillus* tienen forma elongada, a menudo bacilar, ensamblándose en parejas o en cadenas de tamaño variable. Son Gram positivas e inmóviles, aunque existen unas pocas especies móviles que presentan flagelos peritricos. No son esporuladas. Tienen un contenido en G+C de 36-47% y muchas especies contienen ácidos teicoicos en su pared. El tamaño de las células es muy variable en este género, con diámetros de 0.5 a 1.2 μm y longitudes de 1 a 10 μm . Su crecimiento se ve favorecido por la anaerobiosis o por bajas presiones parciales de oxígeno. Crecen entre 2°C y 53°C, aunque su temperatura óptima está entre 30-40°C. Son acidófilos, creciendo óptimamente a pHs comprendidos entre 5.5 y 6.2 [5]. Se han descrito más de 100 especies y 16 subespecies en este género. Existen tres grupos metabólicos basados en la producción de diferentes metabolitos a partir de hexosas y pentosas: los homofermentativos obligados, los heterofermentativos obligados y los heterofermentativos facultativos [18]. Las principales especies del género *Lactobacillus* aisladas del proceso de vinificación se enumeran en la Tabla 2. Las bacterias del género *Lactobacillus* se encuentran ampliamente distribuidas en los vegetales, carnes y pescados. Forman parte de la microbiota normal de la boca, tracto intestinal y aparato reproductor femenino humano y de muchos animales. No se las considera patógenas, excepto a algunas especies que se han aislado de procesos de caries dental. Tienen una gran importancia

industrial, pues se utilizan en diversos procesos de fermentación láctica (yogur, quesos...). Intervienen también en la fabricación de productos fermentados derivados de los vegetales (pepinillos, aceitunas...) y de la carne (embutidos).

Tabla 2. Algunas especies del género *Lactobacillus* aisladas del proceso de vinificación [18].

ESPECIE	REFERENCIA
<i>L. brevis</i>	Vaughn, 1955
<i>L. bobalius</i>	Mañes-Lázaro y col., 2008a
<i>L. buchneri</i>	Vaughn, 1995
<i>L. casei</i>	Vaughn, 1995
<i>L. collinoides</i>	Carr y Davies, 1972
<i>L. fermentum</i>	Vaughn, 1955
<i>L. fructivorans</i>	Amerine y Kunkee, 1968
<i>L. hilgardii</i>	Duouglas y Cruess, 1936
<i>L. kunkeei</i>	Edwards y col., 2000
<i>L. lidneri</i>	Bae y col., 2006
<i>L. mali</i>	Carr y Davis, 1970
<i>L. nagelii</i>	Edwards y col., 2000
<i>L. oeni</i>	Mañes-Lázaro y col., 2009
<i>L. paracasei</i>	Du Plessis y col, 2004
<i>L. paraplantarum</i>	Curk y col., 1996
<i>L. plantarum</i>	Carre, 1982
<i>L. uvarum</i>	Mañes-Lázaro y col., 2008b
<i>L. vaccinostercus</i>	Inês, 2007
<i>L. vini</i>	Rodas y col., 2006

Las bacterias de la especie *L. plantarum* tienen una morfología bacilar con un tamaño de 0.9-1.2 μm x 3.0-8.0 μm . Pueden encontrarse en solitario, en parejas o formando cadenas cortas. Se han aislado de diferentes ambientes como productos lácteos fermentados, vegetales fermentados (sorgo, chucrut), estiércol de ganado, cuerpo humano: boca, intestino y heces, y en aguas residuales. Es una bacteria aerotolerante, que crece a 15 °C pero no a 45, y produce los dos isómeros del ácido láctico, D y L. El peptidoglicano de su pared celular contiene ácido meso-diaminopimélico. Esta especie tiene un contenido G+C (% mol) del 44-46%. La temperatura óptima de crecimiento está entre 30-40°C y es dependiente de cada cepa [7]. *L. plantarum* es capaz de fermentar multitud de carbohidratos como la amigdalina, arabinosa, celobiosa, esculina, gluconato, manitol, melecitosa, melibiosa, rafinosa, ribosa, sorbitol, sacarosa y xilosa [7].

1.3. Las bacterias lácticas en la vinificación

Existen numerosas especies aisladas en el proceso de vinificación correspondientes a los géneros descritos en el apartado anterior. Del género *Leuconostoc* se han aislado en mosto o estadíos iniciales de la vinificación las especies *Lc. mesenteroides*, *Lc. citreum* y *Lc. fructosum* [19, 20]. En cambio, del género *Oenococcus* sólo se ha aislado la especie *O. oeni*, encontrándose durante las etapas iniciales de la vinificación en bajas concentraciones, aunque tras la FA su población se incrementa en gran medida, a diferencia de las otras especies. *Oenococcus oeni* es la especie más adaptada al bajo pH, y a las elevadas concentraciones de anhídrido sulfuroso y de etanol del vino [19, 20]. Del género *Pediococcus* se han aislado diferentes especies en mostos o etapas posteriores de la vinificación; generalmente se las ha considerado bacterias alterantes que aparecen en vinos de pH elevado. Dichas especies son *P. damnosus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus* y *P. pentosaceus*, siendo la más frecuente *P. parvulus* [19, 20]. El género *Weissella* contiene 12 especies descritas, aunque la única especie que se ha aislado de mosto/vino es *W. paramesenteroides* [19-21]. En cuanto al género *Lactobacillus* existe una gran diversidad de especies asociadas al proceso de vinificación, ya que se han aislado especies como *L. alvei*, *L. bobalius*, *L. brevis*, *L. buchnerii*, *L. casei*, *L. collinoides*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. diolivorans*, *L. fermentum*, *L. fructivorans*, *L. frumenti*, *L. hilgardii*, *L. jensenii*, *L. kunkeii*, *L. lindneri*, *L. mali*, *L. nagelii*, *L. oeni*, *L. pantheris*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. satsumensis*, *L. uvarum*, *L. vaccinostercus*, *L. vini* y *L. zeae* [19, 20, 22-27].

En cuanto a su dinámica poblacional, las BL aparecen ya en las uvas en el momento de la vendimia. La población en las bayas es baja (10^2 - 10^4 UFC/mL), aunque ello depende de las condiciones climáticas existentes durante la maduración y del estado sanitario de los frutos [21]. En las uvas se han encontrado especies de los cuatro géneros como *L. brevis*, *L. casei*, *L. fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. plantarum*, *Lc. mesenteroides*, *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* y *O. oeni* [28]. En el mosto y durante los primeros días de FA, las BL están en una concentración en torno a 10^2 - 10^4 UFC/mL, aunque depende del grado de madurez de la uva y del grado de sulfitado del mosto [5]. La mayoría de especies existentes en esta fase corresponden a *L. casei*, *L. hilgardii*, *L. mali*, *L. plantarum*, *Lc. mesenteroides*, *P. damnosus* y en menor número *L. brevis* y *O. oeni* [29]. A medida que avanza la transformación del mosto en

vino, la microbiota láctica queda disminuida en número y diversidad, ya que tiene lugar una selección a favor de las cepas más resistentes al alcohol y el pH. En esta etapa la población de BL decae a 10^2 - 10^3 UFC/mL, aislándose especies como *Lc. mesenteroides*, *L. plantarum* y en mayor proporción *O. oeni* [30]. Al final de la FA, sólo suelen aislarse cepas de *O. oeni* y en algún caso también de *L. plantarum* y *L. hilgardii*, ya que la viabilidad de las demás especies se va reduciendo progresivamente. Después de la FA, las BL entran en un periodo de latencia variable y al final de éste, algunas cepas de *O. oeni* crecen hasta alcanzar poblaciones de hasta 10^7 UFC/mL, realizando la fermentación maloláctica (FML) [5]. En raros casos se aislan otras especies como *Lactobacillus* sp., *L. brevis*, *L. frumenti*, *L. hilgardii*, *Lc. mesenteroides* y *P. parvulus* [19, 31]. Cuando el ácido málico se ha degradado completamente, los vinos se suelen sulfitar con el fin de hacer desaparecer por completo la población microbiana y se estabilizan para evitar alteraciones posteriores.

1.4. Metabolismo de las bacterias lácticas en mostos y vinos

1.4.1. Metabolismo de los azúcares

La principal vía de obtención de energía y fuente de carbono para las BL es la fermentación de los azúcares del mosto. La concentración de azúcares totales en el mosto es de 150 a 250 g/L. Los azúcares mayoritarios en el mosto son las hexosas como la glucosa y la fructosa, presentes en cantidades similares. También hay pentosas como L-arabinosa, D-xilosa, D-ribosa y L-ramnosa en concentraciones de 0.3 a 2 g/L y disacáridos como la melibiosa, maltosa, lactosa, rafinosa y sacarosa en muy bajas concentraciones [32]. Existen tres vías por las cuales las BL pueden fermentar los azúcares: la vía homofermentativa, la vía heterofermentativa o la vía heterofermentativa facultativa. Las bacterias pertenecientes al género *Pediococcus* utilizan las hexosas por la vía homofermentativa, las del género *Oenococcus* y *Leuconostoc* por la vía heterofermentativa; en cambio, las bacterias del género *Lactobacillus* pueden utilizarlas por una o por otra vía según la especie [5].

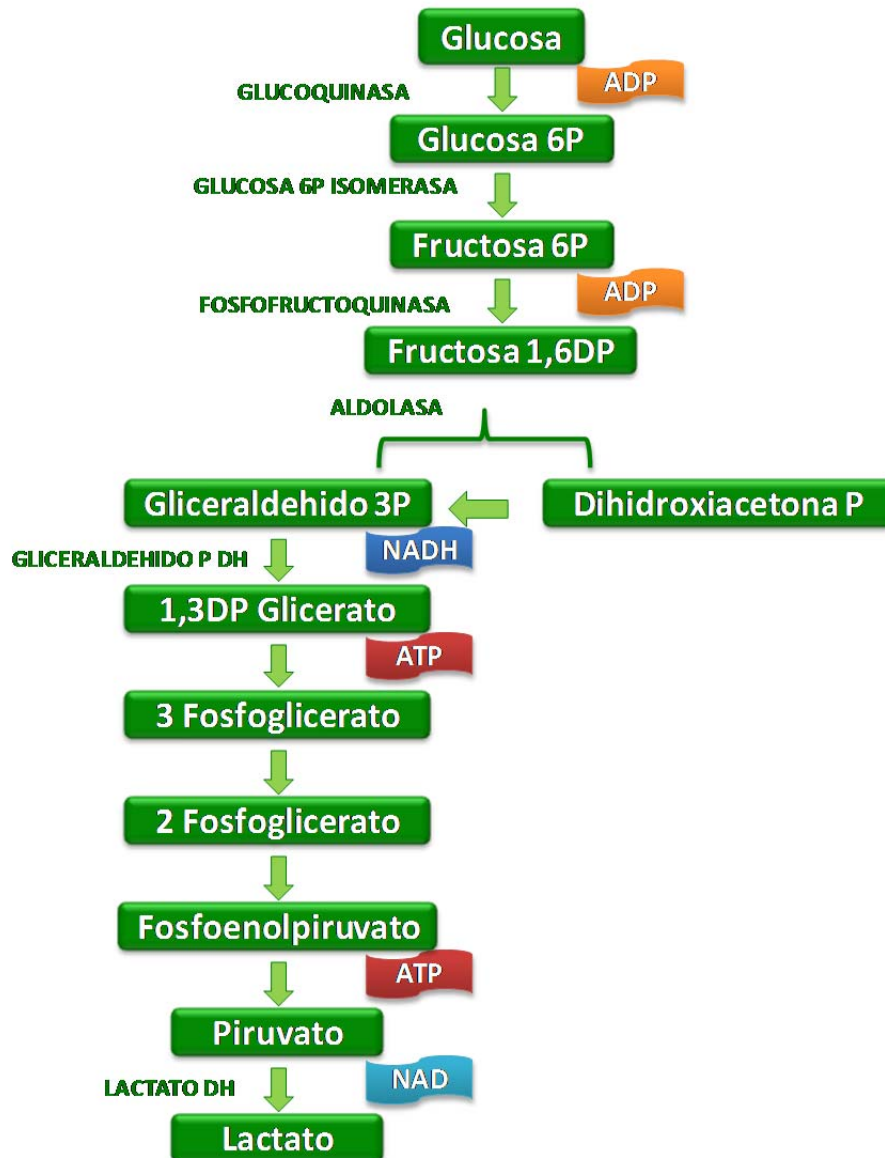


Figura 1. Metabolismo homofermentativo de los azúcares en las bacterias lácticas. Se ilustran los principales metabolitos que componen esta ruta, las principales enzimas implicadas en la misma y la producción de moléculas relacionadas con energía y poder reductor (ATP/ADP; NADH/NAD).

La vía homofermentativa utiliza la ruta de Embden-Meyerhoff-Parnas (Figura 1), la cual a partir de las hexosas proporciona ácido pirúvico, que luego es reducido a lactato. En esta ruta metabólica se generan 2 moles de ácido láctico y 2 moles de ATP netos por cada mol de hexosa fermentada. Además, la vía metabólica queda equilibrada en cuanto a poder reductor en forma de NADH. El enzima clave en esta ruta es la aldolasa. Las especies homofermentativas carecen de los enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-

fosfogluconato deshidrogenasa, siendo por tanto incapaces de fermentar las pentosas o el gluconato. La fructosa y la manosa también pueden ser fermentadas a través de esta vía por algunas especies de BL, incorporándose a la misma a nivel de la glucosa-6-fosfato o de la fructosa-6-fosfato, después de una isomerización y/o fosforilación [1, 5].

La vía heterofermentativa utiliza la ruta del 6-fosfogluconato/fosfocetolasa (Figura 2). La enzima clave de esta ruta es la fosfocetolasa. En esta ruta metabólica se genera un mol de ácido láctico, un mol de CO₂ y un mol de etanol o acetato. Dependiendo del destino del acetyl fosfato en la reacción, el rendimiento energético y redox de la misma será distinto. Si la ruta se dirige hacia la síntesis de etanol, la vía queda equilibrada desde el punto de vista redox y se genera 1 ATP. En cambio, si se sintetiza acetato se generan 2 ATP pero no se alcanza el equilibrio redox, quedando una molécula de NADPH en estado reducido. En presencia de aceptores de electrones alternativos, se formará ácido acético en lugar de etanol como producto final. La fructosa puede ser metabolizada a través de esta ruta de forma análoga a la glucosa, y puede también actuar como aceptor de electrones en la oxidación del NADH, reduciéndose gran parte de la misma a manitol [1, 5].

Las especies heterofermentativas pueden a su vez ser facultativas o estrictas. Las primeras metabolizan hexosas por la vía homofermentativa dando exclusivamente ácido láctico, pero además son capaces de transformar las pentosas en un mol de lactato, un mol de etanol y dos moles de ATP al poseer una fosfocetolasa inducible por la presencia de pentosas. Por el contrario, las heterofermentativas estrictas producen por cada mol de hexosa un mol de ácido láctico, un mol de etanol/acetato y un mol de CO₂, siendo capaces de fermentar las pentosas que dan lugar a ácido láctico y ácido acético/etanol [1, 5].

Las diferencias entre las BL homo y heterofermentativas, en lo que a productos finales de la fermentación se refiere, son consecuencia de diferencias bioquímicas. El rendimiento de las rutas homo y heterofermentativas es distinto. Las bacterias homofermentativas son capaces de extraer doble cantidad de energía de la fermentación de la glucosa que la que genera la ruta heterofermentativa si se dirige hacia la producción de etanol. En cambio, si la ruta heterofermentativa produce acetato, el rendimiento energético es el mismo que en la homofermentativa, pero la vía queda desequilibrada desde el punto de vista del potencial

Introducción

redox. El rendimiento en ácido láctico producido es mayor en la ruta homofermentativa (2 moles) que en la heterofermentativa (1 mol) por mol de hexosa fermentada [1, 5, 33].

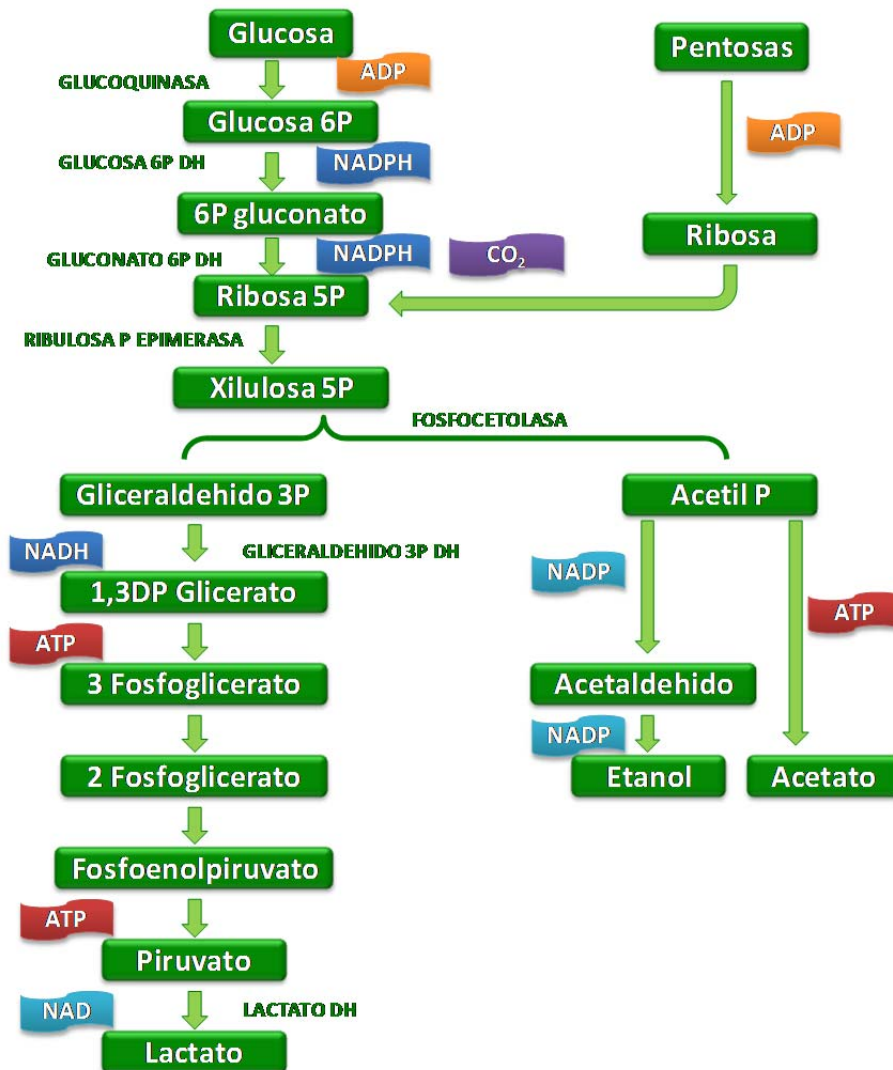


Figura 2. Metabolismo heterofermentativo de los azúcares en las bacterias lácticas. Se ilustran los principales metabolitos que componen esta ruta, las principales enzimas implicadas en la misma y la producción de moléculas relacionadas con energía y poder reductor (ATP/ADP; NADH/NAD).

Un tipo de metabolismo muy particular es el de la especie *Lactobacillus vini*, aislada del proceso de vinificación y recientemente descrita [24]. Esta especie tiene un metabolismo homofermentativo tanto para pentosas como para hexosas, produciendo únicamente ácido

láctico. Esta ruta metabólica contiene los enzimas transacetolasa y transaldolasa, los cuales mediante un intercambio de carbonos entre distintos azúcares produce gliceraldehido-3-fosfato que da lugar exclusivamente a ácido láctico (Figura 3). El resultado neto de la ruta es la producción de dos hexosas y una triosa a partir de tres pentosas, las cuales tienen como destino la síntesis exclusiva de ácido láctico.

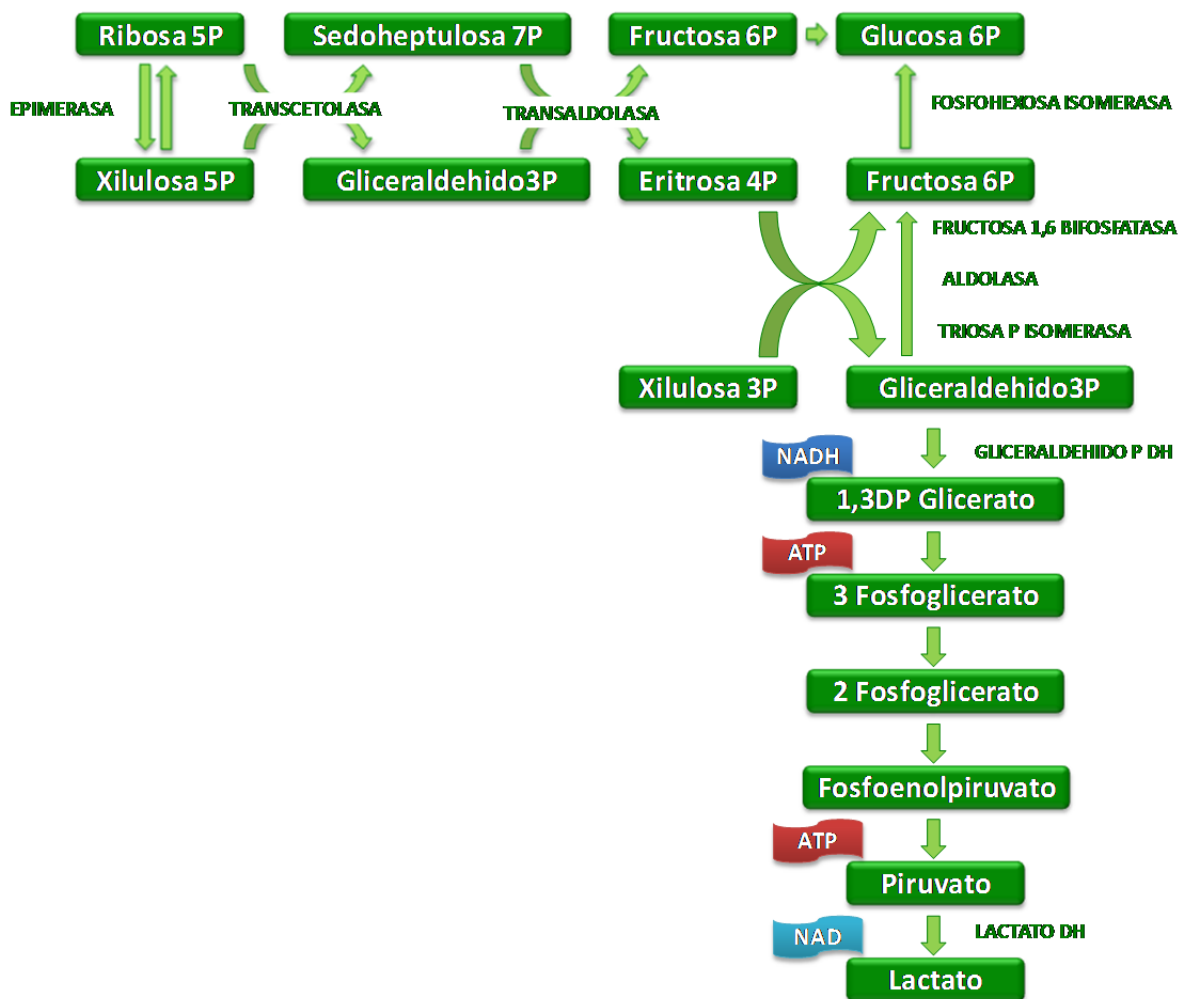


Figura 3. Metabolismo de los azúcares en la especie *Lactobacillus vini*. Se ilustran los principales metabolitos que componen esta ruta, las principales enzimas implicadas en la misma y la producción de moléculas relacionadas con energía y poder reductor (ATP/ADP; NADH/NAD).

El tipo de metabolismo de algunas de las especies de BL aisladas de mostos y vinos se ilustra en la Tabla 3.

Tabla 3. Algunas especies de bacterias lácticas aisladas de mostos y vinos según su metabolismo de los azúcares [36].

GÉNERO	ESPECIE	FERMENTACIÓN AZÚCARES
<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Heterofermentativo estricto
<i>Oenococcus</i>	<i>Oenococcus oeni</i>	Heterofermentativo estricto
<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus damnosus</i>	Homofermentativo
	<i>Pediococcus parvulus</i>	Homofermentativo
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Heterofermentativo facultativo
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Homofermentativo
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Homofermentativo
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Homofermentativo
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Homofermentativo
	<i>Lactobacillus mali</i>	Homofermentativo
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	Homofermentativo
	<i>Lactobacillus vini</i>	Homofermentativo
	<i>Lactobacillus bobalius</i>	Heterofermentativo facultativo
	<i>Lactobacillus casei</i>	Heterofermentativo facultativo
	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Heterofermentativo facultativo
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Heterofermentativo facultativo
	<i>Lactobacillus sakei</i>	Heterofermentativo facultativo
	<i>Lactobacillus brevis</i>	Heterofermentativo estricto
<i>Lactobacillus buchneri</i>	Heterofermentativo estricto	
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Heterofermentativo estricto	
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	Heterofermentativo estricto	
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	Heterofermentativo estricto	
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Heterofermentativo estricto	

El metabolismo de los azúcares por parte de las BL en el vino puede causar alteraciones en los mismos. Un ejemplo de ello es el **picado láctico** del vino, que consiste en la transformación de los azúcares del vino en ácido láctico, principalmente por vía heterofermentativa. Suele ocurrir como consecuencia de un excesivo desarrollo de BL de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Pediococcus* en vinos de pH alto con alto contenido en azúcares y con baja cantidad de SO₂. Sus consecuencias son el aumento de la concentración de ácido láctico y de ácido acético, lo que incrementa tanto la acidez total (AT) como la acidez volátil (AV). Algunas especies implicadas en esta alteración son *L. fructivorans* y *L. hilgardii* [5, 33-35].

Una manifestación particular del ataque a los azúcares del vino por las BL es el defecto llamado **vuelta manítica**, en el que las BL heterofermentativas forman cantidades importantes de manitol a partir de la fructosa proporcionando un sabor de fruta pasada al vino [5, 33, 34].

Las BL también pueden sintetizar polisacáridos extracelulares a partir de los azúcares. Los polisacáridos son del tipo β -D-glucano [36]. Si la cantidad de estos compuestos no es demasiado elevada pueden mejorar las características del vino al aumentar la sensación de volumen en boca o el cuerpo de los vinos. Otro efecto positivo de su presencia es que pueden polimerizarse con los taninos disminuyendo la sensación de aspereza y la astringencia que confiere su presencia en forma libre. Sin embargo, si la concentración de exopolisacáridos es elevada se genera un defecto denominado **“ahilado o grasa”**, el cual confiere un aspecto viscoso u oleoso al vino. Esto suele ocurrir cuando el vino contiene una elevada concentración de azúcares residuales, el pH del mismo es alto y la temperatura es elevada. Las principales responsables de esta alteración son cepas de las especies *P. damnosus*, *P. parvulus*, *O. oeni* y en algunos casos de *Lc. mesenteroides*, capaces de sintetizar glucanos y de excretarlos al medio [34, 37]. Esta alteración, aunque aparentemente es muy escandalosa, no suele ser muy grave. Además, las BL también pueden sintetizar polioles como el glicerol y el eritritol a partir de la glucosa [38].

1.4.2. Metabolismo de los ácidos orgánicos

Los principales ácidos orgánicos existentes en el mosto o en el vino son el ácido tartárico, en una concentración de 3.5 g/L a 11.5 g/L, el ácido málico, en una concentración de 1 a 5 g/L y el ácido cítrico, en una concentración de 0.2 a 0.5 g/L. Además, pueden existir otros ácidos minoritarios como el glioxílico o el fumárico [37].

Las BL del vino son capaces de transformar el ácido málico de la uva, de sabor fuerte, herbáceo y áspero en ácido láctico, de sabor lácteo y suave, liberando CO₂ como consecuencia de la reacción [38]. Dado que el ácido málico tiene dos grupos carboxílicos mientras que el ácido láctico contiene solo uno, la FML tiene como consecuencia un ligero aumento del pH y una disminución de la acidez total. Esta transformación se realiza mediante el enzima

maloláctico que contienen las BL del vino y que genera exclusivamente L-láctico y CO₂. Algunos ácidos orgánicos del vino pueden actuar como inhibidores de este enzima, como los ácidos succínico, cítrico y tartárico [33, 35].

La presencia del enzima maloláctico se describió por primera vez en *L. plantarum* [39]. Posteriormente se aisló en *O. oeni* [40], demostrándose que en esta especie tiene un carácter constitutivo a diferencia de *L. plantarum*, en la que es inducible. Más tarde se comprobó que la actividad maloláctica es constitutiva en el 60% de las BL heterofermentativas [1].

Aunque la conversión de ácido L-málico en ácido L-láctico por el enzima maloláctico no produce energía directamente, se ha demostrado que sí produce ATP de forma indirecta [41]. Esto es posible gracias a un mecanismo quimiosmótico que genera una fuerza protón motriz a través de la membrana celular [42]. De este modo, el L-málico entra a la célula a través de una permeasa y se descarboxila en su interior, liberando dióxido de carbono y un protón. El ácido láctico producido sale de la célula mediante un mecanismo de simporte con un protón, lo cual genera un gradiente de protones a través de la membrana celular entre el citoplasma y el medio. Este gradiente, combinado con una ATPasa específica en la membrana celular, facilita la generación de energía necesaria que puede ser utilizada para procesos de transporte o para la síntesis de ATP mediante una ATPasa de membrana [43-46]. La FML se lleva a cabo tras la FA en el momento que las BL implicadas alcanzan poblaciones de 10⁷ UFC/mL. Estas BL suelen ser cepas de la especie *O. oeni*, ya que es la mejor adaptada a las condiciones que se dan tras la FA. Esta fermentación tiene un gran interés para los enólogos ya que puede disminuir la acidez del vino, dando lugar a un descenso de la AT de hasta 0.4 g/L expresado en H₂SO₄ (ó 0.6 g/L en ácido tartárico) y un aumento de pH de 0.1 a 0.3 unidades. Como consecuencia de la FML, se produce una mejora de las propiedades sensoriales y de la calidad de los vinos [47-49]. Un ejemplo de esta mejora sensorial se debe a que el reemplazo del ácido málico, de sabor ácido a manzana verde, por el ácido láctico que proporciona un sabor mucho más suave y menos agresivo [50]. Un posible problema es que se produzca una desacidificación excesiva, en el caso de vinos poco ácidos. Este fenómeno da lugar a vinos sin carácter y además el descenso de la acidez puede permitir el crecimiento de un mayor número de microorganismos perjudiciales que pueden causar alteraciones [34, 51].

El ácido cítrico es un sustrato que las BL pueden degradar simultáneamente a la degradación del málico o no. Normalmente, no se inicia su metabolismo hasta que no se ha consumido más de la mitad del ácido málico [46, 52]. Ciertas BL del vino pueden degradar el ácido cítrico, ya que poseen las enzimas para poder hacerlo. En cambio, las cepas incapaces de degradarlo carecen del primer enzima de la ruta de degradación, la citrato liasa, que cataliza la escisión del citrato en una molécula de oxalacetato y otra de acetato (Figura 4). El oxalacetato producido es descarboxilado para dar piruvato, en el caso de *O. oeni*, o formiato en el de ciertas especies de *Lactobacillus* [35]. A partir del piruvato se sintetizan sustancias acetoínicas aromáticas como el diacetilo, la acetoína y el 2,3-butanodiol, aunque también puede ser fuente de otros productos como el lactato, etanol o acetato. Dependiendo de las condiciones en las que se encuentran las BL, el metabolismo del citrato proporcionará unos u otros productos finales. Cuando las condiciones de crecimiento de las BL son difíciles, como cuando se encuentran a pH bajo o con un reducido nivel de azúcar, el metabolismo se desvía preferentemente hacia la formación de compuestos acetoínicos. Esta vía actúa como un proceso de destoxificación mediante el cual se elimina el exceso de ácido pirúvico, contribuyendo de esta manera al mantenimiento de su pH intracelular. Por el contrario, cuando las condiciones son favorables el metabolismo del citrato tiende hacia la formación de ácido acético y ácidos grasos [53], pudiendo aumentar la concentración de ácido acético entre 0.1 y 0.2 g/L, en función de la concentración inicial de citrato. En esta transformación se produce energía adicional para el desarrollo bacteriano [54], lo que explica el mayor crecimiento de *O. oeni* durante el co-metabolismo de glucosa con ácido cítrico [55]. El metabolismo del ácido cítrico contribuye, con el del ácido málico, a la estabilización microbiológica del vino al desaparecer dos sustratos utilizables para los microorganismos [46].

Las BL que degradan el ácido cítrico pertenecen a los géneros *Leuconostoc* y *Oenococcus* y también algunas especies de *Lactobacillus* (*L. casei* y *L. plantarum*), mientras que las del género *Pediococcus* no lo utilizan [56-58], debido a que carecen del enzima citrato liasa [46].

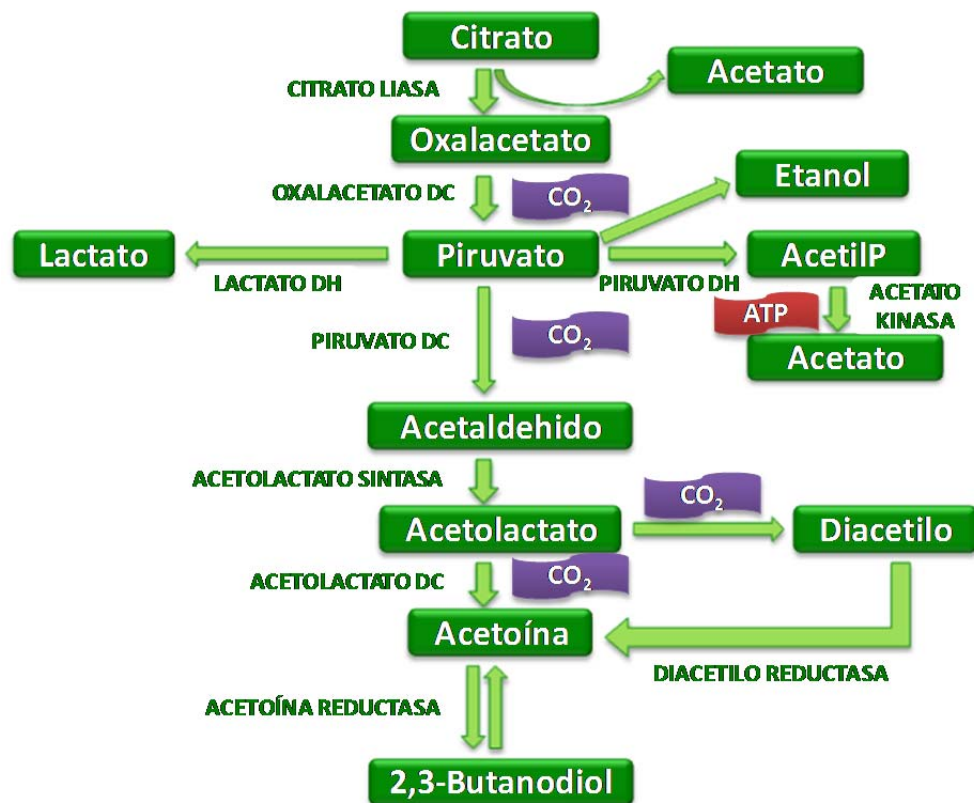


Figura 4. Posibles rutas para la metabolización del ácido cítrico utilizadas por las bacterias lácticas del vino.

La implicación enológica positiva más importante de la fermentación del citrato es la producción de diacetilo, un compuesto aromático con aroma a mantequilla que resulta beneficioso siempre que no sobrepase determinados límites [51]. Este compuesto se detecta fácilmente en cata a partir de concentraciones relativamente bajas, del orden de 5-6 mg/L en los vinos blancos y 8-9 mg/L en los tintos [59]. Por debajo de este umbral, el diacetilo contribuye al “bouquet” del vino y a su complejidad; por encima, puede llegar a resultar desagradable [46, 60]. Favorecen la producción de diacetilo la oxigenación, la elevada concentración de citrato y de azúcares, la baja temperatura (18 °C) y la eliminación de las levaduras antes de la FML. Por el contrario, la presencia de levaduras viables durante la FML y la adición de SO₂ causan la reducción de la síntesis de diacetilo [55].

Existe un bajo número de cepas de BL capaces de degradar el ácido tartárico, pero si lo hacen resulta perjudicial para el vino, ya que aumenta el pH del mismo y la AV [51]. El mecanismo de degradación del ácido tartárico es distinto según se trate de una bacteria homo

o heterofermentativa, produciéndose diferentes compuestos finales en cada caso. Así, mientras las bacterias homofermentativas forman acético, láctico y CO₂, las heterofermentativas forman acético, CO₂ y cantidades minoritarias de ácido succínico [1, 61]. Las cepas que degradan ácido tartárico suelen pertenecer a las especies *L. plantarum* y *L. brevis* [62]. La degradación del ácido tartárico causa un defecto en los vinos conocido como “vuelta” o “rebote” en el que además de elevarse la AV se genera un olor característico a col cocida. Esta alteración es propia de vinos de zonas cálidas con un pH del vino superior a 3.5 y con un bajo nivel de SO₂, circunstancia que facilita el desarrollo de algunos *Lactobacillus*. No suele ser frecuente, ya que las cepas capaces de degradar el ácido tartárico son poco numerosas.

El ácido sórbico también puede ser metabolizado por las BL del vino. El ácido sórbico es hidrogenado a sorbinol y después isomerizado a 3,5-hexadien-2-ol. Este compuesto reacciona con el etanol para dar 2-etoxi-hexa-3,5-dieno, responsable de olor a geranio en el vino. Suelen ser responsables de esta alteración algunas cepas de *O. oeni* [34, 51].

1.4.3. Metabolismo de los compuestos nitrogenados

Las BL son capaces de transformar, utilizando distintas rutas metabólicas, las proteínas, los péptidos y algunos aminoácidos del mosto y el vino. Para ello han desarrollado sistemas proteolíticos complejos que les permiten utilizar eficientemente las proteínas presentes en el medio, liberando péptidos y/o aminoácidos, que se incorporarán a la célula a través de la membrana citoplasmática, mediante sistemas de transporte específicos [63]. La presencia de aminoácidos libres en el medio que habitan es de gran utilidad para estas bacterias, debido a su limitada capacidad para sintetizar los aminoácidos a partir de fuentes de nitrógeno inorgánico [64], y a que la capacidad de producir proteasas no es general. Además de fuente de nitrógeno los aminoácidos pueden ser utilizados como fuente de carbono [65].

Muchas BL tienen una gran capacidad proteolítica, pero se observan diferencias significativas entre los diferentes géneros, siendo el sistema proteolítico de *O. oeni* mucho menos conocido que el de los lactococos o el de los lactobacilos.

Es bien conocido que los péptidos originados por las levaduras durante la fermentación alcohólica son liberados al vino tras la finalización del proceso [66], pudiendo constituir una fuente de nitrógeno alternativa para las BL. Ello es importante en medios que presentan deficiencias de aminoácidos libres. No obstante, y debido a que las necesidades de nitrógeno de las BL son muy bajas, no se ha encontrado una buena correlación entre el nivel de nitrógeno y la formación de biomasa [67, 68].

Los aminoácidos también pueden ser descarboxilados por las BL para la obtención de energía, dando lugar a dióxido de carbono y a la correspondiente amina biógena [69]. El gran interés suscitado por la presencia de las aminas biógenas en vinos y alimentos proviene del hecho de que algunas de ellas pueden ser tóxicas en bajas concentraciones, por lo que su presencia supone un riesgo para los consumidores. Así, la histamina y la tiramina pueden inducir la aparición de reacciones adversas que afectan al sistema nervioso, digestivo y vascular [70-72]. La putrescina puede conferir mal olor o enmascarar los aromas del vino en bajas concentraciones, pero además potencia los efectos de la histamina y la tiramina. Hay que señalar que para que en el vino se produzca acumulación de aminas biógenas es necesario que confluyan varias de las siguientes circunstancias: disponibilidad de los aminoácidos precursores, presencia de microorganismos con actividad aminodescarboxilásica y condiciones favorables, tanto para el crecimiento de la bacteria como para la actuación del enzima descarboxilásico correspondiente [73]. En vinos, las aminas biógenas encontradas con mayor frecuencia son la histamina, la tiramina y la putrescina, siendo la primera la más tóxica. Además, se ha descrito la presencia de otras 24 aminas en menores concentraciones [74]. La capacidad para producir aminas biógenas es cepa dependiente. Las cepas productoras de mayores cantidades de histamina pertenecen a las especies *L. hilgardii* y *P. parvulus*, aunque algunas cepas de *O. oeni*, *L. mali* y *Lc. mesenteroides* también pueden contribuir a su presencia [75]. La capacidad productora de feniletilamina y de tiramina no está muy extendida entre las BL del vino, habiendo sido descrita en cepas de *L. brevis* y *L. hilgardii*. Algunos autores han encontrado además una correlación entre la síntesis de ambas aminas [75, 76].

Las enzimas responsables de la síntesis de histamina y tiramina en las BL son la histidina descarboxilasa y la tirosina descarboxilasa respectivamente, las cuales descarboxilan los aminoácidos histidina y tirosina para convertirlos en histamina y tiramina. Estas enzimas están

codificadas por los genes *hdc* y *tdc* [77, 78]. La putrescina puede derivar de la descarboxilación de la ornitina aunque también se puede producir a partir de la arginina o del intermediario de su catabolismo, la agmatina. La ruta de síntesis de putrescina es distinta en los géneros *Oenococcus* y *Lactobacillus*. En *O. oeni* se realiza una descarboxilación directa de ornitina a putrescina llevada a cabo por la enzima ornitina descarboxilasa, codificada por el gen *odc*. En cambio, las bacterias del género *Lactobacillus* utilizan una arginina descarboxilasa para convertir la arginina en agmatina, y ésta es transformada en N-carbamilputrescina mediante una agmatina deiminasa, codificada por el gen *aguA*. Finalmente, la N-carbamilputrescina es transformada en putrescina mediante una putrescina carbamoiltransferasa, codificada por el gen *ptcA* [79].

Algunos autores [80, 81] indican que los riesgos toxicológicos que conlleva la presencia de aminas biógenas en los alimentos, hacen aconsejable la determinación de la capacidad aminobiógena en las cepas que vayan a ser utilizadas como cultivos iniciadores en la elaboración de productos fermentados, entre ellos el vino. Una de las formas en que puede detectarse la presencia de cepas formadoras de aminas biógenas es amplificando los genes que codifican para las enzimas descarboxilásicas de aminoácidos por PCR.

Las BL del vino también tienen influencia en la producción de otros compuestos que pueden resultar tóxicos para el consumidor como el carbamato de etilo. Este compuesto es potencialmente carcinogénico y se forma por la reacción espontánea, no enzimática, entre el etanol y un compuesto que tiene grupo carbamil. Este compuesto lo producen las BL a partir de carbamil fosfato, que es un intermediario de la ruta de degradación de la arginina [82-85]. La mayor parte de los *Lactobacillus* del vino y algunas cepas de *Oenococcus* catabolizan la arginina, pero la concentración de carbamato de etilo formado por este motivo es pequeña, siendo su principal precursor la urea producida por las levaduras durante la FA [86, 87].

1.4.4. Degradación del glicerol

El glicerol es uno de los principales constituyentes del vino, tanto por su concentración, entre 5 y 8 g/L, como por su contribución al sabor y a las sensaciones táctiles del mismo al aportar cierto grado de dulzor y suavidad en boca. Su presencia en el vino es debida al

metabolismo de las levaduras que lo forman durante la FA, a partir del proceso conocido como fermentación glicero-pirúvica [88]. Algunas cepas de BL pueden degradarlo mediante un proceso en el que el enzima glicerol deshidrogenasa transforma el glicerol en β -hidroxipropionaldehído, compuesto precursor de la acroleína. Desde la época de Pasteur este proceso se considera una alteración del vino y se le conoce con el nombre de amargor de los vinos [58], debido al sabor amargo que proporcionan los compuestos resultantes de la unión de la acroleína con los taninos del vino [1, 50].

1.4.5. Transformaciones de sustratos que modifican el aroma del vino

El metabolismo de las BL en el vino puede generar compuestos aromáticos agradables que mejoran el perfil aromático del mismo, pero también pueden sintetizar compuestos desagradables que dan lugar a defectos organolépticos.

El metabolismo de las BL durante la vinificación puede contribuir a aumentar los aromas afrutados debido a la síntesis de ésteres, y de aromas a mantequilla por la síntesis de diacetilo a partir del metabolismo del citrato, como se indica en el apartado 1.4.2. Los ésteres se forman cuando un alcohol reacciona con un ácido graso, liberando una molécula de agua [89]. Los ésteres sintetizados por BL se forman mediante esterificación enzimática, aunque otros también pueden formarse por esterificación química durante el envejecimiento [90]. Las enzimas implicadas en la formación de ésteres son las alcohol acetil transferasas. Existen numerosas reseñas de que algunos ésteres tales como el acetato de etilo, lactato de etilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo se forman como consecuencia de alcohol acetil transferasas presentes en BL [91, 92].

Por otro lado también se ha constatado el papel de las BL en la disminución de los aromas vegetales y herbáceos, lo cual resulta positivo para el vino. Esto es debido al catabolismo de los aldehídos. Así, el acetaldehído que producen las levaduras durante la FA y tiene un aroma desagradable puede ser transformado por las BL convirtiéndolo en etanol y acetato [93].

Las BL también pueden liberar monoterpenos aromáticos en el vino. Los monoterpenos son unos compuestos aromáticos importantes presentes en uvas y vinos. Estos compuestos se encuentran frecuentemente glicosilados mediante su unión a azúcares, por ejemplo a la glucosa [89, 94]. Los monoterpenos unidos a azúcares no son compuestos volátiles y, por tanto carecen de aroma. La rotura del enlace glicosídico puede realizarse por enzimas glicosilásicas, que liberan el azúcar y el monoterpeno volátil, lo cual aumenta el carácter afrutado de los vinos [94-96]. Se ha detectado actividad β -glucosidasa en BL del vino como *O. oeni* [95].

El metabolismo de los ácidos ferúlico y p-cumárico por las BL resulta en la formación de fenoles volátiles como el 4-etilguayacol y el 4-etilfenol [97, 98]. El umbral de detección de estos compuestos es muy bajo y proporcionan un olor desagradable a animal [97]. Este fenómeno suele ocurrir en las barricas y se atribuye principalmente a *Brettanomyces* spp., aunque también algunas especies de BL como *L. plantarum*, *L. brevis* y *Pediococcus* spp. pueden metabolizar estos ácidos fenol carboxílicos, y por tanto producir esta alteración [94]. Las BL productoras de estos compuestos poseen actividad cinamoil esterasa, siendo la posesión de este enzima un carácter dependiente de cepa.

Otra alteración negativa del aroma puede ser consecuencia del metabolismo de aminoácidos azufrados como la cisteína y la metionina por parte de las BL. Existen BL del vino capaces de degradar la metionina para formar metanetiol, dimetil sulfuro, 3-metil disulfamil-propan-1-ol y 3-metil disulfamil-propionato, que dan olores a putrefacción. Algunas cepas de *O. oeni* y de *Lactobacillus* pueden formar estos compuestos en cantidades importantes [94].

El metabolismo de otros aminoácidos como la lisina y la ornitina puede llevar a la formación de compuestos heterocíclicos desagradables que confieren olor a orina de ratón. Las BL heterofermentativas como *O. oeni*, *Lc. mesenteroides* y algunas especies de *Lactobacillus* son capaces de sintetizar tres compuestos de este tipo: 2-acetiltetrahidropiridina, 2-acetil-1-pirrolina y 2-etiltetrahidropiridina. Las homofermentativas como *Pediococcus* producen sólo pequeñas cantidades de estos compuestos [99].

1.5. Factores que afectan al crecimiento y a la viabilidad de las bacterias lácticas en el vino

1.5.1. Los nutrientes y las fuentes de energía

El crecimiento de las BL depende del tipo y de la cantidad de nutrientes que existen en el mosto y en el vino, los cuales les aportaran la energía y los elementos básicos para desarrollarse.

La obtención de energía por las BL en la vinificación ocurre mediante la asimilación de sustratos orgánicos como los azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos. Principalmente, la obtienen de la fermentación de los azúcares, pero también a partir de los ácidos (málico o cítrico), directamente o indirectamente, o de los aminoácidos como la arginina [5].

En cuanto a los nutrientes esenciales para poder sobrevivir en mostos y vinos, las BL necesitan elementos químicos esenciales como carbono, nitrógeno y sales minerales. El carbono lo obtienen de los azúcares y de los ácidos orgánicos del mosto. Los azúcares principales que fermentan las BL son la glucosa y la fructosa, aunque también pueden utilizar otros azúcares como la manosa, galactosa, pentosas o disacáridos. La fuente de nitrógeno la obtienen de los aminoácidos y de los péptidos y proteínas presentes en el vino. Es importante la presencia de aminoácidos en el vino ya que algunas cepas de BL son auxótrofas para algunos de ellos. Además, algunos minerales como magnesio, manganeso, sodio y potasio, y algunos elementos traza como cobre, hierro, molibdeno y selenio son necesarios para su crecimiento. También es importante para las BL la presencia de vitaminas en el vino, ya que muchas de ellas son incapaces de sintetizar vitaminas del grupo B, en particular el ácido nicotínico, la tiamina, la biotina y el ácido pantoténico. De igual forma es esencial la presencia de fósforo y de azufre para la síntesis de ácidos nucleicos, fosfolípidos y el almacenamiento de energía en forma de ATP [5]. Todos estos componentes están presentes en el mosto o el vino, por lo que desde el punto de vista nutricional es un medio muy completo para las BL.

1.5.2. El pH

Las BL son acidófilas y esto les permite desarrollarse a pHs bajos, en torno a 3.5, que suele ser el valor medio de pH del vino, aunque son capaces de crecer mejor a pH de 3.7-3.8 que a 2.9-3.0. La tolerancia al pH bajo es dependiente de la especie y la cepa, de manera que la especie *O. oeni* es capaz de mantener mejor su pH intracelular que *L. plantarum* cuando el medio externo está a un pH 3.5, y por tanto la primera soporta mejor la acidez del vino. Un pH en el vino superior a 3.5 facilita el crecimiento de las BL y mejora su supervivencia, al hallarse éstas en unas condiciones de crecimiento menos adversas, y al disminuir el efecto antiséptico del anhídrido sulfuroso a pH más elevados [100]. Además, el valor de pH también afecta a la realización de la FML, ya que aunque ésta se realiza a pHs tan bajos como 3.0-3.2, el pH óptimo para la realización de la misma es de 3.8 [101]. La actividad metabólica de las BL también está influenciada por el pH. En vinos de bajo pH, el metabolismo se dirige a la realización de la FML, en cambio en vinos de pH alto se redirecciona hacia la fermentación de azúcares [100]. Cuando el pH del vino es bajo también se favorece la síntesis de diacetilo a partir de ácido cítrico durante la FML [102].

1.5.3. El etanol

El etanol tiene efecto antiséptico sobre las BL, por ello la presencia de etanol en el medio condiciona su crecimiento. La resistencia al etanol de las BL depende del género, la especie y la cepa. Además, la tolerancia al etanol en medios de laboratorio es menor que en el vino, ya que la bacteria que crece en vino es capaz de adaptarse mejor a la presencia de este compuesto [100]. La capacidad de las BL de crecer y sobrevivir en vino disminuye cuando la concentración de etanol está por encima de los 10 grados alcohólicos. *O. oeni* y algunas cepas de *Pediococcus* tienen alta tolerancia al etanol, mientras que las cepas del género *Lactobacillus* toleran cantidades inferiores a 15 grados alcohólicos, excepto el caso de *Lactobacillus trichodes* que ha sido aislado de vinos con un 20% de etanol. Además, la tolerancia al etanol de las BL se ve afectada por la temperatura y el pH, de manera que a

medida que aumenta el pH y disminuye la temperatura del vino, la tolerancia al etanol es mayor [36].

1.5.4. El anhídrido sulfuroso

El SO_2 se usa en vinificación como antioxidante y antiséptico para controlar el desarrollo de levaduras y bacterias, tanto lácticas como acéticas. El concepto de SO_2 total comprende las formas libre y combinada de éste. La forma combinada no es activa frente a los microorganismos y está en equilibrio con las sustancias capaces de combinarlo (etanol, ácidos cetónicos, azúcares y antocianos). La fracción libre la constituye el anhídrido sulfuroso en solución, que dependiendo del pH del medio está más o menos ionizado. Forman parte del SO_2 libre el SO_2 (molecular), el HSO_3^- y el SO_3^{2-} , existiendo un equilibrio pH dependiente entre ellos de manera que a pHs altos existe una mayor proporción de SO_3^{2-} y a pHs bajos una mayor proporción de SO_2 molecular. Este último es el que tiene mayor efecto antimicrobiano, y por ello el pH del vino afecta directamente a esta capacidad. Por ejemplo, a pH 3.0 y 3.8 los porcentajes de SO_2 molecular son 7.84 1.33, respectivamente, lo que representa un descenso del contenido en SO_2 molecular de alrededor del 83%. Esto significa aproximadamente un 20% de descenso por cada aumento de una décima de pH. Esto demuestra la importancia de un pH bajo en el vino para aumentar la relación de SO_2 molecular, y por lo tanto su poder biostático [100, 102].

Aunque la dosis máxima legal depende del tipo de vino, para controlar la microbiota autóctona son suficientes concentraciones de 100-150 mg/L de SO_2 total, 50-100 mg/L de SO_2 combinado y 1-10 mg/L de SO_2 libre. La resistencia de las BL al anhídrido sulfuroso depende de la especie, del pH, de la presencia de sustancias que combinen con el SO_2 y de los sólidos insolubles presentes en el vino. El SO_2 molecular penetra hacia el citoplasma por difusión a través de la membrana de las BL, y en el interior celular encuentra un pH próximo a 6.5. A estos valores de pH, el SO_2 se disocia y reacciona con los puentes disulfuro de enzimas, coenzimas y vitaminas, dando como resultado la muerte celular [100]. Entre las BL, la especie

O. oeni es menos resistente a este antiséptico que la mayoría de las especies de *Lactobacillus* [103, 104].

1.5.5. La temperatura

La temperatura influye en el desarrollo de las BL, no sólo porque afecta a su velocidad de crecimiento y a la duración de su periodo de latencia [105], sino también porque acentúa el efecto tóxico del anhídrido sulfuroso y del etanol. La influencia del pH, del SO₂, del etanol y de la temperatura en el desarrollo de las BL están interrelacionados, teniendo que ser considerados conjuntamente, ya que actúan de forma sinérgica [106].

El rango de temperatura para el crecimiento de las BL en el vino y la degradación del ácido málico está aproximadamente entre 20 y 25°C, según la especie. A una temperatura superior a 25°C se ralentiza la FML por la disminución de la tasa de crecimiento bacteriano, y además se aumenta el riesgo de alteración del vino por el aumento de la acidez volátil a causa del metabolismo de BL y bacterias acéticas indígenas. En cambio, en el caso de temperaturas inferiores a 18°C la FML se ralentiza, por lo que la duración de ésta es mayor [100].

1.5.6. Las interacciones microbianas

Cuando el mosto recién estrujado llega a la bodega contiene gran variedad de microorganismos como hongos, levaduras, bacterias lácticas y acéticas. Los microorganismos se van seleccionando durante la vinificación, en parte por las modificaciones que experimenta el mosto durante la FA y en parte por las relaciones antagónicas o sinérgicas entre ellos.

1.5.6.1. La interacción entre bacterias lácticas y levaduras

Al inicio de la FA las levaduras inhiben el crecimiento de las BL mediante diversos fenómenos de antagonismo. Las interacciones entre ellas son complejas y dependen de las cepas presentes. La inhibición se considera desde dos puntos de vista: la competencia por los nutrientes y la formación de metabolitos inhibidores [107-114]. Por un lado, en el mosto en

fermentación las levaduras asimilan más rápidamente que las BL los nutrientes debido a su mayor masa. Además, agotan ciertas sustancias nutritivas necesarias para el desarrollo de las BL, especialmente aminoácidos como la arginina [115, 116]. Por otro lado, las levaduras durante la FA excretan al medio metabolitos que perturban el crecimiento bacteriano. El principal es el etanol, que es el responsable en gran medida de la inhibición o incluso muerte de algunas especies de BL, sobre todo cuando supera el 6% (v/v) [117]. Otro inhibidor importante de las BL es el anhídrido sulfuroso que pueden producir algunas cepas de levaduras durante la FA. La capacidad de *S. cerevisiae* para sintetizar este compuesto depende de cada cepa. Las cepas más productoras pueden liberar más de 100 mg/L de anhídrido sulfuroso [118-122]. Las levaduras también sintetizan ácidos grasos de cadena media (C₆ a C₁₂) que son excretados al medio extracelular y que pueden inhibir el crecimiento de algunas BL como *O. oeni*. Su efecto inhibidor depende del tipo y de la concentración de ácidos grasos. La combinación de varios tipos de ácidos grasos como el hexanoico, octanoico y decanoico ejerce un mayor grado de inhibición que cada uno individualmente [115]. Además, los ácidos grasos pueden actuar en sinergia con el etanol y el bajo pH del vino alterando las células a nivel de membrana [29, 123, 124]. Se han descrito también proteínas catiónicas con efecto antibacteriano potente que secretan algunas cepas de *S. cerevisiae* [125-128]. Incluso hay autores que han descrito el efecto tóxico sobre las BL de otros compuestos sintetizados por las levaduras como el β-feniletanol o el ácido succínico [129, 130]. *O. oeni* es la especie más resistente a estos fenómenos de antagonismo y se ha estudiado extensamente su interacción con las levaduras. Cuando las bacterias y las levaduras se inoculan en concentraciones similares, los lactobacilos desaparecen completamente después de 8 días. En cambio, *O. oeni* desaparece más lentamente y subsiste a baja concentración, y en el momento que se alcanzan los 5-6% de alcohol se activa el crecimiento de esta bacteria, ya que esta especie es altamente resistente a las concentraciones de etanol del vino [5].

Sin embargo, también existen interacciones positivas entre levaduras y BL. La relación sinérgica entre levaduras y BL se basa en diferentes aspectos. Por un lado, las levaduras liberan vitaminas y aminoácidos que facilitan el crecimiento bacteriano tras la FA [131]. Además, la lisis celular de las levaduras al final de la FA enriquece el medio en elementos

nutritivos, aumentando sobre todo las fuentes de nitrógeno [29]. También se liberan polisacáridos y proteínas de la pared celular que estimulan el crecimiento de las BL mediante dos mecanismos: destoxificando el medio al adsorber ácidos grasos de cadena media y estimulando la producción de enzimas hidrolíticos por parte de las BL. De este modo aumenta el contenido nutricional del medio [132, 133].

Otro efecto a considerar es la inhibición de las levaduras por las BL. Según algunos autores [134], la presencia de BL no tiene efecto sobre el crecimiento de las levaduras, pero puede acelerar la muerte de éstas. Este fenómeno puede deberse a la formación de metabolitos bacterianos inhibidores o a la eliminación de ciertos factores de supervivencia requeridos por las levaduras. Sin embargo, otros autores han demostrado que ciertos metabolitos bacterianos como el propionato o el acetato sí limitan el crecimiento de las levaduras y la producción de etanol [135]. También puede existir competencia frente a algún nutriente como la arginina, el ácido pirúvico o el etanal. Se ha observado una muerte más rápida de las levaduras en cultivos mixtos, con lo cual las BL pueden resultar responsables de paradas fermentativas [134]. Además, las BL pueden acelerar la muerte de las levaduras si poseen actividades glucanasa y proteasa al tener capacidad para hidrolizar componentes de su pared celular, lo que acelera la autólisis de las levaduras al final de la FA [5]. En cambio, otros autores han demostrado que la inoculación de BL antes de la FA no afecta al transcurso de ésta [136-139].

1.5.6.2. La interacción entre bacterias lácticas

Existen cepas de BL aisladas de vino que producen sustancias que causan la muerte o inhibición del crecimiento de otras BL situadas en el mismo ambiente. Es bien conocido el hecho de que las BL producen diversos compuestos como ácidos orgánicos, etanol, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, diacetilo, acetaldehído, benzoatos y algunos compuestos no proteicos de pequeño tamaño molecular como las bacteriocinas [140].

Las BL pueden producir H_2O_2 en presencia de oxígeno, lo que ocasiona la oxidación de los grupos sulfhidrilo y la desnaturalización de las enzimas que los contienen [141]. También puede causar peroxidación de los lípidos de membrana aumentando la permeabilidad de la

Introducción

misma. Provoca la formación de radicales libres bactericidas como los iones superóxido e hidroxilo, que son capaces de dañar el ADN.

Otro inhibidor es el diacetilo producido a partir del citrato y que reacciona con la arginina convirtiéndola en inutilizable para otras BL [142].

También se ha observado que algunas BL son productoras de bacteriocinas. Las bacteriocinas son péptidos biológicamente activos sintetizados por BL que tienen propiedades bactericidas contra otras bacterias, tanto de la misma especie como de especies diferentes, generalmente Gram positivas [143-146]. Las bacteriocinas afectan principalmente a especies próximas desde el punto de vista filogenético a la especie productora, con las que comparten habitualmente un nicho ecológico. Las bacterias productoras de bacteriocinas presentan una gran ventaja frente a las no productoras a la hora de competir por los mismos nutrientes [147, 148]. Estos péptidos interactúan con polímeros aniónicos de la pared celular formando poros transitorios o canales iónicos que disminuyen la fuerza protón-motriz y acaban permeabilizando y desestabilizando la membrana plasmática bacteriana. Las bacterias productoras se autoprotegen de la toxicidad de estos compuestos mediante la expresión de una proteína de inmunidad específica codificada en el mismo operón de la bacteriocina [149]. Algunas de las bacteriocinas sintetizadas por BL se ilustran en la Tabla 4.

Tabla 3. . Algunas bacteriocinas producidas por BL [149].

BACTERIOCINA	BL PRODUCTORA
Pediocina PA-1	<i>P. acidilactici</i> y <i>L. plantarum</i>
Pediocina JD	<i>P. acidilactici</i>
Sakacina A	<i>L. sakei</i>
Sakacina P	<i>L. sakei</i>
Curvacina	<i>L. curvatus</i>
Mesentericina	<i>Lc. mesenteroides</i>
Plantaricina E/F	<i>L. plantarum</i>
Helveticina	<i>L. helveticus</i>
Nisina	<i>Lactococcus lactis</i>

Entre las BL de origen enológico productoras de bacteriocinas cabe destacar algunas cepas de *L. plantarum* [150-152], *P. pentosaceus* [153], *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lc. mesenteroides* subsp. *cremoris* y *L. fructivorans* [154]. No se han identificado cepas de *O. oeni*

productoras de bacteriocinas, si bien se ha descrito que esta especie es sensible a la nisina, plantaricina y pediocina producidas por otras BL [155]. La especificidad de actuación depende de la bacteriocina, ya que la pediocina NSp producida por una cepa de *P. pentosaceus* inhibe a *Pediococcus* spp., *O. oeni* y *Lactobacillus* spp. [153], mientras que la pediocina PD-1 producida por una cepa de *P. damnosus* es activa contra *Clostridium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus* [155]. Respecto a la utilización de las bacteriocinas en el control del proceso de vinificación hay que indicar que, aunque se ha demostrado la estabilidad de las mismas en las condiciones de vinificación y que no producen efectos negativos sobre el crecimiento de las levaduras o sobre el perfil sensorial del vino, no se ha aprobado todavía su uso en dicho proceso [156-159].

1.5.7. Los polifenoles

Los compuestos fenólicos influyen en el crecimiento, supervivencia y estado fisiológico de las BL [160-164]. Algunos polifenoles del vino como los taninos tienen efecto antimicrobiano e inhiben el crecimiento de las BL en el vino [165]. El ácido vainílico y los taninos poseen un efecto bactericida muy importante, y por esta razón se cree que la FML puede ser más difícil en barricas de roble nuevas ya que proporcionan una mayor cantidad de taninos al vino [166, 167]. En cambio, otros polifenoles como el ácido gálico y las antocianinas promueven el crecimiento, ya que las BL son capaces de degradarlos y utilizarlos como fuente de energía [168, 169].

1.5.8. La lisozima

El uso de lisozima en el sector enológico tiene como fin disminuir la población de BL autóctonas. La lisozima es un enzima lítico de origen biológico que se obtiene de la clara de huevo y que produce la lisis de la pared celular de bacterias Gram positivas, por ruptura de la unión glicosídica $\beta(1-4)$ entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina, ocasionando la muerte celular por plasmólisis debido a un choque osmótico. Es una proteína activa a pHs

superiores a 3.5 y suele usarse en vinos con el fin de inhibir a las BL causantes de posibles alteraciones. La lisozima complementa la actividad del SO₂ que en esas condiciones de elevado pH es baja [170]. Se añade al mosto o vino con el fin de bloquear temporalmente la FML y reducir así las dosis de SO₂ utilizadas en conservación. Al contrario que el SO₂, su eficacia no disminuye con el aumento de pH sino que aumenta, ya que el pH óptimo de esta enzima es de 7.0. Además no es tóxica y no tiene incidencia organoléptica. Su acción depende de la dosis empleada, del pH del vino, y de las especies y concentración de BL que existen en el medio. Se ha observado una mayor eficacia de la lisozima frente a *O. oeni* que frente a *L. plantarum* [171].

Su utilización está autorizada por la OIV en su Código Internacional de Prácticas Enológicas, y por la Unión Europea mediante el reglamento (CE) nº 2066/2001, en dosis máximas de 500 mg/L. Se puede añadir al mosto de uva, al mosto parcialmente fermentado y al vino, con el objetivo de controlar el crecimiento y la actividad de las BL. Diversas experiencias han mostrado que la aplicación de lisozima en dosis de 500 mg/L al mosto o en dos adiciones, al comienzo y al final de la FA, consigue reducir, e incluso eliminar, las BL indígenas. Por otra parte, la aplicación de lisozima tras la FML, permite reducir los niveles de SO₂ empleados para la estabilización microbiológica del vino [46, 172].

Sin embargo, el uso de lisozima también presenta inconvenientes, ya que ésta puede adsorberse a los compuestos fenólicos y taninos en lugar de a las paredes bacterianas, inactivarse por la acción de la bentonita o desaparecer progresivamente por precipitación en el vino [46].

1.5.9. Otros factores enológicos

Existen otros factores que afectan a la concentración de BL durante la vinificación, a su crecimiento y a su metabolismo. Uno de ellos es el ácido tartárico, que en concentraciones superiores a 4 g/L tiene efecto desfavorable en el crecimiento de las BL. También los pesticidas añadidos para el control fitosanitario de las viñas afectan negativamente a las BL [173]. Técnicas enológicas como la clarificación del mosto por sedimentación, filtración o

centrifugación, el intercambio iónico y la estabilización por frío eliminan tanto a las bacterias como a los posibles nutrientes para su crecimiento. En cambio, un excesivo contacto del mosto con los hollejos aumenta la proporción de BL en el vino y aporta nutrientes [102]

2. CULTIVOS INICIADORES PARA VINIFICACIÓN

Los cultivos iniciadores consisten en preparaciones de microorganismos vivos que se utilizan para que lleven a cabo determinadas reacciones en procesos industriales [174]. Los cultivos iniciadores pueden contener una mezcla de cepas desconocidas, denominándose cultivos indefinidos, una mezcla de cepas definidas, denominándose cultivos mixtos, o una sola cepa, denominándose cultivos simples [174].

Las cepas microbianas destinadas a cultivos iniciadores deben cumplir unos requisitos esenciales. En primer lugar los preparados comerciales deben de ser seguros: no deben contener patógenos ni microorganismos con actividad tóxica. Además deben exhibir alta efectividad tecnológica, debiendo ser capaces de imponerse sobre la microbiota autóctona y de realizar la actividad metabólica requerida. Igualmente, es un requisito indispensable desde el punto de vista económico el que sea factible la producción de una elevada cantidad de biomasa. El cultivo iniciador debe de ser susceptible de preservarse por refrigeración, congelación o liofilización con baja pérdida de su actividad, y debe de mantener sus propiedades estables durante varios meses bajo condiciones de almacenaje [174].

La producción y el uso de cultivos iniciadores para vinificación empezó en EE.UU a mitad de los años 60, siendo los primeros en utilizarse los de levadura seca activa para llevar a cabo la FA; de ahí esta práctica se expandió por todo el mundo [175]. Los primeros intentos serios de selección de BL para la elaboración de vinos datan también de 1960. Pero es en la década de los 70, cuando aprovechando las técnicas ya desarrolladas de preparación y conservación de BL para la industria de productos lácteos fermentados, se aplican los primeros criterios de selección y producción de cultivos iniciadores malolácticos eficaces. De este periodo data la salida al mercado de los primeros inóculos o cultivos bacterianos para la industria enológica, que no estuvieron exentos de importantes fracasos. La actividad maloláctica y la resistencia al

alcohol, a la elevada acidez, a las bajas temperaturas y a otras condiciones del vino, fueron los primeros criterios que se consideraron en los primeros programas de selección de cultivos malolácticos que se realizaron en los años 70 [46]. La especie que más frecuentemente forma parte de estos cultivos iniciadores es *O. oeni*, pero también existen preparaciones de *Lactobacillus* y de *Pediococcus* [176].

2.1. Aplicación de cultivos para la inducción de la fermentación maloláctica

2.1.1. Ventajas de la utilización de cultivos malolácticos

Desde hace años se han publicado numerosos trabajos acerca de un mejor control del proceso de la FML mediante la utilización de cultivos iniciadores seleccionados [85, 177-182]. Con la adición de bacterias malolácticas se trata de aportar al vino una elevada población de bacterias en fase activa, de forma que se asegure el completo desarrollo de la FML y se controle la calidad a través de la naturaleza y cantidad de los productos secundarios formados por las cepas seleccionadas [46]. La inoculación con cultivos iniciadores seleccionados disminuye la posibilidad de contaminación por parte de otras BL contribuyendo a la estabilidad microbiológica del vino. Además, garantiza un rápido inicio de la FML y un mejor control sobre la producción de compuestos organolépticos del vino, contribuyendo así al aumento de su complejidad [183]. La microbiota indígena puede generar desviaciones sensoriales desconocidas y que pueden ser perjudiciales para las cualidades sensoriales, y también pueden producir sustancias tóxicas como las aminas biógenas y el carbamato de etilo. La adición de cultivos iniciadores permite anticipar con precisión la duración de la FML y por tanto de la vinificación en su totalidad. Además, el coste económico que representa el uso de cultivos iniciadores es inferior al que supone la estimulación de la FML espontánea (calentamiento del vino y análisis suplementarios necesarios).

2.1.2. Criterios de selección de bacterias malolácticas

Las bacterias que forman parte de los cultivos iniciadores han sido aisladas a partir de FML espontáneas, en base a sus buenas cinéticas de fermentación, su buen comportamiento en condiciones extremas del vino, y las propiedades sensoriales específicas que otorgan al vino [183].

Para la selección de cultivos iniciadores malolácticos se han descrito una serie de criterios. Buckenhüskes [174] divide estos criterios en criterios de primer, segundo y tercer orden. Los criterios de primer orden son la resistencia a pHs bajos, al etanol y a las bajas temperaturas, y además el que posean un metabolismo limitado de las hexosas y las pentosas. Entre los criterios de segundo orden están la cinética de crecimiento y supervivencia en vino tras la inoculación, así como la cinética de degradación del ácido málico. Los criterios de tercer orden incluyen una limitada interacción del cultivo iniciador con las levaduras en la FA y con otras BL, la resistencia a fagos, la ausencia de capacidad aminobiogénica y un potencial limitado para formar diacetilo y acetoína.

Posteriormente, Krieger-Weber [21] revisó estos criterios en los términos que quedan recogidos en la Tabla 5.

2.1.3. Especies utilizadas en los cultivos malolácticos

Existen cultivos iniciadores malolácticos comercializados por varias empresas especializadas. Están basados en distintas especies como *O. oeni*, *L. plantarum* o *Pediococcus* spp., capaces de realizar la FML en vinos. También existen cultivos mixtos que están compuestos por una mezcla de cepas de la misma especie o de especies distintas (Tabla 6).

Tabla 4. Características deseables y no deseables de las bacterias destinadas a formar parte de cultivos iniciadores malolácticos.

CARACTERÍSTICAS DESEABLES		
Propiedades tecnológicas	Resistencia al estrés durante la fase de producción	
	Resistencia al estrés durante la congelación y la liofilización	
	Resistencia a pHs bajos	
	Alta tolerancia al etanol	
	Alta tolerancia al SO ₂	
	Tolerancia a bajas temperaturas	
	Corta fase de latencia	
	Degradación rápida del ácido málico	
	Tolerancia a pesticidas	
	Elevada resistencia a la lisozima	
	Producción de bacteriocinas	
	Buena tolerancia al oxígeno	
	Propiedades cualitativas	Actividad β-glucosidasa
		Actividad esterasa
Producción de aromas afrutados		
Reducción en notas vegetativas		
Sensación de redondez en boca		
Disminución de la astringencia		
Disminución del amargor		
Aumento de la complejidad		
Hidrólisis de combinaciones de SO ₂ con acetaldehído y cetonas		
Producción de acetaldehído para la estabilización del color		
Producción de cantidades moderadas de diacetilo		
Producción de butanodiol		
Baja afinidad por la glucosa		
CARACTERÍSTICAS NO DESEABLES		
Propiedades tecnológicas	Formación excesiva de polisacáridos	
	Huésped de profagos	
	Degradación del ácido málico demasiado rápida	
Propiedades cualitativas	Producción de aminas biógenas	
	Producción de carbamato de etilo	
	Producción de compuestos derivados del azufre	
	Incremento de la acidez volátil	
	Producción de aromas a ratón	
	Producción de excesivas cantidades de diacetilo	
	Rápida degradación del ácido cítrico	
	Producción de lactato de etilo	
	Producción de fenoles volátiles	
	Producción de olor a geranio	
	Producción/degradación de acetaldehído	

Tabla 5. Diversidad de cultivos iniciadores malolácticos comercializados.

PRODUCTOR	ESPECIE	CULTIVOS	PRESENTACIÓN
Lallemand Inc	<i>O. oeni</i>	Alpha 1-step	Liofilizado
	<i>O. oeni</i>	Inobacter	Liofilizado
	<i>O. oeni</i>	MTO1	Liofilizado
	<i>O. oeni</i>	MBR31	Liofilizado
	<i>O. oeni</i>	MBR-alpha	Liofilizado
	<i>O. oeni</i>	MBR-beta	Liofilizado
	<i>O. oeni</i>	MBR VP41	Liofilizado
	<i>O. oeni</i>	MBR B1	Liofilizado
	<i>O. oeni</i>	OSU	Liofilizado
	<i>O. oeni</i>	Microenos B16	Liofilizado
	<i>O. oeni</i>	Elios 1	Liofilizado
	<i>O. oeni</i>	Lactoenos	Liofilizado
	Mezcla de cepas	3X	Liofilizado
	Mezcla de cepas	Enoferm	Liofilizado
Pickering Wine Supplier	<i>L. plantarum</i>	V22	Liofilizado
	<i>Pediococcus spp.</i>	44-40	Liofilizado
Biosource Flavours	<i>Pediococcus spp.</i>	54-40	Liofilizado
	<i>O. oeni</i>	Leuconostoc	Liofilizado
Christian Hansen Inc.	<i>O. oeni</i>	CH 35	Liofilizado
	<i>O. oeni</i>	CH 16	Liofilizado
	<i>O. oeni</i>	Viniflora oenos	Liofilizado
	<i>L. plantarum</i>	Viniflora LP	Liofilizado
Vinquiry	<i>O. oeni</i>	MCW	Líquido y liofilizado
	<i>O. oeni</i>	Enoferm alpha	Líquido y liofilizado
	<i>O. oeni</i>	Enoferm beta	Líquido y liofilizado
	<i>O. oeni</i>	Enoferm D	Líquido y liofilizado

En los últimos años, la especie *O. oeni* ha sido la más empleada como cultivo iniciador maloláctico. Las cepas de esta especie son las más recomendables, ya que pueden degradar el ácido málico sin producir alteraciones sensoriales ni sustancias tóxicas, además de estar muy bien adaptadas a concentraciones elevadas de etanol, al bajo pH y a una limitada disponibilidad de nutrientes [62, 184, 185]. Sin embargo, también existen cultivos de *L. plantarum* en el mercado, aunque son menos frecuentes [18, 186-188].

Se han hallado cepas de *L. plantarum* capaces de realizar la FML en las mismas condiciones adversas del vino que *O. oeni*. Algunas cepas toleran la combinación de pH ácido y etanol en el medio, y son capaces de proliferar bajo condiciones que normalmente son letales para las BL. Como ejemplo, se han descrito cepas capaces de sobrevivir y proliferar a pH 3.2, crecer en

presencia de 13% de etanol y a 18 °C, alcanzando poblaciones de 10^8 UFC/mL, capacidades semejantes a las que exhiben algunas cepas de *O. oeni* adaptadas a crecer en vino. Por esta razón existen cultivos malolácticos puros o mixtos de *L. plantarum* que han resultado eficaces para la eliminación del ácido málico del vino [186].

Las bacterias de la especie *L. plantarum* son capaces de realizar la FML en vino, ya que poseen el enzima maloláctico. Este enzima fue descrito por primera vez en esta especie. *L. plantarum* es menos eficiente que *O. oeni* para llevar a cabo la FML, ya que la expresión del enzima maloláctico depende de la concentración de ácido málico en el medio, sin embargo la actividad maloláctica es mayor. Al tratarse de un enzima inducible, la FML mejora progresivamente cuanto mayor es la concentración inicial de L-malato, pero cuanto mayor resulta la concentración de L-láctico *L. plantarum* disminuye la velocidad de la FML, mientras que en *O. oeni* la velocidad de la FML es independiente de la concentración de L-láctico en el vino [189]. Un inconveniente que se genera de ello es que la población de *L. plantarum* disminuye cuando la concentración de ácido málico es inferior a 0.5 g/L, mientras que la de *O. oeni* mantiene su población hasta niveles de 0.1 g/L de ácido málico en el vino. En cambio, una gran ventaja que presentan las cepas de *L. plantarum* para la realización de la FML es que se han descrito mayor proporción de cepas de esta especie que presentan actividades enzimáticas de interés como las actividades tanasa, citrato liasa y β -glucosidasa que en *O. oeni* [190].

Se han patentado varias cepas y procedimientos para realizar la FML con cepas de *L. plantarum*. En 1989 Prahil publicó la patente WO 89/06685, basada en la realización de la FML en mosto. La cepa de *L. plantarum* fue aislada de mosto en fermentación y se seleccionó de entre un grupo que abarcaba cepas de diferentes especies del género *Lactobacillus* como *L. delbruekii*, *L. buchneri*, *L. hilgardii*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. collinoides* y *L. plantarum*. Se observó que esta bacteria no aumentaba la AV del vino ni inhibía la actividad fermentativa de las levaduras. Esta bacteria era incapaz de fermentar azúcares a ácido láctico en presencia de ácido málico, y además realizaba la FML a pHs próximos a 3.2. La duración de ésta a estos pHs (3.1-3.2) fue de una semana, aunque a pHs más altos se realizó en tiempos más cortos. Otra característica de esta cepa es que las células de *L. plantarum* no

se multiplicaban en el mosto y desaparecían progresivamente durante la FA hasta su total eliminación al final de ésta. El cultivo se debía añadir al mosto no sulfitado o con bajas concentraciones de SO₂ libre, antes de que se iniciase la FA o en los primeros estadios de ésta [176]. Recientemente también se han desarrollado metodologías similares para llevar a cabo el mismo proceso con otras cepas de *L. plantarum* [191].

En los últimos años la empresa Lallemand ha desarrollado una nueva generación de cultivos iniciadores basados en cepas de *L. plantarum* para llevar a cabo la FML en vinos de pH elevado. Deleris-Bou y Krieger-Weber describen que se han realizado ensayos comparativos con cultivos iniciadores liofilizados de la cepa CNCM-12924 de *L. plantarum* y de la cepa EQ54 de *O. oeni* [192]. Cuando la cepa CNCM-12924 se inoculaba directamente al finalizar la FA, la degradación del ácido málico empezaba inmediatamente. En cambio, en los vinos inoculados con la cepa EQ54 de *O. oeni* transcurrieron 8 días para observar un descenso de málico. Además, en los vinos inoculados con *O. oeni* la microbiota indígena fue capaz de desarrollarse, mientras que en el inoculado con *L. plantarum* no. Además se observó que cuando la cepa CNCM-12924 de *L. plantarum* se inoculaba a las 24 horas de haber inoculado la levadura en vez de inocular al final de la FA, el periodo de la FML se acortaba de 20 a 13 días [192].

Esta misma empresa está comercializando actualmente el cultivo iniciador Enoferm V22[®] de la especie *L. plantarum* para la realización de la FML en vinos de pH alto. Se ha demostrado que a pHs elevados las cepas de *L. plantarum* crecen más rápidamente que las cepas de *O. oeni*, llevando a cabo la FML de una forma más rápida y segura. Este cultivo puede utilizarse tanto en coinoculación con la levadura fermentativa como en inoculación secuencial. Se ha demostrado que es capaz de sobrevivir tras la inoculación directa y puede inducir la FML en vinos con un contenido en etanol inferior al 15.5%, un pH superior a 3.5, un contenido de SO₂ total de 50 mg/L y una temperatura superior a 17 °C. A pesar de tratarse de una cepa de metabolismo heterofermentativo facultativo se ha demostrado que no produce ácido acético a partir de las pentosas. Además, se han descrito en esta cepa la presencia de varios genes que codifican para enzimas asociadas a la producción de aromas beneficiosos durante la FML. En el cultivo Enoferm V22[®] se han descrito las actividades enzimáticas esterasa, proteasa, β-glucosidasa, citrato liasa, metionina sintasa y descarboxilasa de ácidos fenólicos. También se

han hallado genes que codifican para una plantaricina, lo que facilitaría su implantación en el proceso. Se ha observado la capacidad de esta cepa de degradar la ocratoxina A y se ha comprobado su incapacidad para producir aminas biógenas [188].

2.1.4. Posibles momentos de inoculación del cultivo iniciador

No hay un enfoque general para la inoculación de cultivos iniciadores malolácticos. El momento más conveniente para la inoculación depende de muchos factores de la vinificación, siendo los más importantes la composición del mosto, la cepa de levadura fermentativa responsable de la FA y las técnicas de vinificación. Generalmente se ha recomendado que se realice al finalizar la FA para evitar el picado láctico, aunque investigaciones recientes mencionan la posibilidad de inocular simultáneamente la levadura y la bacteria en el mosto mediante la estrategia denominada coinoculación [193]. Otros autores plantean la posibilidad de una inoculación temprana de las BL antes de que finalice la FA, mientras que otros plantean su siembra algún tiempo después del fin de la FA para lograr una óptima estabilización del color en vinos tintos.

La estrategia más ampliamente utilizada es la inoculación secuencial, en la cual el cultivo bacteriano se inocula al final de la FA. Este método no plantea riesgo de metabolismo bacteriano de los azúcares y evita el aumento de la AV. En general, los enólogos de Burdeos recomiendan esta estrategia de inoculación para prevenir el picado láctico del vino [165]. Además, de esta manera se evita gran parte de la toxicidad que ejercen los ácidos grasos procedentes de las levaduras sobre las BL, ya que la concentración de éstos disminuye tras la FA. En este momento también existe una mayor disponibilidad de nutrientes para las bacterias debido a la autólisis de las levaduras al final de la FA. Sin embargo, esta técnica también plantea inconvenientes, ya que los niveles de etanol son máximos en esta etapa y además el cultivo iniciador requiere un periodo de aclimatación para adaptarse a unas condiciones más adversas que las que se encuentran en fases más tempranas [194]. Esta modalidad es la que más se usa cuando el cultivo iniciador está compuesto por cepa(s) de *O. oeni*, especie altamente resistente al etanol. Pocas cepas de *Lactobacillus* son capaces de llevar a cabo la

FML en estas condiciones, ya que su tolerancia al etanol es muy baja si este supera los 8 grados alcohólicos [188]. Sin embargo, pueden llevarla a cabo con efectividad en mosto cuando se coinoculan con levaduras [195, 196].

Otra opción planteada es realizar la inoculación del cultivo maloláctico previamente a la de la levadura fermentativa. Esta estrategia fue descrita por Prahll por primera vez como método de proceder con un cultivo maloláctico de *L. plantarum* [197]. Si las BL se inoculan en ese momento y antes que las levaduras, el crecimiento bacteriano se ve potenciado por la elevada cantidad de nutrientes y la ausencia de levaduras y de etanol. En estas condiciones las BL como *L. plantarum*, crecen y pueden realizar la FML rápidamente.

Actualmente existe un gran interés en la coinoculación de la levadura fermentativa y las bacterias malolácticas en el mosto. Esta estrategia resulta beneficiosa para el crecimiento y metabolismo de las bacterias, ya que tienen mayor disponibilidad de nutrientes y no se ven expuestas a las altas concentraciones de etanol que existen en el vino. Sin embargo, esta técnica también presenta inconvenientes, ya que los vinos en los que la FML se ha realizado de esta forma presentan una mayor AV que cuando se inoculan secuencialmente. Ello sucede porque se forma ácido acético a partir de los azúcares presentes en altas concentraciones, y del ácido cítrico una vez que las BL han agotado el ácido málico [198]. Otro aspecto que debe tenerse en cuenta en esta estrategia de inoculación son las interacciones entre BL y levaduras fermentativas [126, 199-202]. Aunque algunos autores han demostrado que el crecimiento de las levaduras no resulta afectado por la presencia de BL durante la vinificación [203], otros han demostrado lo contrario, tal y como se ha explicado en el apartado 1.5.6 [194, 198]. Mediante esta técnica, la FML se simultanea con la FA, acortándose la duración total de la vinificación [194, 204], ya que permite adelantar la estabilización de los vinos con anhídrido sulfuroso evitando que el vino esté desprotegido durante los largos periodos de tiempo que requiere la inoculación de la bacteria al final de la FA [194, 198]. Igualmente, se facilita la implantación de la bacteria inoculada respecto a cuando se inocula al final de la FA [204]. Además, se ha comprobado que la aplicación de esta estrategia disminuye el contenido en aminos biógenos de los vinos [204]. Otros beneficios ligados a la estrategia de coinoculación es que el contenido en azúcares residuales es menor en estos vinos que en los que se han inoculado

secuencialmente, lo cual también resulta beneficioso para mejorar la estabilidad microbiológica. Este método facilita la realización de la FML en vinos difíciles, de bajo pH, alto contenido en etanol o que están a bajas temperaturas [205]. También se ha descrito que esta estrategia conduce a una mejora aromática, que se traduce en un mayor carácter afrutado y mayor intensidad de aromas debida a la síntesis de acetato de etilo, alcoholes superiores, acetatos y ésteres, y a la reducción de las concentraciones de acetoína y butirolactona. Además, en estos vinos se aprecia un aumento de la redondez y tanicidad dulce en boca [204, 206]. Por el contrario, los vinos elaborados mediante inoculación secuencial presentan aromas más lácteos que afrutados y mayores sensaciones de amargor, aunque por el contrario presentan mayor intensidad y estabilidad del color [204, 206].

2.1.5. Formas de presentación de los cultivos iniciadores

En el mercado existen diferentes tipos de presentación de cultivos iniciadores para inducir la FML. Éstos pueden distribuirse en forma de cultivos líquidos: la obtención de este tipo de cultivos no requiere el tratamiento de secado ni liofilización como ocurre con los cultivos iniciadores tradicionales. Ello garantiza el mantenimiento de un mayor número de células viables activas en el preparado y también en el producto en el que se inoculan. Otra alternativa son los cultivos congelados en los que las células se mantienen a temperaturas entre -18 y -20°C, pero la modalidad más ampliamente utilizada de cultivos malolácticos son los cultivos liofilizados. El uso de los primeros cultivos liofilizados era complicado, ya que requerían una fase de aclimatación/reactivación muy prolongada antes de su inoculación en vino. Los cultivos iniciadores se tenían que resuspender en mosto de uva sin sulfitar, diluido con agua o con vino en iguales proporciones, se debía de corregir el pH hasta 3.6 o más, se debía de adicionar nutrientes y se necesitaba un periodo de aclimatación de la bacteria de 48 horas, a una temperatura similar a la del vino a inocular. La evolución de la metodología de preparación de los cultivos iniciadores ha permitido que actualmente puedan ser inoculados directamente al vino o aclimatados en un periodo de tiempo mucho más corto.

Para la elaboración de los cultivos liofilizados de inoculación directa, las bacterias se someten a una fase de aclimatación durante el proceso de producción. Este proceso le facilita a la bacteria la supervivencia en el ambiente hostil del vino tras la inoculación, sin una reducción importante del número de células viables y sin la consiguiente pérdida de la actividad maloláctica. A través de esta fase de aclimatación las bacterias adquieren mecanismos de resistencia que les permiten regular el pH intracelular para mantener viable la maquinaria celular, se modifica la estructura de la membrana celular, lo cual afecta a su fluidez, y se sintetizan las mismas proteínas que las que causa el estrés térmico. Este método presenta el inconveniente de que no todas las cepas son capaces de soportar este proceso de aclimatación durante la fase de producción [183].

Otro tipo de cultivos liofilizados son aquellos que requieren un corto periodo de rehidratación. En este caso las células son sometidas a un estrés más suave durante su fase de producción, generando bacterias menos preacondicionadas, y por ello requieren de una fase de aclimatación antes de su inoculación en vino. Estos cultivos han sido desarrollados para ofrecer una solución económicamente más rentable que los de inoculación directa, gracias al mayor rendimiento en biomasa que se obtiene al crecer en condiciones de producción menos estresantes. Durante la fase de aclimatación, la activación del sistema metabólico bacteriano proporciona rápidamente un cultivo muy activo tras la inoculación, lo que se traduce en una corta fase de latencia y un rápido inicio de la FML. Esta fase de aclimatación no es necesaria cuando se aplican estrategias de coinoculación con levaduras en mosto y cuando las condiciones del vino son compatibles con la supervivencia de la cepa, sobre todo en pHs altos [183].

2.2. Aplicación de cultivos de *L. plantarum* para evitar el pardeamiento de los vinos

El pardeamiento del vino es un proceso natural que comienza cuando la uva se prensa. Se traduce en un cambio de color hacia la gama del amarillo-marrón que se hace especialmente obvio durante la fase de envejecimiento. Una de las principales reacciones clave para el pardeamiento de los vinos es la condensación de flavanoles como la catequina y

la epicatequina con ácido glioxílico. El producto generado son compuestos incoloros, que por posterior oxidación dan sales de xantilo coloreadas [207, 208]. La actividad de los microorganismos asociados a la vinificación también puede influir en las reacciones químicas que dan lugar al pardeamiento. Debido a que el proceso de polimerización de flavanoles que genera pigmentos de color marrón depende de la naturaleza y de la concentración relativa de los compuestos fenólicos presentes [209], la interacción entre las BL con los compuestos fenólicos del vino (ya comentados en el apartado 1.5.7) puede influir en el proceso de pardeamiento [210].

Los métodos utilizados para prevenir el oscurecimiento o pardeamiento del vino, se agrupan en métodos físico-químicos y biológicos. El método más extendido para prevenir el pardeamiento es el uso de sulfitos debido a su capacidad antioxidante. Sin embargo, su uso presenta objeciones relacionadas con la salud, ya que puede resultar un alérgeno en los vinos. Otros métodos menos frecuentes y más caros son el tratamiento con resinas de intercambio iónico, la adición de carbón activo, de quitosano o de escleroproteínas bovinas. Sin embargo, la utilización de un método biológico en lugar de químico para evitar el pardeamiento tendría una mayor aceptación entre los consumidores y sería un método no objetable para la producción de vinos orgánicos y ecológicos. Además, carecería de las restricciones legales de los métodos físico-químicos empleados de forma habitual [210]. Para ello se han usado ciertas levaduras fermentativas, ya que las paredes celulares de éstas son capaces de adsorber polímeros de color marrón [211, 212] o disminuir la producción de los mismos al ser capaces de adsorber intermediarios incoloros de la reacción [213, 214]. Sin embargo, el uso de levaduras para este fin puede alterar las cualidades organolépticas del vino debido a su capacidad para la formación de aromas indeseables.

Se ha observado que ciertas BL pueden disminuir el pardeamiento, tal y como lo demostraron Curiel y col. por primera vez [215]. Como consecuencia de ello, recientemente se ha desarrollado la patente WO 2011/151494A1, titulada “Uso de bacterias lácticas para conservar los flavanoles de un producto alimenticio y prevenir el pardeamiento del vino”. Esta invención se refiere al uso de al menos una bacteria láctica de grado GRAS (*Generally Regarded As Safe*) para conservar mayor cantidad de flavanoles en un producto alimenticio así

como también para disminuir el pardeamiento los vinos. En estos estudios se ha demostrado que la cepa RM71 de *L. plantarum* inhibe las rutas que dan lugar a los pigmentos de xantilo, consiguiendo disminuir en un 29% el pardeamiento, sin afectar a las propiedades organolépticas del vino. La capacidad antipardeamiento de *L. plantarum* sería de especial interés ya que permitiría eliminar el uso de productos químicos para la prevención del pardeamiento en vinos orgánicos y para conseguir vinos con un mayor contenido en flavanoles y mayor poder antioxidante [210].

3. LA PROBLEMÁTICA DE LOS VINOS DE BAJA ACIDEZ

3.1. Consecuencias del cambio climático en la acidez de los vinos

El cambio climático se ha definido como una alteración en los tradicionales regímenes termo-pluviométricos. El cambio climático supone una serie de variaciones atmosféricas y climáticas que afectan seriamente a todo hábitat y seres vivos, y cuyas consecuencias se observan a largo plazo. Estos cambios se deben a variaciones normales de la propia naturaleza, pero se ven intensificadas principalmente por la influencia de la actividad humana. Existen varias evidencias de este cambio climático. Por un lado, las observaciones que se han hecho durante el siglo XX y lo que llevamos del siglo XXI, han demostrado que la temperatura media global del planeta ha aumentado, debido principalmente a la emisión de gases a la atmósfera por parte del ser humano. El aumento medio de la temperatura anual desde 1972 a 2002 ha sido de 1.8°C [216]. Como consecuencia de este aumento de temperatura, los fenómenos meteorológicos extremos como lluvias y tormentas son más intensos, y las sequías se han multiplicado. Otra consecuencia del aumento de temperatura del planeta ha sido la retracción de las capas y extensiones de hielo en ambos polos y en las zonas más frías del globo, lo que a su vez ha contribuido a un aumento del nivel del mar en todo el mundo. Todo ello ha producido cambios en el comportamiento de algunas especies de animales y vegetales debidos a la alteración de sus ciclos vitales. Sin embargo, el calentamiento global no es uniforme en todo el planeta, encontrándose áreas en las que se observa un aumento y áreas en las que se ha producido una disminución de la temperatura.

Estos fenómenos han tenido consecuencias importantes en la composición de las uvas, observándose una descompensación entre la madurez fenólica y la madurez industrial de las mismas. Así, se generan cosechas tempranas que dan lugar a mostos con una elevada concentración de azúcares y una baja concentración de ácidos. Esto conduce a vinos con un elevado contenido en etanol, de elevado pH y baja AT.

Un ejemplo de los efectos del cambio climático es el que ha ocurrido en la región vitivinícola de la Rioja, donde en los últimos años se ha observado un aumento de 0.4 unidades de pH en los vinos, registrándose actualmente valores de pH de entre 3.6-3.8 frente a los valores de 3.2-3.4 que se registraban hace 20 años [217]. También se ha comprobado que la fecha media de inicio de la maduración de las uvas se ha adelantado aproximadamente 3 semanas desde 1976 a 2006 [218]. En Australia la maduración de la uva se ha adelantado en 0.5-3.1 días por año entre 1993 y 2006 [219]. Como otra evidencia de los efectos del cambio climático, se ha visto que la AT ha descendido de 6 a 4 g/L expresado como g/L H₂SO₄ y el pH se ha incrementado de 3 a 3.3 en el momento de la vendimia en el sur de Francia desde 1980 a 2001 [220].

En las uvas se ha observado que la concentración de azúcares, aminoácidos y compuestos fenólicos ha aumentado durante la maduración, mientras que el contenido en ácidos orgánicos, particularmente el ácido málico, ha disminuido [221-223]. Además, al alargarse el periodo con temperaturas más elevadas, la tasa metabólica de la planta aumenta durante la maduración del fruto, lo cual afecta a la acumulación de ciertos metabolitos en las uvas, como el potasio. El potasio entra en las células de la uva mediante un fenómeno de antiporte con protones que genera un aumento directo del pH en las mismas [2, 217, 222, 224-226]. También se produce una menor síntesis de antocianidinas en las uvas, por lo cual las uvas de zonas más cálidas presentan un color menos intenso [227, 228]. En cuanto a los aromas, las elevadas temperaturas propician menores niveles de precursores aromáticos varietales en las uvas, a concentraciones equivalentes de azúcares [229, 230].

A su vez, los fenómenos que ocurren en las uvas debidos al cambio climático tienen importantes consecuencias sobre la vinificación. Por un lado, las elevadas temperaturas y un pH del mosto elevado potencian las reacciones de oxidación en los estadios prefermentativos

[216, 231, 232]. Las elevadas concentraciones de azúcar en las uvas y la consiguiente alta concentración de etanol durante la FA afectan de forma importante a la vinificación. Concentraciones elevadas de azúcares pueden causar inhibición del crecimiento o la lisis de microorganismos a causa del estrés osmótico, lo cual puede traducirse en paradas fermentativas [232]. En uvas alteradas, bacterias acéticas y lácticas y algunas levaduras no-*Saccharomyces* que pueden desarrollarse durante las paradas de fermentación producen ácido acético a partir de los azúcares no fermentados. La FML también se ve afectada por los niveles elevados de alcohol, ya que las BL se encuentran más inhibidas en estas condiciones porque principalmente la integridad de su membrana se ve afectada. Las paradas en la FML alteran el desarrollo de la vinificación y retrasan el envejecimiento y la estabilización [28, 167, 233]. Sin embargo, el pH más elevado que presentan actualmente los vinos favorecería la FML y el metabolismo de los aminoácidos, lo que supone un mayor aumento del pH [87].

Además de las implicaciones organolépticas directas que supone la falta de acidez (falta de frescura) también tiene consecuencias tecnológicas: los mostos de baja acidez y pHs elevados son mucho más susceptibles a las alteraciones microbianas, y por tanto a sufrir desviaciones organolépticas importantes. El riesgo de alteración es mayor en estadios tempranos de la fermentación, debido a que unos niveles bajos de etanol no garantizan la estabilidad microbiológica. Estas condiciones también permitirían el crecimiento incontrolado de BL o levaduras alterantes como *Dekkera/Brettanomyces* que pueden aumentar el riesgo de producción de toxinas (aminas biógenas) o de provocar alteraciones organolépticas (fenoles volátiles) [234-236]. La competición por los nutrientes entre los microorganismos no deseados y las levaduras fermentativas puede dar lugar a paradas fermentativas. Aunque estas paradas pueden ser reconducidas con la adición de nutrientes, no es fácil evitar la producción de metabolitos indeseables como el ácido acético, debida a la proliferación de microorganismos peligrosos. También pueden formarse por esta causa otros metabolitos como el acetaldehído o el piruvato [237], los cuales pueden combinarse con el SO₂ disminuyendo su eficiencia. Además, recientes estudios relacionan el clima cálido con los niveles altos de ocratoxina A en vinos [238].

Otra consecuencia del aumento de pH es que una gran parte del SO_2 está disociado y por tanto tiene menor poder antiséptico. El vino puede estabilizarse mediante la adición de SO_2 pero para un vino de pH 4.0 la concentración de SO_2 libre requerida para la estabilización es de 95-126 mg/L, mientras que para el mismo vino con pH 4.2 es de 150-200 mg/L, concentración que excede los límites legales en varias legislaciones. Por este motivo habría que reconsiderar los máximos legales admitidos de SO_2 en la actual situación en la que es muy común la obtención de vinos de pH alto. Ello entraría en controversia con la tendencia existente en la Unión Europea de disminuir la concentración de este compuesto [216].

Por último, la temperatura elevada facilita la disolución de oxígeno en el vino [167] y con ello el pardeamiento del mismo [239-241].

3.2. La importancia de la acidez y del contenido en ácidos del vino

Un ácido es una especie química hidrogenada, cuya disolución en agua produce hidrogeniones. El logaritmo de la concentración de hidrogeniones es lo que definimos como el pH, que es una forma de cuantificar la acidez real del medio [242].

La acidez es un concepto que engloba al conjunto de todas las sustancias de carácter ácido presentes en un medio, y es uno de los factores que condiciona las características gustativas del vino. Si es baja, los vinos son planos y sin frescor, y si es demasiado alta los vinos resultan agresivos. Además, la actividad de ciertos enzimas vegetales como polifenol oxidasas, pectinasas y proteasas, y también el metabolismo de levaduras y bacterias están influenciados por la acidez del mosto o del vino [242].

Los ácidos presentes en el mosto y en el vino son ácidos débiles cuyas funciones ácidas están parcialmente salificadas [242]. Proviene de la uva o de los procesos metabólicos llevados a cabo por los microorganismos. Se han descrito numerosos ácidos orgánicos en el vino, de los cuales, los que se presentan en mayor concentración son el ácido tartárico, el ácido málico y el ácido cítrico. Todos ellos tienen su origen en la uva.

El ácido tartárico es el ácido más abundante y el más fuerte de entre todos los ácidos del vino. Es el único de entre todos los poliácidos que tiene parcialmente salificados todos sus grupos carboxílicos con potasio y con calcio, generando sales poco solubles que pueden precipitar [242]. En las uvas maduras se puede encontrar en cantidades variables de 3.5 hasta 11.5 g/L. Las altas temperaturas hacen que se catabolicen grandes cantidades de este ácido durante la maduración, mientras que la humedad y las bajas temperaturas hacen que aumente su concentración en los frutos. Se encuentra en la forma isomérica L(+), y es en buena parte el responsable del pH del mosto y del vino. Las sales de este ácido pueden insolubilizarse provocando pérdida del mismo por precipitaciones en el vino cuando disminuye la temperatura o cuando el grado alcohólico es elevado [243].

El ácido málico se encuentra menos disociado que el tartárico, sólo en uno de sus grupos carboxílicos. Las sales de este ácido son solubles por lo que no presenta problemas de precipitación. Se encuentra en la forma isomérica L-málico en cantidades de 1-5 g/L en uvas maduras. El ácido málico contribuye en menor medida al pH que el ácido tartárico [243]. Tiene un sabor herbáceo poco agradable

El ácido cítrico se encuentra en baja concentración, en torno a 0.2-0.5 g/L, y debido a esto no influye de forma significativa en el contenido total de ácidos ni en el pH [243].

Además, la vid es capaz de sintetizar otros ácidos que se presentan en las uvas en cantidades muy inferiores como el ácido glioxílico, cetoglutárico, galacturónico, fumárico, glicólico, glicérico, oxálico, pirúvico y oxalacético. Además, como consecuencia de la actividad microbiana se forman otros ácidos como el succínico, láctico, acético y glucónico [243].

3.3. Métodos para aumentar la acidez de los vinos con déficit de ácidos

3.3.1. Métodos físicos

Una técnica de acidificación física de vinos consiste en el tratamiento de los mismos con resinas de intercambio iónico. Este método está regulado por el reglamento 6/76 de la OIV dedicados a los métodos de acidificación de vinos, y OENO 1/93 y OENO 447/2011 dedicados a

Introducción

la estabilización tartárica de los mismos mediante esta técnica. En este reglamento se exige que la disminución del pH producida sea inferior a 0.3 unidades y que el pH alcanzado tras el tratamiento no sea menor a 3.0. Esta operación consiste en pasar el vino a través de una columna de resina polimerizada que actúa como un polielectrolito insoluble, en el cual se eliminan de forma parcial los cationes calcio y potasio del vino (Figura 5). Las resinas utilizadas tienen en su interior un ácido mineral, como el ácido sulfúrico, fijando hidrogeniones, los cuales se intercambian por los cationes del vino. Con ello se consigue por una parte una acidificación con una importante bajada de pH, y al mismo tiempo un descenso del calcio y del potasio, protegiendo al vino frente a precipitaciones tartáricas que provocarían un descenso adicional de la acidez. Una vez realizado el intercambio de iones, la resina se regenera con el ácido mineral, iniciándose de nuevo el ciclo de trabajo. Con este sistema se pueden lograr notables modificaciones del pH del vino, sin los inconvenientes que presenta la utilización directa de ácidos minerales, cuya adición, además, está prohibida. Se pueden obtener descensos de pH de hasta 0.2 unidades sin alterar las condiciones del vino. La OIV especifica que este tratamiento sólo debe realizarse para conseguir la estabilización tartárica del vino aunque además consiga disminuir el pH de los vinos de baja AT y el contenido en cationes [58].

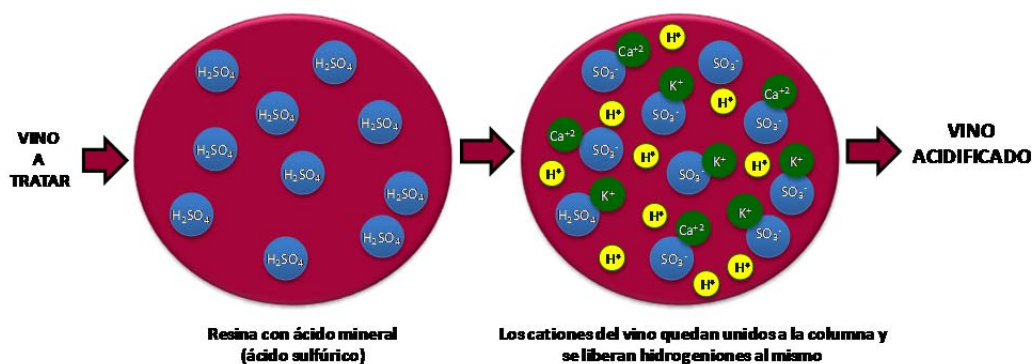


Figura 5. Acidificación de vinos mediante el tratamiento con resinas de intercambio iónico.

Otra alternativa física consiste en el tratamiento de los vinos por electrodiálisis (Figura 6). El reglamento OENO 361/2010 de la OIV sobre la acidificación de vinos regula este tratamiento, advirtiendo que la acidificación por electrodiálisis no debe usarse para ocultar fraudes y que la AT final de los vinos tratados no debe exceder de 54 meq/L o 4 g/L expresados

en ácido tartárico. Es un método físico que se basa en la extracción de iones del vino bajo la acción de un campo eléctrico. Los procedimientos con electromembranas permiten extraer los iones de las soluciones. Utilizan membranas de permeabilidad selectiva a través de las que la transferencia de los iones está garantizada por la ley de Coulomb mediante la aplicación de una corriente eléctrica continua entre dos electrodos a cada uno de los lados de las membranas semipermeables. Las membranas bipolares están constituidas de una cara aniónica y otra catiónica superpuesta. Esta doble membrana, cuidadosamente asociada a una membrana monopolar catiónica o aniónica constituye un compartimiento permeable o impermeable sólo a aniones o sólo a cationes, en función del tipo de membranas asociadas. De esta manera, la asociación de membranas bipolares a membranas catiónicas conduce a la eliminación de cationes del vino, como el calcio y el potasio, y a la retención de aniones. Esta operación conduce a la acidificación por disminución del pH. La aplicación de esta técnica en enología permite aumentar la acidez total del vino, obtener vinos con características organolépticas equilibradas y garantizar una buena evolución bioquímica en el almacenamiento del vino.

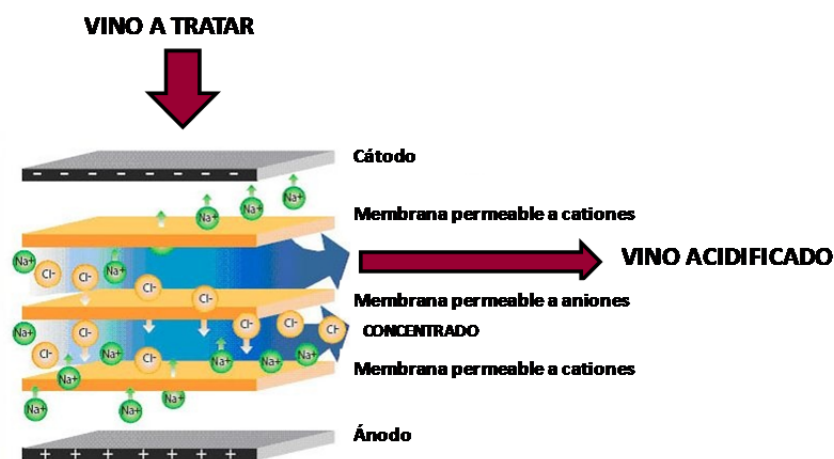


Figura 6. Acidificación de vinos mediante el tratamiento con resinas de intercambio iónico.

3.3.2. Métodos químicos

El uso de la acidificación química en enología está sujeto a un gran número de reglamentaciones redactadas por la OIV, que se engloban en el reglamento 4/99 OENO 14/01

de acidificación de vinos. Además, para los países miembros de la UE, la acidificación está limitada por el Reglamento del Consejo en el que se regula la organización del mercado vitivinícola sobre “Prácticas y tratamientos enológicos autorizados”. Los puntos principales de este reglamento son:

- La práctica de acidificación está permitida en las zonas vitícolas CII, CIIa y CIIb, descritas en el anexo III del Reglamento (CE) nº 1493/1999, entre las cuales se encuentra España.
- La acidificación solamente podrá realizarse hasta el límite máximo de 1.5 g/L, expresado en ácido tartárico, o 20 meq/L, y se podrá realizar en uva fresca, mosto de uva parcialmente fermentado y vino en proceso de fermentación.
- En vinos, la acidificación máxima permitida es de 2.5 g/L expresado en ácido tartárico o 33.3 meq/L.
- La acidificación y aumento artificial del grado alcohólico natural, así como la acidificación y desacidificación de un mismo producto, se excluyen mutuamente.
- La acidificación ha de realizarse mediante la adición directa de ácidos orgánicos autorizados, estando prohibida la utilización de ácidos minerales. Pueden usarse el ácido láctico, el ácido L(-)-málico o DL-málico, el ácido L(+)- tartárico y el ácido cítrico.
- La adición de ácidos no debe realizarse con fines fraudulentos.
- Los ácidos sólo se podrán adicionar al vino bajo condiciones de acidez inferiores a 54 meq/L o 4 g/L expresado en ácido tartárico. Cuando los ácidos sean adicionados a mostos o vinos, la dosis acumulativa no debe exceder los límites anteriores.

Los ácidos orgánicos autorizados por la OIV para realizar acidificación química de vinos son el tartárico, el málico, el cítrico y el láctico, coincidiendo con la legislación europea.

El ácido tartárico es el principal agente acidificante. La forma natural, el L(+)-tartárico, es la que debe utilizarse, quedando excluidas las otras formas isoméricas de este ácido, especialmente el racémico de síntesis o DL-tartárico. Éste deberá de ser de origen vegetal, extraído de productos vinícolas y cumplir los criterios de pureza fijados en la Directiva 96/77/CE de la Comisión. Este ácido tiene alto poder acidificante, ya que teóricamente, 1 g/L de ácido tartárico es capaz de aumentar la acidez total del vino en 0.65 g/L expresada en ácido

sulfúrico o 1 g/L en ácido tartárico. Es recomendable realizar la corrección de la acidez con tartárico en el mosto inicial, inmediatamente tras la vendimia. La práctica de acidificación tardía en momentos próximos al embotellado no es aconsejable, ya que se manifiesta en los vinos como una sensación secante y de dureza en boca, propia de este ácido [58].

La adición de ácido cítrico está limitada por la OIV mediante el reglamento OENO 23-2000 a un contenido total de 1 g/L, cifra que debe incluir la pequeña cantidad proveniente de las uvas, que se estima alrededor de 0.3 g/L [243]. Debe evitarse su empleo como ácido corrector en la vendimia, pues puede ser rápidamente metabolizado por las BL en caso de eventuales paradas de fermentación o de una posterior FML, pudiendo elevar la AV de los vinos. Su utilización se reduce a la corrección final de la acidez de los vinos blancos antes del embotellado, ya que les comunica agradables sensaciones de frescura y sabor cítrico. La corrección de acidez de los vinos tintos con cítrico no es aconsejable, debido a que aumenta el riesgo de ataques bacterianos [58].

La acidificación con ácido láctico está legalizada desde el 1 de Agosto de 2009 en base a las prácticas enológicas aprobadas por la OIV mediante el reglamento OENO 29-2004 [243]. El ácido láctico fue descubierto por el químico sueco Scheele en 1780 en la leche. Su composición química responde al nombre de 2-hidroxi-propanoico y su fórmula química es $C_3H_6O_3$. Tiene un peso molecular de 90, un pKa de 3.8 y posee un carbono asimétrico, con lo cual puede adoptar dos formas ópticamente activas, L(+) y D(-). Es un líquido incoloro o ligeramente amarillento, con aspecto de sirope, de sabor netamente ácido con gusto ligeramente lácteo. Sus propiedades organolépticas permiten su aplicación en vinificación, ya que tiene un perfil sávido de tipo ácido suave de efecto persistente prolongado. Además, no enmascara el sabor de otros sabores y evoluciona produciendo ésteres de aromas muy agradables. Se puede añadir tanto a mostos como a vinos, según la reglamentación de la OIV. Este ácido puede generar un máximo de acidez de 1.5 g/L expresado en ácido tartárico o 20 meq/L en mostos, y un máximo de 2.5 g/L en ácido tartárico o 33.3 meq/L en vinos. Diversas investigaciones llevadas a cabo, concluyen que la aplicación de este ácido para acidificación de vinos y mostos presenta mayores beneficios que el uso de los anteriores ácidos descritos. Por un lado, confiere a los vinos estabilidad química y microbiológica, y además mejora sus

cualidades sensoriales. También mejora la vinificación facilitando la clarificación cuando se combina con bajas dosis de SO₂ y garantiza una adecuada evolución de los aromas durante el envejecimiento. La adición de este ácido garantiza la armonía de los ácidos del vino, mejorando también el brillo, vivacidad, equilibrio y frescura del mismo. Además, permite un aumento notable de la AT y de la capacidad tampón, al conservar el contenido en potasio del vino. Su adición provoca una disminución del pH menor que la conseguida con el ácido tartárico, pero siempre predecible y calculable, a diferencia de la del tartárico, ya que éste no se pierde en forma de sales insolubles, y por tanto se puede adicionar antes del embotellado [243].

3.3.3. Métodos biológicos

Como alternativa a la acidificación química ciertos autores han considerado alternativas biológicas. La ventaja de estas metodologías es que no están sujetas a las restricciones legales estrictas de los métodos químicos, que son los empleados de forma habitual. Además, esta alternativa resulta válida también para acidificar vinos ecológicos, ya que no utiliza compuestos químicos no autorizados en este tipo de vinificación.

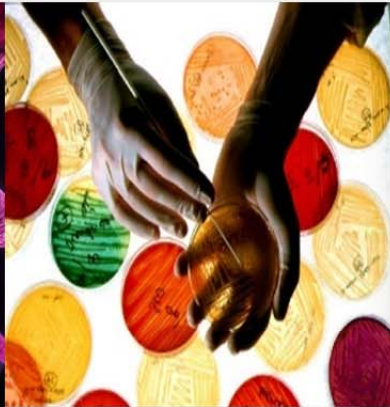
Una de las primeras estrategias desarrolladas para acidificar biológicamente los vinos fue el uso de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* modificada genéticamente. Esta levadura se construyó clonando en un plásmido multicopia el gen que codifica para la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) de *Lactobacillus casei* (organismo GRAS). Esta levadura expresa el gen LDH bajo el promotor propio del gen que codifica para la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH1). Mediante este proceso, la levadura convierte la glucosa en alcohol y lactato simultáneamente, de manera que el 20% de la glucosa se convierte en este ácido [244]. En vinos obtenidos con esta fermentación ácido-alcohólica se obtienen entre 2.6 y 8.6 g/L de ácido L(+)-láctico. En comparación con la FA clásica, el uso de esta levadura proporciona un descenso del pH de 0.2-0.35 unidades de pH, y una concentración de 5-8 g/L de ácido láctico. Además, se reduce un 0.25% (vol/vol) la concentración final de etanol como resultado de la desviación del carbono hacia la producción de ácido láctico. Se ha observado una tasa de

fermentación más lenta en esta levadura, pero la capacidad para completar la FA no resulta afectada [245]. Sin embargo, el uso de esta levadura no está muy extendido, quedando restringido a USA y Canadá. Ello se debe al uso de un organismo modificado genéticamente (OMG), que no está muy aceptado en Europa y que obligatoriamente debe ser declarado en el etiquetado del producto.

Otra alternativa ha sido la aplicación en la vinificación de levaduras seleccionadas productoras de altas cantidades de ácido málico, que sean capaces de aumentar la AT del vino durante la FA. Urrutia y col. (2005) llevaron a cabo la selección de cepas de *S. cerevisiae* productoras de ácido málico y las inocularon en mostos pobres de este ácido para que aumentasen la acidez de los vinos resultantes. Las mejores cepas lograron niveles de producción de ácidos de entre 0.91-1.02 g/L, lo que dio lugar a una disminución significativa del pH de los vinos [246].

Para llevar a cabo el mismo fin, también se han desarrollado estrategias que implican la inoculación de BL en fases tempranas de la vinificación, con el fin de producir una acidificación biológica en el vino. Val y col. (2002) seleccionaron BL autóctonas de las especies *L. plantarum*, *L. mali* y *L. casei* procedentes de diferentes zonas vitivinícolas españolas de clima cálido. La adición conjunta de levaduras y bacterias seleccionadas permitió aumentar la AT a los vinos. Estos autores demostraron que los vinos acidificados de esta manera presentaban mejores propiedades organolépticas que los controles no inoculados y que los vinos acidificados con ácido tartárico [247].

Objetivos



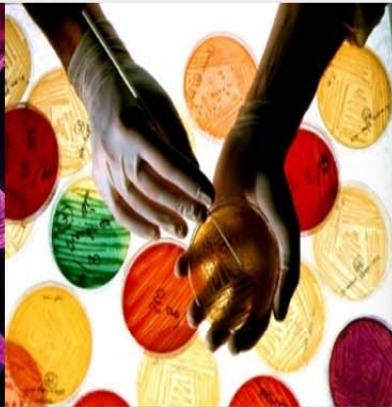
La búsqueda de soluciones para paliar el déficit de acidez total y de ácidos orgánicos en los mostos de zonas cálidas constituye un tema de investigación de primera magnitud para la OIV, tal como quedó reflejado en la Reunión de los Grupos de Expertos en Tecnología y Microbiología del Vino de dicho organismo, celebrada en París en 1997.

Una de las estrategias para tratar de solucionar el problema de baja acidez de los mostos consiste en potenciar la acidificación mediante el uso de bacterias lácticas, previamente seleccionadas para su uso en vinificación.

Los objetivos generales que se han abordado en este trabajo son los siguientes:

- Seleccionar cepas del género *Lactobacillus* productoras de elevados niveles de ácido láctico para llevar a cabo la acidificación biológica de mostos de baja acidez.
- Desarrollar y optimizar un procedimiento de acidificación biológica transferible a bodega.
- Evaluar el comportamiento y características de los inóculos, producidos según procedimientos comerciales estándar, en vinificaciones a escala de laboratorio y de planta piloto.
- Determinar las posibilidades de transferencia industrial del procedimiento mediante evaluación de su comportamiento a nivel semiindustrial.

Material y Métodos



1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Los microorganismos utilizados en este trabajo proceden de la colección Enolab, perteneciente al grupo de investigación del mismo nombre de la Universidad de Valencia, y de la empresa Lallemand. La relación de los mismos se muestra en la Tabla 7.

La conservación a medio plazo de las cepas se realizó por congelación a -20°C . Para llevar a cabo este procedimiento, las cepas de BL se cultivaron en medio MRS líquido hasta el final de la fase exponencial de crecimiento. Se mezclaron en un criotubo volúmenes iguales de células crecidas en este medio con glicerol estéril al 15% (v/v). La mezcla se homogeneizó por agitación y se congeló a -20°C . Las cepas así conservadas se mantuvieron durante un periodo de 6 a 8 meses.

Los cultivos iniciadores comerciales utilizados se mantuvieron almacenados a -20°C .

2. MEDIOS DE CULTIVO

2.1. Medios generales

- **MRS + Cisteína:** para el crecimiento de BL de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*

- MRS Broth (Scharlau) 52 g/L
- L-Cisteína (Sigma) 0.5 g/L
- Agar (Pronadisa) 20 g/L (sólo para medio sólido)
- Agua destilada 1L

El pH del medio se ajustó a 6.5 o a 3.5 con NaOH 10N y HCl 10N, respectivamente, y se esterilizó mediante autoclavado a 115°C durante 30 minutos.

Para evitar el crecimiento de levaduras procedentes de muestras de vinificaciones naturales o de ensayos con cultivos mixtos de levaduras y bacterias se añadieron al medio 0.075 g/L de natamicina (0.15 g/L de Actistab, Gistbrocades) disuelta en dimetil sulfóxido.

Tabla 6. Cepas microbianas utilizadas en el trabajo.

CEPA	ESPECIE	FUENTE
Enolab 4258	<i>L. brevis</i>	Colección Enolab
Enolab 4323	<i>L. vini</i>	Colección Enolab
Enolab 4538	<i>L. plantarum</i>	Colección Enolab
Enolab 4539	<i>L. paracasei</i>	Colección Enolab
Enolab 4540	<i>L. paracasei</i>	Colección Enolab
Enolab 4541	<i>L. paracasei</i>	Colección Enolab
Enolab 4542	<i>L. paracasei</i>	Colección Enolab
Enolab 4555	<i>L. satsumensis</i>	Colección Enolab
Enolab 4606	<i>L. plantarum</i>	Colección Enolab
Enolab 4607	<i>L. plantarum</i>	Colección Enolab
Enolab 4608	<i>L. plantarum</i>	Colección Enolab
Enolab 4609	<i>L. plantarum</i>	Colección Enolab
Enolab 4610	<i>L. plantarum</i>	Colección Enolab
Enolab 4611	<i>L. plantarum</i>	Colección Enolab
Enolab 4612	<i>L. plantarum</i>	Colección Enolab
Enolab 4613	<i>L. plantarum</i>	Colección Enolab
Enolab 4614	<i>L. plantarum</i>	Colección Enolab
Enolab 4615	<i>L. plantarum</i>	Colección Enolab
Enolab 4616	<i>L. plantarum</i>	Colección Enolab
Enolab 4617	<i>L. plantarum</i>	Colección Enolab
Enolab 4618	<i>L. plantarum</i>	Colección Enolab
Enolab 4619	<i>L. plantarum</i>	Colección Enolab
Enolab 4620	<i>L. plantarum</i>	Colección Enolab
Enolab 4634	<i>L. mali</i>	Colección Enolab
Enolab 4635	<i>L. pantheris</i>	Colección Enolab
Enolab 4636	<i>L. mali</i>	Colección Enolab
Enolab 4637	<i>L. mali</i>	Colección Enolab
Enolab 4638	<i>L. pantheris</i>	Colección Enolab
Enolab 4639	<i>L. plantarum</i>	Colección Enolab
Enolab 4672	<i>L. plantarum</i>	Colección Enolab
Enolab 4673	<i>L. mali</i>	Colección Enolab
Enolab 4674	<i>L. plantarum</i>	Colección Enolab
X1b	<i>L. hilgardii</i>	Colección Enolab ^a
ST2A	<i>L. buchneri</i>	Colección Enolab ^b
Enoferm V22 [®]	<i>L. plantarum</i>	Lallemand
Lalvin VP41 [®]	<i>O. oeni</i>	Lallemand
Uvaferm VN [®]	<i>S. cerevisiae</i>	Lallemand
Enoferm M2 [®]	<i>S. cerevisiae</i>	Lallemand
Lalvin QA23 [®]	<i>S. cerevisiae</i>	Lallemand
Lalvin Rhône 4600 [®]	<i>S. cerevisiae</i>	Lallemand

^a Manca de Nadra y col. , 2001; ^b Sumner y col., 1985.

- **MLO:** para el crecimiento de *Oenococcus oeni*.
 - Triptona (Cultimed) 10 g/L
 - Extracto de levadura (Scharlau) 5 g/L
 - Glucosa (Panreac) 10 g/L
 - Fructosa (Panreac) 5 g/L
 - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Panreac) 0.2 g/L
 - $MnSO_4 \cdot H_2O$ (Panreac) 0.05 g/L
 - Citrato diamónico (Panreac) 3.5 g/L
 - L-Cisteína (Sigma) 0.5 g/L
 - Extracto de zumo de tomate^a 300 mL/L
 - Tween 80 (Panreac) 1 mL/L
 - Agar (Pronadisa) 20 g/L (sólo para medio sólido)^b
 - Agua destilada 1L

El pH del medio se ajustó a 4.8 con HCl 10N, y se autoclavó a 115°C durante 30 minutos.

Para evitar el crecimiento de levaduras en cultivos mixtos se añadieron al medio 0.075 g/L de natamicina (0.15 g/L de Actistab, Gistbrocades) disuelta en dimetil sulfóxido.

^aEl extracto de zumo de tomate se preparó macerando a 4°C durante toda la noche una mezcla de 1L de zumo de tomate comercial y 2 L de agua destilada. El macerado se centrifugó a 14000 rpm durante 20 minutos en una centrífuga Beckman Coulter Avanti J-E. El sobrenadante se recogió y se filtró con papel de filtro. Este extracto se pudo conservar a -20°C hasta su utilización.

^bPara la preparación del medio sólido se disolvieron todos los ingredientes para 1L excepto el agar en 500 mL de agua destilada. El agar correspondiente a 1L de medio se autoclavó por separado disuelto en 500 mL de agua destilada para evitar su hidrólisis a pH ácido. Una vez autoclavado se mezcló el agar en caliente con el resto de ingredientes del MLO.

- **GPYA:** para el crecimiento de levaduras.
 - Glucosa (Panreac) 40 g/L
 - Peptona micológica (Pronadisa) 5 g/L
 - Extracto de levadura (Scharlau) 5 g/L
 - Agar (Pronadisa) 20 g/L (sólo para medio sólido)
 - Agua destilada 1L

Se esterilizó mediante autoclavado a 115°C durante 30 minutos.

- **ACE:** para el crecimiento de bacterias acéticas.
 - Glucosa (Panreac) 25 g/L
 - Extracto de levadura (Scharlau) 10 g/L
 - Agar (Pronadisa) 20 g/L (sólo para medio sólido)
 - Agua destilada 1L

Se esterilizó mediante autoclavado a 115°C durante 30 minutos.

- **PCA:** para crecimiento de bacterias mesófilas
 - Glucosa (Panreac) 1 g/L
 - Extracto de levadura (Scharlau) 2.5 g/L
 - Triptona (Cultimed) 5 g/L
 - Agar (Pronadisa) 20 g/L (sólo para medio sólido)
 - Agua destilada 1L

Se esterilizó mediante autoclavado a 115°C durante 30 minutos.

2.2. MDBmod: Medio para la detección y cuantificación de aminas biógenas

Está basado en un medio previamente descrito por Landete y col., 2005 [74].

- Extracto de carne (Pronadisa) 8 g/L
- Triptona (Cultimed) 5 g/L
- Extracto de levadura (Scharlau) 4 g/L
- Glucosa (Panreac) 5 g/L
- Fructosa (Panreac) 5 g/L
- Tween 80 (Panreac) 0.5 g/L

- MgSO_4 (Panreac) 0.66 g/L
- MnSO_4 (Panreac) 0.165 g/L
- FeSO_4 (Panreac) 0.075 g/L
- CaCO_4 (Panreac) 0.1 g/L
- Piridoxal fosfato (Sigma) 0.25 g/L
- Púrpura de bromocresol (Panreac) 0.03 g/L
- Histidina (Sigma) 2 g/L
- Arginina (Sigma) 2 g/L
- Tirosina (Sigma) 2 g/L

Se ajusta el pH a 5.2 y se esteriliza mediante autoclavado a 115°C durante 30 minutos.

2.3. Medios basados en mosto para selección de cepas y evaluación del crecimiento, acidificación y consumo/producción de compuestos

- Medio M

- Mosto concentrado de la variedad Airén 250 mL/L
- Agua destilada 750 mL/L

El pH se ajustó a 3.5 con HCl 10N y se esterilizó mediante autoclavado a 115°C durante 30 minutos.

La composición del medio M fue: 110 g/L de glucosa, 99 g/L de fructosa, 1.77 g/L de ácido málico, 0.2 g/L de ácido cítrico y 1.5 g/L de ácido tartárico.

- Medio MEL

- Medio M 1L
- Extracto de levadura (Scharlau) 5 g/L

- Medio MC (Mosto blanco suplementado con cortezas de levadura)

- Medio M 1L
- Nutrient Vit End™ (Lallemand) 0.3 g/L

- Medio MR

- Mosto concentrado rosado 250 mL/L
- Agua destilada 750 mL/L

Se esterilizó mediante autoclavado a 115°C durante 30 minutos.

- Medio MNE

- Mosto concentrado de la variedad Airén 250 mL/L
- Agua destilada 750 mL/L

El pH no se ajustó ni se esterilizó.

- Medio BNE

- Mosto fresco de la variedad Bobal 1L.

El pH no se ajustó ni se esterilizó.

- Medio BE

- Mosto fresco de la variedad Bobal 1L.

Se esterilizó mediante autoclavado a 115°C durante 30 minutos.

- Medio A+B

- Medio M 500 mL/L
- Medio BE 500 mL/L

- Medio A+T (Medio mosto Airén con Taninos)

- Medio M 1L
- Tanicol® (Agrovin) 3 g/L

3. TÉCNICAS PARA ESTIMAR EL CRECIMIENTO

3.1. Recuento de células totales mediante microscopía

Los recuentos de células totales se realizaron en Cámara de Thoma mediante un microscopio de contraste de fases (Leica DMB 5000).

3.2. Recuento de células viables en placa

El recuento de bacterias viables se realizó tras diluir decimalmente las muestras con solución salina (9 g/L de NaCl, Panreac). Se sembraron 100 µL de las diluciones adecuadas sobre la superficie de los medios sólidos (MRS o MLO) y se extendieron con asa Digrafsky. Se incubaron las placas durante 3-4 días a 28°C hasta observar la aparición de colonias aisladas. Se llevó a cabo el recuento de colonias sobre las placas y a partir de ahí se obtuvo el número de bacterias viables, que se expresó como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

El recuento de levaduras viables se realizó siguiendo el mismo procedimiento anterior, realizándose la siembra en placas de medio GPYA.

3.3. Recuento de células vivas y muertas mediante microscopía de fluorescencia

En paralelo al recuento en placa anteriormente descrito se llevó a cabo un recuento microscópico de células vivas y muertas utilizando para ello el kit LIVE/DEAD® BacLight™ (Invitrogen). Este kit comercial se compone de dos fluoróforos, el SYTO9® que emite fluorescencia verde y el ioduro de propidio que emite fluorescencia roja. El SYTO9® penetra en todas las células, tanto vivas como muertas, pero el ioduro de propidio solo penetra en las células con la membrana celular dañada, de manera que al microscopio de fluorescencia las células viables se observaron de color verde y las muertas de color rojo. Para realizar dicho recuento se diluyeron las muestras de forma adecuada hasta obtener una concentración aproximada de 10^5 - 10^6 células totales/mL. Un mL de los cultivos diluidos hasta alcanzar la

concentración anterior se centrifugó a 8000 rpm en una centrífuga Prismr (Labnet International Inc.) durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante resultante. Las células sedimentadas se resuspendieron en 100 μL de agua Milli U (Millipore), a los que se añadieron 0.15 μL de SYTO9[®] y 0.15 μL de yoduro de propidio. Transcurridos 15-20 minutos de incubación con los fluorocromos en oscuridad, se depositó 1 μL de cada muestra en los pocillos de un portaobjetos gelatinizado para su observación en un microscopio de epifluorescencia Leica DMRB, y equipado con una lámpara de mercurio de alta presión de 100 W.

Para realizar los recuentos de células vivas y muertas se obtuvieron diez imágenes diferentes (diferentes campos) de las preparaciones mediante una cámara fotográfica acoplada al microscopio. A partir de estas imágenes y utilizando el programa informático Adobe Photoshop[®] se estimó la concentración de células vivas y muertas y se determinó la proporción de ambas en la muestra.

3.4. Medida del crecimiento mediante lectura de la D.O. 600 nm de cultivos líquidos

El crecimiento en cultivos líquidos se evaluó mediante medición de la D.O. 600 nm, bien directamente en tubos transparentes de polipropileno, bien en microplacas de 96 pocillos (Falcon[™] Microplates, BD). Para la lectura del crecimiento en los tubos se utilizó un espectrofotómetro CE 373 (CECIL), ajustando la longitud de onda de lectura a 600 nm y estableciendo como blanco el medio de cultivo sin inocular. Se realizaron lecturas a diferentes intervalos de tiempo.

Para observar el crecimiento de los cultivos realizados en microplacas, se monitorizó de forma continua la D.O. 600 nm en un lector de microplacas FLUOstar Optima Microplate Reader (BGM LABTECH, GmbH), equipado con un agitador y unidad de control de temperatura. Se ajustó la longitud de onda de lectura a 600 nm y se estableció como blanco el medio de cultivo sin inocular, como en el caso anterior. Se obtuvieron los datos mediante un programa informático adaptado al lector. Los datos obtenidos en uno y otro caso se

exportaron a Microsoft Office Excel® para la construcción de las curvas de crecimiento a partir de las cuales determinar los parámetros cinéticos característicos de cada una de ellas.

4. TÉCNICAS DE ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO

4.1. Medida del pH

Para medir el pH de un medio de cultivo o de una muestra de mosto/vino, se extrajo una alícuota, se centrifugó a 10000 rpm en una centrífuga Prismr (Labnet International Inc.) durante 10 minutos y se midió el pH del sobrenadante mediante un electrodo SenTix 81 (WTW) acoplado a un pHmetro pH330i (WTW). En el caso de medidas de pH en ensayos realizados en microplacas se utilizó un electrodo Slimtrode (Hamilton) acoplado al mismo pHmetro, sumergiendo directamente el electrodo en los diferentes pocillos.

4.2. Análisis de compuestos mediante HPLC

Para realizar el análisis de compuestos presentes en los medios de cultivo y en mostos/vinos se utilizó un equipo HPLC. Las muestras se procesaron directamente o diluidas 1:10 en el caso de mostos, debido a su elevada concentración de azúcares. Todas las muestras (diluidas o no) se centrifugaron en una centrífuga Prismr (Labnet International Inc.) a 10000 rpm durante 10 minutos para eliminar células e impurezas, y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de nylon de 0.45 µm (Agilent). Las muestras así procesadas se introdujeron en viales de vidrio de 2 mL con tapón de silicona (Agilent) y se analizaron mediante un equipo HPLC Agilent serie 1200, equipado con inyector automático de alto rendimiento, detector de índice de refracción, detector de longitud de onda variable G1314B/G1314C, bomba isocrática y compartimento termostatzado de columna (Agilent serie 1200). Se inyectaron 5 µL de muestra. La fase móvil consistió en una solución de 0.75 mL de H₃PO₄ del 85% de pureza (Panreac) en un litro de agua desionizada. La separación de los componentes se llevó a cabo mediante una precolumna AMINEX HPX-87H (BIORAD) unida a dos columnas de exclusión de

iones de 300 nm x 7.8 mm AMINEX HPX-87H (BIORAD). La temperatura de la columna se fijó a 70°C y el flujo de la fase móvil a 0.7 mL/min.

Mediante esta técnica se cuantificaron compuestos como glucosa, fructosa, ácido málico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido acético, ácido tartárico, etanol y glicerol.

A partir de los datos cuantitativos obtenidos se realizó el cálculo de los siguientes parámetros:

A. Consumo de azúcares

La concentración de azúcares totales en la muestra se calculó mediante la suma de las concentraciones de glucosa y fructosa de la misma, determinadas por HPLC.

El porcentaje de azúcares consumidos por los microorganismos en la muestra se calculó observando la proporción entre la concentración final de azúcares y concentración inicial en la misma.

$$\% \text{ de azúcares consumidos} = \frac{[\text{glucosa (g/L)} + \text{fructosa (g/L)}]_{\text{inicial}} - [\text{glucosa (g/L)} + \text{fructosa (g/L)}]_{\text{final}}}{[\text{glucosa (g/L)} + \text{fructosa (g/L)}]_{\text{inicial}}} \times 100$$

B. Consumo de ácido málico

El porcentaje de ácido málico consumido por los microorganismos en la muestra se calculó observando la proporción entre la concentración de ácido málico final y la concentración inicial en la misma.

$$\% \text{ de ácido málico consumido} = \frac{\text{ácido málico (g/L)}_{\text{inicial}} - \text{ácido málico (g/L)}_{\text{final}}}{\text{ácido málico (g/L)}_{\text{inicial}}} \times 100$$

C. Síntesis de ácido láctico por fermentación láctica y fermentación maloláctica

La concentración de ácido láctico total producido por las bacterias se determinó mediante el análisis de la muestra al final del ensayo por HPLC.

El ácido láctico proveniente de la FML se calculó teniendo en cuenta la estequiometría teórica de la reacción maloláctica que da lugar a 1 g de ácido láctico a partir de 1.5 g de ácido málico.

$$\text{ácido láctico (FML)} = \frac{\text{ácido málico (g/L)}_{\text{inicial}} - \text{ácido málico (g/L)}_{\text{final}}}{1.5}$$

Para la determinación del ácido láctico proveniente de la fermentación de azúcares, es decir, por fermentación láctica (FL), se halló la diferencia entre el ácido láctico total determinado por HPLC y el ácido láctico proveniente de la FML.

$$\text{ácido láctico (FL)} = \text{ácido láctico total (g/L)} - \text{ácido láctico FML (g/L)}$$

D. Consumo de ácido cítrico

El porcentaje de ácido cítrico consumido se calculó observando la proporción entre la concentración de ácido cítrico consumido y la concentración inicial del mismo en la muestra.

$$\% \text{ ácido cítrico consumido} = \frac{\text{ácido cítrico (g/L)}_{\text{inicial}} - \text{ácido cítrico (g/L)}_{\text{final}}}{\text{ácido cítrico (g/L)}_{\text{inicial}}} \times 100$$

E. Rendimiento de la fermentación láctica

El rendimiento total de la FL se determinó calculando la proporción entre el ácido láctico producido a partir de los azúcares y los azúcares consumidos en el ensayo.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{ácido láctico por FL (g/L)}}{\text{azúcares consumidos (g/L)}} \times 100$$

4.3. Análisis de compuestos volátiles mediante cromatografía de gases

Para la determinación de los compuestos aromáticos de los vinos se ha utilizado la técnica de la cromatografía de gases. El método de extracción utilizado es el que propone Herranz [248] y que se basa en el propuesto previamente por Cocito y col. [249], aunque con

ciertas modificaciones realizadas por la primera autora mencionada con el objeto de optimizar la técnica (comunicación personal).

Para el tratamiento de las muestras se realizaron una serie de pasos: se tomó 1 mL de solución de patrón interno y se aforó a 100 mL con el vino, se adicionaron 30 mL de disolvente (dietiléter y n-pentano, en proporción 2:1) y se colocó en un baño de ultrasonidos a 20°C durante 10 minutos. Se introdujo la mezcla en un embudo de decantación para conseguir la separación de las fases, se añadieron 10 mL de disolvente, se mantuvo de nuevo 10 minutos en ultrasonidos a 20°C y finalmente se dejaron separar las fases por decantación. Si era preciso, se podía repetir esta última operación otra vez. Los compuestos volátiles se recuperaron en la fase correspondiente al éter.

A continuación se reunieron los volúmenes obtenidos en el tratamiento de la muestra y se trataron con 4 g de sulfato de magnesio, cuyo efecto es deshidratante. Se filtró el volumen obtenido con un filtro de separación de fases de 0.45 μm de porosidad. Después se concentró la muestra en un rotavapor modelo Büchi R-114 sumergido en un baño de agua caliente a 40°C (modelo P Selecta Tectron 3473100). Con ello se logró la eliminación parcial del disolvente, tras lo cual, se concentró la muestra en corriente de nitrógeno hasta conseguir un volumen final de 1 mL.

Las condiciones aplicadas para la identificación de compuestos volátiles en el cromatógrafo de gases fueron: temperatura del horno 50°C durante 5 minutos, y posteriormente se incrementó hasta 225°C con diferentes rampas de 1 y 2°C/minuto. La temperatura de inyector y detector fue de 270°C, y el gas portador, hidrógeno. Se estableció un cromatograma de referencia inyectando 1 μL de una solución patrón con los componentes que se pretendía identificar. La solución patrón se preparó de acuerdo con el método empleado por Herranz y col. [248].

Se realizó la inyección de 1 μL de cada extracto por duplicado en la columna capilar ZB-WAX Plus (Phenomenex) de 60 m de longitud y 0,25 mm de diámetro interno, instalada en el cromatógrafo de gases HP-6890, dotado de detector de ionización de llama.

5. TÉCNICAS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN

La técnica molecular 16S-ARDRA (Amplification Ribosomal DNA Restriction Analysis) permite la identificación a nivel de especie de las BL [250], y por ello se ha utilizado para comprobar la identidad de las cepas bacterianas. La técnica de RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) permite la caracterización molecular a nivel de cepa (tipificación mediante “*fingerprints*”) de las BL. Ambas técnicas se han utilizado en este trabajo para comprobar la identidad y la implantación de las cepas inoculadas en los diferentes ensayos realizados.

5.1. Identificación de bacterias lácticas a nivel de especie mediante 16S – ARDRA

Esta técnica se basa en la amplificación por PCR del gen que codifica para el ARNr 16S de las BL y en la posterior digestión del fragmento amplificado con enzimas de restricción. Para llevarla a cabo se siguió el protocolo descrito por Rodas y cols. [250]. El ADN molde para la PCR se obtuvo a partir de una suspensión celular obtenida a partir de una colonia disuelta en 10 µL de agua MilliU (Millipore) estéril. A partir de esta suspensión de células se amplificó por PCR el gen que codifica para el ARNr 16S usando los cebadores pA y pH [251]. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 50 µL que contenía 200 µM de cada uno de los dNTP (Roche), 1 µM de cada cebador, 75 µM de Tris-HCl (pH 9.0), 2 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 20 mM de (NH₄)₂SO₄ y 1 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen). La PCR se llevó a cabo en un termociclador Techne PTC-100™ (M.J. Research, Watertown, USA) y el programa de amplificación utilizado fue el siguiente: desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos de: 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, y elongación final a 72°C durante 5 minutos.

El producto de la amplificación se reveló por electroforesis en un gel al 1.2% (v/v) de agarosa (SeaKem LE agarose, FMC), aplicando una corriente de 80 V durante 1 hora. Se utilizó como sistema tampón Tris-borato EDTA 0.5M, pH 8.0 [252] y como marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). El gel se tiñó con bromuro de etidio 0.5 µg/mL (MoBio) y la imagen obtenida se digitalizó mediante un captador de imagen (GelPrinter Plus, TDI).

Tal como Rodas y col. [250] describen, el fragmento amplificado se digirió mediante el enzima de restricción *MseI* (New England Biolabs, USA) siguiendo las indicaciones del proveedor. Los fragmentos de restricción se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa Seakem LE (FMC, USA) al 2% (v/v), aplicando una corriente de 80 V durante 3 horas. Se utilizó el mismo marcador de peso molecular y tampón de electroforesis que en el caso anterior. Los geles se digitalizaron de forma similar a la descrita anteriormente.

Los perfiles de restricción obtenidos se compararon con perfiles de cepas de referencia incluidos en la base de datos ENOLAB contenidos en el programa informático BioNumerics versión 6.5 (Applied Maths). El análisis de similitud de los perfiles 16S-ARDRA obtenidos se llevó a cabo utilizando el coeficiente de Dice y el método de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

5.2. Tipificación de bacterias lácticas mediante RAPD

Esta técnica se basa en la amplificación de partes repetitivas del genoma mediante el uso de un único cebador de secuencia aleatoria corta. Las amplificaciones se realizaron directamente desde colonia y utilizando el cebador Coc, descrito por Coconcelli y col. para la tipificación de bacterias del género *Lactobacillus* [253]. Cada colonia se resuspendió en 10 µL de agua Milli U estéril y se utilizó 1 µL de esta suspensión para realizar una reacción en 50 µL totales que contenía 1 µM del cebador, 200 µM de cada uno de los dNTP (Roche), 10 mM de Tris-HCl pH 8.8, 50 mM de KCl, 0.1% de Tritón X-100, 2 mM de MgCl₂, 1 U de DyNzyme™ II ADN polimerasa (Finnzymes), y 1 µL de la suspensión celular como ADN molde.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador Techne PTC-100™ (M.J. Research, Watertown, USA), siguiendo las condiciones descritas por Rodas y cols [254]. El programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos; 15 ciclos de 30 segundos a 94 °C con rampa de 0.3 °C/segundo, 30 segundos a 30 °C con rampa de 0.3 °C/segundo y 1 minuto a 72 °C con rampa de 0.3 °C/segundo; y 25 ciclos de 30 segundos a 94 °C con rampa de 0.3, 30 segundos a 30 °C con rampa de 0.3 °C/segundo y 1 minuto a 72 °C con rampa de 0.3 °C/segundo.

Los fragmentos amplificados se separaron en gel de agarosa Seakem LE (FMC, USA) al 1.2%, en las mismas condiciones de electroforesis descritas en el apartado 5.1.

El análisis de similitud entre los perfiles de RAPD de los aislados se realizó en el programa BioNumerics versión 6.5 (Applied Maths), utilizando el coeficiente de similitud de Pearson y UPGMA como método de agrupamiento.

6. EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA DETERMINAR EL CRECIMIENTO DE LAS BL Y SU CAPACIDAD ACIDIFICANTE

El objetivo de esta parte del trabajo fue diseñar un medio de cultivo de laboratorio similar a un mosto o vino real en el que realizar diversos ensayos con las BL. Para establecer la formulación más adecuada se evaluó el crecimiento de las bacterias en microplacas de 96 pocillos (Falcon™ Microplates, BD). Los pocillos se rellenaron con 200 µL de los medios de cultivo a ensayar y se inocularon las cepas de *Lactobacillus* descritas en la Tabla 7 a una concentración final de 2×10^6 UFC/mL. Se evaluó el crecimiento de las mismas en los medios de cultivo M, MEL, y MC. Los medios MRS a pH 6.5 y 3.5 se utilizaron como medios control con los que contrastar el crecimiento bacteriano en M, MEL y MC. Para evitar los fenómenos de evaporación durante el periodo de incubación en microplaca, los pocillos periféricos se rellenaron con agua destilada estéril y la microplaca inoculada se cubrió con un adhesivo sellador de microplacas (Perkin Elmer) y se selló perimetralmente con parafilm para proceder a su incubación durante una semana a 28°C. El crecimiento se determinó a partir del incremento en la D.O. 600 registrado de forma continua en el equipo FLUOstar Optima Microplate Reader, como se explicó en el apartado 3.2.

7. PROGRAMA DE SELECCIÓN DE CEPAS DE BL PARA PROMOVER LA ACIDIFICACIÓN BIOLÓGICA DEL VINO

En el programa de selección de cepas de BL para promover la acidificación biológica de vinos se consideraron criterios de selección de primer y segundo orden, a los cuales se les adjudicó una puntuación numérica. Se consideraron criterios de primer orden el que las cepas exhibiesen buen crecimiento en medio MC, el que realizaran la FML durante el periodo de crecimiento, el que disminuyeran el pH del medio de cultivo y el que dieran lugar a elevada producción de ácido láctico por FL. Así, se les otorgó 10 puntos por prueba a todas aquellas cepas que presentaron un Área Bajo la Curva (ABC) superior a 70 unidades (ver apartado 7.1), a las que generaron un descenso de pH en el medio mayor a 0.35 unidades, a las que completaron la FML durante su periodo de crecimiento, y a las que sintetizaron una cantidad superior a 12 g/L de ácido láctico a partir de los azúcares.

Como criterios de segundo orden se consideraron la resistencia a los compuestos inhibidores de BL utilizados en vinificación, como la lisozima y el anhídrido sulfuroso. Las cepas que mostraron una mayor ABC en presencia de estos inhibidores fueron puntuadas con 5 puntos.

Tras el sumatorio de puntos obtenido para cada cepa, se eligieron para llevar a cabo la acidificación las dos cepas que presentaron una mayor puntuación.

7.1. Determinación del crecimiento en medio MC

La capacidad de las cepas para crecer en el medio MC se determinó mediante la medida de la D.O. 600 nm de los cultivos realizados en tubos transparentes de polipropileno (apartado 3.4.). A partir de las curvas de crecimiento obtenidas se calculó el parámetro cuantitativo área bajo la curva (ABC) mediante el método de los trapezoides. El parámetro ABC se basa en el cálculo del área total que existe debajo de la curva de crecimiento poblacional, considerando todas las medidas tomadas para confeccionar dicha curva (Figura 7). Se genera así un valor

cuantitativo discreto representativo del crecimiento de cada cepa en el medio de cultivo MC. Se consideró que las cepas que mejor crecimiento exhibían eran las de mayor ABC.

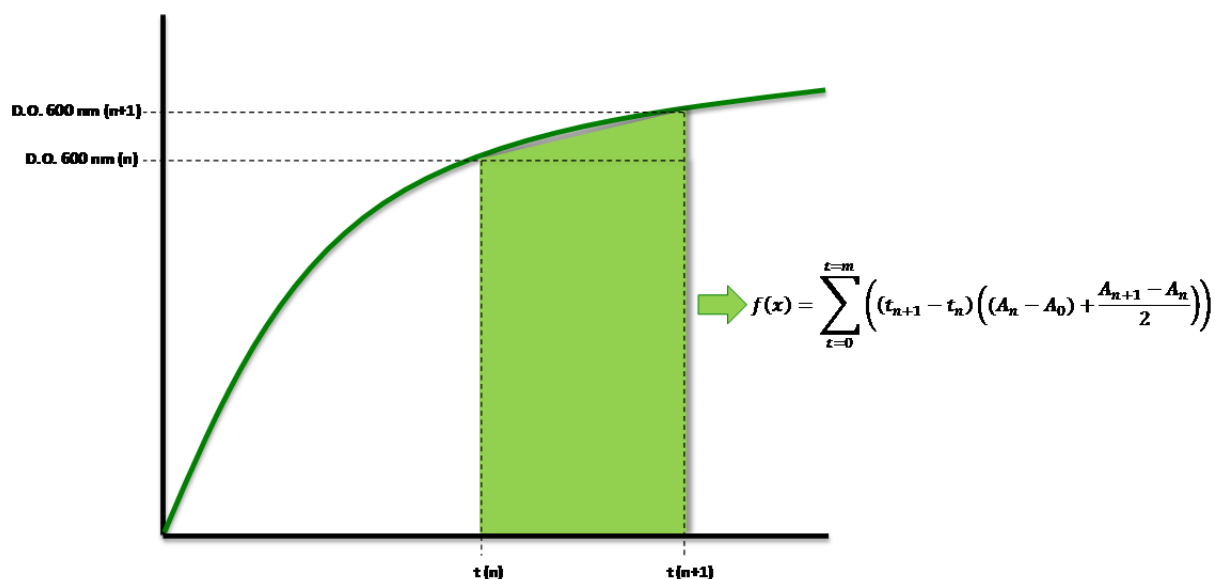


Figura 7. Representación gráfica y ecuación utilizada para calcular el Área Bajo la Curva, siendo t el tiempo en el cual se llevó a cabo el experimento y A la medida de la D.O. a 600 nm.

7.2. Determinación de la capacidad acidificante

La capacidad acidificante de los microorganismos engloba el balance entre la síntesis y degradación de varios compuestos del medio que influyen sobre el valor de pH del medio al final del ensayo. Por un lado, la síntesis de ácido láctico, ácido cítrico, ácido málico y ácido acético disminuye el pH del medio, mientras que la degradación de ácido cítrico y ácido málico aumentan el pH del mismo.

La síntesis y degradación de los ácidos orgánicos se determinó mediante el análisis del medio por HPLC como se indica en el apartado 4.2 de Material y Métodos, mientras que la variación de pH de los medios se calculó estimando la diferencia entre el pH inicial y final de los mismos.

7.3. Determinación de la resistencia a la lisozima y al anhídrido sulfuroso

Se ensayó la resistencia a la lisozima y al anhídrido sulfuroso únicamente en aquellas cepas que proporcionaron los mejores resultados en crecimiento y disminución de pH del medio. Los ensayos se realizaron en tubos de polipropileno utilizando el medio MC suplementado con 0.2 mg/mL de lisozima (Roche) o con 0.1 mg/mL de metabisulfito potásico, que equivale a 0.05 mg/mL de SO₂. Las BL se inocularon a una concentración final de 2 x 10⁶ UFC/mL. Se incubaron durante una semana a 28°C. El crecimiento se evaluó midiendo la D.O. a 600 nm durante este periodo.

8. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS DE BL SELECCIONADAS

8.1. Análisis de sustratos consumidos y productos producidos en medio MC por las BL seleccionadas

Para evaluar la utilización de compuestos del medio MC por las cepas seleccionadas, éste se inoculó con cada una de las cepas a una concentración final de 2 x 10⁶ UFC/mL. Los tubos se incubaron durante 1 semana a 28°C.

Tras el periodo de incubación, se midió el pH de los medios y éstos se analizaron mediante HPLC para la cuantificación de las concentraciones finales de glucosa, fructosa, ácido láctico, málico y cítrico, tal como se ha descrito en el apartado 4.2.

Para la caracterización de las cepas en base a la proporción de isómeros D-láctico y L-láctico que sintetizan, se ha empleado un kit enzimático para la cuantificación del isómero L-láctico en el medio (12802, Biosystems). Este método se basa en la reacción del enzima L-LDH que cataliza la transformación del L-láctico en piruvato. Esta reacción es una reducción que produce NADH. Puesto que es posible medir el NADH mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 340 nm, se determinó la cantidad de L-láctico en la muestra, a partir de la relación estequiométrica que tiene con el NADH generado. Con este fin se cultivaron las BL en

medio MRS líquido y se incubaron durante una semana a 28°C. Finalizado este periodo se analizaron los caldos de cultivo libres de células mediante el kit enzimático, diluyendo previamente la muestra en los casos en los que la concentración de ácido láctico total determinado por HPLC fuera mayor a 0.5 g/L. Ello se hizo porque el rango de medida de este kit enzimático es de 0.15-0.5 g/L. Las reacciones se realizaron en cubetas de plástico de 1 mL, siguiendo el protocolo indicado por el proveedor. Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro DU 800 (Beckman Coulter). La cantidad de D-láctico producida a partir de los azúcares se determinó mediante el cálculo de la diferencia entre el ácido láctico total cuantificado por HPLC y el L-láctico determinado por el kit enzimático.

8.2. Determinación de la resistencia a la presión osmótica

Para determinar la resistencia de la cepa Enolab 4323 a la elevada presión osmótica del mosto, se observó el crecimiento de la misma en el medio MC diluido varias veces. Así, el medio MC se utilizó de forma directa, y diluido 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 y 1:6. Las diluciones se realizaron con agua destilada, y los medios, una vez esterilizados por autoclave a 115°C durante 30 minutos se distribuyeron en tubos de ensayo de 12 mL. Los distintos medios se inocularon a una concentración final de 2×10^6 UFC/mL con la cepa Enolab 4323 y se incubaron a 28°C durante 25 días. Se estimó el crecimiento mediante seguimiento diario de la D.O. 600 nm tal como se describe en el apartado 3.4 de Material y Métodos.

8.3. Determinación de la resistencia al etanol

Para determinar la resistencia de la cepa Enolab 4323 al etanol generado durante la FA, se observó el crecimiento de la misma en medios con diferente concentración de etanol.

Para ello se utilizó el medio MRS pH 6.5 con concentraciones de etanol de 0, 1, 5, 9, 12 y 13% (v/v). Los diferentes medios se prepararon adicionando al medio MRS líquido las cantidades adecuadas de etanol absoluto (Panreac) previamente esterilizado por filtración mediante filtros de policarbonato de 0.22 μ m. Estos medios se inocularon a una concentración

final de 2×10^6 UFC/mL con la cepa Enolab 4323 y se incubaron a 28°C durante 25 días. Se evaluó el crecimiento mediante lectura diaria de la D.O. a 600 nm.

8.4. Determinación del efecto del mosto en distintas etapas de fermentación

Para determinar el efecto sobre la cepa Enolab 4323 del mosto parcial o totalmente fermentado se utilizaron dos tipos de medios que simulan las etapas de una fermentación: sintéticos y naturales. De este modo también se pudo determinar si la inhibición del crecimiento era causada por la síntesis de etanol durante la FA o por otros compuestos sintetizados durante la misma.

Los medios naturales de fermentación se denominaron F0, F1, F2, F3, F4, F7, F8 y F9, y correspondían a los caldos correspondientes a 0, 1, 2, 3, 4, 7, 8 y 9 días de una fermentación alcohólica. Para la preparación de estos medios se partió del medio MC en el cual se inoculó la levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* Uvaferm VN® (Lallemand), según las instrucciones del fabricante, y se incubó durante 9 días para que llevase a cabo la FA. El medio F0 correspondió al medio MC no inoculado con la levadura, y los demás medios correspondieron al mosto recogido a diferentes días de la FA. De cada volumen extraído se eliminaban las levaduras por filtración usando para ello filtros de acetato de celulosa de 0.22 μm . Los diferentes medios preparados de esta manera se distribuyeron en tubos de ensayo de 12 mL y se procedió a su inoculación con la cepa Enolab 4323 a una concentración final de 2×10^6 UFC/mL. Los tubos se incubaron durante 25 días a 28°C.

Los medios sintéticos de fermentación se denominaron FS0, FS1, FS2, FS3, FS4, FS7, FS8 y FS9. Estos medios de cultivo, cuya base es el medio MC, se prepararon simulando las etapas de una FA, es decir, aumentando progresivamente la concentración de etanol y disminuyendo progresivamente la concentración de azúcares, tal como se describe en la Tabla 8. Los diferentes medios se distribuyeron en tubos de 12 mL y se procedió a la inoculación con la cepa Enolab 4323 a una concentración final de 2×10^6 UFC/mL. Los tubos se incubaron durante 25 días a 28°C.

En ambos casos se evaluó el crecimiento de la cepa mediante mediciones diarias de la D.O. a 600 nm.

Tabla 7. Composición de los medios sintéticos de fermentación. (*Corresponde al medio MC).

MEDIO	DILUCIÓN	ETANOL AÑADIDO (v/v)
FSO*	-	-
FS1	1:2	1%
FS2	1:3	3%
FS3	1:4	5%
FS4	1:5	8%
FS7	1:6	10%
FS8	1:8	11%
FS9	1:16	12%

8.5. Evaluación de la producción de aminas biógenas por las cepas seleccionadas

Se analizó la capacidad que presentaban las cepas seleccionadas para producir aminas biógenas. Ello se abordó de dos maneras: por un lado se procedió a detectar la presencia de los genes responsables de la síntesis de histamina, tiramina y putrescina mediante PCR, y por otro lado se verificó por HPLC la producción de estas aminas en un medio de cultivo que contenía los aminoácidos precursores.

A. *Determinación de la presencia de genes que codifican para las enzimas histidina descarboxilasa, tirosina descarboxilasa, agmatina deiminasa y putrescina carbamoil transferasa.*

Para la detección de los genes *hdc*, *tdc*, *aguA* y *ptcA* se realizó una amplificación parcial de los mismos mediante PCR con los cebadores específicos correspondientes (Tabla 9) [77-79]. Para ello se llevó a cabo previamente la purificación del ADN bacteriano mediante un kit de aislamiento de ADN microbiano de Laboratorios MoBio, Carlsbad, CA, USA. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 50 μ L, que contenía 1 μ M del cebador específico correspondiente al gen diana a detectar, 200 μ M de cada uno de los dNTP (Roche), 10 mM de Tris-HCl pH 8.8, 50 mM de KCl, 0.1% de Tritón X-100, 2 mM de MgCl₂, 1 U de DyNzyme™ II ADN polimerasa (Finnzymes), y 1 μ L de ADN extraído [78]. Las reacciones de

Material y Métodos

PCR se llevaron a cabo en un termociclador Techne PTC-100TM (M.J. Research, Watertown, USA), siguiendo las condiciones de amplificación descritas en la Tabla 9 [77-79]. Los amplificadores resultantes se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa Seakem LE (FMC, USA) al 1.2%, durante 1 hora a 80 V, utilizando 5 µL de 1 Kb Plus Ladder (Invitrogen) como marcador de pesos moleculares y Tris borato EDTA 0.5 M pH 8.0 como sistema tampón. Los geles fueron analizados tras su tinción en 0.5 µg/mL de bromuro de etidio (MoBio) [78].

Tabla 8. Cebadores y condiciones de amplificación de los genes que codifican para la síntesis de aminas biógenas en *Lactobacillus*.

	<i>hdc</i>	<i>tdc</i>	<i>aguA</i>	<i>ptcA</i>
Cebadores	JV16HC/JV17HC	P1rev/p0303	aguA-R/aguA-F	ptcA-R/ptcA-F
Tamaño del amplicón	367 pb	370 pb	830 pb	350 pb
Cepa control positivo	ST2A	Enolab 4258	X1B	X1B
Condiciones de amplificación	95°C 5 min	94°C 5 min	95°C 5 min	95°C 5 min
	40 ciclos:	35 ciclos:	40 ciclos:	40 ciclos:
	94°C 1 min	94°C 1	94°C 1 min	94°C 1 min
	40°C 1 min	50°C 1	53°C 1 min	53°C 0.5 min
	72°C 1 min	72°C 1	72°C 2 min	72°C 1 min
	72°C 20 min	72°C 10 min	72°C 10 min	72°C 10 min
Referencia	[77]	[78]	[79]	[79]

B. Cuantificación de la capacidad para formar aminas biógenas en medio sintético

Para estudiar la producción de aminas biógenas por las bacterias seleccionadas se utilizó el medio MDBmod, al que se le añadió 2 g/L de cada uno de los aminoácidos precursores por separado (histidina, tirosina y arginina). Las aminas producidas se cuantificaron mediante HPLC. Las cepas se inocularon en 10 mL de este medio a una concentración final de 2×10^6 UFC/mL. El cultivo se incubó durante de 20-30 días a 28°C.

Una vez finalizado el periodo de incubación, se extrajo una muestra de 1.5 mL de cada cultivo, de la que se eliminaron las células por centrifugación a 8000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga Prismr (Labnet International Inc.). El sobrenadante se filtró a través de un filtro de nylon de 0.22 µm y se tomaron 960 µL del mismo, a los que se añadieron 40 µL de ácido 2-aminoheptanoico a una concentración de 2 mg/L, como estándar interno [255].

A continuación se eliminaron aminoácidos y polifenoles, utilizando para ello las columnas de resina Oasis 96-well MCX de 30 mg (Waters, MA, USA). Estas columnas se acondicionaron previamente pasando secuencialmente 2 mL de metanol y 2 mL de agua MilliQ (Millipore). A continuación se pasaron 0.6 µL de la muestra por la columna, en la que quedaban retenidas las aminas biógenas. La columna se sometió a 3 lavados consecutivos con 3 tipos de soluciones, 2 mL de 10 mM H₃PO₄:metanol (90:10), 2 mL de 10 mM NaOH:metanol (70:30) y 2 mL de 10 mM CaCl₂:metanol (70:30), intercalados con lavados de 2 mL de agua MilliQ (Millipore). Después, los analitos se eluyeron con 1.2 mL de solución 100 mM NaOH:metanol (65:35), y se recogieron en un vial con 100 µL de HCl 1.2 M para su neutralización [255]. Seguidamente, el eluato neutralizado se derivatizó mediante AQC (6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamato, Waters, MA, USA). Para ello, se adicionaron 50 µL de tampón borato de sodio y EDTA 5 mM pH 8.8 a 20 µL del eluato, añadiendo a continuación 30 µL del fluoróforo AQC [255].

A partir de la muestra derivatizada se llevó a cabo la cuantificación de aminas biógenas producidas mediante un sistema HPLC Agilent 1200SL equipado con un desgasificador en línea, inyector automático, calentador de columna y detector de fluorescencia. La separación cromatográfica se realizó con una columna de 250 mm x 4.6 mm (Luna C18 sílice, Phenomenex) y con una precolumna de 20 mm x 4.6 mm. Se utilizó como fase móvil A, metanol, y como fase móvil B, una solución de trietilamina 17 mM ajustada a pH 5.05 con una solución de acetato trihidratado 140 mM. Se utilizó un gradiente de elución de la fase B al 25% durante 5 minutos, seguido al 40% hasta los 17 minutos, después al 65% hasta los 42 minutos y finalmente al 80% hasta los 47 minutos. El tiempo de elución total de la muestra fue de 47 minutos. Las longitudes de onda de excitación y emisión del detector de fluorescencia se fijaron en 250 y 395 nm respectivamente. Se inyectó un volumen de muestra derivatizada de 5 µL. La temperatura de la columna se mantuvo a 65°C. La cuantificación de cada amina biógena se realizó en base a las áreas de los picos detectados, extrapolando estos valores a una recta de calibración realizada con patrones externos [255].

9. PUESTA A PUNTO DEL SISTEMA DE ACIDIFICACIÓN BIOLÓGICA DE VINOS MEDIANTE LA INOCULACIÓN DE BL SELECCIONADAS

Para poner a punto el sistema de acidificación biológica de vinos se evaluaron diferentes parámetros que pudieran afectar al comportamiento de las BL durante la vinificación. Para ello se realizaron diferentes ensayos en los cuales se analizó la dinámica poblacional de los microorganismos implicados mediante recuentos de viables en placa, la evolución del pH y de los productos consumidos y producidos mediante HPLC.

9.1. Elección de la estrategia de inoculación del cultivo bacteriano

Para evaluar el mejor momento de inoculación del cultivo bacteriano durante la vinificación se evaluaron tres estrategias:

- a) Inoculación previa (IP): inoculación de la bacteria acidificante en mosto previa a la inoculación de la levadura.
- b) Coinoculación (CI): inoculación de la bacteria acidificante en mosto simultáneamente a la inoculación de la levadura.
- c) Inoculación secuencial (IS): inoculación de la bacteria acidificante en vino en fases finales de la FA (5° Brix).

Mediante la inoculación previa, las BL son inoculadas en el mosto antes de que se inicie la FA, y transcurrido un cierto periodo de tiempo en el cual las BL transforman azúcares en ácido láctico se inoculan las levaduras para que lleven a cabo la FA. La forma concreta en la que se realizó el experimento fue como se describe a continuación. Una de las BL seleccionadas (Enolab 4608) se inoculó en medio MC a una concentración final de 2×10^6 UFC/mL, y transcurrida una semana se inoculó la levadura Uvaferm VN® (Lallemand) según las instrucciones del fabricante. En la estrategia de coinoculación, las BL se inoculan también en el mosto pero de forma simultánea a las levaduras, esperando en este caso que la FL de los azúcares se realice de forma paralela a la FA y a la FML. En el ensayo se inocularon

simultáneamente en medio MC la cepa Enolab 4608 y la levadura Uvaferm VN[®], ambas a concentraciones finales de 2×10^6 UFC/mL. La inoculación secuencial se planteó para que la acidificación biológica tuviese lugar a partir de la FL de los azúcares residuales tras la FA. En este caso, la levadura Uvaferm VN[®] se inoculó en el medio MC a una concentración final de 2×10^6 UFC/mL y se esperó a que el vino tuviese una densidad de 5 o menos grados Brix (final de la FA). Para determinar este parámetro se empleó un refractómetro portátil (VWR). En este momento se inoculó la cepa Enolab 4608 a una concentración final de 2×10^6 UFC/mL.

Los ensayos se realizaron en matraces de vidrio estériles con 100 mL de medio MC. En todos los casos se evaluó el consumo de azúcares y de ácido málico, la producción de ácido láctico, la evolución del pH y las dinámicas de las poblaciones de bacterias y levaduras, estimadas a partir de los recuentos de viables en placa, desde la inoculación de éstas y hasta pasadas 1-2 semanas. Para ello se tomaron muestras diariamente de los cultivos.

9.2. Determinación del periodo de actuación de las bacterias lácticas para generar la acidificación deseada

Una vez decidida la estrategia de inoculación se determinó el periodo de tiempo necesario para que las BL produjesen 3 g/L de ácido láctico. La cepa de *L. plantarum* Enolab 4608 se inoculó a una concentración final de 2×10^6 UFC/mL en 10 mL de medio MC. El cultivo se incubó durante 15 días a 28°C. Durante el transcurso del ensayo se extrajeron muestras diariamente para la realización de los análisis indicados en el apartado 9.1.

9.3. Elección de la cepa de levadura encargada de realizar la fermentación alcohólica

Tras decidir las cepas de BL y la estrategia más adecuada para lograr la acidificación, se seleccionó una levadura comercial para llevar a cabo la FA. El criterio principal para la elección de la misma fue el de que no comprometiera el proceso de acidificación. Para ello se analizó la

compatibilidad de las cepas de BL seleccionadas con cuatro levaduras comerciales, a fin de elegir la mejor combinación. Las levaduras comerciales utilizadas Uvaferm VN[®], Lalvin QA23[®], Enoferm M2[®] y Lalvin Rhône 4600[®] (Lallemand), todas ellas pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

Los ensayos de compatibilidad se realizaron mediante análisis del crecimiento de la BL en presencia de las levaduras comerciales. Todos los ensayos se realizaron en matraces con 20 mL de medio MC. Inicialmente, se inocularon las cepas de BL seleccionadas a una concentración final de 2×10^6 UFC/mL y, transcurridas 72 horas se inocularon las levaduras según las instrucciones del fabricante. Los cultivos se incubaron a 28°C hasta el final de la FA. Un matraz se inoculó únicamente con la BL pero no con levaduras, sirviendo como control de crecimiento bacteriano en solitario, y otro matraz se estableció como control sin inocular con ningún microorganismo. Durante el transcurso del ensayo se extrajeron muestras diariamente para evaluar la cinética poblacional de las BL inoculadas. Al final del ensayo se determinó la variación de pH del medio y el consumo/producción de azúcares y ácidos. La levadura a seleccionar sería aquella que permitiera un crecimiento más prolongado de las bacterias, un mayor descenso de pH del medio, una menor cantidad de azúcares residuales y de ácido málico, y una mayor cantidad de ácido láctico y de ácido cítrico. A partir de estos datos se revelaría la mejor combinación levadura-bacteria.

9.4. Evaluación del efecto del pH del mosto en la efectividad del proceso de acidificación biológica

Se observó el efecto de dos valores de pH del mosto (3.2 y 3.7) sobre la acidificación llevada a cabo por la cepa de *L. plantarum* Enolab 4608, evaluando el crecimiento de la misma, la producción de ácido láctico y el descenso de pH generado. El efecto sobre el crecimiento se evaluó por recuento de viables en placas de MRS y la evolución de los azúcares y ácidos del mosto se analizó por HPLC.

Para ello se utilizó el medio MR a pH 3.2 y a pH 3.7. Como el mosto que constituía el medio MR tenía un pH de 3.2 no hubo que modificar este pH para ensayar ese valor. Para preparar el medio MR pH 3.7 se utilizó el medio anterior pero ajustándole el pH con productos desacidificantes utilizados frecuentemente en vinificación: “Blanco Neve” (Enartis), compuesto por bicarbonato potásico 95% y tartrato neutro 5%, y bicarbonato de potasio puro (Enartis). Con estos productos se preparó una disolución concentrada y con ella se fue ajustando el pH del medio MR hasta alcanzar el pH de 3.7.

Cada medio se alicuotó (20 mL) en tres matraces de 100 mL de capacidad. En cada serie, uno de ellos se consideró como control y se mantuvo sin inocular, otro se inoculó con la levadura fermentativa, estableciéndose éste como control de FA. En el tercer matraz se inoculó la cepa de *L. plantarum* Enolab 4608 a una concentración final de 2×10^6 UFC/mL y a los 6 días se inoculó la levadura fermentativa Uvaferm VN[®], según las instrucciones del fabricante. Los cultivos se incubaron a 28°C durante 15 días. Durante el transcurso del ensayo se extrajeron muestras a diferentes intervalos de tiempo para la realización de los análisis químicos y microbiológicos descritos en el apartado 9.1 de Material y Métodos.

9.5. Evaluación del efecto sobre la acidificación biológica de la adición de enzimas líticos de levaduras

Un posible contratiempo en el proceso de acidificación biológica controlada es la rapidez en el desencadenamiento de la FA espontánea, que puede comprometer el desarrollo de la bacteria acidificante. Para garantizar que el mosto permaneciese sin fermentar el tiempo necesario para que se desarrollen las BL, se le adicionaron enzimas que lisan las paredes celulares de las levaduras propias del mosto provocando su muerte. Sin embargo, estos enzimas pueden ejercer su efecto también sobre la levadura comercial que se inocula con posterioridad. Con el ensayo que se describe se evaluó el efecto que ejercían estos enzimas sobre la viabilidad y el metabolismo de las levaduras utilizadas y también se estudió si tenía algún efecto sobre el comportamiento de las BL inoculadas.

Material y Métodos

Los productos comerciales ensayados fueron:

- Lallzyme MMXTM (Lallemand): mezcla de glucanasa y pectinasa de *Trichoderma* spp. y *Aspergillus niger*. Se utilizó a dosis de 5 g/hL, siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Glucanex[®] (Lallemand): es una preparación enzimática con actividad exo- β -glucanasa. Se utilizó a dosis de 5 g/hL, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se observó el efecto de estos preparados sobre la microbiota propia de un mosto natural. Para ello se distribuyeron 20 mL de mosto natural en tres matraces; uno no se trató con ningún preparado enzimático y los dos restantes se trataron con Lallzyme MMXTM y Glucanex[®], respectivamente. Para evaluar el efecto sobre la microbiota autóctona se realizaron siembras de viables en placas de GPYA a las 0, 4, 24, 48 y 72 horas de la adición de los preparados enzimáticos, y se compararon los recuentos obtenidos en cada uno de los experimentos.

Para evaluar el efecto de estos productos líticos sobre la levadura Uvaferm VN[®] y sobre las BL seleccionadas, se inoculó cada microorganismo en 20 mL de medio MC a una concentración final de 2×10^6 UFC/mL. Se estableció un ensayo control sin la adición de enzimas y un ensayo control sin enzimas y sin inocular con ningún microorganismo.

La adición de los preparados enzimáticos se realizó inmediatamente tras la inoculación de los microorganismos en el medio MC. Para ello, se disolvió 1 g de cada preparación enzimática en 10 mL de agua destilada estéril consiguiendo una solución concentrada de 0.1 g/mL. De esta solución se inocularon 10 μ L en cada ensayo correspondiente, consiguiendo de esta manera una dosis de 5 g/hL (50 mg/L) en el medio MC, que es la dosis que indica el proveedor.

Se dejaron transcurrir 72 horas tras la adición de los agentes líticos, extrayendo muestras diariamente durante este periodo. En todos los casos se evaluaron las dinámicas poblacionales de los microorganismos mediante recuentos de viables en placa y también el descenso de pH.

9.6. Efecto de la presencia de microbiota autóctona en el mosto sobre el proceso de acidificación biológica

Se evaluó de qué manera afectaba al proceso de acidificación biológica la presencia de microbiota autóctona del mosto, posible competidora de la BL inoculada.

Para evaluar el efecto de la presencia/ausencia de microbiota autóctona sobre el proceso de acidificación se utilizaron los medios M, MNE, BE y BNE, correspondientes a mostos blancos y tintos tanto filtrados amicrobicamente como sin filtrar, es decir, conteniendo su propia microbiota autóctona. En todos ellos se inoculó Enolab 4608, a una concentración final de 2×10^6 UFC/mL en 20 mL; se incluyeron controles sin inocular. Los cultivos se incubaron durante 1 semana a 28°C, extrayéndose muestras diariamente para realizar análisis de dinámica poblacional de la bacteria inoculada, del consumo de azúcares y ácido málico, de la producción de ácido láctico y cítrico, y medida del pH del producto final. Se determinó el efecto de la presencia de microbiota autóctona comparando estos parámetros en los diferentes medios.

9.7. Evaluación del efecto de la concentración de polifenoles del mosto en el proceso de acidificación biológica

Se evaluó de qué manera afecta la concentración de polifenoles del mosto al proceso de acidificación biológica, ya que éstos se consideran compuestos inhibidores de las BL. Se utilizaron los medios M, A+B, BE y A+T, que presentan un rango creciente de concentración de polifenoles

Se inoculó la cepa de *L. plantarum* Enolab 4608 a una concentración final de 2×10^6 UFC/mL en 20 mL de estos cuatro medios de cultivo, incluyendo en el experimento también medios control sin inocular. Los cultivos se incubaron durante 1 semana a 28°C, extrayéndose muestras de los cultivos diariamente para análisis de dinámica poblacional de la bacteria inoculada, de consumo de azúcares y ácido málico, de la producción de ácido láctico y cítrico, y medida del pH del producto final. Se determinó el efecto de la concentración de polifenoles comparando estos parámetros en los diferentes medios.

9.8. Determinación de la resistencia de las BL a la lisozima

Se analizó la resistencia a la lisozima de las cepas de *L. plantarum* Enolab 4607 y 4608, ya que este compuesto inhibidor de BL es utilizado frecuentemente en la vinificación para controlar el desarrollo de poblaciones de BL. Para ello, las cepas seleccionadas se inocularon en medio MC suplementado con diferentes concentraciones de lisozima: 0, 0.05, 0.1, 0.2 0.5 y 1 mg/mL. Los medios de cultivo suplementados con lisozima se prepararon inmediatamente antes de la inoculación de las cepas, ya que la acción de este enzima disminuye con el tiempo. Para su preparación, se pesó un gramo de lisozima en polvo (Roche), se diluyó en 100 mL de agua destilada para conseguir una disolución concentrada de lisozima de 10 mg/mL y se esterilizó mediante un filtro de jeringa de 0.22 μm . Esta disolución concentrada se añadió al medio MC en las cantidades adecuadas para conseguir las concentraciones indicadas anteriormente. Una vez conseguidos los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de lisozima se distribuyeron en tubos ensayo de 12 mL, e inmediatamente después se procedió a la inoculación de las BL a una concentración final de 2×10^6 UFC/mL. Los tubos se incubaron a 28°C durante 11 días.

Para determinar la resistencia a la lisozima de las cepas se extrajeron muestras de los cultivos a lo largo del ensayo y se comparó el ABC obtenido mediante la lectura diaria de la D.O. 600 nm de los cultivos, los recuentos de células viables en placa, la acidificación en el producto final por medida del pH y el consumo de azúcares y producción de ácidos por HPLC.

9.9. Determinación de la resistencia de las BL al SO₂

Se analizó la resistencia al SO₂ de las cepas de *L. plantarum* Enolab 4607 y 4608. Para ello, las cepas se inocularon en medio MC suplementado con diferentes concentraciones de anhídrido sulfuroso: 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2 y 0.5 mg/mL. Para su preparación se utilizó metabisulfito potásico (Agrovin), del cual se añadió el doble de la cantidad que la de SO₂ que se deseaba ensayar. Para conseguir una disolución concentrada de metabisulfito potásico de 20 mg/mL se pesaron 2 gramos de este compuesto, se diluyeron en 100 mL de agua destilada

y se esterilizó la disolución por filtración a través de un filtro de 0.22 μm . Esta solución se añadió al medio MC en las cantidades suficientes para conseguir la concentración de SO_2 deseada. Una vez preparados los diferentes medios de cultivo, éstos se distribuyeron en tubos de 12 mL e inmediatamente después se procedió a la inoculación de las BL a una concentración final de 2×10^6 UFC/mL. Los tubos se incubaron durante 11 días a 28°C.

Para determinar qué cepas de BL eran las más resistentes al anhídrido sulfuroso se extrajeron muestras de los cultivos a lo largo del ensayo y se compararon las ABC obtenidas a partir de la medida diaria de la D.O. 600 nm, los recuentos de viables en placas de medio MRS, la medida de pH en el producto final y las concentraciones de diferentes compuestos producidos y consumidos mediante análisis por HPLC.

10. PRODUCCIÓN INDUSTRIAL Y APLICACIÓN DEL CULTIVO INICIADOR PARA LA INDUCCIÓN DE ACIDIFICACIÓN BIOLÓGICA EN VINOS

Dado que uno de los objetivos de esta tesis era la selección de bacterias acidificantes que pudiesen transferirse a la industria, las cepas seleccionadas se prepararon en forma liofilizada, ya que ésta es la forma más ampliamente utilizada en el sector enológico para la inoculación de cultivos bacterianos. Para ello se requirió la colaboración de la empresa Lallemand que tiene una amplia experiencia en la producción de cultivos iniciadores para alimentación. Se analizó la resistencia de las cepas al proceso de producción estándar de estos cultivos, así como la efectividad de los mismos una vez inoculados en mosto. También se estudiaron qué condiciones de producción industrial garantizaban el mantenimiento de la viabilidad y de la actividad metabólica de las BL. Por último, se optimizaron las condiciones de rehidratación de estos cultivos con el objetivo de mantener al máximo la efectividad de los cultivos liofilizados tras su inoculación en mosto.

10.1. Optimización del sistema de producción industrial del cultivo iniciador liofilizado

Con el fin de optimizar las condiciones de producción del cultivo iniciador, se evaluaron las características que exhibía la cepa Enolab 4608 cuando era sometida a 6 procesos de producción diferentes, propios de la empresa Lallemand y de los cuales se ignoran los detalles, ya que están bajo secreto industrial. Estos 6 procesos generaron 10 preparados distintos.

En la Tabla 10 se muestran las denominaciones y características de los lotes industriales proporcionados por Lallemand. Una vez producidos en la empresa, se evaluaron las características que presentaron los preparados comerciales: la viabilidad de las células, el grado de contaminación con otros microorganismos y la capacidad acidificante de los mismos.

Tabla 9. Lotes de cultivos iniciadores liofilizados generados a partir de la cepa Enolab 4608 mediante diferentes sistemas de producción.

LOTE	CÉLULAS /GRAMO
F 6828	1.2×10^{11}
F 6829	2.2×10^{11}
F 6873 R1	1.8×10^{11}
F 6873 R2	1.9×10^{11}
F 6874 R1	1.6×10^{11}
F 6874 R2	1.8×10^{11}
F 6889 R1	1.5×10^{11}
F 6889 R2	1.7×10^{11}
F 6890 R1	2.1×10^{11}
F 6890 R2	1.6×10^{11}

A. *Determinación de la viabilidad de los preparados comerciales*

Para determinar la viabilidad de los preparados se realizaron recuentos de células totales y viables, y se estimaron los porcentajes de viabilidad. Las células viables se cuantificaron mediante dos métodos, el recuento mediante siembra en placas de MRS, y el recuento por microscopía de fluorescencia tras aplicar el kit de viabilidad LIVE/DEAD® (Invitrogen). El recuento de células totales se realizó por recuento microscópico en cámara de

Thoma. La metodología usada para los diferentes tipos de recuento se describe en los apartados 3.1, 3.2 y 3.3 de Material y Métodos.

B. Estimación del grado de contaminación de los preparados comerciales y comprobación de la identidad de la cepa producida industrialmente

Con el fin de detectar posibles contaminaciones de los preparados con bacterias mesófilas, bacterias acéticas o levaduras durante la etapa de producción, se extrajo una alícuota de 0.2 g del preparado y se resuspendió en 10 mL de suero fisiológico estéril (9 g/L de NaCl). Se sembraron 100 μ L de esta suspensión sobre placas de los medios GPYA, PCA y ACE. Las placas se incubaron durante una semana a 28°C. Las contaminaciones se detectaron por la aparición de morfologías coloniales distintas a las del cultivo original en éstas. Todas aquellas colonias que presentaban diferente morfología a la de la cepa Enolab 4608 se consideraron contaminaciones.

Igualmente, se comprobó que las bacterias mayoritariamente presentes en los preparados industriales contenían la cepa seleccionada. Para ello, se resuspendió una alícuota de 0.2 g de estos preparados en 10 mL de suero fisiológico estéril, obteniendo una suspensión a partir de la cual se realizaron diluciones decimales adecuadas que se sembraron en placas de MRS. Tras la incubación de las placas a 28°C durante 3-4 días se obtuvieron colonias aisladas, que fueron identificadas a nivel de especie mediante la técnica 16S-ARDRA y a nivel de cepa (tipificación) mediante RAPD utilizando el cebador Coc. Para este último objetivo se analizaron 10 colonias por placa. El análisis de agrupamiento de los perfiles moleculares obtenidos se realizó mediante el programa informático BioNumerics versión 6.5 (Applied Maths).

C. Evaluación de la capacidad acidificante

Se estimó la capacidad acidificante de los preparados comerciales y se comparó con la que mostraban las mismas cepas crecidas en medios líquidos de laboratorio.

Material y Métodos

Para evaluar esto, se realizaron cultivos paralelos en medio MC de las cepas no sometidas al proceso industrial de liofilización (cultivo de laboratorio) y de los preparados comerciales de éstas. En ambos casos, el medio MC se inoculó a una concentración final de 2×10^6 UFC/mL. Se determinó la concentración de células viables al inicio (tras la inoculación) y al cabo de 7 días de incubación a 28°C mediante recuento en placas de MRS. También se estimó la acidificación que tuvo lugar en el medio de cultivo y los diferentes compuestos consumidos y producidos en cada caso, de la misma forma que se describe en el apartado 7.2.

10.2. Producción de los cultivos iniciadores liofilizados y evaluación de sus características

Una vez determinadas las condiciones que daban lugar a mayores rendimientos en biomasa y en capacidad acidificante, se aplicaron a la fabricación de preparados liofilizados de las cepas Enolab 4538, 4634, 4555, 4607, 4608 y Enoferm V22®. Las características de los preparados producidos en los años 2009, 2010 y 2011 se ilustran en la Tabla 11.

Tabla 10. Preparados comerciales liofilizados fabricados a partir de las cepas de BL seleccionadas para llevar a cabo acidificación biológica.

PREPARADO COMERCIAL	CEPA	AÑO	CÉLULAS/GRAMO
S4538	Enolab 4538	2009	1.7×10^{11}
S4555	Enolab 4555	2009	2.5×10^{11}
S4634	Enolab 4634	2009	2.1×10^{11}
S4608	Enolab 4608	2009	1.6×10^{11}
S4555	Enolab 4555	2010	1.8×10^{11}
S4607	Enolab 4607	2010	1.8×10^{11}
S4608	Enolab 4608	2010	1.8×10^{11}
Enoferm V22®	Enoferm V22®	2010	1.8×10^{11}
Lalvin VP41®	Lalvin VP41®	2010	1.8×10^{11}
S4607	Enolab 4607	2011	3.0×10^{11}
S4608	Enolab 4608	2011	2.6×10^{11}

La producción de cultivos iniciadores liofilizados se llevó a cabo durante tres años consecutivos, 2009, 2010 y 2011, en la empresa Lallemand (Toulouse, Francia). Estos cultivos iniciadores se produjeron a partir de diferentes cepas, según la selección de cepas realizada en cada etapa de la selección. De entre las cepas seleccionadas, en el año 2009 se produjeron

industrialmente los preparados comerciales S4538, S4608, S4634 y S4555, y el año 2010 los preparados comerciales S4555, S4607 y S4608. Además, este año también se sometió a este proceso las cepas comerciales de *L. plantarum* Enoferm V22® y de *O. oeni* Lalvin VP41® (Lallemand). De la selección de cepas realizada en el año 2011 se produjeron los preparados comerciales S4607 y S4608. Los cultivos iniciadores comerciales producidos en 2010 y 2011 se ensayaron en volúmenes semiindustriales (50-200 L).

Una vez producidos en la empresa Lallemand, se evaluaron las características que presentaron los preparados comerciales: viabilidad de las células, identificación y tipificación, grado de contaminación con otros microorganismos y la capacidad acidificante, utilizando la metodología descrita en el apartado 10.1.

10.3. Evaluación del efecto del tipo de rehidratación sobre el crecimiento y la acidificación del cultivo iniciador

Para llevar a cabo este ensayo, el preparado comercial S4608 se rehidrató en las soluciones acuosas estériles que se especifican en la Tabla 12.

Tabla 11. Composición de distintas soluciones de rehidratación del cultivo iniciador.

SOLUCIÓN DE REHIDRATACIÓN	COMPOSICIÓN
Suero	NaCl 9 g/L
Glucosa	Solución de glucosa 10 g/L
Fructosa	Solución de fructosa 10 g/L
Optí'Malo Plus	Solución de Optí'Malo Plus® (Lallemand)20 g/L
Nutrient Vit End	Solución de Nutrient Vit End™ (Lallemand)20 g/L
Medio M	Medio M

La rehidratación se llevó a cabo de la siguiente forma: se tomaron 0.2 g del preparado comercial y se resuspendieron en 10 mL de agua estéril para conseguir una concentración aproximada de 7.5×10^9 células/mL, determinado por recuento en Cámara de Thoma. Para determinar el número de células viables iniciales en el preparado se realizó un recuento de viables en placas de MRS. A continuación, esta suspensión de células se diluyó 1:10 en cada solución de rehidratación anteriormente descrita, consiguiendo una concentración final

aproximada de 7.5×10^8 células/mL. Las células se rehidrataron durante 2 horas en estas soluciones. Trascurrido este tiempo, se inocularon 500 μ L de las células rehidratadas en 50 mL de medio MC (aproximadamente 7.5×10^6 células/mL), a fin de evaluar el crecimiento y la acidificación de las células sometidas a distintos procedimientos de rehidratación. El preparado hidratado en agua destilada se inoculó a la misma concentración. Los cultivos se incubaron a 28°C durante 72 horas, extrayéndose muestras para análisis a diferentes intervalos de tiempo. En cada experimento se determinó el crecimiento de la bacteria por recuento en placas de MRS, la capacidad acidificante y la formación y degradación de algunos compuestos producidos/consumidos mediante el procedimiento descrito en el apartado 7.2.

11. ENSAYOS A NIVEL SEMIINDUSTRIAL

Una vez seleccionadas las cepas de BL para su utilización en el proceso de acidificación biológica y establecido el proceso de producción industrial de los cultivos, se realizaron ensayos de acidificación biológica a nivel semiindustrial. Estos ensayos tuvieron lugar durante los años 2010 y 2011. En estos ensayos se compararon las características de los vinos obtenidos con y sin acidificación biológica.

11.1. Vinificaciones

A. *Laboratorios Excell Iberica (2010)*

En el año 2010 las vinificaciones semiindustriales se llevaron a cabo en la planta piloto de los Laboratorios Excell Ibérica (La Rioja) en depósitos de acero inoxidable de 25 y 200 litros. Se realizaron vinificaciones tanto en blanco como en tinto.

Para los ensayos de acidificación biológica se utilizaron los preparados comerciales S4607, S4608 y S4555, comparándose su comportamiento con el de *L. plantarum* Enoferm V22[®], comercializado por Lallemmand como cultivo maloláctico para vinos de pH elevado. También se utilizó la cepa comercial de *O. oeni* Lalvin VP41[®] para que llevase a cabo la FML en las vinificaciones control. En este año, todos los cultivos iniciadores se rehidrataron en agua sin

cloro previamente a su inoculación. Como levaduras fermentativas se utilizaron las levaduras comerciales Lalvin QA23® (Lallemand) para la vinificación en blanco, y Uvaferm VN® (Lallemand) para la vinificación en tinto, ambas de la especie *S. cerevisiae*. Éstas se inocularon a una dosis de 20 g/hL (10^6 células/mL), siguiendo el protocolo de rehidratación y aclimatación térmica, tal como describía el proveedor.



Figura 8. Esquema de las vinificaciones semiindustriales en blanco realizadas en Laboratorios Excell Ibérica en 2010 (IP: inoculación previa de las BL, CI: coinoculación, 10^6 - 10^7 : concentración de inóculo en células/mL).

Para la vinificación en blanco, la experiencia se realizó en un mosto procedente de uvas de la variedad Viura. Se partió de 900 L de mosto cuyas características eran: densidad de 1090 g/L, grado alcohólico probable de 12.4%, AT de 5.99 expresada en g/L de ácido tartárico, pH de 3.7, 0.12 g/L de D-láctico, 2.60 g/L de ácido málico, 28 mg/L de sulfuroso libre y 51 mg/L de sulfuroso total. Dado que el pH de este mosto era muy bajo (3.2) se desacidificó químicamente para conseguir aumentar este pH a 3.7. Para ello se utilizó “Blanco Neve” (Enartis) y

bicarbonato potásico (Enartis), el primero a una dosis de 1.5 g/hL y el segundo a 1 g/hL. Este mosto se repartió en 3 depósitos de 200 L, se le añadieron 30 g/hL de Nutrient Vit End® (Lallemand) antes de iniciarse la FA y 20 g/hL de FermaidE® (Lallemand) a mitad de la misma. La temperatura de fermentación fue de 18°C controlada constantemente. Al final de la FA el vino se sulfitó de nuevo con el fin de elevar la concentración de sulfuroso a 30 mg/L de SO₂ libre, se estabilizó y se trasegó. Se realizaron varios ensayos para evaluar el efecto del tipo de cultivo iniciador, la concentración de inóculo, el periodo de acidificación y la estrategia de inoculación (previa o coinoculación). El esquema de los ensayos se ilustra en la Figura 8.



Figura 9. Esquema de las vinificaciones semiindustriales en tinto realizadas en Laboratorios Excell Iberica en 2010 (IP: inoculación previa de las BL, IS: inoculación secuencial, 10⁶-10⁷: concentración de inóculo en células/mL).

Para la vinificación en tinto, se utilizó mosto procedente de uva de la variedad Tempranillo. Se realizó el despalillado y estrujado de la uva, y se repartió la pasta en 4

depósitos de 200 L. Los depósitos se sulfitaron con una dosis de 3 g/hL y se añadió una dosis de 3 g/100 Kg de uva del enzima EXV® (Lallemand). Al inicio de la vinificación el mosto presentaba una densidad de 1064, un grado alcohólico probable de 13.2%, una AT de 5.46 expresada en g/L de ácido tartárico, un pH de 3.69, y unas concentraciones de D-láctico y málico de 0.19 y 2.30 g/L respectivamente. A 1/3 de la FA se adicionó al mosto en fermentación una dosis de 20 g/hL de FermaidE® (Lallemand). La temperatura de fermentación en todos los casos fue de 22-24°C. Al fin de la FA el vino se trasegó y se estabilizó. En este caso, se evaluaron el efecto del tipo de cultivo iniciador y de la estrategia de inoculación (previa o secuencial) sobre la acidificación de los vinos obtenidos. El esquema de los ensayos se ilustra en la Figura 9.

B. *Bodega Dominio de la Vega (2011)*

Los ensayos se llevaron a cabo en 6 depósitos de plástico alimentario de 40 litros, realizándose vinificaciones en tinto con mosto procedente de uva de la variedad Tempranillo. Las características del mosto fueron: 116.98 g/L de glucosa, 116.64 g/L de fructosa, 2.24 g/L de ácido málico, 0.28 g/L de ácido cítrico, 4.57 g/L de ácido tartárico y un pH de 3.92. Tras el despalillado y estrujado, se llenaron los depósitos con aproximadamente 30 L de una mezcla de hollejos y mosto. A continuación se realizó el sulfitado de los depósitos en una dosis de 6 g/hL, añadiendo para ello 3.6 g de metabisulfito potásico por depósito. Durante la vinificación se realizaron dos remontados diarios y al final de la FA se llevó a cabo el embotellado del vino. Tras un periodo de 3 semanas en botella, se realizó un sulfitado en dosis de 30 g/hL y un nuevo embotellado.

Para este experimento se utilizaron los preparados comerciales S4607 y S4608. Previamente a su inoculación, todos los preparados se rehidrataron en una solución de 20 g/hL de OptíMalo Plus® (Lallemand) durante 3 horas. La inoculación se realizó a una concentración final de 2×10^6 células/mL y se llevó a cabo cuando la concentración de SO₂ libre en los depósitos fue inferior a 50 mg/L. Como levadura fermentativa se utilizó la levadura comercial Uvaferm VN® (Lallemand), que se inoculó a una dosis de 20 g/hL (10^6 UFC/mL), siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. En este caso, el periodo de tiempo entre la

inoculación del preparado bacteriano y la levadura no se decidió de antemano, sino que la levadura se sembró una vez que se evidenció el arranque de la FA espontánea, lo que ocurrió aproximadamente pasadas 48 horas. En este caso se evaluó el efecto del tipo de cultivo iniciador sobre la acidificación y sobre el perfil organoléptico de los vinos. El esquema de los ensayos se ilustra en la Figura 10.

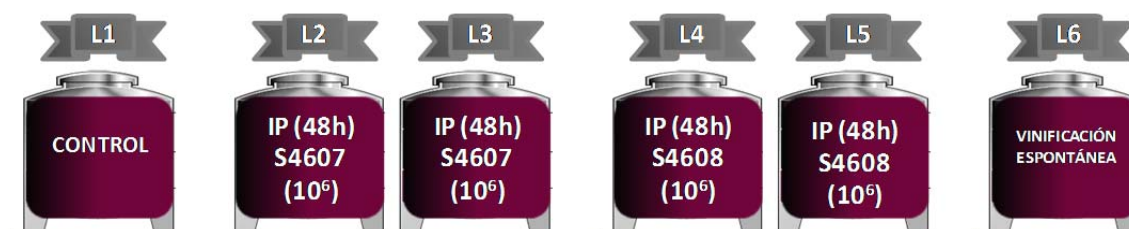


Figura 10. Esquema de las vinificaciones semiindustriales en tinto realizadas en la bodega Dominio de la Vega en 2011 (ver leyenda Figura 8).

C. *Enolab (2011)*

Los ensayos se llevaron a cabo en 5 depósitos de plástico alimentario de 40 litros que contenían mosto rosado. El mosto procedía de la variedad de uva Tempranillo, que se despalilló, estrujó y sulfitó a razón de 4 g/hL. Tras el despalillado y estrujado, se llenaron los depósitos con aproximadamente 30 L de mosto sangrado sin hollejos. A continuación se realizó un sulfitado, añadiendo 1.2 g de metabisulfito potásico por depósito. Tras esta adición, el mosto contenía un SO₂ libre de 9 mg/L, 90.32 g/L de glucosa, 92.43 g/L de fructosa, 1.58 g/L de ácido málico, 0.15 g/L de ácido cítrico, 2.14 g/L de ácido tartárico y un pH de 3.65. Durante la fermentación se realizaron 2 remontados diarios y al final de la FA se llevó a cabo el sulfitado en una dosis de 30 g/hL y el embotellado. Las vinificaciones tuvieron lugar en una habitación climatizada con una temperatura constante de 25°C, manteniendo la temperatura del mosto aproximadamente a 20°C.

Para el ensayo de acidificación biológica se utilizaron los preparados S4607 y S4608. Previamente a su inoculación, estos preparados se rehidrataron en una solución de 20 g/hL de Opti'Malo Plus® (Lallemand) durante 2-3 horas. La inoculación de los preparados comerciales se realizó a una concentración final de 2×10^6 células/mL. Como levadura fermentativa se

utilizó la levadura comercial Uvaferm VN® (Lallemand). Ésta se inoculó a una dosis de 20 g/hL (10^6 UFC/mL), siguiendo el protocolo descrito por el proveedor. En este caso, el periodo entre la inoculación del cultivo iniciador bacteriano y la levadura no se decidió de antemano, sino que la levadura se sembró una vez que se evidenció el arranque de la FA espontánea, aproximadamente pasadas 48 horas. En este caso se analizó el efecto del tipo de cultivo iniciador sobre la acidificación y sobre el perfil organoléptico de los vinos. El esquema de los ensayos se ilustra en la Figura 11.



Figura 11. Esquema de las vinificaciones semiindustriales en rosado realizadas en Enolab en 2011 (ver leyenda Figura 8).

D. Laboratorios Excell Iberica (2011)

Los ensayos se llevaron a cabo en 7 depósitos de acero inoxidable de 200 L, realizándose vinificaciones en tinto y en rosado. Para ambos tipos de vinificaciones se utilizó mosto de la variedad de uva Tempranillo. Tras el despalillado y estrujado se llenaron los depósitos y a continuación se realizó un sulfitado de los depósitos a una dosis de 3 g/hL. Al inicio de la vinificación el mosto rosado contenía 118.96 g/L de glucosa, 116.67 g/L de fructosa, 2.95 g/L de ácido málico, 0.28 g/L de ácido cítrico, 3.74 g/L de ácido tartárico y un pH de 3.586. Al inicio de la vinificación el mosto tinto contenía 119.89 g/L de glucosa, 121.57 g/L de fructosa, 2.24 g/L de ácido málico, 0.24 g/L de ácido cítrico, 0.75 g/L de ácido tartárico y un pH de 4.134. A 1/3 de la FA se añadió Specific Nutriment® (Lallemand) al mosto en fermentación a una dosis de 20 g/hL. La temperatura de fermentación se mantuvo a 22-24°C. Durante la misma se realizaron 4 remontados diarios y al final de la ésta se llevó a cabo la estabilización, trasiego y embotellado.

Para llevar a cabo la acidificación biológica se utilizaron los preparados industriales S4607 y S4608. Previamente a su inoculación se rehidrataron en una solución de 20 g/hL de Optí'Malo Plus® (Lallemand) durante 3 horas. La inoculación de los cultivos iniciadores bacterianos se llevó a cabo a una concentración final de 2×10^6 células/mL. Como levadura fermentativa se utilizó la levadura comercial Uvaferm VN® (Lallemand). Se inoculó en una dosis de 20 g/hL (10^6 UFC/mL), siguiendo el protocolo descrito por el proveedor. En este ensayo se analizó el efecto sobre la acidificación del tipo de cultivo iniciador, la concentración de inóculo y el tipo de mosto, tanto tinto como rosado. El esquema de los ensayos se ilustra en la Figura 12.



Figura 12. Esquema de las vinificaciones semiindustriales en tinto y en rosado realizadas en Laboratorios Excell (2011) (ver leyenda Figura 8).

11.2. Evaluación del comportamiento de los preparados comerciales

A. *Análisis del crecimiento y de la implantación de la bacteria inoculada*

Con el fin de comprobar la evolución de la población viable de bacterias presentes en los preparados durante las vinificaciones se realizaron recuentos de viables mediante siembra en placas de MRS con natamicina en el caso de los ensayos con lactobacilos y MLO con natamicina en el caso de los ensayos con *O. oeni* LalvinVP41®. En los ensayos en los que se realizó la inoculación previa, los recuentos de viables se efectuaron antes de la inoculación de la levadura, al final de la FA y tras el sulfitado. En el ensayo de coinoculación los recuentos de

viabiles se realizaron al final de la FA y tras el sulfitado. En los ensayos llevados a cabo mediante inoculación secuencial los recuentos de viabiles se realizaron aproximadamente a los 5 días de la inoculación del cultivo iniciador bacteriano. Las placas se incubaron durante 4 días a 28°C y se llevó a cabo el recuento de colonias aisladas.

B. Análisis físico-químicos

Las muestras correspondientes a diferentes momentos de las vinificaciones se analizaron mediante HPLC. También se midió el pH de las muestras. A partir de los parámetros obtenidos se calculó la disminución de pH producida en cada ensayo, el consumo de azúcares y ácido málico y la producción de ácido láctico, cítrico, acético, así como la producción de etanol y glicerol.

Resultados



1. DESARROLLO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA REALIZAR LOS ENSAYOS A NIVEL DE LABORATORIO

Se evaluó el crecimiento de 23 cepas de BL en los medios MRS pH 6.5, MRS pH 3.5, M, MEL y MC. En la Figura 13 se representan las Áreas Bajo Curva (ABC) de las cepas crecidas en cuatro de estos medios (todos excepto en medio M, ya que los crecimientos en éste resultaron inapreciables). Las 23 cepas pertenecían a las especies *L. mali*, *L. pantheris*, *L. paracasei* y *L. plantarum* (Tabla 7).

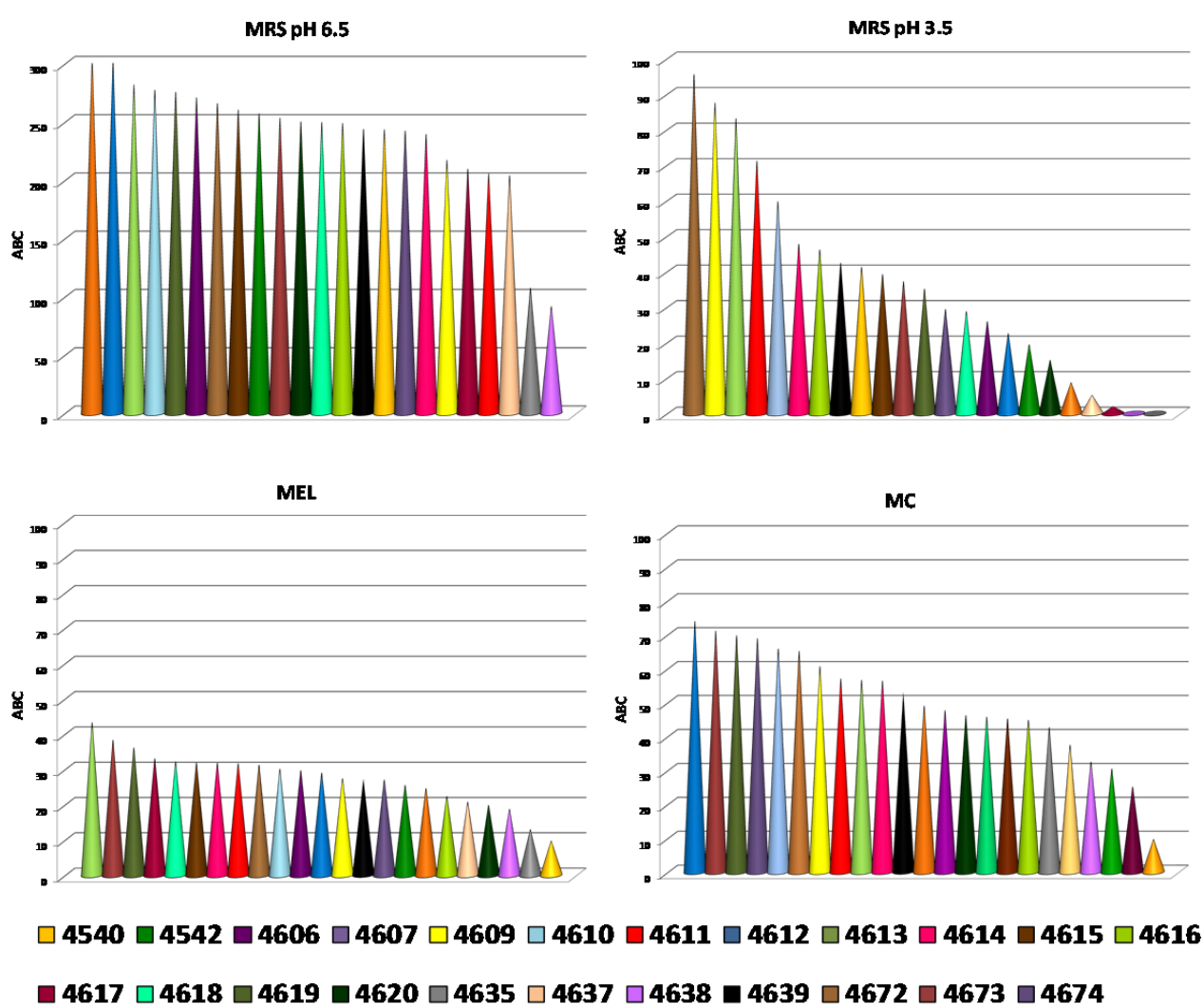


Figura 13. Valores de ABC de 23 cepas de BL creciendo en los medios MRS pH 6.5, MRS pH 3.5, MEL y MC.

Los mejores resultados de crecimiento se consiguieron en el medio MRS a pH 6.5. En este mismo medio aunque a pH 3.5 (pH propio del vino) se observó una notable reducción del crecimiento de entre el 60 y el 100%, debido exclusivamente al descenso de pH. Sin embargo, se descartó la utilización del medio MRS, ya que no se puede añadir al vino un preinóculo de células contenidas en este medio. La mayoría de cepas fueron incapaces de crecer en medio M, preparado a partir de mosto concentrado (datos no mostrados). Posiblemente la baja o nula concentración de aminoácidos o vitaminas sea la razón que explique este comportamiento. Los resultados de crecimiento fueron mucho mejores en el medio MEL, que contenía mosto concentrado y extracto de levadura. Sin embargo, este medio se acabó descartando por la imposibilidad de incorporar el extracto de levadura como ingrediente o aditivo al vino. Resultados de crecimiento superiores a los obtenidos en el medio MEL se obtuvieron en el medio MC que contenía cortezas de levadura inactiva, ingrediente que está autorizado para su uso en vinificación, y que es fuente de nutrientes para las bacterias. Se seleccionó por tanto este medio para realizar los ensayos de crecimiento y acidificación. Las cepas que mejor crecieron en este medio pertenecían a las especies *L. plantarum* y *L. mali* y las que peor crecieron a *L. pantheris* y *L. paracasei*.

2. SELECCIÓN DE BL PARA PROMOVER LA ACIDIFICACIÓN BIOLÓGICA EN VINO

Veintinueve cepas de las especies *L. mali*, *L. pantheris*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. satsumensis* y *L. vini* se analizaron en medio MC para determinar su capacidad para crecer, para disminuir el pH y para producir ácido láctico, para degradar el ácido málico y para resistir a la lisozima, el SO₂ y el etanol.

El crecimiento de las cepas en medio MC representado como ABC se muestra en la Figura 14A. De 29 cepas analizadas sólo 10 mostraron valores de ABC superiores a 70 unidades, siendo éstas Enolab 4607, 4608, 4609, 4610, 4613, 4614, 4619, 4620, 4639 y 4672, todas ellas pertenecientes a la especie *L. plantarum*. Estas cepas se puntuaron con 10 puntos en la selección final (Tabla 13). Las cepas que peor crecieron en este medio fueron Enolab 4323 (*L.*

vini), 4541, 4542 (ambas de la *L. paracasei*) y 4636, 4637 (ambas pertenecientes a *L. mali*). Las pequeñas diferencias de valores de ABC que se aprecian entre la Figura 13 y 14A, que representan crecimientos en el mismo medio (MC), se deben a que los datos que aparecen en la primera se obtuvieron en microplaca mientras que los segundos se obtuvieron en tubo. Las diferencias en la tolerancia al oxígeno de las cepas pudo ser la causa de las diferencias en el crecimiento, ya que en la microplaca están sometidas a un mayor contacto con el oxígeno que en el tubo [256].

Sólo 6 cepas de las 29 analizadas fueron capaces de disminuir el pH en 0.35 unidades o más (Figura 14B), siendo éstas Enolab 4606, 4607, 4608, 4609, 4617 y 4618, todas pertenecientes a la especie *L. plantarum*. Estas cepas se puntuaron con 10 puntos en la selección final (Tabla 13). Las cepas que no provocaron un descenso significativo de pH fueron Enolab 4323 (*L. vini*), 4541, 4542 (*L. paracasei*) y 4636, 4637 (*L. mali*).

Las cepas 4607, 4608, 4610, 4613, 4615, 4618 y 4619, todas pertenecientes a la especie *L. plantarum*, produjeron cantidades superiores a 12 g/L de ácido láctico (Figura 14C). Estas cepas se puntuaron con 10 puntos en la selección final (Tabla 13).

Todas las cepas analizadas realizaron la FML con la excepción de las cepas Enolab 4323, 4539, 4541, 4636, 4637 y 4638. Todas las que la llevaron a cabo pertenecían a las especies *L. plantarum* y *L. satsumensis* y fueron puntuadas con 10 puntos en la selección final (Tabla 13), mientras que las que fueron incapaces pertenecían a las especies *L. paracasei*, *L. mali* y *L. pantheris*.

En la mayoría de las cepas no existió correlación entre la mayor síntesis de ácido láctico y la mayor disminución del pH del medio. Esto pudo ser debido a la degradación de otros ácidos existentes en el medio como el málico y el cítrico, que dan lugar a un aumento relativo del pH del mismo.

Resultados

Tabla 12. Puntuaciones obtenidas por las cepas en base a diferentes criterios. Los criterios se enumeran del 1 al 6. 1) Capacidad de crecimiento igual o superior a 70 unidades (ABC); 2) Realización de la FML durante el periodo de acidificación; 3) Disminución del pH igual o superior a 0.35 unidades; 4) Producción de ácido láctico superior a 12 g/L; 5) Elevada resistencia a la lisozima; 6) Elevada resistencia al anhídrido sulfuroso. Las zonas sombreadas indican que dicha cepa ha recibido la puntuación para dicho criterio.

CEPA	1	2	3	4	5	6	PUNTUACIÓN
Enolab 4538							10
Enolab 4539							0
Enolab 4540							10
Enolab 4541							0
Enolab 4542							10
Enolab 4555							10
Enolab 4606							20
Enolab 4607							45
Enolab 4608							45
Enolab 4609							40
Enolab 4610							40
Enolab 4611							15
Enolab 4612							10
Enolab 4613							35
Enolab 4614							20
Enolab 4615							20
Enolab 4616							10
Enolab 4617							25
Enolab 4618							35
Enolab 4619							30
Enolab 4620							20
Enolab 4634							10
Enolab 4635							10
Enolab 4636							0
Enolab 4637							0
Enolab 4638							0
Enolab 4639							20
Enolab 4672							20
Enolab 4673							10
Enolab 4674							10

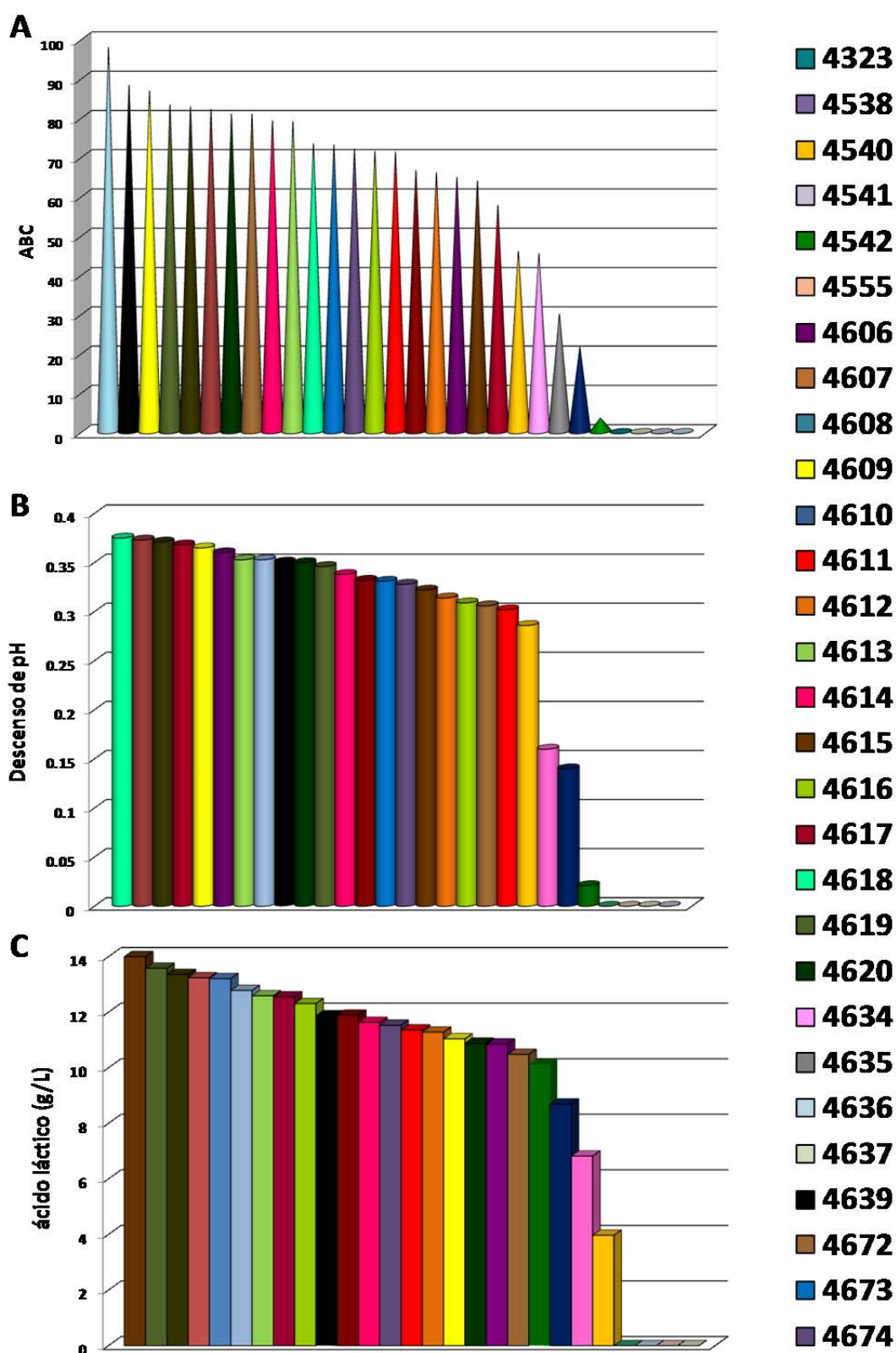


Figura 14. Datos obtenidos al representar el crecimiento, el descenso de pH y la producción de ácido láctico en medio MC por las cepas de BL de la colección Enolab sometidas al programa de selección A) Crecimiento expresado como Área Bajo Curva (ABC) B) Disminución del pH en el medio (en unidades de pH) C) Concentración de ácido láctico producido (en g/L).

Resultados

Tras analizar la resistencia a la lisozima y al anhídrido sulfuroso de las cepas se observó que las que presentaban mayor resistencia a la primera fueron Enolab 4608, 4609, 4610, 4611 y 4613 y las que presentaban mayor resistencia al SO₂ fueron Enolab 4607, 4609, 4610, 4617 y 4618, todas las cepas nombradas pertenecían a la especie *L. plantarum*. Se seleccionaron las 5 cepas que presentaron mayor resistencia a estos compuestos, lo cual se dedujo porque presentaban los valores más altos de ABC; estos valores se muestran en las Figuras 15A y 15B. Estas cepas se puntuaron con 5 puntos en la selección final (Tabla 13).

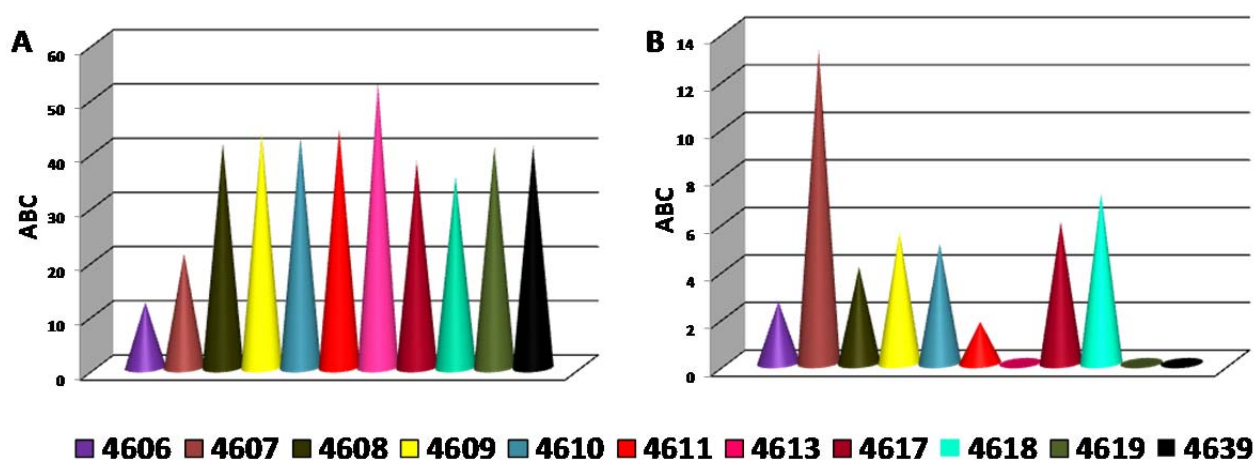


Figura 15. Representación del crecimiento de las cepas de BL con mayor puntuación en la Tabla 13 expresado como Área Bajo Curva (ABC) A) medio MC suplementado con 0.2 g/L de lisozima y B) medio MC suplementado con 0.05 mg/L de SO₂.

En el programa de selección se incluyó la cepa Enolab 4323 de *L. vini* cuya utilización como cultivo iniciador para conseguir la acidificación biológica en vinos presentaba gran interés. Esta especie es la única BL aislada del proceso de vinificación que presenta metabolismo homofermentativo tanto para las pentosas como para las hexosas del mosto, produciendo a partir de ambos tipos de azúcares ácido láctico exclusivamente [24]. Esta especie también presenta la importante ventaja de no producir ácido acético como consecuencia del metabolismo de los azúcares. Sin embargo, la cepa Enolab 4323 no creció en medio MC. Se planteó que la posible causa de esta incapacidad era la elevada presión osmótica del mosto, que contenía 200 g/L de azúcares. Tras realizar cultivos de esta bacteria en medio MC diluido progresivamente para conseguir diferentes presiones osmóticas, se observó que el

crecimiento de la bacteria era mayor cuanto menor era la presión osmótica del medio (Figura 16A). El máximo crecimiento se observó a partir de la dilución 1:5, es decir, a una concentración de azúcar en el medio de aproximadamente 50 g/L.

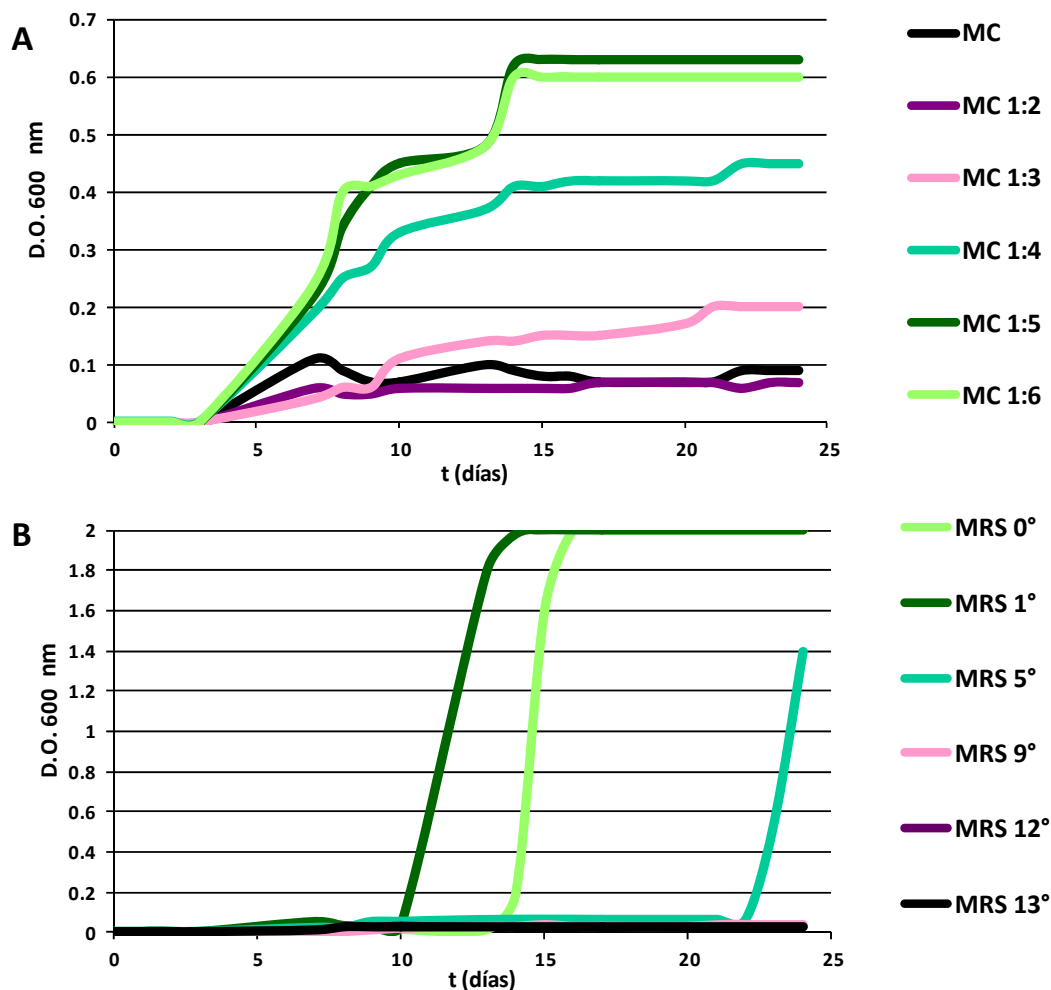


Figura 16. Cinética de crecimiento de la cepa Enolab 4323. A) Medio MC diluido en distintas proporciones. B) Medio MRS suplementado con diferentes concentraciones de etanol.

Se evaluó si el crecimiento de esta bacteria estaba negativamente influido por el etanol, observándose que el alcohol apenas afectaba a la velocidad de crecimiento de la bacteria pero sí a la fase de latencia hasta una concentración de 5% (v/v), y que a partir de valores superiores a 5% (v/v) no crecía (Figura 16B). Fue curioso el hecho de que la adición de 1% de etanol a esta cepa disminuyó en 4 días la fase logarítmica, comparada con el crecimiento en

Resultados

medio sin etanol. Sin embargo, la adición de 5% de etanol (v/v) retrasó en 10 días el inicio de la fase logarítmica.

Para evaluar si el crecimiento de la bacteria 4323 se veía afectado por metabolitos producidos por la levadura fermentativa o únicamente por la concentración de azúcar o etanol, se realizaron cultivos en los medios FS0-FS9 (Figura 17A) y F0-F9 (Figura 17B) que mimetizan las diferentes etapas de una vinificación. El crecimiento de la cepa Enolab 4323 resultó mayor en los medios F1 y FS1, en los cuales la concentración de azúcares era de 100 g/L aproximadamente y que contenían una concentración aproximada de etanol del 1% (v/v). Se observó un menor crecimiento en el medio derivado de una fermentación natural (F1) que en FS1, lo cual indicó la existencia de algún tipo de inhibición producida por la levadura fermentativa. No se pudo determinar con este experimento si la inhibición se debía al agotamiento de algunos nutrientes esenciales para la cepa, o a la síntesis de compuestos antimicrobianos como SO_2 o ácidos grasos de cadena media por parte de la levadura o a otra causa distinta [113].

Los resultados obtenidos mostraron que el crecimiento de la cepa Enolab 4323 era muy bajo o nulo en mosto sin diluir, en mostos fermentados por una levadura y en mostos con concentraciones de etanol superiores al 5%, mientras que era potencialmente estimulado por la presencia de 1% (v/v) de etanol.

Debido a que la cepa Enolab 4323 no creció bien en medio MC, preparado a base de mosto, que es el medio en el que tendría que llevar a cabo la fermentación láctica, se restringió la selección únicamente a las cepas que sí mostraron un buen crecimiento en MC.

La selección final de las cepas de BL se basó en la puntuación final asignada a las cepas sometidas al programa de selección, que fue el resultado de la suma de las puntuaciones obtenidas para cada uno de los criterios de selección considerados (Tabla 13). Se eligieron aquellas cepas con mayor puntuación y éstas fueron **Enolab 4607** y **Enolab 4608**, ambas pertenecientes a la especie *L. plantarum*.

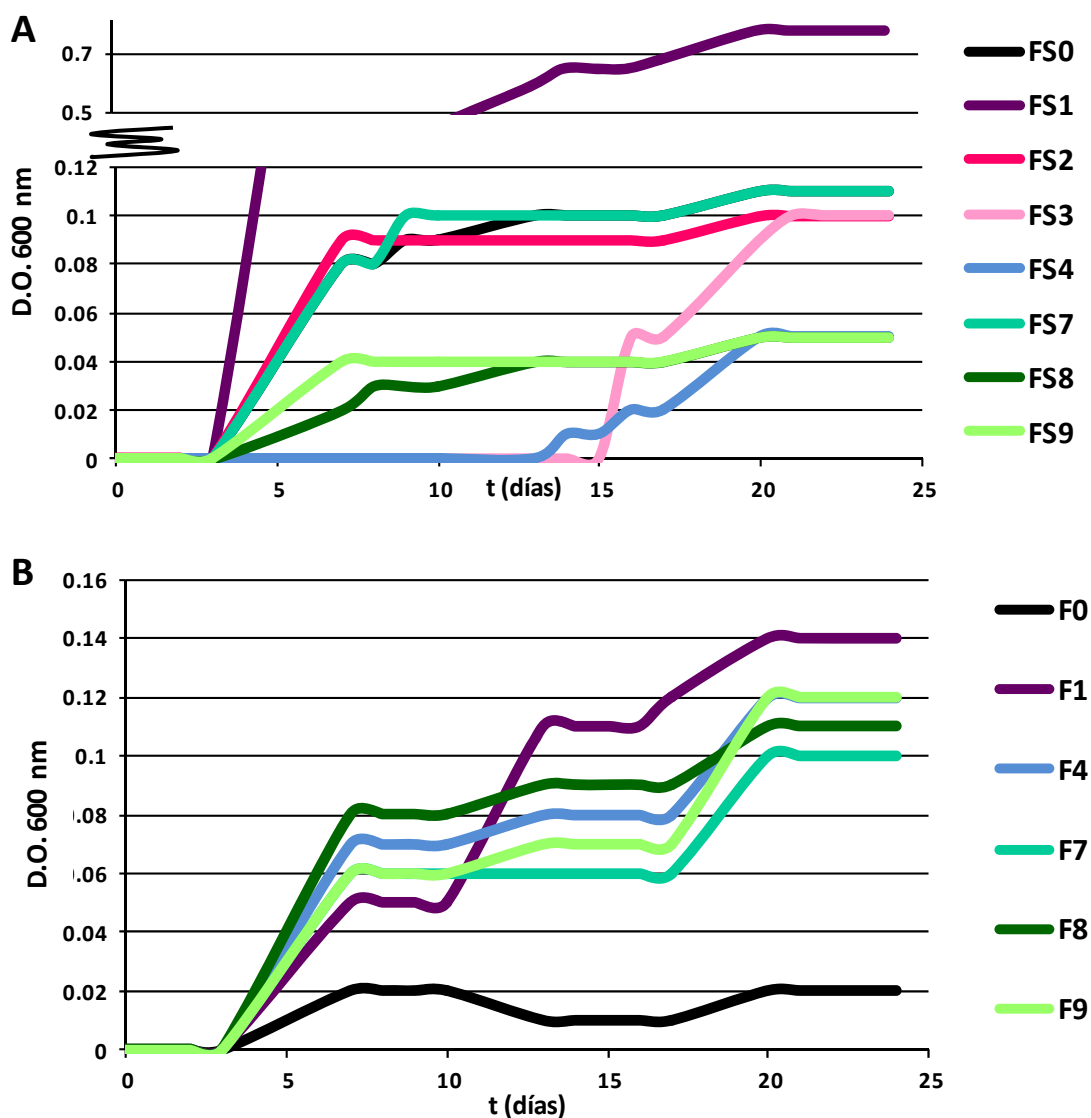


Figura 17. Cinética de crecimiento de la cepa Enolab 4323 en medios que simulan las distintas etapas de una fermentación. A) Medios sintéticos de fermentación, FS0-FS9. B) Medios reales de fermentación, F0-F9.

El hecho de que las cepas que presentaron crecimientos más altos pertenecieran a la especie *L. plantarum* no es sorprendente, ya que las cepas de esta especie crecen en presencia de altas concentraciones de azúcar y moderadas de etanol, condiciones propias del mosto en las etapas iniciales de la vinificación, que es de donde se la aísla normalmente [28]. Sin embargo, lo contrario ocurre con *L. vini*, que es incapaz de crecer a las altas concentraciones de azúcar que hay en el en mosto [24].

La totalidad de las cepas capaces de realizar la FML durante la fase de acidificación pertenecían a *L. plantarum*. Ello está en consonancia con lo observado por otros autores y por ello se ha utilizado a esta especie para promover la FML en el mosto [176, 197]. Siete cepas de *L. plantarum* dieron lugar a elevadas cantidades de ácido láctico como consecuencia del catabolismo de los azúcares. Como ya se ha descrito en el apartado de Introducción, ésta especie transforma las hexosas vía homoláctica, generando exclusivamente este ácido a partir de las mismas [28]. Otras cepas pertenecientes a especies que tienen el mismo tipo de metabolismo como *L. mali* o *L. paracasei* no han sido capaces de producir tanto ácido. Un caso especial es el de *L. vini*, que desde el punto de vista teórico presentaba un metabolismo más adecuado que las otras especies para producir ácido láctico, ya que es capaz de producirlo también a partir de las pentosas [257], a diferencia de *L. plantarum*. Sin embargo, las cepas de esta especie son incapaces de crecer en mosto y por tanto, no resultan de interés para los objetivos de esta tesis.

De entre las cepas de *L. plantarum* que presentaban mejor crecimiento y mayor capacidad acidificante se han escogido aquellas que presentan mayor resistencia a la lisozima y al SO₂, ya que son dos de los productos que se utilizan para controlar el crecimiento de bacterias indeseables que pudiesen competir con la bacteria acidificante inoculada.

3. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

3.1. Sustratos consumidos y productos producidos en medio MC

El consumo de azúcares, la capacidad acidificante (producción de ácido láctico y disminución del pH), el consumo de ácido málico y cítrico y la producción de ácido acético por las cepas seleccionadas en el apartado anterior (4607 y 4608) se muestran en la Tabla 14.

Tabla 13. Consumo y producción de compuestos, descenso de pH y rendimientos de la fermentación láctica (FL) de las cepas seleccionadas en medio MC, durante 7 días a 28°C.

	Enolab 4607	Enolab 4608
Disminución de pH (unidades pH)	0.73	0.73
Azúcares consumidos (g/L)	20.69	28.21
% ácido málico consumido	100	100
Ácido láctico producido por FL (g/L)	12.02	12.52
Isómeros D-láctico y L-láctico (D:L)	50:50	30:70
Ácido acético producido	0	0
% ácido cítrico consumido	100	100
Rendimiento FL (%)	58	44.3

Los resultados obtenidos con ambas cepas fueron muy similares. Ambas disminuyeron en 0.73 unidades el pH, realizaron la FML al completo y consumieron la totalidad del ácido cítrico del medio. Aunque el consumo de ácido málico disminuye la acidez, esta disminución se compensa con el aumento debido a la elevada síntesis de ácido láctico. Además, la FML mejora el gusto del vino al desaparecer el gusto herbáceo que es sustituido por un gusto frutal o lácteo. Ambas cepas produjeron 12 g/L de ácido láctico por FL, aunque la cepa 4607 consumió aproximadamente 8 g/L más de azúcar que la 4608, por lo que su rendimiento en ácido láctico fue algo inferior al de la otra cepa. Ambas cepas sintetizaron DL-láctico, pero existieron variaciones en cuanto a la proporción de isómeros producidos, siendo de 50:50 en la cepa Enolab 4607 y de 30:70 en la cepa Enolab 4608. Ninguna cepa fue capaz de sintetizar ácido acético, a pesar de que la especie *L. plantarum* es capaz de fermentar ribosa y en ocasiones xilosa y producir este ácido a partir de las mismas [258]. Tampoco lo sintetizaron a partir de ácido cítrico, a pesar de que algunos autores han descrito su producción y de que se observa una completa degradación de éste en el medio [56].

3.2. Producción de aminas biógenas

A. *Detección de los genes responsables de la síntesis de aminas biógenas*

No se detectó el amplicón correspondiente a la amplificación parcial del gen que codifica para la histidina descarboxilasa (*hdc*) en ninguna de las cepas seleccionadas (Enolab 4607 y 4608). Sólo se detectó este amplicón de 367 pb en la cepa de *L. buchneri* ST2A usada

Resultados

como control positivo para este gen [78] (Figura 18A). Por tanto, se demostró que las cepas seleccionadas 4607 y 4608 eran incapaces de producir histamina.

Sin embargo, sí se detectó en ambas cepas el amplicón de 370 pb correspondiente a la amplificación parcial del gen *tdc*, que codifica para la tirosina descarboxilasa, al igual que en la cepa Enolab 4258 utilizada como control positivo para este gen [77] (Figura 18B). Por esta causa, se considera que las cepas seleccionadas son potencialmente productoras de tiramina. La existencia de cepas de *L. plantarum* capaces de producir tiramina ya se ha descrito previamente por Arena y col. [259].

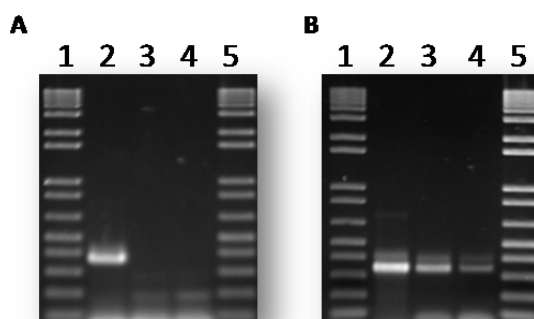


Figura 18. A) Amplificación por PCR de un fragmento del gen *hdc* con los cebadores JV16HC y JV17HC. Ladder 1 Kb Plus (Invitrogen) (1, 5), *L. buchnerii* ST2A (2) usado como control positivo, Enolab 4607 (3), Enolab 4608 (4). B) Amplificación por PCR de un fragmento del gen *tdc* con los cebadores p1-rev y p0303. Ladder 1 Kb Plus (Invitrogen) (1, 5), *L. brevis* Enolab 4258 (2) usado como control positivo, Enolab 4607 (3), Enolab 4608 (4).

Ninguna de las cepas seleccionadas contiene el gen *aguA*, que codifica para la agmatina deiminasa, ya que no se detectó el amplicón de 830 pb correspondiente a la amplificación parcial de este gen. Sin embargo, sí se detectó en la cepa X₁B utilizada como control positivo [79] (Figura 19A). En cambio, ambas cepas poseen el gen *ptcA*, que codifica para la putrescina carbamoiltransferasa. En la Figura 19B se observa el resultado positivo de la amplificación parcial del gen *ptcA*, tanto en las cepas 4607 y 4608 como en la cepa X₁B utilizada como control positivo. No obstante, estas cepas carecían de capacidad para producir putrescina, ya que la presencia de ambos genes (*aguA* y *ptcA*) es esencial para la síntesis de putrescina en esta especie.

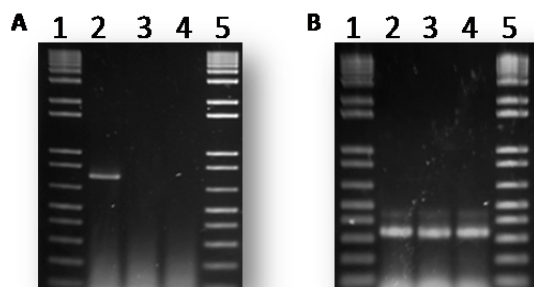


Figura 19. A) Amplificación por PCR de un fragmento del gen *aguA* con los cebadores *aguA-R* y *agua-F*. Ladder 1 Kb Plus (Invitrogen) (1, 5), *L. hilgardii* X₁B (2) usado como control positivo, Enolab 4607 (3), Enolab 4608 (4). B) Amplificación por PCR de un fragmento del gen *ptcA* con los cebadores *ptcA-R* y *ptcA-F*. Ladder 1 Kb Plus (Invitrogen) (1, 5), *L. hilgardii* X₁B (2) usado como control positivo, Enolab 4607 (3), Enolab 4608 (4)

B. Cuantificación de aminas biógenas producidas en medio sintético

Los resultados de la cuantificación de aminas producidas por las cepas 4607, 4608 y por varios controles positivos en el medio sintético MDBmod se ilustran en la Tabla 15.

Tabla 14. Concentraciones de aminas producidas por diferentes cepas en medio MDBmod.

ESPECIE	CEPA	HISTAMINA (mg/L)	TIRAMINA (mg/L)	PUTRESCINA (mg/L)
<i>L. buchneri</i>	ST2A	624.68	0	0
<i>L. brevis</i>	Enolab 4258	0	534.09	0
<i>L. hilgardii</i>	X ₁ B	0	0	6.94
<i>L. plantarum</i>	Enolab 4607	0	1.34	0
<i>L. plantarum</i>	Enolab 4608	0	0	0

Las cepas seleccionadas Enolab 4607 y 4608 no fueron capaces de producir ni histamina ni putrescina, lo cual era de esperar ya que carecen de los genes *hdc* y *aguA*, que codifican para los enzimas que intervienen en síntesis de estas aminas. A pesar de que las cepas 4607 y 4608 sí que poseían el gen *tdc*, estas cepas no produjeron tiramina o lo hicieron en concentraciones muy bajas. No es frecuente que las BL sinteticen aminas biógenas en mosto. Como demuestran algunos autores [74], las aminas biógenas son sintetizadas principalmente durante las etapas tardías de la vinificación y el envejecimiento. Ello se debe a que en esta fase ya se han consumido los azúcares y las bacterias necesitan obtener energía descarboxilando aminoácidos, lo que conlleva la síntesis de aminas biógenas.

4. PUESTA A PUNTO DEL SISTEMA DE ACIDIFICACIÓN BIOLÓGICA

4.1. Determinación de la estrategia idónea de inoculación del cultivo bacteriano durante la vinificación

En la Figura 20 se muestran las cinéticas de crecimiento de la cepa Enolab 4608 y de la levadura Uvaferm VN® en las diferentes estrategias de inoculación ensayadas: inoculación previa (IP), coinoculación (CI) e inoculación secuencial (IS).

Se observaron diferencias importantes en las cinéticas de crecimiento de la bacteria, dependiendo de la estrategia de inoculación. Cuando la cepa Enolab 4608 se inoculaba una vez acabada la FA (IS), su viabilidad descendía radicalmente tras su inoculación (Figura 20C). Cuando Enolab 4608 se inoculaba antes que la levadura (IP), la bacteria aumentaba su concentración en aproximadamente 2 órdenes de magnitud en ausencia de levadura. Sin embargo, tras la inoculación de ésta, la concentración de bacterias viables descendió 3 órdenes de magnitud a las 48 horas. Al cabo de cuatro días no se detectaron bacterias vivas, por tanto, la BL era desplazada por la levadura responsable de la FA (Figura 20A). Cuando se inocularon simultáneamente la bacteria y la levadura (CI) se observó que la BL experimentaba un crecimiento de aproximadamente 1.3 unidades logarítmicas durante las 48-72 horas tras su inoculación, pero más tarde se observó un brusco descenso (Figura 20B).

En todas las estrategias la cinética de crecimiento de la levadura tras su inoculación fue similar, con la excepción de que experimentó una muerte más acelerada en la estrategia CI (Figura 20). Este fenómeno confirma la teoría de algunos autores que han observado que cuando coexisten levaduras y bacterias, las primeras mueren antes que si se desarrollan en diferentes momentos de la vinificación [194]. Sin embargo, otros autores indican que el crecimiento de las levaduras no resulta afectado por la presencia de BL durante la vinificación [203]. Estas discrepancias se deben posiblemente a las interacciones entre cepas concretas de levaduras y bacterias [260].

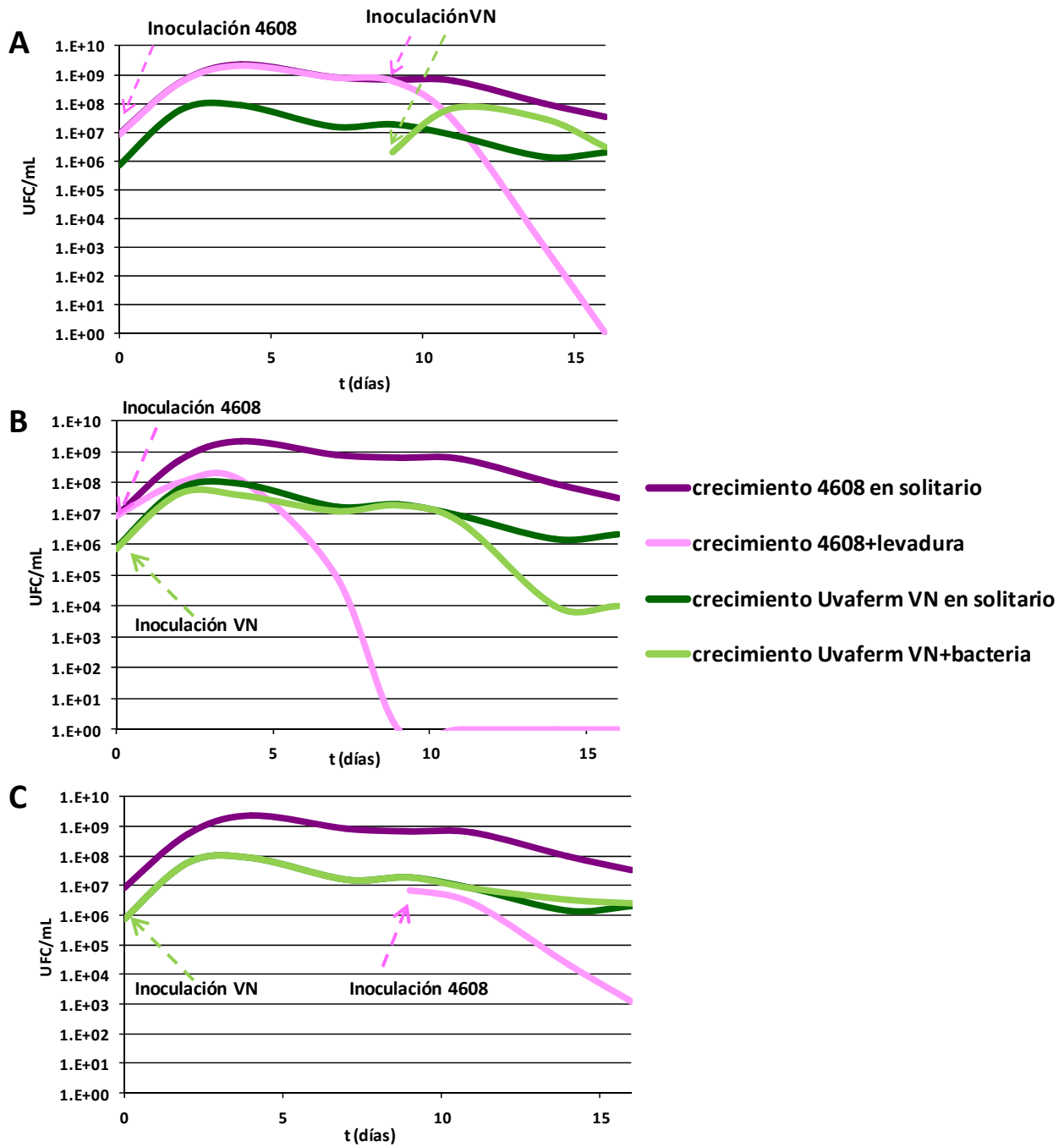


Figura 20. Cinéticas de crecimiento de Enolab 4608 y Uvaferm VN® en medio MC según la estrategia de inoculación. A) Inoculación previa. B) Coinoculación. C) Inoculación secuencial.

Resultados

La evolución del pH del medio MC durante los ensayos se muestra en la Figura 21, y la concentración de metabolitos en los vinos finales obtenidos a partir de las diferentes estrategias se muestra en la Tabla 16.

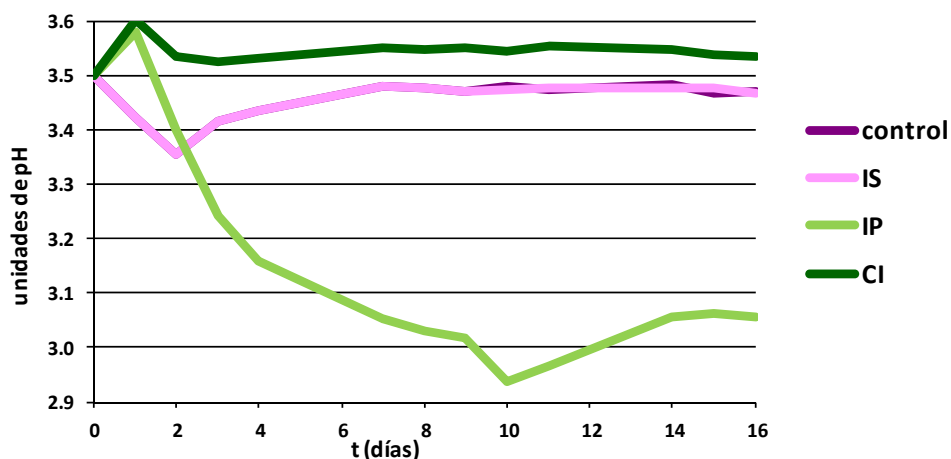


Figura 21. Evolución del pH durante las microvinificaciones realizadas mediante las estrategias ensayadas.

Tabla 15. Resultados de algunos parámetros físico-químicos de los vinos finales obtenidos mediante las diferentes estrategias. IS: inoculación secuencial, IP: inoculación previa, CI: coinoculación, FL: fermentación láctica ¹: aumento (+) o disminución (-) de ácido cítrico con respecto al medio inicial, en g/L ²: rendimiento en ácido láctico por FL.

	Control	IS	IP	CI
Azúcares residuales (g/L)	1.79	2.05	1.98	1.22
Ácido málico consumido (%)	18	26	100	100
Ácido láctico FL (g/L)	0	0	11.65	2.48
Incremento en ácido cítrico (g/L) ¹	+0.29	+0.12	-0.27	-0.04
Etanol producido (v/v)	10.39	9.92	9.44	10.24
Glicerol producido (g/L)	6.16	6.29	6.23	5.97
Rendimiento (%) ²	0	0	5.49	1.63

En cuanto a la variación de pH que tuvo lugar durante los ensayos, se observó que el mayor descenso de pH ocurría en los ensayos realizados mediante la estrategia IP, ya que las BL fueron capaces de crecer mucho más tiempo y más extensamente en ausencia de levaduras. En este caso, el ácido láctico generado por FL fue superior a 10 g/L, sintetizándose éste exclusivamente durante el periodo en el que no estaban presentes las levaduras. Además, las BL inoculadas fueron capaces de realizar la FML durante las 48 horas siguientes a su inoculación, compensando rápidamente el aumento de pH que supone ésta con la formación

de ácido láctico por FL. El rendimiento en ácido láctico obtenido en la estrategia IP resultó significativamente superior (5.5%) a los obtenidos en las demás estrategias. Se observó que las levaduras eran capaces de sintetizar ácido cítrico, lo cual pudo contribuir al descenso del pH del producto final. En el caso de la IP, la BL fue capaz de degradar el ácido cítrico sintetizado por la levadura durante la FA, con lo cual no hubo variación de pH en el producto final (Tabla 15).

La estrategia CI no sólo no logró disminuir el pH sino que lo elevó a valores superiores al conseguido con otras estrategias. En este caso, las BL inoculadas fueron capaces de generar sólo 2.5 g/L de ácido láctico por FL, pero llevaron a cabo la FML. Las cantidades de ácido láctico producidas no fueron capaces de compensar el aumento de pH causado por la FML, y de ahí el hecho de que el pH final sea más elevado que en el control en el que no ha tenido lugar la FML. La CI proporcionó un rendimiento de ácido láctico del 1.6%, valor intermedio entre el obtenido en las estrategias IS e IP. Además, en este caso se observó la degradación del ácido cítrico sintetizado por la levadura fermentativa, causando esto un aumento de pH del medio. La estrategia CI permitió el crecimiento de las BL durante los primeros momentos de la vinificación (3 días), en los cuales la concentración de etanol no era demasiado elevada para inhibir a la bacteria (Figura 20B). Además, durante este periodo la mayoría del anhídrido sulfuroso está unido a compuestos carbonilo producidos durante el crecimiento de las levaduras, lo cual también minimiza su efecto tóxico sobre la bacteria. La desventaja de la aplicación de esta estrategia es el elevado nivel de antagonismo que se establece entre ambos microorganismos, unas de cuyas manifestaciones son la competencia por los nutrientes y el efecto tóxico del etanol producido por las levaduras [198]. Cuando la concentración de etanol alcanzó niveles del 5-6% (v/v) la viabilidad de las BL descendió por la intolerancia a este compuesto.

La estrategia de IS no reveló diferencias significativas en los valores de pH respecto al ensayo control, en el cual no se inocularon BL. En este caso, las BL no fueron capaces de sintetizar ácido láctico ni de realizar la FML, por lo que el rendimiento en ácido láctico a partir de azúcares fue 0. Las diferencias en los rendimientos observados entre las tres estrategias se

deben a que la bacteria es capaz de transformar una importante cantidad de azúcar en ácido láctico en ausencia de levaduras (IP), pero sin embargo, cuando éstas están presentes (CI e IS) la cantidad de azúcar transformada es notablemente inferior o incluso nula, probablemente por fenómenos de antagonismo entre ambos microorganismos o por incapacidad de la bacteria para crecer, como es el caso de la IS [108]. Aunque mediante la IS las BL evitaban gran parte de la toxicidad de los ácido carboxílicos, ya que la concentración de éstos disminuye tras la FA, y aumentaba la disponibilidad de nutrientes gracias a la autólisis de las levaduras [29], también ocurre que tras la FA se alcanza el máximo nivel de etanol y la disponibilidad de azúcares es mínima. Estas condiciones adversas dieron lugar a una muerte inmediata de las BL inoculadas, lo cual impidió la síntesis de ácido láctico.

Se constató que la FA se llevó a cabo de forma completa independientemente de la estrategia de inoculación utilizada, siendo el azúcar residual en todos los casos inferior a 2 g/L. Tampoco se observaron diferencias en las concentraciones finales de etanol y glicerol en los vinos.

Teniendo en cuenta que el objetivo que se pretende en esta tesis es conseguir aumentar la acidez del vino, la estrategia IP fue la más apropiada. La inoculación de las BL en el mosto antes de que se iniciase la FA presentó varias ventajas: las BL no se vieron afectadas por la presencia de etanol ni de otros inhibidores sintetizados por las levaduras, no existió competencia con las mismas y las BL dispusieron en exclusividad de una gran cantidad de nutrientes. Ni la coinoculación de las cepas de *L. plantarum* con las levaduras, ni la siembra de las mismas tras la FA se revelaron eficaces para conseguir aumentar la acidez de los vinos.

4.2. Elección de la levadura fermentativa

Una vez seleccionada la estrategia de inoculación IP como la más adecuada se pasó a determinar qué cepa de levadura fermentativa era la más adecuada para potenciar la acidificación biológica. En la Figura 22 se representan las cinéticas de crecimiento de las cepas Enolab 4607 (Figura 22A) y 4608 (Figura 22B), en combinación con diferentes levaduras comerciales inoculadas en el medio MC 72 horas más tarde que las bacterias. En todos los

casos, la población de bacterias disminuyó rápidamente tras la inoculación de las levaduras. La cepa Enolab 4608 soportó algo mejor la competencia con las levaduras comerciales durante la vinificación, ya que se observó una mayor población de esta bacteria que de la 4607 con una de las cuatro levaduras ensayadas: la Uvaferm VN[®]. La disminución de la viabilidad de la cepa 4608 con la levadura Enoferm M2[®] fue mayor y más rápida que la de la cepa 4607, mientras que con la levadura Lalvin Rhône 4600[®] ambas bacterias se comportaron de forma similar. Ambas cepas de bacterias mostraron mejor compatibilidad con la levadura Uvaferm VN[®], ya que mantuvieron una mayor concentración de bacterias viables durante el desarrollo de la FA, especialmente la cepa 4608 [260].

Respecto a las características del medio MC, una vez concluido el experimento se observó que todos los azúcares fueron consumidos de forma semejante, independientemente de la combinación bacteria/levadura ensayada. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones residuales de ácido málico que quedaron en torno a 0.4 g/L en todos los casos. Tampoco se observaron diferencias significativas en las concentraciones de etanol, glicerol, ácido cítrico y ácido acético (datos no mostrados).

Donde sí se observaron diferencias significativas fue en los valores finales de pH y en la cantidad de ácido láctico producido (Figuras 23A y 23B). Así, la cepa 4608 consiguió disminuir el pH en un rango de entre 0.317 y 0.335 unidades, mientras que la cepa 4607 lo hizo en un intervalo menor, de entre 0.283 y 0.31. En el caso de la cepa 4608 la mayor variación de pH se consiguió con la cepa de levadura Uvaferm VN[®], registrándose el mayor descenso de todas las condiciones ensayadas, mientras que en el de la cepa 4607 fue con la levadura Enoferm M2[®].

De igual forma se detectaron diferencias en la concentración final de ácido láctico. Así las mayores concentraciones se consiguieron con la cepa 4608 independientemente de la cepa de levadura utilizada, aunque la máxima concentración se logró con la cepa Uvaferm VN[®] y la mínima con Lalvin Rhône 4600[®]. La cepa 4607 también dio los máximos y mínimos valores de ácido láctico con estas dos cepas. Las relaciones no proporcionales que se observaron entre la producción de ácido láctico y la disminución del pH del medio en las distintas combinaciones

Resultados

de cepas pudo deberse a la síntesis o degradación de otros ácidos como el málico o el cítrico por parte de las levaduras.

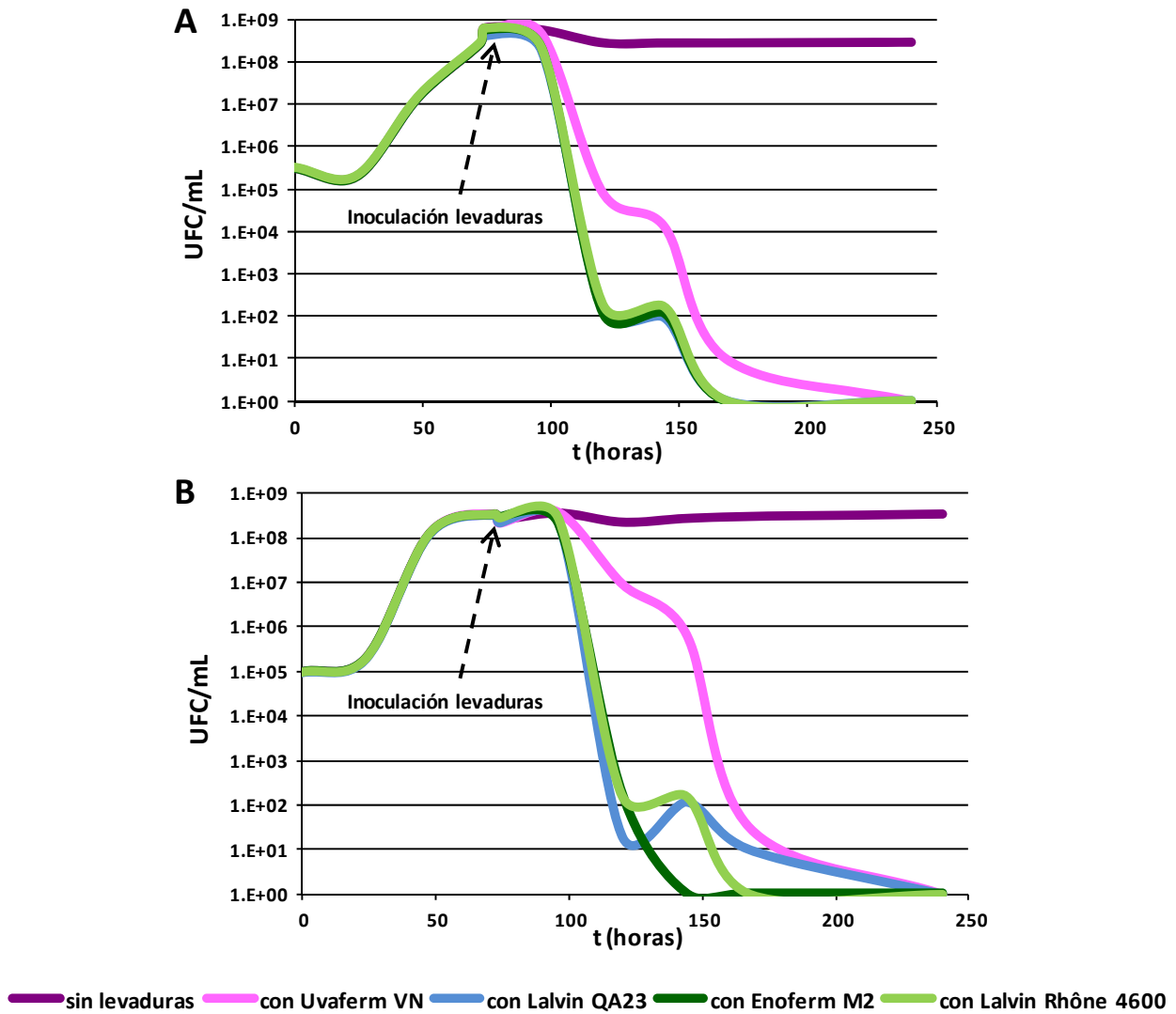


Figura 22. Cinética poblacional en el medio MC de las BL seleccionadas en combinación con diferentes levaduras comerciales. A) Ceba Enolab 4607. B) Ceba Enolab 4608.

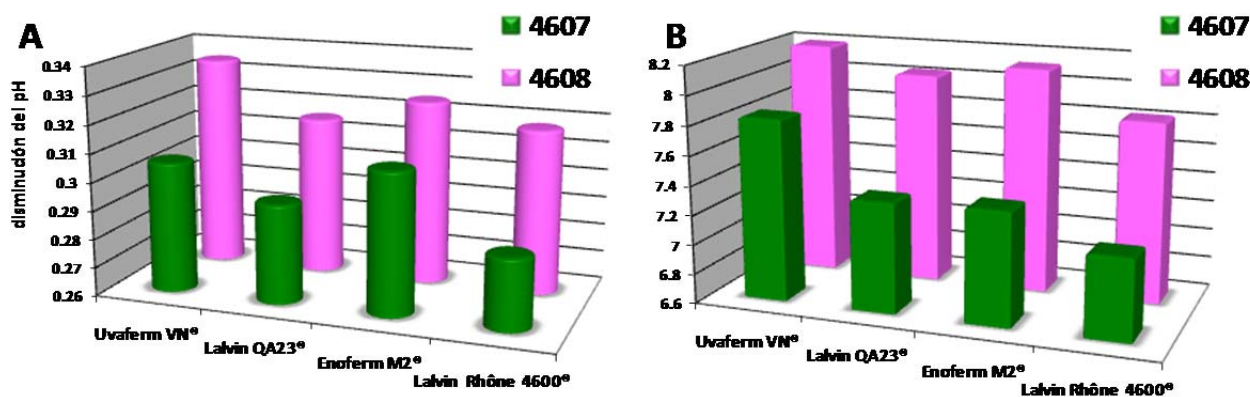


Figura 23. Resultados del análisis del vino final obtenido mediante la combinación de las BL seleccionadas y distintas levaduras comerciales. A) disminución del pH en el vino final. B) concentración de ácido láctico en el vino final.

Aunque el comportamiento general resultó muy similar, la combinación más favorable para llevar a cabo la acidificación del vino fue la de la levadura Uvaferm VN® con la bacteria Enolab 4608, ya que proporcionaron un mayor grado de supervivencia de la bacteria, una mayor disminución del pH y una mayor concentración de ácido láctico en el producto final.

Mediante este ensayo se han detectado fenómenos de antagonismo entre las cepas de *L. plantarum* y las cepas de levaduras comerciales. Una causa que justificaría este antagonismo es la competencia por el consumo de azúcares del mosto, que son metabolizados rápidamente por las levaduras, lo que limita su disponibilidad para las BL [110, 113]. A este fenómeno se suma la síntesis de etanol por parte de las levaduras, ya que las bacterias de la especie *L. plantarum* no toleran elevadas concentraciones de etanol [117]. Dado que las concentraciones de etanol obtenidas con las diferentes levaduras eran las mismas cabe pensar que o bien alguna levadura realizó a mayor velocidad el consumo de azúcares y ello también dio lugar a concentraciones de etanol más elevadas durante los primeros días o bien que algunas de ellas fueron capaces de producir sustancias antibacterianas que afectaron a la viabilidad de las bacterias.

4.3. Determinación del tiempo de actuación de las BL para promover la acidificación

Durante el cultivo en medio MC, la cepa Enolab 4608 creció de manera rápida alcanzando la fase estacionaria de crecimiento a los 2 días de su inoculación. El máximo poblacional alcanzado durante el crecimiento fue de 8×10^8 UFC/mL (Figura 24A). Durante el cultivo, se observó un aumento del pH del medio inmediatamente tras la inoculación; ello fue consecuencia de la realización de la FML. Una vez finalizada ésta, el pH disminuyó progresivamente durante todo el periodo experimental hasta alcanzar un valor de 3.080. Ello se debió a la síntesis de ácido láctico por FL (Figura 24B). La FML se llevó a cabo durante los 2 primeros días de cultivo, coincidiendo con la etapa de crecimiento exponencial de la bacteria. La concentración de ácido láctico aumentó progresivamente durante todo el periodo experimental, alcanzando niveles máximos de 19 g/L al final de éste (Figura 24B). Este ácido provino tanto de la FML como de la FL.

Analizando estos resultados se estableció que un periodo de 48 horas era ideal para que se realizase una adecuada acidificación (al menos una producción de 3 g/L de ácido láctico por FL) y la FML (periodo sombreado en la Figura 24). Tras este periodo se alcanzaron niveles de 8×10^8 UFC/mL y se disminuyó el pH inicial del medio MC en 0.1 unidades, teniendo en cuenta que la FML supuso un incremento de 0.2 unidades de pH respecto al pH inicial. Se sintetizaron 7.36 g/L de ácido láctico, de los que 5.45 g/L procedían de la fermentación de azúcares (rendimiento del 72.8%) y el resto de la FML. Además, durante este periodo se degradó el 50% del ácido cítrico procedente del mosto que componía el medio de cultivo. No se encontraron variaciones significativas en la concentración de otros ácidos como el ácido tartárico a lo largo de todo el experimento.

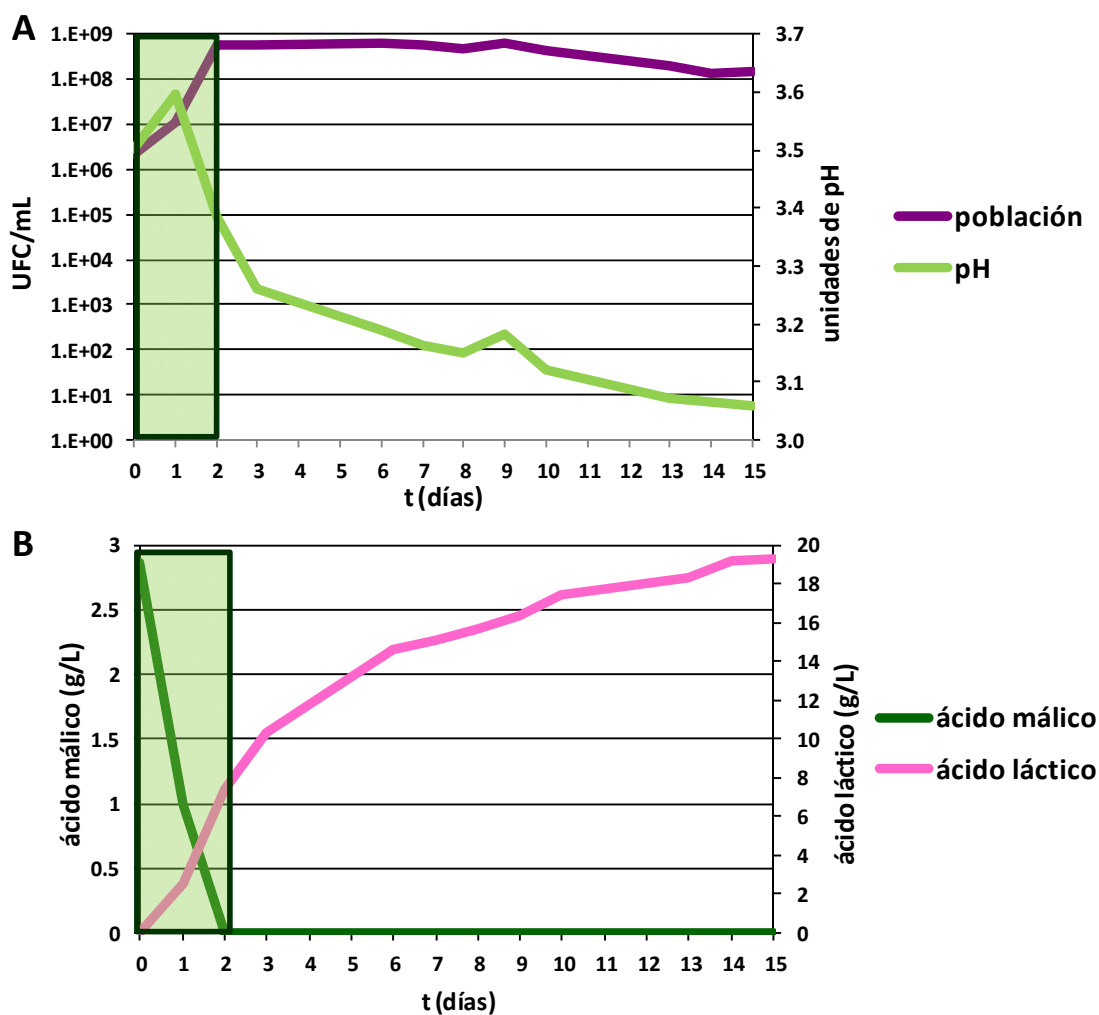


Figura 24. Cinéticas de crecimiento y evoluciones de ácido málico, ácido láctico y pH en medio MC inoculado con la cepa Enolab 4608. A) Cinéticas de crecimiento y evolución del pH del medio durante el cultivo. B) Evolución de ácido málico y ácido láctico. (El área sombreada indica el periodo estimado en el que se generó una acidificación adecuada y además se realizó la FML).

4.4. Evaluación del efecto del pH del mosto sobre el proceso de acidificación biológica

Para evaluar el efecto del pH inicial del mosto en el proceso de acidificación se comparó el crecimiento y metabolismo de la bacteria seleccionada Enolab 4608 en medio MC a diferentes pHs. El mayor crecimiento de la bacteria se consiguió a pH 3.7 (biomasa máxima de 1×10^9 UFC/mL) en un periodo de 4 días, mientras que a pH 3.2 el máximo crecimiento obtenido no superó las $2-3 \times 10^7$ UFC/mL, tardó 2 días más en alcanzarse y presentó una fase “lag” a

Resultados

diferencia de cuando creció a pH 3.7 (Figura 25). Se comparó el grado de acidificación conseguida a los pHs descritos y la que se conseguía en una vinificación en la que no se inoculaban BL. Como era de esperar, la disminución de pH fue mayor en los mostos en los que se inoculó la bacteria, siendo mucho mayor en los mostos de pH 3.7. Ello era esperable debido a que *L. plantarum* crece mejor a pH más elevados que *O. oeni* [100]. Los resultados mostraron que la cepa Enolab 4608 era capaz de provocar una mayor disminución del pH del medio cuanto más alto era el pH inicial de éste (Figura 25). Paralelamente, se confirmó que la acidificación final del vino fue mayor con la inoculación de BL, y ésta resultó también mayor cuanto mayor era el pH inicial del medio (Figura 26A).

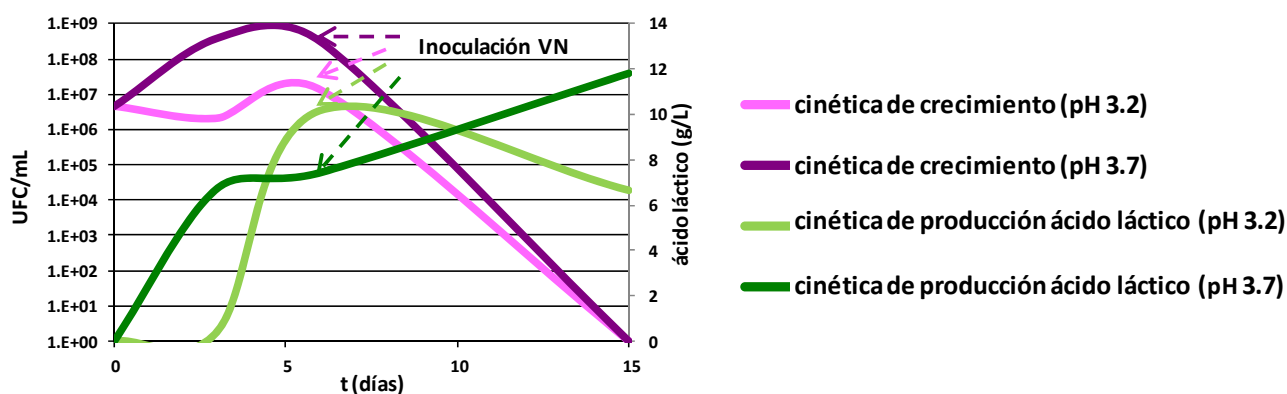


Figura 25. Representación de las cinéticas de crecimiento y de la evolución de la síntesis de ácido láctico en las vinificaciones realizadas a diferentes pHs con la cepa Enolab 4608. *Momento en el que se inoculó la levadura Uvaferm VN®.

En cuanto a la degradación de azúcares y de ácido málico no se observaron variaciones significativas en medios con diferentes pHs. A pH 3.7 la bacteria fue capaz de sintetizar rápidamente ácido láctico durante los 3 primeros días como consecuencia de su rápido crecimiento. Luego la producción se estancó para continuar aumentando tras la inoculación de la levadura aunque a un ritmo más lento. A pH 3.2 la actividad fue prácticamente nula durante los 3 primeros días, posiblemente porque la bacteria fue incapaz de crecer durante ese tiempo. Posteriormente fue aumentando de forma progresiva hasta alcanzar niveles superiores a los que se encontraron a pH 3.7 hasta el momento en el que se inoculó la levadura, a partir del cual disminuyó (Figura 25). Esta disminución se debió posiblemente a la formación de lactato de etilo al combinarse el ácido láctico con el etanol generado por la

levadura, aunque también podría deberse a que este ácido puede ser consumido por *L. plantarum* como fuente de energía [261], aunque resulta más probable la primera hipótesis debido a que aún existen en el medio azúcares que son metabolizables fácilmente. El rendimiento de ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares resultó mayor a pH 3.7. La degradación de ácido cítrico del medio por parte de la bacteria tuvo lugar durante los 3 primeros días de cultivo y de forma similar, independientemente del pH del medio. Sin embargo, la levadura fue capaz de sintetizar ácido cítrico durante la FA, registrándose niveles superiores de este ácido en el vino obtenido sin la bacteria que en los que sufrieron acidificación biológica (Figura 26B). Por otro lado, se observó una mayor concentración de ácido acético en vinos que sufrieron acidificación biológica, alcanzándose niveles ligeramente superiores en el medio con pH más ácido (datos no mostrados).

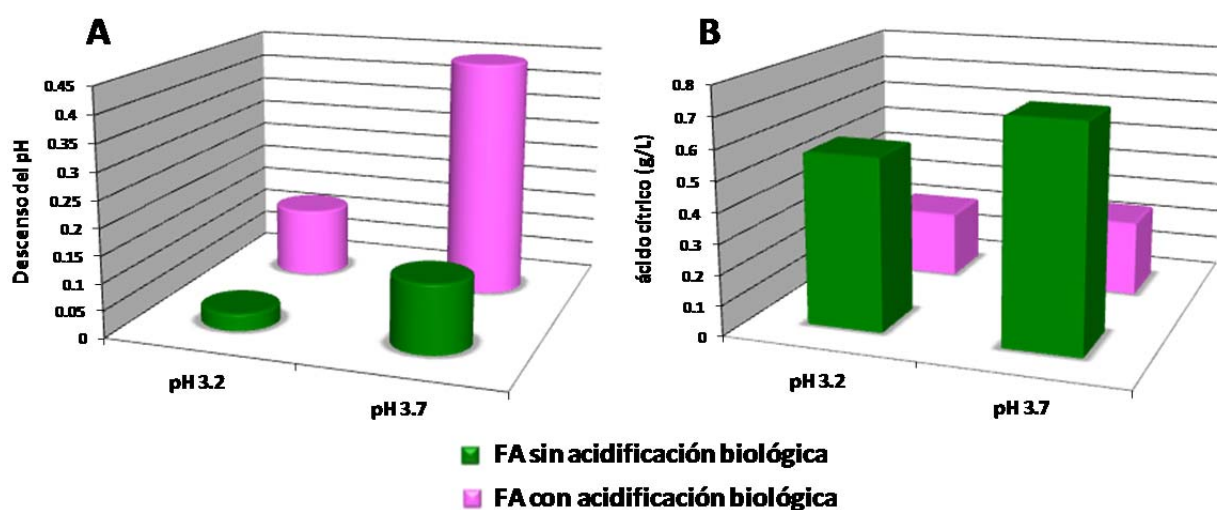


Figura 26. Comparación de los resultados de acidificación y síntesis de ácido cítrico obtenidos en las vinificaciones tradicionales y con acidificación biológica, a diferentes pHs. A) Descenso de pH en el producto final. B) Concentración de ácido cítrico en el producto final.

En resumen, un pH inicial elevado del mosto afectó de forma positiva al proceso de acidificación biológica, de manera que cuanto más elevado fue el pH, la bacteria Enolab 4608 creció de forma más rápida y alcanzó poblaciones mayores. Como consecuencia, la disminución del pH generada en el vino y la cantidad de ácido láctico sintetizada por la bacteria fue mayor (Figuras 25 y 26A). Además, la levadura fermentativa fue capaz de producir más ácido cítrico y menos ácido acético a pHs elevados. Aunque la levadura fue capaz de

sintetizar ácido cítrico (en mayor cantidad a pH 3.7), se observó que en aquellos vinos que sufrieron acidificación biológica las BL lo consumieron de forma similar a cualquiera de los dos pHs ensayados.

4.5. Evaluación del efecto de la adición de enzimas líticos sobre el proceso acidificación biológica

Para garantizar que durante el desarrollo inicial de la BL no se produjera la FA simultáneamente se probaron dos preparados que contenían enzimas que lisan la pared de las levaduras. Teóricamente, estos enzimas disminuirían la concentración de levaduras nativas presentes en el mosto y retrasarían el inicio de la FA. Los experimentos realizados tuvieron como finalidad el comprobar la eficacia de los preparados Lallzyme MMX™ y Glucanex® sobre la población levaduriforme autóctona y el conocer si éstos tenían algún efecto sobre las bacterias acidificantes.

Se llevó a cabo la aplicación de estos preparados en mosto fresco natural en las concentraciones recomendadas por el fabricante. No se observaron descensos significativos de la población autóctona tras su aplicación, siendo éstos inferiores a una unidad logarítmica. La aplicación de estos preparados enzimáticos supuso un retraso inferior a 24 horas en el inicio de la FA con respecto al mosto sin tratamiento.

Para comprobar el efecto de estos preparados sobre los microorganismos implicados en el proceso de acidificación biológica (Enolab 4607 y 4608, y Uvaferm VN®), se probaron sobre cultivos puros de las tres cepas.

La levadura Uvaferm VN® disminuyó su viabilidad con Glucanex® casi una unidad logarítmica a las dos horas de su aplicación, recuperando su población inicial rápidamente. En cambio, apenas se vio afectada por Lallzyme MMX™ (Figura 27A). A pesar de las diferencias de concentración de levaduras vivas durante las primeras horas, durante la FA no se observaron diferencias significativas ni en la tasa de crecimiento ni en el consumo de azúcares por la levadura. Por tanto, estos enzimas no garantizan la paralización de la FA más que por un corto periodo de tiempo (2-3 horas).

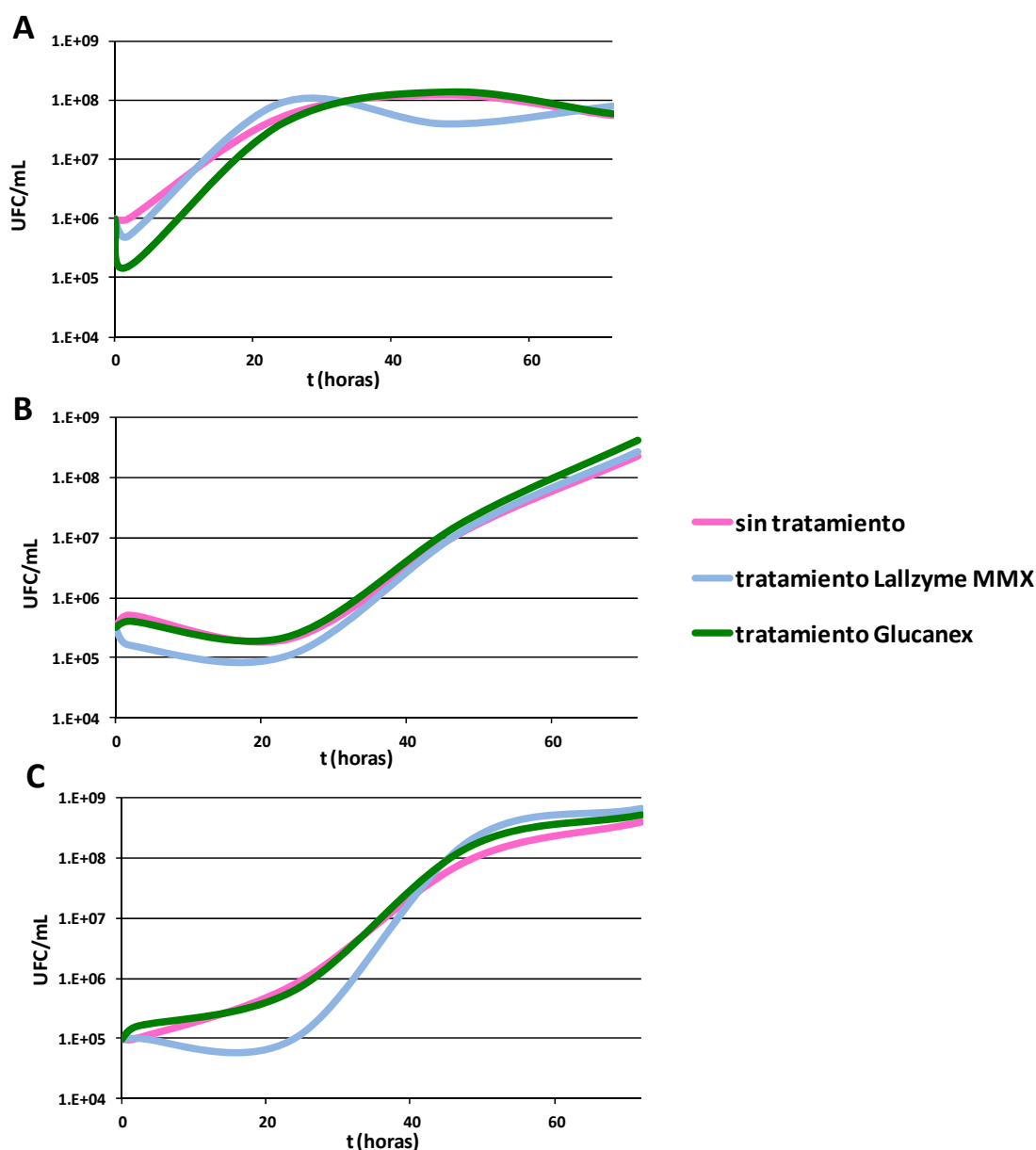


Figura 27. Efecto del tratamiento con preparados enzimáticos líticos (5 g/hL) sobre la cinética poblacional de los microorganismos implicados en el proceso de acidificación biológica. A) Uvaferm VN®. B) Enolab 4607. C) Enolab 4608.

En cuanto a las BL, la viabilidad de ambas cepas se vio afectada únicamente por Lallzyme MMX™, observándose un pequeño descenso de la concentración de bacterias vivas durante las primeras 24 horas en el caso de ambas cepas y un alargamiento de la fase de latencia en el caso de la cepa 4608. Una vez superadas las 24 horas la bacteria 4607 tratada tanto con Glucanex® como con Lallzyme MMX™ inició su fase de crecimiento exponencial con unas cinéticas de crecimiento semejantes a la del control sin tratar (Figura 27B). En el caso de la

Resultados

bacteria 4608, el crecimiento con Glucanex® fue semejante al del control, mientras que con Lallzyme MMX™ la bacteria creció a una velocidad superior a la del control y a la tratada con Glucanex®, aunque consiguió la misma concentración celular máxima (Figura 27C).

En los experimentos realizados con BL no se observaron diferencias significativas en la disminución de pH conseguida tras la aplicación de distintos preparados enzimáticos. Sí que se observaron diferencias entre las dos cepas en el descenso de pH, siendo mayor en el caso de la cepa 4608. Ello fue debido posiblemente a que su fase de crecimiento se inició antes que la de la cepa 4607 y concomitantemente el consumo de azúcares (Figura 28). Tampoco se apreciaron diferencias significativas ni en la síntesis de ácido láctico ni en el tiempo de realización de la FML, la cual se llevó a cabo a las 72 horas tras la inoculación de la BL (datos no mostrados).

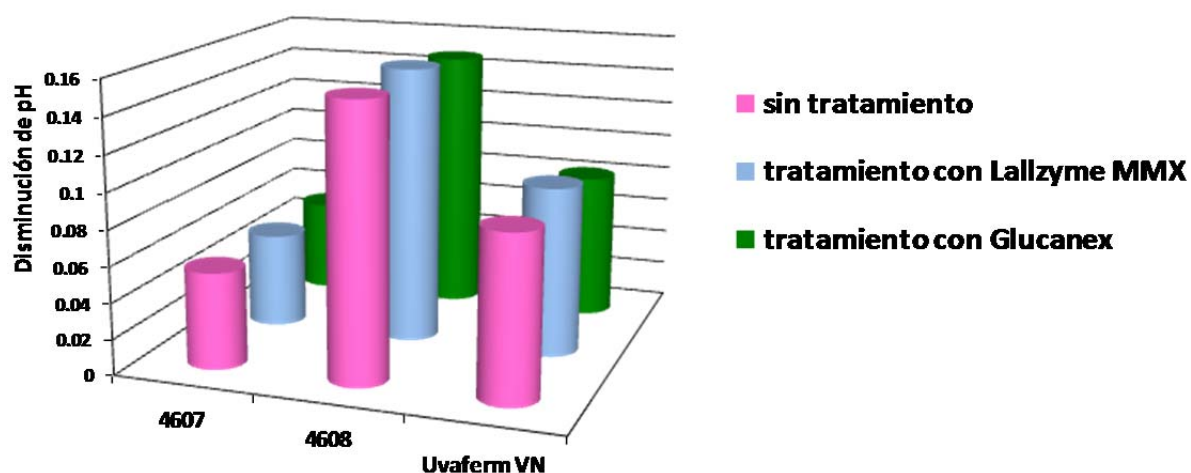


Figura 28. Efecto del tratamiento con preparados enzimáticos líticos (5 g/hL) sobre la acidificación del producto final.

En resumen, el tratamiento con enzimas líticas no resultó lo suficientemente efectivo como para favorecer la supervivencia y actividad de las BL en los primeros días al retrasar el crecimiento de las levaduras.

4.6. Efecto de la presencia de microbiota autóctona en el proceso de acidificación biológica

La evaluación del efecto que puede ejercer la microbiota autóctona sobre el proceso de acidificación biológica se evaluó en dos tipos de mosto: blanco Viura (medios M y MNE) y tinto

Bobal (medios BE y BNE). En ambos casos se compararon los resultados de crecimiento y acidificación por la bacteria 4608 en mostos que presentaban su microbiota autóctona y en los mismos mostos en los que ésta había sido eliminada por filtración.

En el caso del mosto blanco la bacteria 4608 experimentó crecimiento durante las primeras 48 horas tanto en presencia como en ausencia de microbiota autóctona, aunque este crecimiento fue mayor en el caso del mosto estéril (M). A partir de este momento la bacteria se comportó de manera diferente, así en el mosto no estéril la concentración de bacterias viables disminuyó progresivamente durante los siguientes 5 días hasta alcanzar una concentración residual de 10 UFC/mL. Sin embargo, en el mosto estéril la concentración de células viables permaneció estable durante los mismos días (Figura 29). En los medios preparados a partir de mosto tinto (BE y BNE), la concentración de células viables iniciales se mantuvo en los mismos niveles durante las primeras 48 horas en ambos casos. En cambio, a partir de este momento la concentración de bacterias viables disminuyó rápidamente en el mosto no estéril (BNE) mientras que aumentó un orden logarítmico durante el mismo periodo y dos órdenes al cabo de 7 días en el medio estéril (BE) (Figura 29).

Se observó un notable descenso de pH en los medios no estériles. Ello fue debido posiblemente a la síntesis de ácidos orgánicos por parte de la microbiota autóctona, ya que en los medios control MNE y BNE (no inoculados con bacterias) tuvo lugar un descenso similar del pH (Figura 30). En cambio, la bajada de pH observada en los medios estériles fue consecuencia de la actividad de la bacteria inoculada, ya que en el medio control no hubo variación del mismo.

Resultados

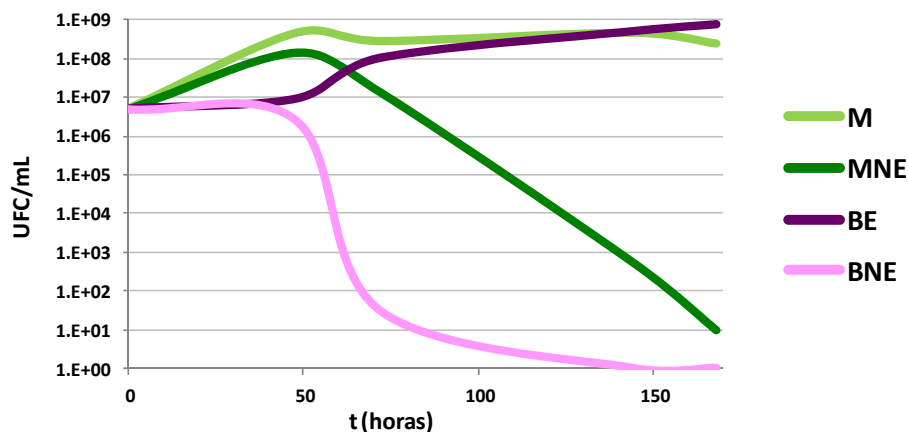


Figura 29. Cinética de crecimiento de la cepa 4608 en medios con mosto blanco y tinto con o sin microbiota autóctona (M: mosto blanco estéril, MNE: mosto blanco no estéril, BE: mosto tinto estéril, BNE: Mosto tinto no estéril).

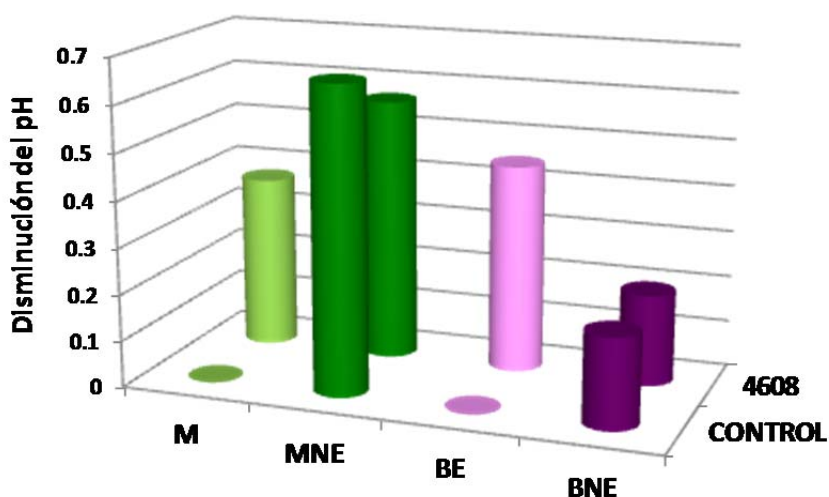


Figura 30. Descenso de pH observado al final de los ensayos en medios con mosto blanco y tinto con o sin microbiota autóctona (ver leyenda Figura 29).

Se analizaron los componentes presentes en los medios a lo largo del experimento con el fin de evaluar el efecto de la microbiota autóctona. El descenso de la concentración de azúcares a lo largo del ensayo fue menor en los medios estériles inoculados con la bacteria que en los no estériles. En los medios MNE y BNE los azúcares disminuyeron acusadamente a lo largo del ensayo debido principalmente al metabolismo fermentativo de las levaduras autóctonas, y en menor grado al de las BL inoculadas. En el medio BNE se observó un consumo de azúcares más acelerado, ya que al proceder de mosto fresco es probable que contuviera

una mayor concentración de microbiota autóctona que el MNE que procedía de mosto concentrado.

Respecto a los ácidos orgánicos, la síntesis de ácido láctico en los medios M y BE fue de 6 y 8 g/L, respectivamente, mientras que en los medios MNE y BNE fue inferior a 3 g/L. La mayor producción de ácido láctico se produjo en medio M debido al mayor crecimiento de la BL en este medio. En los medios MNE y BNE (mostos no estériles) no se observó producción de ácido láctico procedente de la fermentación de azúcares, ya que en el primero la pequeña producción de ácido láctico coincidió temporal y estequiométricamente con la realización de la FML, y en el segundo se observaron concentraciones similares de ácido láctico a las observadas en el medio control, lo cual indicó que lo produjo la microbiota autóctona y no la bacteria inoculada (Figura 31A).

La FML se llevó a cabo en los medios M, MNE y BE, aunque en los dos primeros de forma mucho más rápida que en el tercero. Esto indicó la existencia de algún factor de inhibición de las BL que impidió la realización de la FML en los medios que contenían mosto tinto no estéril. Además, en los medios MNE y BNE se observaron diferencias en las concentraciones de ácido málico. En el medio MNE se sintetizó aproximadamente 1 g/L de este ácido, mientras que en el medio BNE se observó una degradación de aproximadamente 0.5 g/L. Esto podría explicarse por el hecho de que entre la microbiota autóctona del medio MNE debían existir levaduras productoras de este ácido, mientras que en el BNE el consumo de ácido málico podrá deberse bien a levaduras degradadoras, bien a las BL inoculadas [262] (Figura 31B).

También se observó la síntesis de ácido cítrico en los medios MNE y BNE, siendo éste mayor en el primero que en el segundo. Esto fue la causa de la mayor disminución de pH observada en este vino, debida en su mayor parte a la mayor síntesis de éste ácido por las levaduras y no a la producción de ácido láctico por parte de las BL, ya que en el medio no estéril la acidificación fue similar tanto si la bacteria se inoculaba como si no. La bacteria inoculada degradó un 40% del ácido cítrico en medio M y un 28% en medio BE. En cambio, en

Resultados

los medios con microbiota autóctona (MNE y BNE) no se observó degradación de este ácido (Figura 31C).

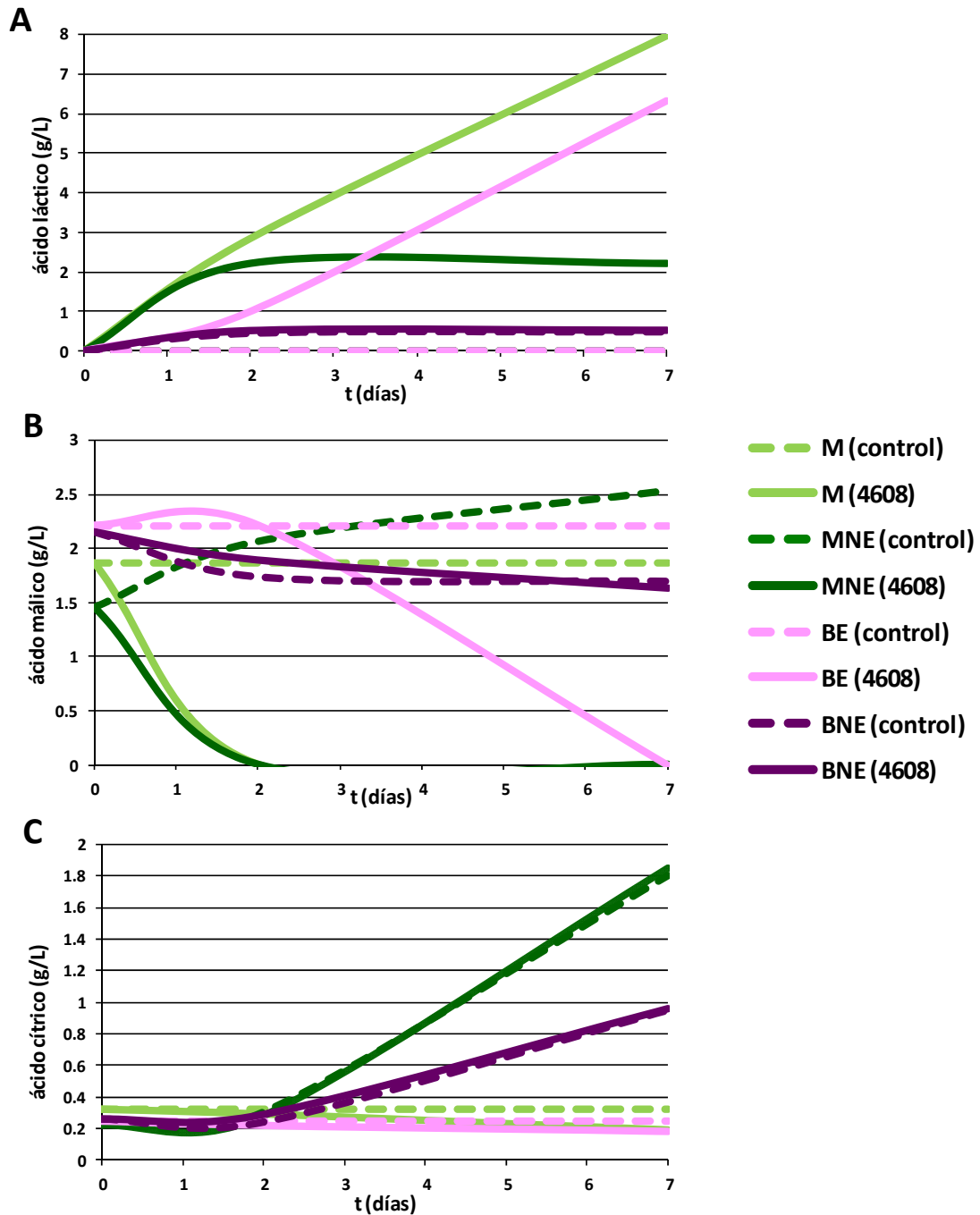


Figura 31. Evolución de la concentración de ácidos observada en medios con mosto blanco y tinto con o sin microbiota autóctona. A) Evolución del ácido láctico. B) Evolución del ácido málico. C) Evolución del ácido cítrico. (ver leyenda Figura 29).

El comportamiento de la BL inoculada, Enolab 4608, se vio altamente influenciado por la presencia de microbiota autóctona en el mosto, sobre todo en mosto tinto. Esto pudo ser debido a una mayor concentración de microorganismos presentes en estos mostos (datos no analizados) o a la presencia de polifenoles que podrían haber inhibido en mayor medida el crecimiento de la bacteria que en los mostos blancos. Los resultados de crecimiento representados en la Figura 29 explican el hecho de que la realización de la FML sólo tuviese lugar en los medios M, MNE y BE ya que fueron en los que se observó crecimiento bacteriano, al menos las primeras 48 horas. De igual manera, la síntesis de ácido láctico y la disminución de pH solo tuvieron lugar en los medios M y BE que es donde se observó crecimiento de la bacteria a lo largo de los 7 días. Este crecimiento no se produjo o fue muy limitado en presencia de microbiota autóctona (medios MNE y BNE).

4.7. Efecto de la concentración de polifenoles del mosto sobre el proceso de acidificación biológica

Se analizó el comportamiento de la bacteria Enolab 4608 en medios con diferente concentración de polifenoles. En los medios M (mosto blanco Airén) y A+B (mosto mezcla 50% blanco Airén y tinto Bobal) la bacteria mostró un comportamiento muy similar, observándose un incremento de su concentración de hasta dos órdenes logarítmicos tras su inoculación. En cambio, en el medio A+T (mosto blanco Airén con taninos) se observó una disminución lenta pero progresiva de las bacterias viables durante todo el ensayo. En el medio BE (mosto tinto Bobal) las bacterias presentaron un comportamiento intermedio, observándose una fase de latencia de en torno a 48 horas tras su inoculación, y un crecimiento rápido en las siguientes 24 horas y más lento posteriormente (Figura 32).

La disminución de pH observada en los productos finales fue similar en los medios con un contenido en polifenoles bajo o intermedio (M y A+B). En cambio, en el medio con mayor contenido en polifenoles (A+T), la disminución de pH fue menor, coincidiendo con la menor viabilidad de la bacteria en este medio (Figura 33).

Resultados

La producción de ácido láctico estuvo relacionada con la cinética de crecimiento de la bacteria en los diferentes medios. Se observó una mayor producción en los medios en los que la bacteria creció mejor debido a su menor contenido en polifenoles, y lo contrario ocurrió en los medios con un mayor contenido en estos compuestos (Figura 34A).

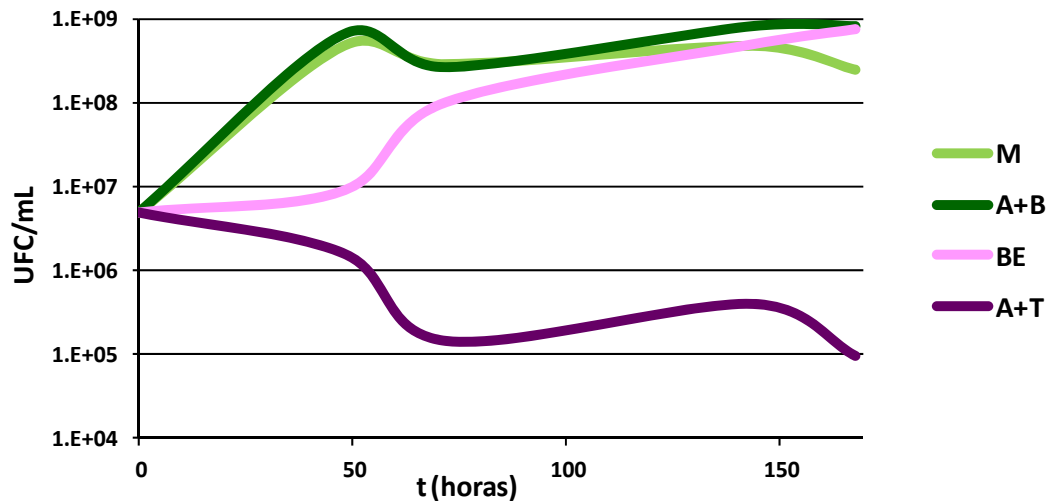


Figura 32. Cinética de crecimiento de la cepa Enolab 4608 en medios con diferente concentración de polifenoles (M: mosto blanco, A+B: mosto blanco y mosto tinto (1:1), BE: mosto tinto, A+T: mosto blanco con taninos).

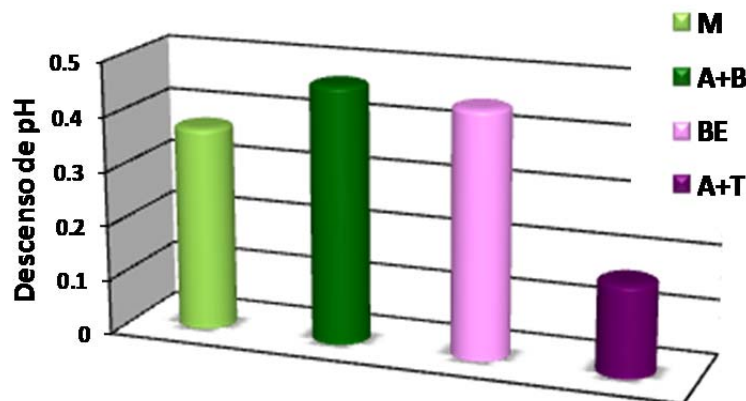


Figura 33. Disminución de pH ocasionada por la cepa 4608 en los medios con diferente concentración de polifenoles (ver leyenda Figura 32).

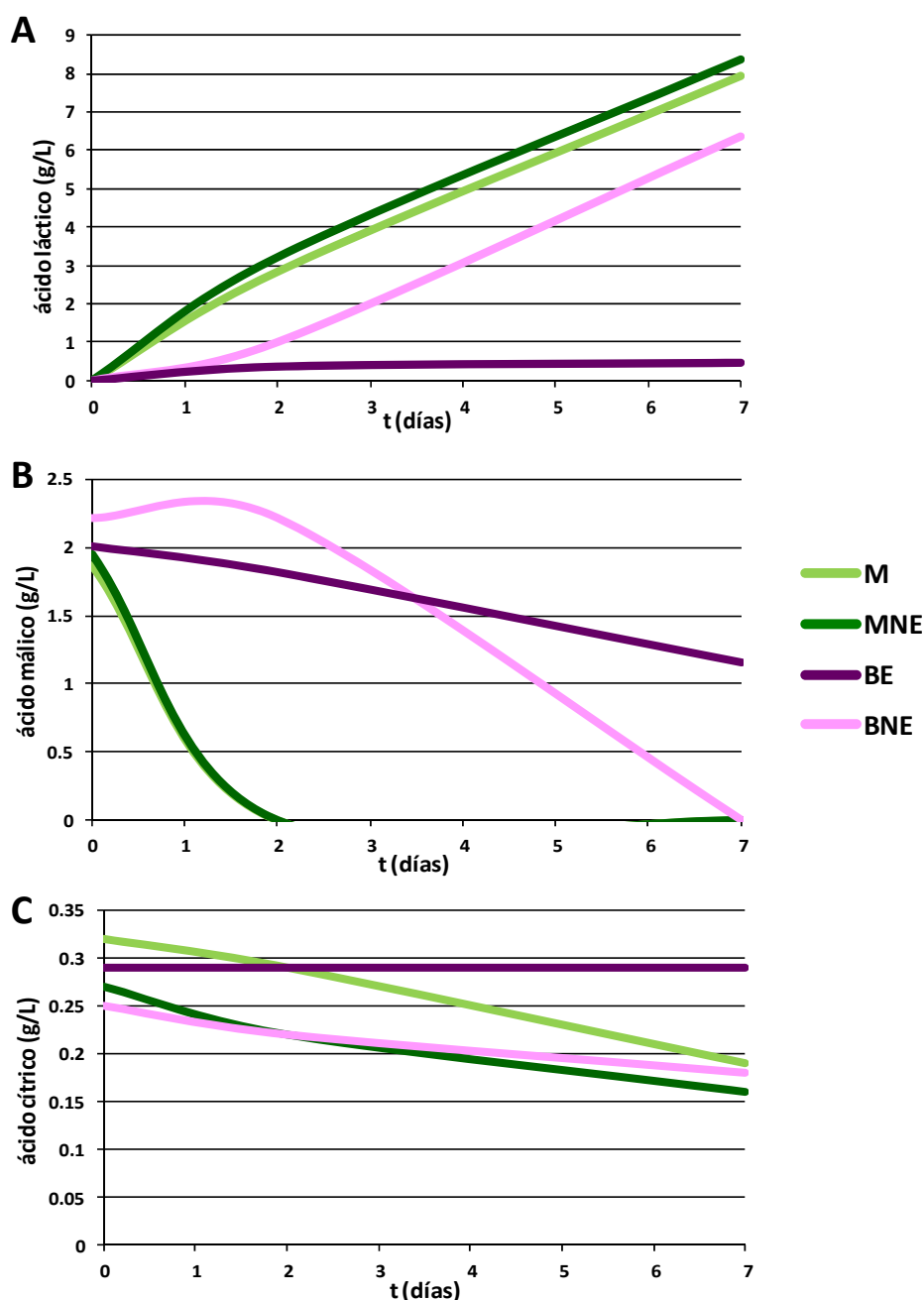


Figura 34. Evolución del ácido láctico en medios con diferentes concentraciones de polifenoles inoculados con la cepa 4608. A) Evolución del ácido láctico. B) Evolución del ácido málico. C) Evolución del ácido cítrico. (ver leyenda Figura 32).

La degradación del ácido málico también estuvo correlacionada con las cinéticas de crecimiento de la bacteria en los medios de cultivo. En los medios en los que el crecimiento de la bacteria fue rápido (M y A+B) la degradación completa tuvo lugar en 48 horas. La degradación de este ácido en el medio en el que la bacteria no creció fue sólo del 40%,

mientras que en el medio BE la degradación fue total pero resultó más lenta que en los medios M y A+B (Figura 34B). Del mismo modo, la degradación del ácido cítrico también resultó dependiente del crecimiento de la bacteria (Figura 34C).

En resumen, se ha observado una importante influencia negativa de los polifenoles sobre el crecimiento y capacidad de acidificación de la BL Enolab 4608. Así, el crecimiento, la disminución de pH, la producción de ácido láctico, la degradación de ácido málico y de ácido cítrico disminuyeron conforme aumentó el contenido en polifenoles del medio.

4.8. Determinación de la resistencia a la lisozima

El efecto de la lisozima sobre el crecimiento y la acidificación se estudió en las cepas Enolab 4607 y Enolab 4608. La adición de lisozima al medio tuvo efectos más o menos negativos para la bacteria en función de la cepa y de la concentración empleada. La más baja concentración del enzima (0.05 mg/mL) o no tuvo efecto o provocó una disminución de la velocidad de crecimiento, según la cepa. Sin embargo, concentraciones superiores a 0.1 mg/mL dieron lugar a una disminución de las células viables inoculadas. Se observó que la cepa 4608 era más resistente a la actividad lítica que la 4607, ya que a la concentración más baja de lisozima (0.05 mg/mL) tardó tan sólo 2 días en igualar la población de células viables con la del cultivo sin lisozima. A la misma concentración de lisozima, la 4607 tardó 5 días. A las concentraciones de lisozima entre 0.05 y 0.5 mg/mL, la cepa 4608 tardó 4 días en igualar su concentración de células viables con la del control sin lisozima, mientras que la 4607 tardó 7 días. A la dosis más alta la cepa 4608 tardó 6 días mientras que la 4607 no consiguió alcanzar la población del medio sin lisozima (Figuras 35A y 35B).

Cuando se evaluó el crecimiento mediante el parámetro ABC que representa el crecimiento global, se observó que a mayor concentración de lisozima se obtenían mayores ABC. La cepa Enolab 4607 rindió siempre menores ABC que la 4608, independientemente de la concentración de lisozima aplicada (Figura 36).

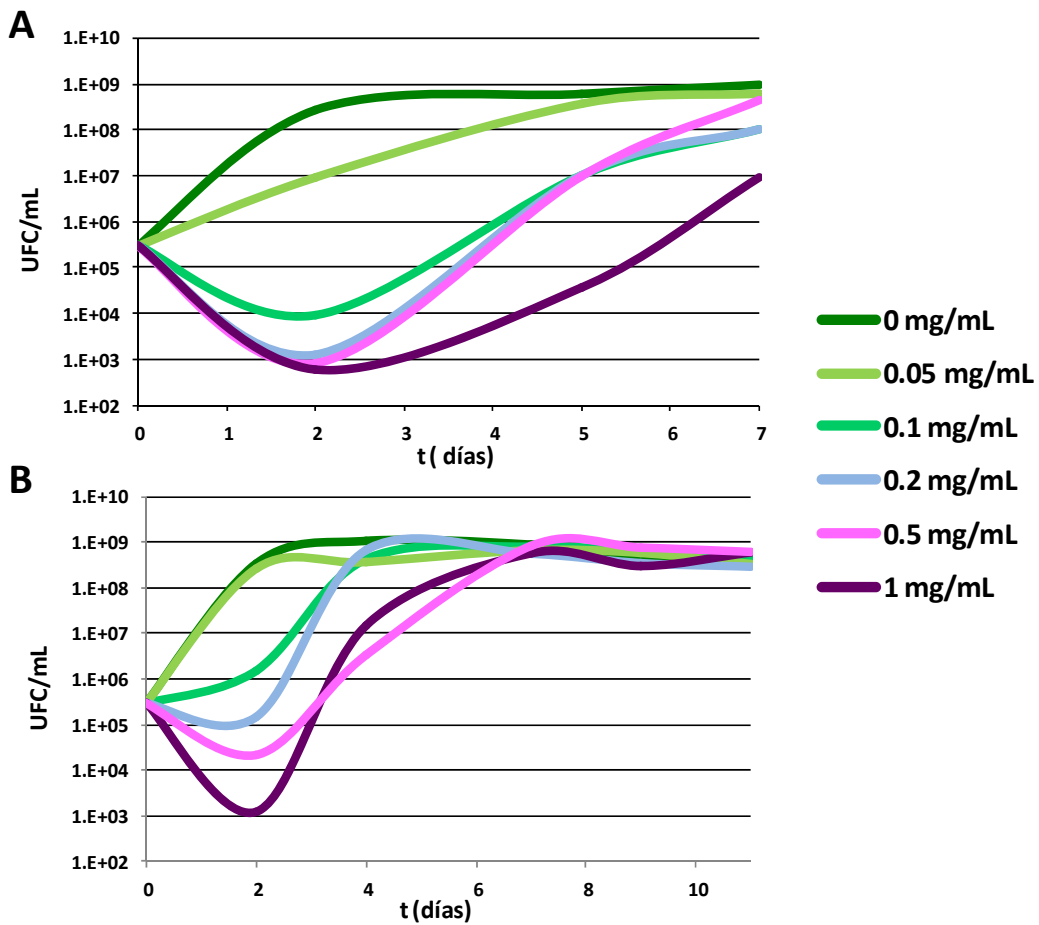


Figura 35. Efecto de la concentración de lisozima sobre el crecimiento de las cepas en medio MC. A) Enolab 4607. B) Enolab 4608.

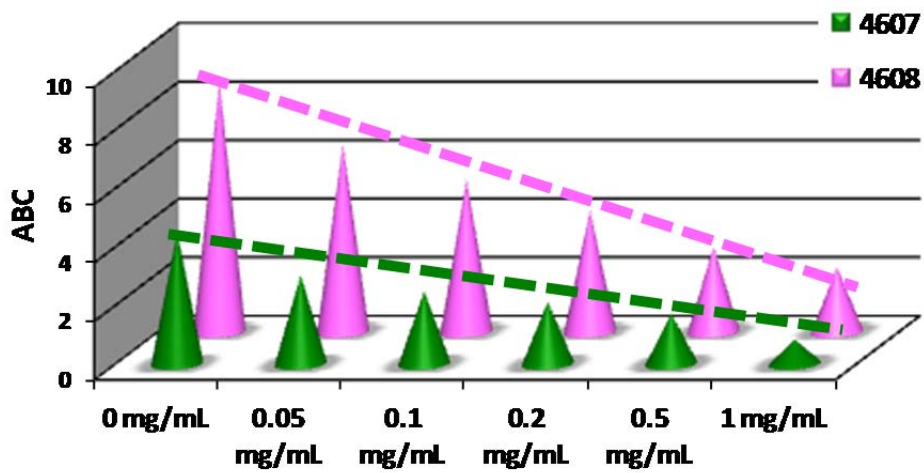


Figura 36. Efecto de la concentración de lisozima sobre el ABC de las cepas Enolab 4607 y 4608.

Resultados

El tratamiento con lisozima también afectó de forma significativa a la disminución de pH del medio al final del cultivo, observándose una menor disminución de pH a las concentraciones más altas de lisozima (Figura 37).

La cepa Enolab 4608 fue capaz de sintetizar mayor cantidad de ácido láctico que la cepa Enolab 4607, independientemente de la concentración de lisozima utilizada. En el caso de la cepa Enolab 4608 se observó una diferencia de 4 g/L de láctico entre el cultivo sin lisozima y los cultivos con una concentración superior a 0.1 mg/mL, mientras que en la cepa Enolab 4607 fue de 2-3 g/L (Figura 38). En la cepa 4608 se observó un rendimiento de ácido láctico por FL prácticamente del 100%, independientemente de la concentración de lisozima en el medio. En cambio, el rendimiento en la cepa Enolab 4607 fue aproximadamente de la mitad en concentraciones superiores a 0.1 g/L con respecto al cultivo sin lisozima. No se observaron diferencias significativas en el consumo de ácido málico ni el de ácido cítrico en relación a la concentración de lisozima, ya que ambos ácidos se consumieron por completo en todos los casos (datos no mostrados). Tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto al consumo de azúcares (datos no mostrados).

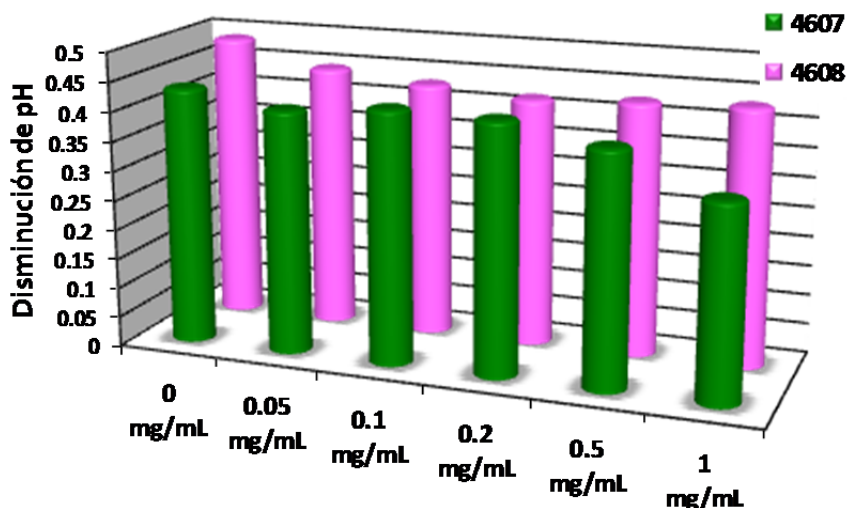


Figura 37. Efecto de la concentración de lisozima sobre la disminución de pH del medio por las cepas Enolab 4607 y 4608.

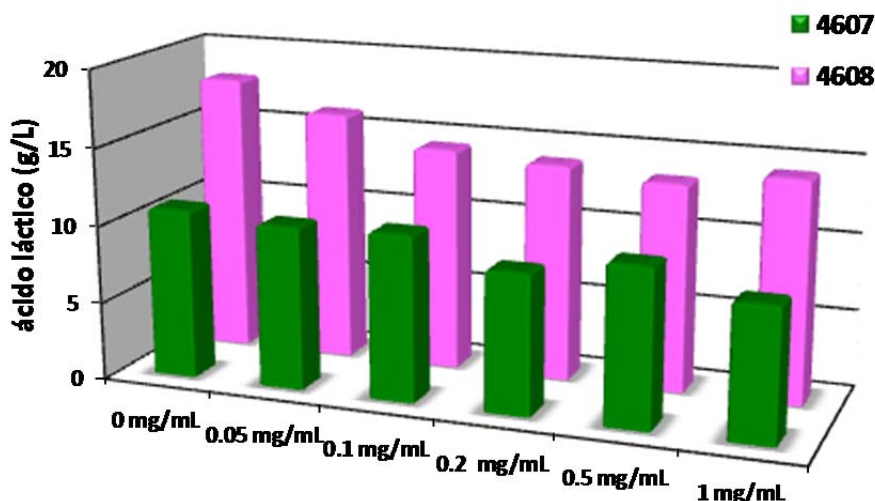


Figura 38. Efecto de la concentración de lisozima sobre la producción de ácido láctico en las cepas Enolab 4607 y 4608.

En resumen, la lisozima afectó a la capacidad de crecimiento de las bacterias, ocasionando un descenso de la población de bacterias viables de entre 1 y 4 órdenes de magnitud o una disminución de la velocidad de crecimiento durante las primeras 48 horas. El efecto más o menos drástico dependió de la concentración de lisozima utilizada. Tras este periodo las bacterias iniciaron el crecimiento exponencial alcanzando niveles máximos de 10^7 - 10^9 UFC/mL. La lisozima afectó en gran medida al metabolismo de las bacterias, haciendo que la bajada de pH del medio de cultivo fuese menor y también la producción de ácido láctico. Es posible que durante la fase de muerte y recuperación de las bacterias parte de los azúcares se destinaron a la síntesis de compuestos necesarios para formar estructuras relacionadas con el crecimiento (pared, membranas, etc.) y no a la síntesis de ácido láctico.

4.9. Determinación de la resistencia al SO₂

La resistencia al SO₂ de las cepas Enolab 4607 y Enolab 4608 se determinó cultivando a estas cepas en medio MC adicionado con diferentes concentraciones de este compuesto.

Se observó que concentraciones inferiores a 0.05 mg/mL apenas tenían efecto sobre ninguna de las dos cepas, ya que apenas supuso una ligera disminución de la velocidad de

Resultados

crecimiento. En cambio, a una concentración de 0.05 mg/mL la concentración de células viables iniciales disminuyó, siendo este fenómeno mucho más evidente en la cepa Enolab 4607. A concentraciones superiores a 0.05 mg/mL la concentración de células viables de ambas bacterias descendió drásticamente (Figura 39). La representación del parámetro ABC también confirmó el efecto negativo del SO_2 sobre el crecimiento de ambas cepas a concentraciones superiores a 0.05 g/L (Figura 40). La cepa Enolab 4608 resistió concentraciones más elevadas de SO_2 que Enolab 4607.

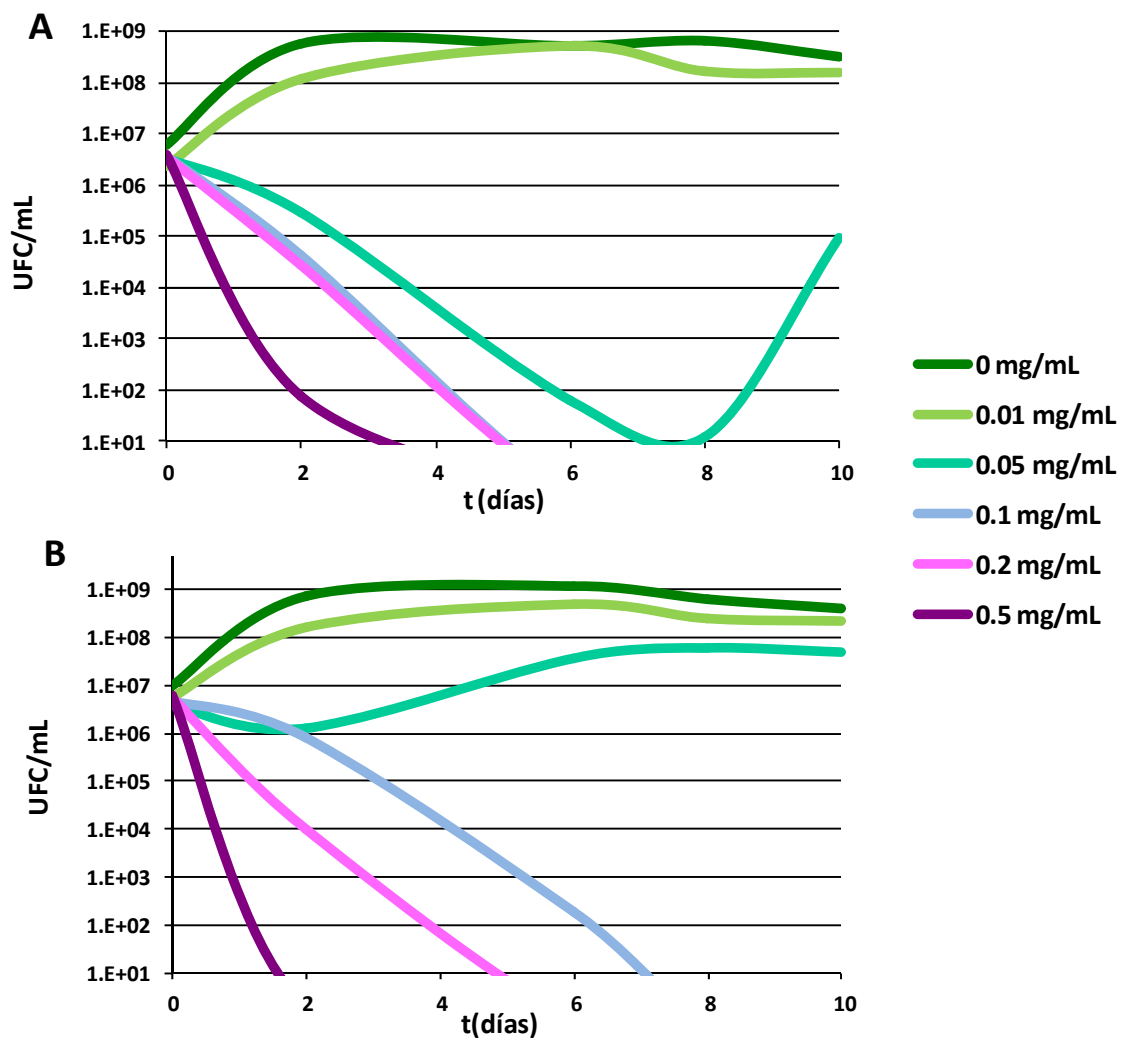


Figura 39. Efecto de la concentración de SO_2 sobre el crecimiento de las cepas en medio MC. A) Enolab 4607. B) Enolab 4608.

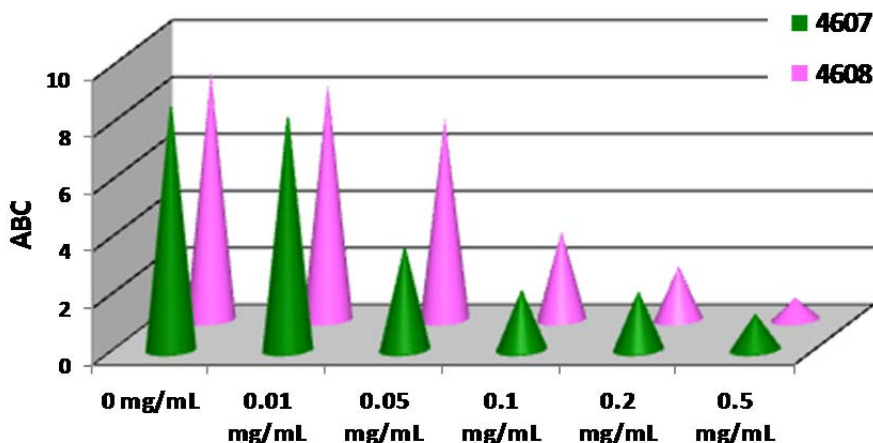


Figura 40. Efecto de la concentración de SO₂ sobre el ABC de las cepas Enolab 4607 y 4608 crecidas en medio MC.

En cuanto a la disminución del pH del medio, se observó que ésta era inversamente proporcional a la concentración de SO₂. Este hecho es un reflejo del efecto de éste antiséptico sobre el crecimiento de la bacteria. Así, el descenso de pH fue un 50% inferior en los cultivos con 0.05 mg/mL de SO₂ y nulo a concentraciones superiores respecto al observado en medio sin SO₂ (Figura 41).

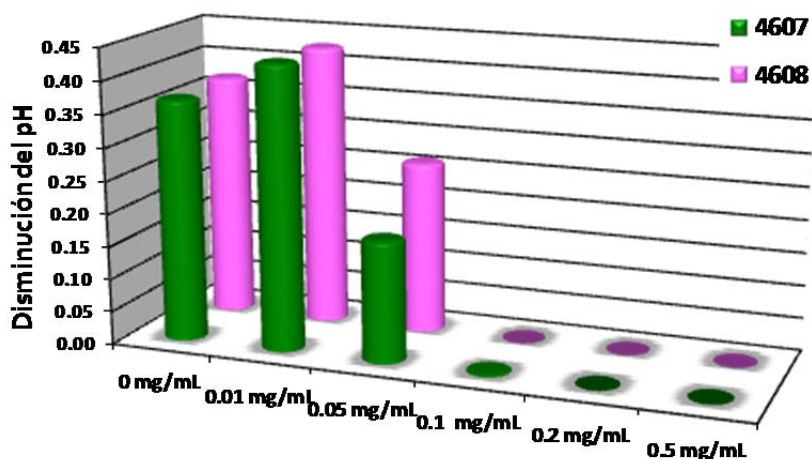


Figura 41. Efecto de la concentración de SO₂ en la disminución de pH del medio por las cepas Enolab 4607 y 4608.

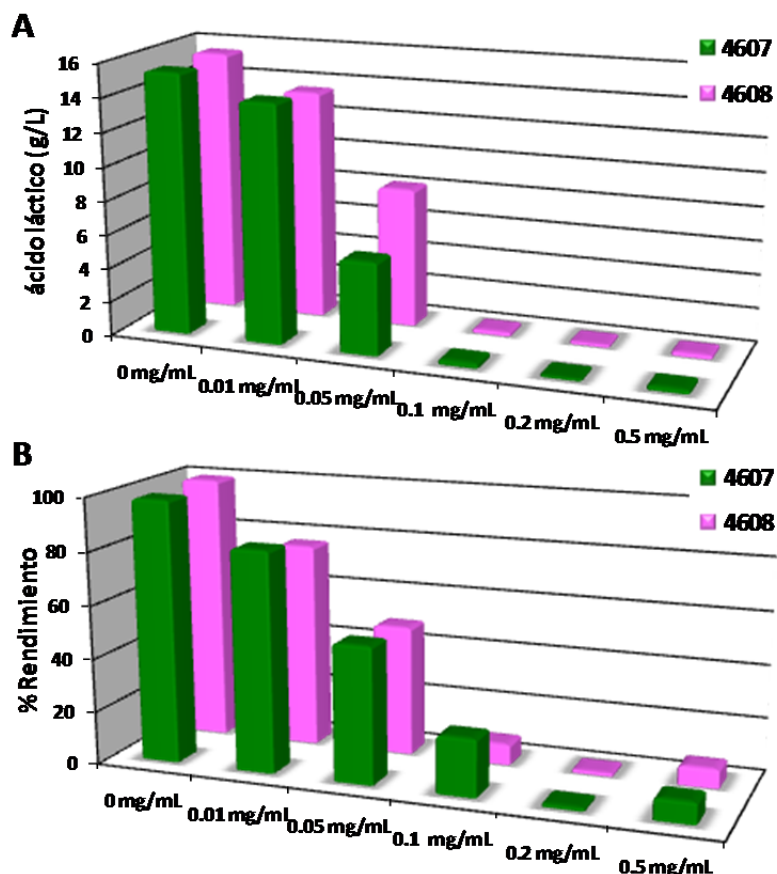


Figura 42. Efecto de la concentración de SO₂ sobre A) la producción de ácido láctico y B) el rendimiento en ácido láctico por FL de las cepas Enolab 4607 y 4608.

Se observó la misma relación inversa entre la concentración de ácido láctico al final del experimento y la concentración de lisozima en el medio. Se observó que la concentración de este ácido en cultivos con una concentración de 0.05 mg/mL de SO₂ era un 50% inferior a la que se obtenía en ausencia del mismo, y que no se sintetizaba a concentraciones superiores (Figura 42A). También el efecto del SO₂ se reflejó en los valores de rendimientos de ácido láctico por FL, disminuyendo éstos con el aumento de concentración de SO₂ (Figura 42B). La FML se llevó a cabo por los dos cultivos bacterianos a concentraciones inferiores a 0.1 mg/mL de SO₂, pero no a concentraciones superiores. Algo parecido ocurrió con el consumo de ácido cítrico que fue totalmente consumido únicamente a concentraciones de SO₂ inferiores a 0.01 mg/mL. A la concentración de 0.05 mg/mL ambas bacterias fueron capaces de consumir solamente el 50%, mientras que no lo consumieron en absoluto a concentraciones superiores. Todos estos efectos metabólicos fueron consecuencia del efecto que el SO₂ provocó en el crecimiento de la bacteria.

5. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS CULTIVOS INICIADORES OBTENIDOS EN CONDICIONES INDUSTRIALES

5.1. Evaluación de diferentes sistemas de producción

Para seleccionar el mejor sistema de producción industrial se utilizó la cepa Enolab 4608 sobre la que se ensayaron varios procesos de producción cuyas características no fueron desveladas por la empresa que los llevó a cabo (Lallemand). Tras la obtención de los lotes liofilizados se evaluó la viabilidad, el grado de contaminación, la identidad de la cepa y el comportamiento de los distintos lotes producidos a lo largo de tres años. Igualmente, se analizó el efecto ejercido por diferentes tipos de rehidratación de los preparados liofilizados sobre el crecimiento, la capacidad para disminuir el pH, la síntesis de ácido láctico y la degradación de ácidos málico y cítrico.

Los recuentos de células totales obtenidos en el laboratorio de los diferentes lotes producidos, expresados en células/g, fueron muy similares a los recuentos proporcionados por la empresa Lallemand. En los diferentes lotes se observó una concentración de células totales que variaba entre 1.5 y 3.5×10^{11} células/gramo (Tabla 17). Con sólo tres excepciones, los recuentos totales obtenidos en nuestro laboratorio (ENOLAB) fueron iguales o superiores a los proporcionados por la empresa.

El porcentaje de células viables que mostraron los preparados fue variable entre los lotes analizados. Estas diferencias se observaron tanto a partir de los recuentos de viables en placa como en los obtenidos mediante el kit de viabilidad LIVE/DEAD® (Tabla 17). El aspecto que presentaban al microscopio distintos lotes analizados con este kit se muestra en la Figura 43. Por ambos métodos, el porcentaje de células viables de los diferentes cultivos iniciadores varió entre el 13 y el 80% según el recuento en placa y entre el 40 y el 75% según el kit LIVE/DEAD®. Los mayores porcentajes de células viables fueron los correspondientes a los lotes F-6873 R1, F-6873 R2, F-6889 R2 y F-6890 R1 (Tabla 17). Estas diferencias en los recuentos mediante los dos métodos fueron debidas a que el kit de viabilidad discrimina entre

Resultados

células vivas y muertas en base a la diferente capacidad de penetración que presenta el yoduro de propidio en células con la membrana dañada o íntegra, mientras que el recuento en placa evidencia aquellas células capaces de crecer sobre un medio sólido. Es por ello por lo que los recuentos de células viables no mostraron resultados semejantes en ambos métodos. Así, un mayor recuento de células viables mediante el kit LIVE/DEAD® puede deberse a que existen células vivas pero incapaces de crecer (células viables no cultivables) en medio sólido, mientras que un mayor recuento obtenido por recuento en placa puede deberse a que existen células con la membrana ligeramente dañada, que en medio sólido pueden recuperarse y crecer [263].

Tabla 16. Recuentos de bacterias totales y viables, y cálculo del porcentaje de viabilidad por diferentes métodos de los cultivos iniciadores.

Lote	Células totales/g		UFC/mL	% viabilidad	
	Lallemand	Enolab		Recuento en placa	Kit LIVE/DEAD®
F-6828	1.2×10^{11}	3.3×10^{11}	2.7×10^8	51	60
F-6829	2.2×10^{11}	3.5×10^{11}	3.3×10^8	52	50
F-6873 R1	1.8×10^{11}	3.3×10^{11}	3.8×10^8	70	70
F-6873 R2	1.9×10^{11}	1.7×10^{11}	3.5×10^8	80	70
F-6874 R1	1.6×10^{11}	2.2×10^{11}	4.2×10^8	45	50
F-6874 R2	1.8×10^{11}	1.5×10^{11}	4.2×10^8	65	70
F-6889 R1	1.5×10^{11}	1.5×10^{11}	2.4×10^8	37	40
F-6889 R2	1.7×10^{11}	2.9×10^{11}	4.8×10^8	65	75
F-6890 R1	2.1×10^{11}	1.9×10^{11}	4.3×10^8	80	75
F-6890 R2	1.6×10^{11}	1.6×10^{11}	8.5×10^7	13	40

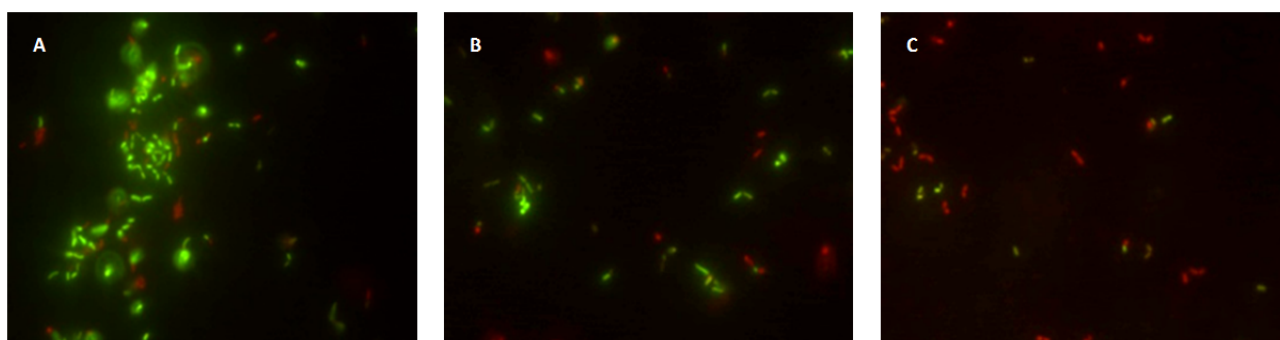


Figura 43. Imágenes obtenidas en el microscopio de fluorescencia de los preparados comerciales analizados con el kit de viabilidad LIVE/DEAD® (Invitrogen). A) Lote F-6890 R1. B) Lote F-6828. C) Lote F-6890 R2.

En ninguno de los lotes se detectaron contaminaciones ni por levaduras ni por bacterias acéticas. Sólo en los lotes F-6828 y F-6829 se detectaron 1.4×10^4 UFC/g y 3.8×10^3 UFC/g de bacterias ambientales, respectivamente.

Se analizaron los perfiles de 16S-ARDRA y RAPD de los aislados obtenidos a partir de cada preparado comercial y se compararon con los de cepas de referencia contenidas en la base de datos Bionumerics_Enolab. El análisis de los perfiles 16S-ARDRA de los aislados de los lotes coincidieron con el de la cepa de referencia *L. plantarum* CECT 748^T, por lo que se dedujo que la cepa de los lotes pertenecía a la especie *L. plantarum* (Figura 44). De igual manera, los perfiles de RAPD de los aislados obtenidos de los diferentes lotes se agruparon con el de la cepa Enolab 4608 a un porcentaje de similitud superior al 80% tras ser analizados por UPGMA y utilizando el coeficiente de Pearson para el análisis. Ello probó que todos los aislados correspondían a dicha cepa. La Figura 45 corresponde a un dendrograma realizado con los perfiles de RAPD de 9 aislados del lote F-6829 y el perfil correspondiente a la cepa Enolab 4608 y se presenta como ejemplo de resultado obtenido con esta técnica de tipificación.

La concentración máxima de células viables que presentaban los preparados liofilizados de los diferentes lotes de la cepa Enolab 4608 inoculados en el medio MC era semejante a la que exhibía la misma cepa inoculada en el mismo medio a partir de un inóculo fresco convencional (concentraciones aproximadamente de 3×10^8 UFC/mL o superiores). No se observaron grandes diferencias entre los medios inoculados en la capacidad para disminuir el pH con los lotes liofilizados y los cultivos frescos. La máxima diferencia de pH es la que se encontró entre el medio inoculado con el cultivo fresco de la cepa 4608 y el inoculado con el lote F6828 (0.03 unidades de pH) (Figura 46A).

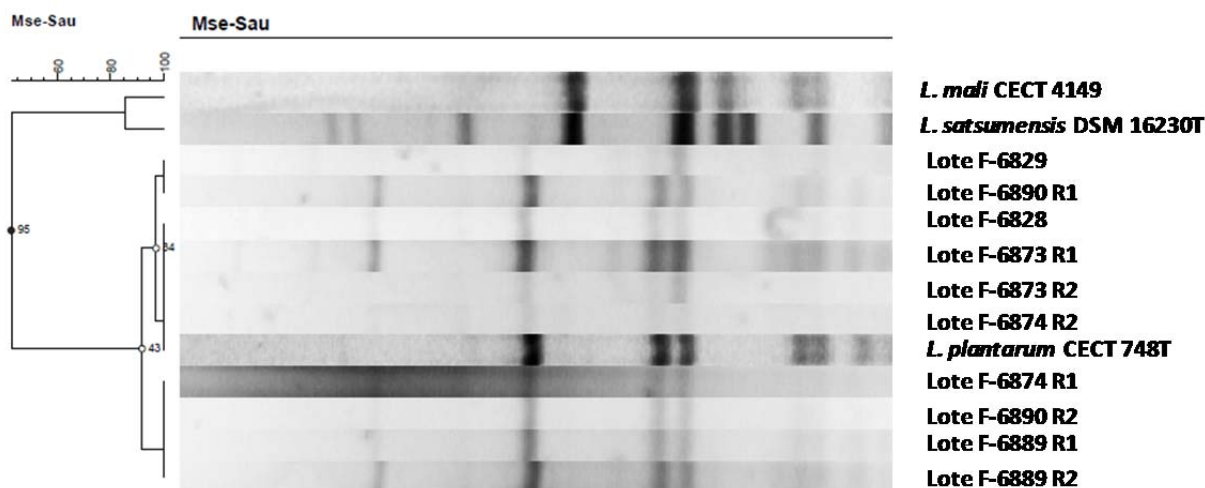


Figura 44. Dendrograma obtenido mediante el análisis de agrupamiento UPGMA de los perfiles 16S-ARDRA (*MseI*) de los aislados de los distintos lotes de preparados comerciales y las cepas tipo de *L. plantarum* CECT 748T, *L. mali* CECT 4149 y *L. satsumensis* DSM 16230T. Para ello se utilizó el coeficiente de similaridad de Dice.

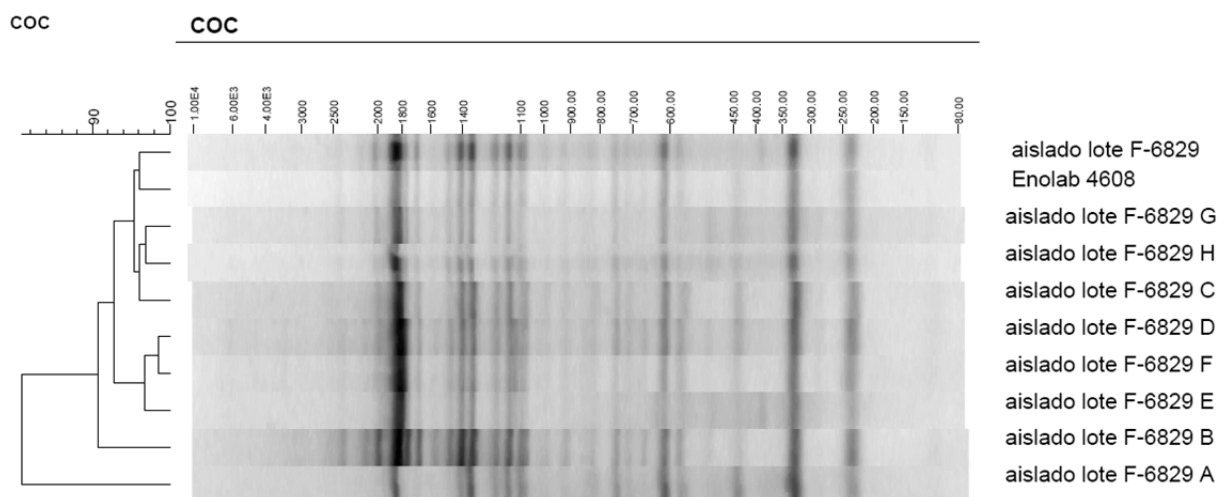


Figura 45. Dendrograma obtenido mediante el análisis de agrupamiento UPGMA de los perfiles de RAPD de los aislados del lote F-6829 y la cepa Enolab 4608. Para ello se utilizó el coeficiente de similaridad de Pearson.

Los lotes liofilizados consumieron entre 1.3 y 3.3 veces más azúcar y generaron unos niveles de ácido láctico entre 1.01 y 1.19 veces inferiores a los del cultivo fresco en el medio MC (Figuras 46B y 46C). El lote que exhibió un consumo de azúcares y una producción de ácido láctico más parecida a los del cultivo fresco fue el F-6829. En general se pudo apreciar un

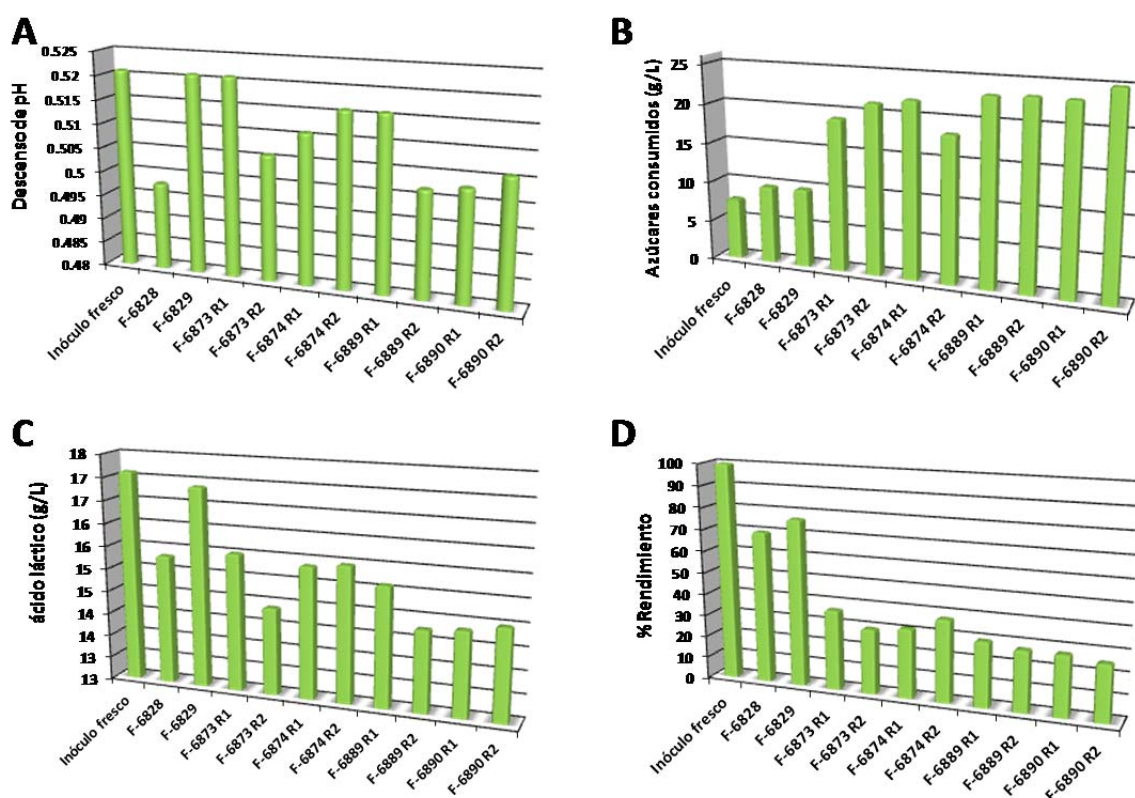


Figura 46. Resultados de algunos parámetros metabólicos de los medios inoculados con los distintos lotes de los preparados comerciales en medio MC. A) Descenso de pH B) Azúcares consumidos. C) Concentración de ácido láctico. D) Rendimiento de la FL.

desequilibrio entre el consumo de azúcar y la producción de ácido láctico en las cepas sometidas a liofilización, ya que el consumo de azúcares en éstos fue mayor que el observado con el inóculo fresco, sin embargo la síntesis de ácido láctico fue menor (Figuras 46B y 46C). La relación no proporcional entre el consumo de azúcares y la síntesis de ácido láctico pudo ser debida al redireccionamiento de los intermediarios de la ruta glucolítica a la síntesis de biomoléculas implicadas en la recuperación del metabolismo latente y del crecimiento celular [264]. Los lotes de producción denominados F6828 y F6829 fueron los que presentaron los rendimientos más elevados en ácido láctico, aunque estos fueron inferiores a los calculados para el cultivo fresco (un 30% y un 23% inferiores, respectivamente) (Figura 46D). Tanto el consumo de ácido málico como el de ácido cítrico fue total en todos los casos e independiente de si el inóculo era fresco o liofilizado.

A partir de los resultados obtenidos se dedujo que el sistema de producción del cultivo iniciador liofilizado más adecuado para el proceso de acidificación biológica fue el que se siguió para producir el lote F-6829. Este sistema, a pesar de que presentaba un porcentaje de viabilidad menor que otros lotes logró alcanzar máximos de células viables similares al resto durante el ensayo, dando lugar a los mayores descensos de pH, mayor producción de ácido láctico y mayores rendimientos de este ácido por FL.

5.2. Evaluación de las características de los diferentes preparados industriales liofilizados

Una vez seleccionado el procedimiento de producción de los preparados, que resultó ser el empleado en la fabricación del lote F-6829, éste se aplicó a otras cepas para producir preparados liofilizados industriales. Estos preparados comerciales se produjeron a lo largo de tres años consecutivos.

A. Determinación de la viabilidad de los preparados

Los recuentos de células totales realizados en nuestro laboratorio mostraron que los preparados presentaban una concentración de bacterias totales próxima a la proporcionada por la empresa Lallemand. Los recuentos de células viables encontrados por recuento en placa y por kit de viabilidad LIVE/DEAD® diferían para cada lote debido a las causas ya expuestas en el apartado 5.1. Todos los preparados mostraron un porcentaje de viabilidad por recuento en placa superior al 50%, excepto los S4538(2009), S4555(2009) y S4608(2010) (Tabla 18). Sin embargo, la viabilidad de todos, determinada por el kit LIVE/DEAD®, fue siempre superior al 50%. Los máximos valores de viabilidad por los dos métodos fueron los del lote S4607(2011).

Tabla 17. Recuentos de bacterias totales y viables por diferentes métodos, y cálculo del porcentaje de viabilidad de los preparados comerciales liofilizados.

PREPARADO COMERCIAL	CÉLULAS TOTALES/G			% VIABILIDAD	
	LALLEMAND	ENOLAB	UFC/mL	PLACA	KIT LIVE/DEAD®
S4538(2009)	1.7×10^{11}	1.62×10^{11}	9.60×10^7	44	50
S4555(2009)	2.5×10^{11}	2.29×10^{11}	1.89×10^8	40	50
S4634(2009)	2.1×10^{11}	2.14×10^{11}	4.90×10^8	69	54
S4608(2009)	1.6×10^{11}	1.23×10^{11}	2.40×10^8	100	67
S4555(2010)	1.8×10^{11}	2.88×10^{11}	3.40×10^8	82	65
S4607(2010)	1.8×10^{11}	2.82×10^{11}	2.00×10^8	57	67
S4608(2010)	1.8×10^{11}	3.72×10^{11}	9.50×10^8	24	55
Enoferm V22(2010)	1.8×10^{11}	1.16×10^{11}	3.00×10^8	67	50
Lalvin VP41(2010)	1.8×10^{11}	1.87×10^{11}	3.40×10^8	62	72
S4607(2011)	3.0×10^{11}	3.20×10^{11}	5.00×10^8	100	80
S4608(2011)	2.6×10^{11}	3.00×10^{11}	5.50×10^8	86	50

B. Detección de contaminaciones

En ningún preparado se detectó contaminación por levaduras ni por bacterias acéticas. En cambio, se detectaron contaminaciones por bacterias ambientales en todos los preparados. El nivel de contaminación detectado estaba entre 2.9×10^3 y 5.8×10^5 células/g. Además, en el preparado Lalvin VP41®(2010) de *O. oeni* se detectó contaminación por *Lactobacillus* en una concentración de 2.2×10^5 células/g.

C. Identificación y tipificación de las células presentes en los preparados

El análisis de los perfiles 16S-ARDRA de los aislados obtenidos de los preparados S4538(2009), S4608(2009), S4607(2010), S4608(2010), Enoferm V22(2010), S4607(2011) y S4608(2011) reveló que los 70 aislados analizados (10 por preparado comercial) se agruparon con la cepa tipo de *L. plantarum* CECT 748T a un porcentaje de similitud del 97.9%, lo que quiere decir que pertenecían a esa especie (Figura 47). Los perfiles de los aislados de los preparados S4555(2009) y S4555(2010) se agruparon con el de la cepa tipo de *L. satsumensis* DSM 16230T a un porcentaje de similitud del 100%, por lo que se asumió que pertenecían a esa especie (Figura 47). Los perfiles de los aislados del preparado S4634(2009) se agruparon con el de la cepa tipo de *L. mali* CECT 4149 a un porcentaje de similitud del 93.3%, mientras

Resultados

que los del preparado Lalvin VP41(2010) se agruparon con el de la cepa tipo de *O. oeni* CECT 4028 a un porcentaje de similitud del 90.9% (Figura 47), por lo que se identificaron como pertenecientes a las especies *L. mali* y *O. oeni*, respectivamente.

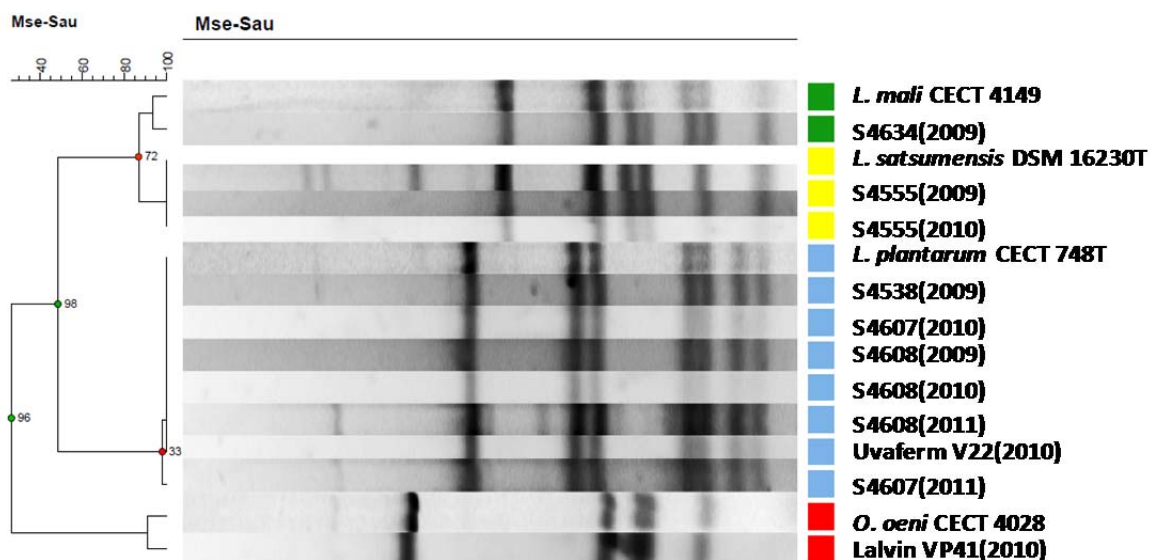


Figura 47. Dendrograma obtenido mediante el análisis de agrupamiento de los perfiles 16S-ARDRA de los aislados de los preparados comerciales liofilizados y las cepas tipo de las especies a las que corresponden.

Los perfiles de RAPD de los aislados de los preparados S4538(2009), S4555(2009 y 2010), S4634(2009), S4607(2010 y 2011), S4608(2009, 2010 y 2011), Enoferm V22(2010) y Lalvin VP41(2010) se agruparon a un porcentaje de similitud superior al 80% con los perfiles de las cepas Enolab 4538, 4555, 4634, 4607, 4608, Enoferm V22® y Lalvin VP41®, respectivamente. Esto aseguró que estos preparados contenían las cepas originales.

D. Determinación de la efectividad del preparado para llevar a cabo la acidificación biológica

No se observaron diferencias notables en el crecimiento máximo alcanzado en el medio MC inoculado con el preparado liofilizado y con el cultivo fresco. Todos los preparados alcanzaron una concentración máxima de $1-3 \times 10^8$ UFC/mL. La disminución de pH observada en los medios inoculados con los preparados fue de hasta 0.5 unidades. No se observaron

diferencias significativas entre los valores finales de pH alcanzados por el cultivo fresco y el liofilizado. Se observó un consumo de azúcares similar tanto en los cultivos frescos como liofilizados, de 3 a 5 g/L dependiendo de la cepa. Se observó una mayor producción de ácido láctico en los medios inoculados con los cultivos frescos que en los inoculados con los liofilizados, la diferencia era entre 1 y 3 g/L más en los primeros que en los segundos. La concentración de ácido láctico producido en medio MC inoculado con los preparados comerciales oscilaba entre 9 y 20 g/L, siendo el preparado S4608 (2010) el que producía mayor cantidad. Los rendimientos del proceso fueron siempre mayores en los medios inoculados con los cultivos frescos que en los inoculados con los liofilizados. Las cepas Enolab 4538, 4607 y 4608 fueron las que proporcionaron mayores recuentos, tanto inoculadas frescas como liofilizadas. El consumo de ácido málico fue total en todos los casos, y el de cítrico fue total en el caso de las cepas Enolab 4634, 4607 y 4608, del 50% en el de la cepa Enoferm V22[®] y prácticamente nulo en los de las cepas Enolab 4538 y 4555.

En todos los casos la efectividad del cultivo iniciador liofilizado fue algo menor que la del cultivo fresco. Esto no es de extrañar ya que este hecho sucede de manera habitual en los cultivos iniciadores comerciales. Ello es debido a que la conservación por liofilización disminuye la viabilidad de los microorganismos y afecta a sus capacidades fisiológicas. A pesar de ello, los cultivos iniciadores utilizados en este trabajo resultaron efectivos en crecimiento, acidificación y producción de ácido láctico en medio MC.

5.3. Evaluación del efecto del tipo de rehidratación sobre el crecimiento y la capacidad acidificante de los preparados liofilizados

Los resultados obtenidos tras la rehidratación del preparado liofilizado S4608 con seis soluciones diferentes (suero, glucosa, fructosa, Optí'Malo Plus[®], Nutrient Vit End[™]) y el obtenido sin rehidratación del mismo mostraron diferencias significativas en el crecimiento de las bacterias durante las primeras etapas de su cultivo en medio MC. Así, las mayores velocidades de crecimiento las exhibieron los preparados rehidratados con Optí'Malo Plus[®] y

Resultados

Nutrient Vit End™. Veinte horas después de su inoculación en mosto, los preparados rehidratados con suero, glucosa y fructosa alcanzaron una población aproximadamente 1.5 veces mayor que los no rehidratados, los rehidratados en mosto dos veces mayor, y los rehidratados con Optí'Malo Plus® y Nutrient Vit End™ tres veces mayor, alcanzando una biomasa máxima de 8×10^8 UFC/mL (Figura 48). Debido a su mejor crecimiento, se observó una mayor velocidad de acidificación del medio con el preparado rehidratado con Optí'Malo Plus® y Nutrient Vit End™ (Figura 49).

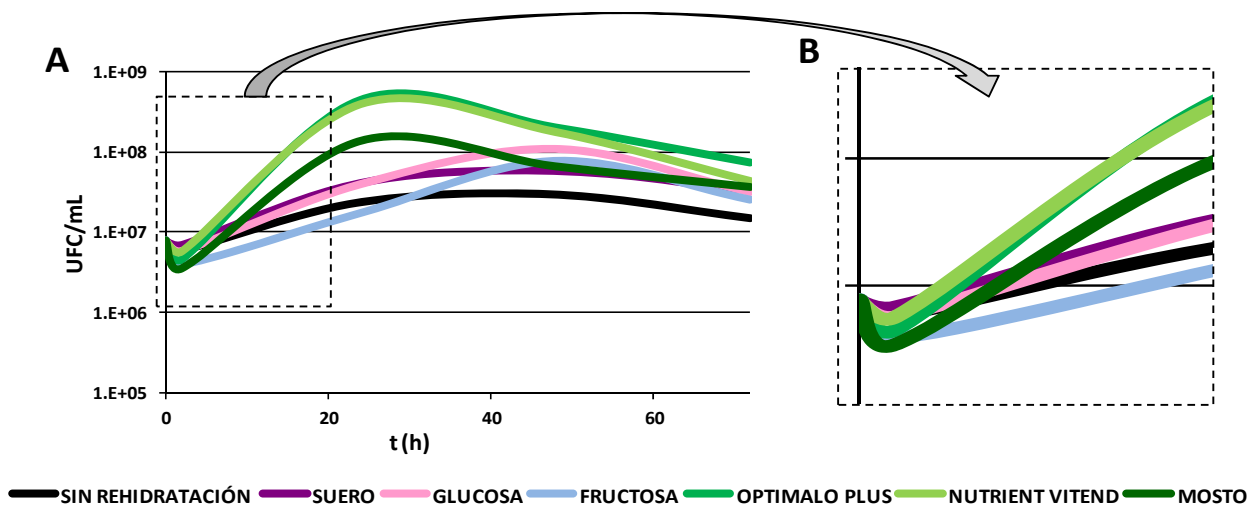


Figura 48. Crecimiento en medio MC del preparado liofilizado S4608 sometido a distintos procesos de rehidratación. A. Crecimiento a lo largo de 70 horas. B. Detalle del crecimiento durante las 20 primeras horas.

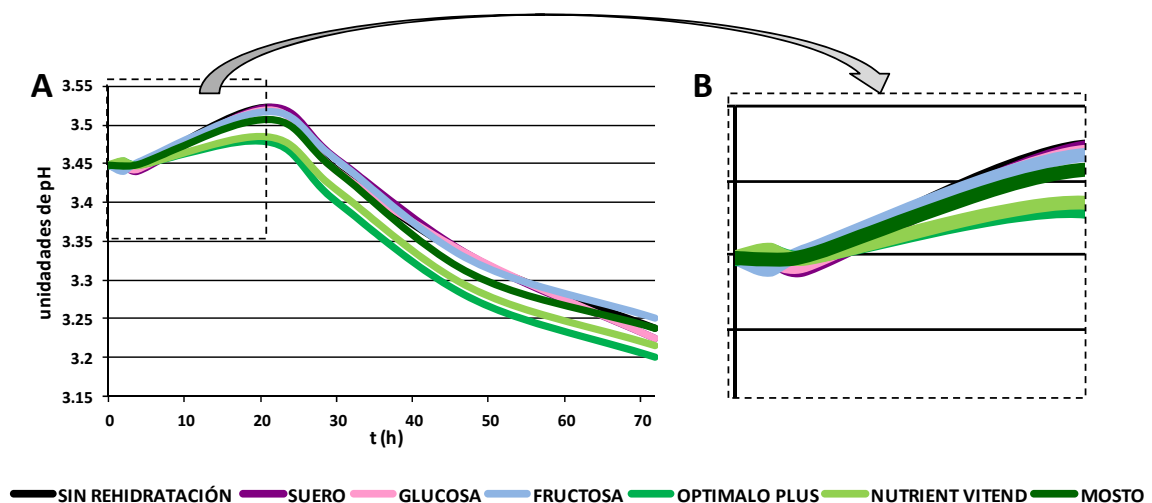


Figura 49. Evolución del pH en medio MC tras la inoculación del preparado liofilizado S4608 sometido a distintos procesos de rehidratación. A. Evolución del pH a lo largo de 70 horas. B. Detalle de la evolución del pH durante las 20 primeras horas.

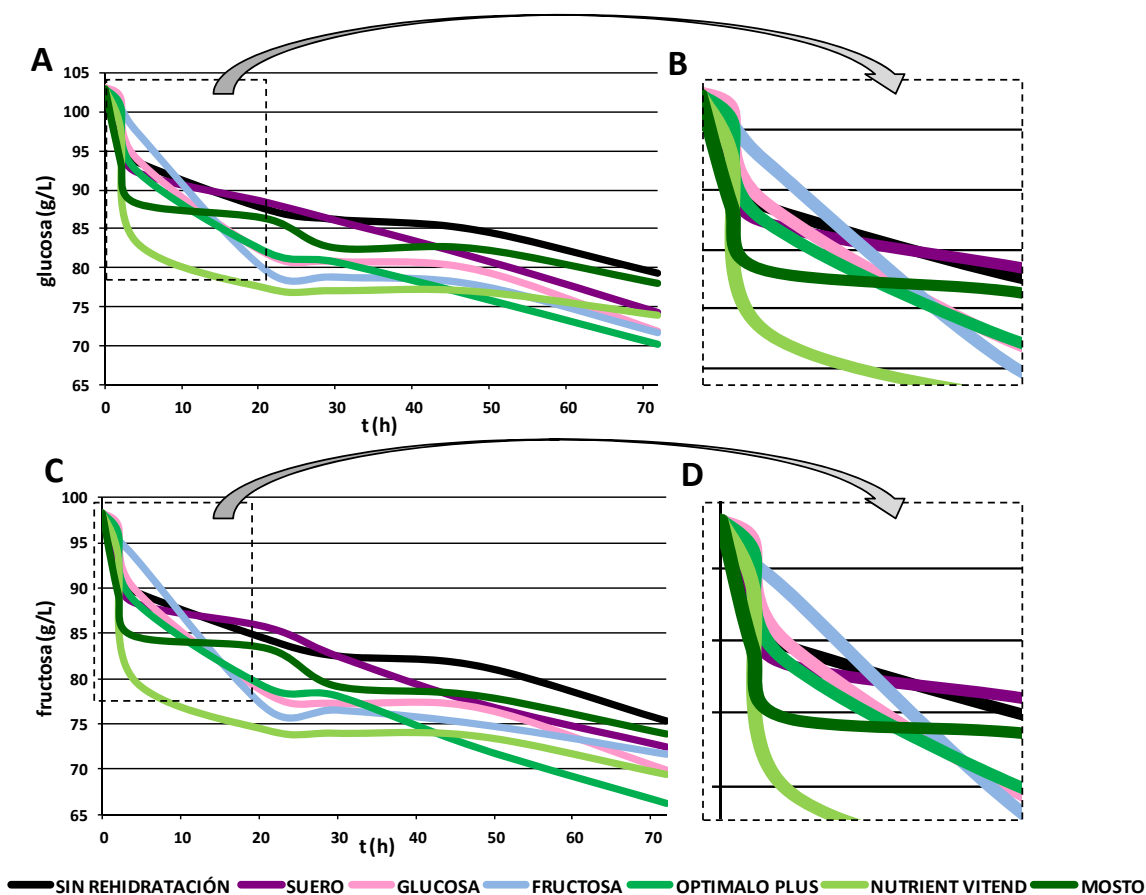


Figura 50. Evolución del consumo de azúcares en medio MC tras la inoculación del preparado liofilizado S4608 sometido a distintos procesos de rehidratación. A. Evolución del consumo de glucosa a lo largo de 70 horas. B. Detalle del consumo de glucosa durante las 20 primeras horas. C. Evolución del consumo de fructosa a lo largo de 70 horas. D. Detalle del consumo de fructosa durante las 20 primeras horas.

La degradación de azúcares también fue más rápida tras la inoculación con los cultivos iniciadores rehidratados con OptíMalo Plus® y Nutrient Vit End™ (Figura 50). Así, se observó mayor velocidad de producción de ácido láctico y mayor cantidad final de éste cuando el preparado se rehidrató con OptíMalo Plus® y Nutrient Vit End® y fructosa (Figura 52). La degradación del ácido málico fue total en todos los casos y se llevó a cabo durante las primeras 24 horas de cultivo. Se representó la cinética de degradación de este ácido durante las 4 primeras horas de cultivo, observándose mayor velocidad en los cultivos iniciadores rehidratados con OptíMalo Plus®, Nutrient Vit End™, suero y mosto (Figura 51).

Resultados

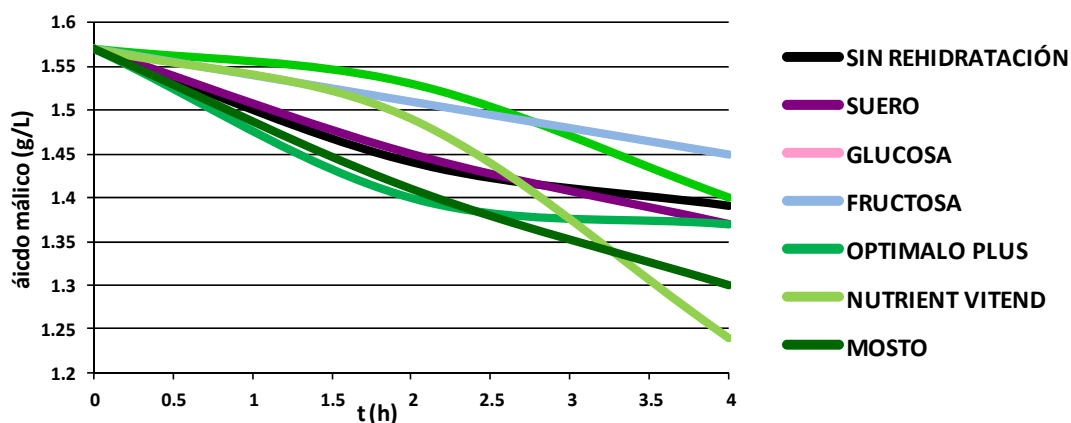


Figura 51. Evolución del consumo de ácido málico en medio MC durante las 4 primeras horas tras la inoculación del preparado liofilizado S4608 sometido a distintos procesos de rehidratación.

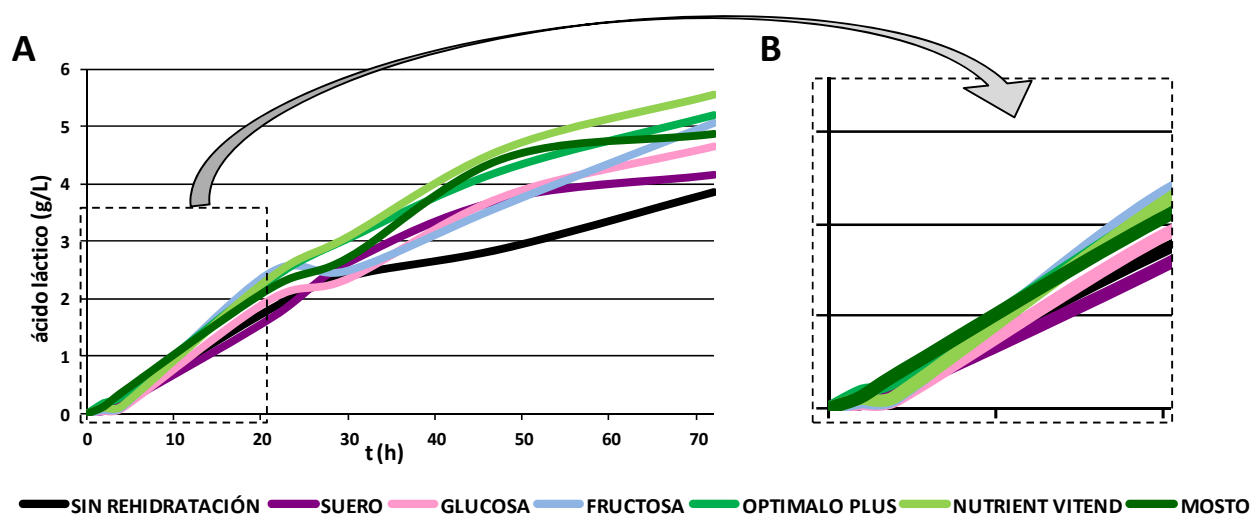


Figura 52. Evolución de la producción de ácido láctico en medio MC tras la inoculación del preparado liofilizado S4608 sometido a distintos procesos de rehidratación. A. Evolución de la producción de ácido láctico a lo largo de 70 horas. B. Detalle de la evolución la producción de ácido láctico durante las 20 primeras horas.

En resumen, los mejores resultados se obtuvieron al rehidratar el preparado liofilizado durante 2 horas en las soluciones de 20 g/hL de Optí'Malo Plus® o Nutrient Vit End™. Ello dio lugar a mayor velocidad de crecimiento, a mayor disminución del pH del medio, a mayor degradación de ácido málico y azúcares y a mayor síntesis de ácido láctico. Estas dos soluciones activaron más eficazmente que el resto el sistema metabólico bacteriano durante la rehidratación, proporcionando un cultivo más activo en el momento de la inoculación, lo que se tradujo en una corta fase de latencia y un rápido inicio del crecimiento y del consumo de

azúcares. Opti'Malo Plus® y Nutrient Vit End® son preparados que contienen nutrientes para bacterias malolácticas y levaduras, respectivamente, y consisten en levaduras inactivas que aportan nitrógeno orgánico, minerales, vitaminas y polisacáridos. Por tanto, estas soluciones proporcionan a las bacterias una mayor cantidad de nutrientes que el suero y las soluciones de azúcares, a excepción posiblemente del mosto.

6. EVALUACIÓN A NIVEL SEMIINDUSTRIAL DEL COMPORTAMIENTO DE LOS PREPARADOS LIOFILIZADOS

6.1. Ensayos realizados en los Laboratorios Excell de La Rioja en el año 2010

Estos ensayos se realizaron en volúmenes de 25 y 200 L de mosto blanco de Viura y tinto de Tempranillo.

A. *Vinificaciones en blanco*

Estos ensayos se realizaron siguiendo el esquema indicado en la Figura 8. En la Tabla 20 se observan los resultados obtenidos tras el análisis físico-químico y microbiológico de los vinos blancos obtenidos en los distintos ensayos. Los ensayos en mosto tenían como objetivos evaluar el efecto sobre la acidificación de los vinos de a) la estrategia de inoculación, b) del periodo de actuación de la bacteria, c) del tipo de bacteria y d) de la concentración del inóculo.

Los resultados obtenidos al evaluar el efecto de las estrategias de inoculación IP y CI sobre la acidificación de vinos blancos y de la duración del periodo de acidificación se muestran en la Tabla 19. Se estableció una vinificación control en la que no se inocularon BL.

Tabla 18. Valores medios de pH final, ácido láctico obtenido por FL y porcentaje de ácido málico degradado en las vinificaciones en blanco inoculadas con BL mediante distintas estrategias (IP: inoculación previa, CI: coinoculación) (¹Valor obtenido a partir del vino D1, ²Valores promedio obtenidos a partir de los vinos L1-L9 y D2-D3, ³Valor obtenido a partir del vino D10, ⁴Valor obtenido a partir del vino L9, ⁵Valores promedio obtenidos a partir de los vinos L1-L6, L8 y D2-D3, ⁶Valores obtenidos a partir del vino L7).

	Control ¹	IP ²	CI ³	IP (24h) ⁴	IP (72h) ⁵	IP (∞) ⁶
pH final	4.205	3.719	3.800	4.072	3.633	4.136
Ác. láctico (FL) (g/L)	0	0.21	0	0	0.19	0.18
Ác. málico degradado (%)	30.76	42.81	30.30	27.69	43.38	38.84

Resultados

La mayor síntesis de ácido láctico se produjo en los vinos obtenidos mediante IP, y sólo tras periodos de acidificación de 72 horas o superiores. Sin embargo, las cantidades sintetizadas fueron tan bajas que es improbable que contribuyeran en gran medida al descenso del pH observado en de los vinos correspondientes. La escasa síntesis de ácido láctico puede deberse a que la BL inoculada no fue capaz de crecer en ninguno de los casos durante el periodo de acidificación.

La degradación de ácido málico fue de aproximadamente el 30% en la vinificación control y en el vino realizado por CI, lo cual indicó la ausencia de actividad maloláctica de la BL inoculada. En los vinos realizados mediante IP el valor medio del porcentaje de ácido málico degradado fue ligeramente superior, pero no llegó a completarse la FML en ninguno de los casos. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones finales de ácido cítrico, etanol y glicerol en ninguno de los casos.

Se observó un menor valor de pH en los vinos inoculados con los preparados comerciales de BL, independientemente de la estrategia utilizada, ya que el valor medio del pH final de los vinos obtenidos mediante IP y CI fue más bajo que en la vinificación control, siendo ligeramente menor en los vinos realizados mediante IP (Tabla 20).

Los ensayos destinados a evaluar la influencia del tiempo de acidificación mostraron que el pH más bajo se conseguía cuando se dejaban transcurrir 72 horas entre la inoculación de la bacteria y la de la levadura (Tabla 20). El menor pH que presentaban los vinos inoculados podría deberse no tanto a la síntesis de ácido láctico sino más bien a la síntesis de ácido acético por parte de bacterias acéticas contaminantes que se detectaron sobre las placas de recuento.

Tabla 19. Condiciones de los ensayos realizados en mosto Viura blanco y resultados de los análisis físico-químicos y recuentos de BL de los vinos obtenidos. IP: inoculación previa, CI: coinoculación, IS: inoculación secuencial ¹Periodo de acidificación indefinido hasta observar un inicio espontáneo de la FA, ²No existen datos, ³Recuento al final del periodo de acidificación.

Depósito	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	D1	D2	D3
Preparado	S4608	S4608	S4607	S4607	S4555	V22	S4608	S4608	S4608	S4608	- ²	S4607	V22
Inóculo (cél/mL)	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	- ²	10 ⁶	10 ⁶
Estrategia de inoculación	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	CI	- ²	IP	IP
Periodo de acidificación	72 h	72 h	72 h	72 h	72 h	72 h	∞ ¹	72 h	24 h	- ²	- ²	72 h	72 h
Recuento de BL (UFC/mL) ³	3.1 x 10 ⁶	3.1 x 10 ⁶	2.2 x 10 ⁶	3.9 x 10 ⁶	6.7 x 10 ⁶	6.7 x 10 ⁶	nd	3.1 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶	- ²	- ²	6.5 x 10 ⁶	5.3 x 10 ⁶
pH final	3.597	3.598	3.580	3.567	3.880	3.590	4.136	3.653	4.072	3.80	4.2	3.601	3.637
Azúcares residuales (g/L)	0.05	0.07	0.07	0.05	0.13	0.10	0.44	0.21	0.08	0	0	0.33	0.14
Ácido láctico total (g/L)	1.51	1.31	1.31	1.17	0.80	0.42	0.86	0.31	0.36	0.31	0.3	0.26	0.31
Ácido láctico por FL (g/L)	1.07	0.87	0.90	0.69	0.64	0.32	0.65	0	0	0	0	0	0
Ácido málico residual (g/L)	1.15	1.15	1.18	1.32	1.64	1.70	1.59	1.77	1.88	1.81	1.8	1.71	1.77
Ácido cítrico (g/L)	0.26	0.25	0.25	0.25	0.24	0.24	0.22	0.23	0.21	0.21	0.2	0.22	0.22
Ácido acético (g/L)	0.28	0.27	0	0.27	0.33	0.34	0.63	0.31	0	0	0	0.80	0.25
Etanol (% v/v)	12.6	12.9	13.0	13.0	12.8	12.8	12.8	12.8	13.5	12.5	12.	13.0	13.0
Glicerol (g/L)	7.34	7.16	7.14	7.23	6.99	7.02	4.72	6.89	6.79	6.23	5.7	6.02	6.25

Resultados

Para evaluar el efecto de la cepa en la acidificación de vinos blancos se inocularon los preparados liofilizados que contenían las cepas: 4607 (ensayos L3, L4 y D2), 4608 (ensayos L1, L2 y L7-L10) y 4555 (ensayo L5). También se analizó la capacidad acidificante del cultivo maloláctico comercial de *L. plantarum* Enoferm V22® (ensayos L6 y D3). Se estableció una vinificación control en la que no se inocularon BL (ensayo D1). En la Tabla 21 se ilustran los valores medios del pH final, la concentración de ácido láctico producido por FL y el porcentaje de ácido málico degradado en los depósitos inoculados con las diferentes cepas, así como en el depósito control. A la concentración más baja no se observó producción de ácido láctico por ninguna de las cepas, mientras que a la concentración más alta sí, siendo la cepa 4607 la más productora (Tabla 22).

Tabla 20. Valores medios de pH final, ácido láctico obtenido por FL y porcentaje de ácido málico degradado en las vinificaciones en blanco inoculadas con distintas cepas de BL ¹Valor obtenido a partir del vino D1, ²Valores promedio obtenidos a partir de los vinos L3, L4 y D2, ³Valores promedio obtenidos a partir de los vinos L1, L2, L7-L10, ⁴Valor obtenido a partir del vino L5, ⁵Valores promedio obtenidos a partir de los vinos L6 y D3.

	Control ¹	4607 ²	4608 ³	4555 ⁴	Enoferm V22® ⁵
pH final	4.205	3.582	3.810	3.880	3.610
Ácido láctico (FL) (g/L)	0	0.22	0.17	0.16	0
Ácido málico degradado (%)	30.76	46.02	39.54	36.92	33.26

Tabla 21. Intervalos de valores de pH final, ácido láctico obtenido por FL y porcentaje de ácido málico degradado en las vinificaciones en blanco inoculadas con diferentes concentraciones de inóculo ¹Valor obtenido a partir del vino D1, ²Valores promedio obtenidos a partir de los vinos L7-L10, D2 y D3, ³Valores promedio obtenidos a partir de los vinos L1-L6.

	Nivel de inóculo		
	Control ¹	10 ⁶⁽²⁾	10 ⁷⁽³⁾
pH final	4.205	3.601-4.136	3.567-3.880
Ácido láctico (FL) (g/L)	0	0-0.65	0.32-1.07
Ácido málico degradado (%)	30.76	27-34	34-55

En estas vinificaciones se ha observado que los vinos inoculados con BL presentan un menor valor de pH que el de la vinificación control. En general, se han producido pequeñas cantidades de ácido láctico por FL en los depósitos inoculados con la concentración más alta (10⁷ células/mL) de las cepas 4607 (0.69-0.90 g/L), 4608 (0.87-1.07 g/L) y 4555 (0.64 g/L). Sin embargo, no se produjo nada de ácido láctico por FL en los depósitos inoculados con un inóculo 10 veces inferior, excepto en el caso de la cepa 4608 en L7 (0.65 g/L). Tampoco se

generó ácido láctico por FL en los depósitos inoculados con Enoferm V22®. La baja síntesis de este ácido se debió a que las bacterias fueron incapaces de crecer, aunque en algunos casos se mantuvieron vivas en poblaciones de aproximadamente 3×10^6 UFC/mL hasta el momento de la inoculación de la levadura fermentativa. No se observó una relación directa entre el ácido láctico producido y la disminución de pH conseguida, aunque en general, los valores finales de pH de los vinos inoculados fueron inferiores al de los no inoculados, con un descenso máximo de hasta 0.6 décimas de pH. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de ácido cítrico, etanol y glicerol a ninguna de las concentraciones ensayadas. En el caso del ácido acético las concentraciones fueron similares en todos los ensayos, excepto en el depósito L7 y D2 en los que se observaron concentraciones más altas como consecuencia de que los vinos se habían contaminado con bacterias acéticas.

La cepas 4607, 4555 y Enoferm V22® representaron el 100% de la población láctica en los depósitos inoculados con los preparados comerciales correspondientes, tanto a una concentración de 10^6 como de 10^7 células/mL, lo que significa que se implantaron a la población autóctona. La cepa 4608 también representó el 100% de la población láctica en las vinificaciones L1,L2, L7-L10 en las que se inoculó el preparado S4608 tanto a 10^6 como a 10^7 células/mL, y dejando un periodo de acidificación de 72 horas. En cambio, en el ensayo L9 en el que el periodo de acidificación fue de 24 horas, no se aisló esta cepa sino otra cepa autóctona de la misma especie. Se observó que en los depósitos L1-L5, L8 y D2 sólo se aislaba la cepa inoculada. En cambio, en los demás depósitos se aislaron BL autóctonas. En el depósito control (D1) una cepa autóctona de *Lc. mesenteroides* representó el 80% de los aislados y otra de *L. plantarum* autóctona el 20%. En el depósito L9 en el que el periodo de acidificación fue de 24 horas se aisló una cepa autóctona de *L. plantarum* autóctona. En los depósitos inoculados con Enoferm V22® (L6 y D3) se aislaron cepas autóctonas de *L. plantarum* y *Lc. mesenteroides*. Estos resultados nos indicaron que la inoculación de los preparados de las cepas 4607, 4608 y 4555 mediante IP en concentraciones tanto de 10^6 como de 10^7 células/mL, y el dejar transcurrir un periodo de 72 horas antes de la inoculación de la levadura impedía el desarrollo de la microbiota láctica autóctona.

Resultados

B. Vinificaciones en tinto

Estos ensayos se realizaron siguiendo el esquema indicado en la Figura 9. En la Tabla 23 se muestran los resultados de los análisis físico-químicos y de los recuentos obtenidos al final del experimento en los vinos tintos vinificados en distintas condiciones. Los ensayos en mosto tinto Tempranillo tenían como objetivos la evaluación a) del tipo de bacteria y b) de la estrategia de inoculación, sobre la acidificación de los vinos obtenidos.

En la Tabla 24 se ilustran, entre otros, los valores medios del pH final, la concentración de ácido láctico producido por FL y el porcentaje de ácido málico degradado en los vinos tintos obtenidos a partir de mosto Tempranillo inoculados con BL mediante las estrategias IP e IS, así como en el depósito control.

Tabla 22. Condiciones de los ensayos realizados en mosto tinto de Tempranillo y resultados de análisis físico-químicos y recuentos de BL en los vinos obtenidos IP: Inoculación previa, IS: inoculación secuencial ¹Los recuentos de L11-L14 corresponden a la muestra tomada al final de la vinificación, mientras que los de los D5-D7 a la tomada al final del periodo de acidificación, ²Periodo desde el final de la FA al final de la vinificación, ³No determinado.

Depósito	L11	L12	L13	L14	D4	D5	D6	D7
Cepa	4608	4607	V22	VP41	- ²	4608	4607	V22
Concentración de inóculo	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	- ²	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
Estrategia de inoculación	IS	IS	IS	IS	- ²	IP	IP	IP
Periodo de acidificación	- ²	- ²	- ²	- ²	- ²	24 h	24 h	24 h
Recuento (UFC/mL) ¹	50	2 x 10 ³	1.4 x 10 ⁴	3.1 x 10 ⁷	- ²	2.7 x 10 ⁵	1.1 x 10 ⁶	3 x 10 ⁶
pH final	3.940	4.230	3.855	3.870	3.504	3.904	3.840	3.870
Azúcares residuales (g/L)	0	0	0	0	0.11	0	0	0
Ácido láctico total (g/L)	1.99	2.08	1.54	2.52	0.14	2.26	1.42	2.25
Ácido láctico por FL (g/L)	0.98	1.31	0.53	1.75	0.14	1.17	0.65	1.48
Ácido málico residual (g/L)	0.12	0.13	0.12	0.13	1.63	0	0.13	0.13
Ácido cítrico (g/L)	0	0	0	0.34	nd ³	2.25	2.19	2.10
Ácido acético (g/L)	4.74	2.61	5.07	1.88	nd ³	1.48	5.89	1.93
Etanol (% v/v)	11.4	11.9	11.4	11.3	12.5	12.9	12.3	11.1
Glicerol (g/L)	7.60	7.48	7.42	7.55	nd ³	7.84	7.84	7.49

Tabla 23. Intervalos de valores de pH final, ácido láctico obtenido por FL y porcentaje de ácido málico degradado en las vinificaciones en blanco inoculadas con distintas cepas de BL (IP: inoculación previa, IS: inoculación secuencial) (¹Valor obtenido a partir del vino D4, ²Valores obtenidos a partir de los vinos D5-D7, ³Valores obtenidos a partir de los vinos L11-L14).

	Control ¹	IP ²	IS ³
pH final	3.540	3.84-3.90	3.85-4.23
Ácido láctico (FL) (g/L)	0.14	0.65-1.48	0.53-1.75
Ácido málico degradado (%)	0	94-100	94-95

En todos los vinos inoculados con BL se observó una producción de ácido láctico por FL de entre 0.5 y 1.75 g/L, independientemente de la estrategia de inoculación empleada. Esto no ocurrió en el vino control (D4). La FML también se llevó a cabo en todos los vinos excepto en la vinificación control, lo cual generó un pH superior en los vinos inoculados frente a este control. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de ácido cítrico, etanol y glicerol entre los diferentes ensayos.

Para evaluar el efecto de la cepa en la acidificación de vinos tintos se inocularon los preparados liofilizados que contenían las cepas 4607 y 4608. Los resultados obtenidos de estos ensayos se compararon con los de los vinos inoculados con las cepas comerciales *L. plantarum* Enoferm V22® y *O. oeni* Lalvin VP41® y con un vino control no inoculado con BL. En la Tabla 25 se ilustran los valores medios del pH final, la concentración de ácido láctico producido por FL y el porcentaje de ácido málico degradado en los depósitos inoculados con las diferentes cepas, así como en el depósito control.

Tabla 24. Intervalos de valores de pH final, ácido láctico obtenido por FL y porcentaje de ácido málico degradado en las vinificaciones en tinto de mosto Tempranillo inoculadas con distintas cepas de BL. ¹Valor obtenido a partir del vino D4, ²Valores promedio obtenidos a partir de los vinos L12 y D6, ³Valores promedio obtenidos a partir de los vinos L11 y D5, ⁴Valor obtenido a partir del vino L13 y D7, ⁵Valores obtenidos a partir del vino L14.

	Control ¹	4607 ²	4608 ³	V22® ⁴	VP41® ⁵
pH final	3.504	3.84-4.23	3.90-3.94	3.85-3.87	3.87
Ác. láctico (FL) (g/L)	0.14	0.65-1.31	0.98-1.17	0.53-1.48	1.75
Ác. málico degradado (%)	0	94	94-100	94	04

En las vinificaciones en tinto se observaron recuentos de BL y producciones de ácido láctico algo más elevadas que en los blancos, siendo Enoferm V22® y Enolab 4608 las que más ácido láctico produjeron por FL (valores medios de 1.48 y 1.17 g/L respectivamente) cuando se inocularon antes que la levadura (IP) (Tabla 23). Sin embargo, cuando la inoculación se realizó tras la FA (IS) las cepas que más ácido láctico produjeron por FL fueron Lalvin VP41® y Enolab 4607 (valores medios de 1.75 y 1.31 g/L respectivamente) y la que menos Enoferm V22® (0.53 g/L). En todos los casos, excepto en el ensayo control, el ácido málico se consumió casi en su totalidad. En los experimentos de IS no se detectó la presencia de ácido cítrico más que en el ensayo realizado con la cepa Lalvin VP41®, mientras que en los que las bacterias se inocularon antes que la levadura (D5-D7) la cantidad de ácido cítrico fue casi 2 gramos más alta. Ello

Resultados

debió de ser consecuencia de la producción de este ácido por parte de las levaduras responsables de la FA. En todos los casos se observó una alta concentración de ácido acético, sobre todo en los vinos de los experimentos L11, L13 y D6. La razón de la aparición de altas concentraciones de este ácido en esas vinificaciones es que se observó que todas ellas habían sido colonizadas por bacterias acéticas, que seguramente fueron las responsables de la síntesis de este ácido.

Los pHs de los vinos tintos inoculados con BL fueron muy semejantes al del vino control sin inocular, por lo que no parece que la cinética de producción y degradación de ácidos en los distintos experimentos haya influido sobre este parámetro.

En general, se observó que la concentración de etanol fue mayor en aquellos vinos que se inocularon con la bacteria antes de la FA, mientras que los otros presentaron una graduación más baja. Estos resultados apoyarían la existencia de un cierto efecto estimulador de las BL sobre la capacidad fermentativa de las levaduras. Los niveles de glicerol detectados en los vinos finales fueron muy parecidos en todos los experimentos.

Se observó una muerte muy importante de las bacterias cuando se inocularon tras la FA, excepto en el caso de Lalvin VP41®. Sin embargo, cuando se inocularon antes de que ésta tuviese lugar, la concentración de bacterias viables al final del periodo de acidificación fue muy parecida a la concentración a la cual se inocularon. La cepa Enolab 4607 fue capaz de implantarse al 100% a la población láctica autóctona en todos los depósitos inoculados, tanto en la estrategia IP como en la IS. La cepa Enolab 4608 no se implantó en las vinificaciones en tinto, siendo desplazada por BL autóctonas. Las cepas Enoferm V22® y Lalvin VP41® se implantaron al 100% en las vinificaciones en las que se inocularon. Además, se observó que en los depósitos en los que se inoculó el preparado EnofermV22® (L13) y el S4607 (D6) sólo se aislaba la bacteria inoculada. En los demás depósitos se aislaron cepas de *L. plantarum* de origen autóctono. Esto nos indicó que la inoculación en vinificaciones en tinto de las cepas 4607 mediante IP y Enoferm V22® mediante IS generaba un desplazamiento de la microbiota láctica autóctona.

En resumen, de los ensayos realizados en los Laboratorios Excell se deduce que en las vinificaciones en blanco los vinos inoculados consiguieron disminuir el pH en aproximadamente 0.5 unidades. Sin embargo, sólo se produjo ácido láctico cuando se inocularon las bacterias lácticas a la concentración más alta de inóculo y la cantidad producida fue muy baja. Ello se debió a que las bacterias inoculadas, a pesar de mantenerse viables a concentraciones similares a las que fueron inoculadas, no fueron capaces ni de consumir azúcares ni de crecer. En cambio, en las vinificaciones en tinto no se observó efecto de las BL sobre la acidificación de los vinos. Se encontraron niveles de entre 0.5 y 1.75 g/L de ácido láctico sintetizado por FL en los vinos finales, aunque no se logró disminuir el pH de los mismos. Las concentraciones de BL viables disminuyeron durante el periodo de acidificación en mayor proporción que en los vinos blancos. A pesar de ello se realizó la FML en todas las vinificaciones en tinto inoculadas, independientemente de si la BL se inoculaba antes o después de la levadura.

6.2. Ensayos realizados en la bodega Dominio de la Vega en el año 2011

Los objetivos de los ensayos realizados en esta bodega fueron: a) evaluar el comportamiento de dos preparados comerciales (S4607 y S4608) sobre la acidificación de mosto tinto de Tempranillo y b) determinar si existían diferencias organolépticas entre los vinos producidos con y sin acidificación biológica y los vinificados con una u otra cepa. En este ensayo se utilizó un inóculo de 10^6 células/mL en todos los casos. Además, se contemplaron dos vinos controles: uno en el cual se inoculó la levadura Uvaferm VN[®] pero no BL, y otro vino en el que la vinificación sucedió de forma espontánea sin que se inoculase ningún microorganismo. Estos ensayos se realizaron siguiendo el esquema indicado en la Figura 10.

En la Tabla 26 se muestran los análisis físico-químicos de los vinos obtenidos en las distintas condiciones y en las Figuras 53 y 54 se han representado las evoluciones de los ácidos (láctico, málico y cítrico) y del pH, respectivamente, a lo largo de las vinificaciones.

Resultados

Tabla 25. Resultados de los análisis físico-químicos de los vinos obtenidos en los ensayos semiindustriales realizados en Dominio de la Vega en el año 2011 (L1: Control no inoculado con BL pero si con Uvaferm VN®; L2, L3: inoculado con S4607; L4, L5: inoculado con S4608; L6: Control no inoculado).

	L1	L2	L3	L4	L5	L6
Azúcares residuales (g/L)	0.85	0.44	0.97	1.53	0.92	1.03
Ácido málico (g/L)	1.79	0.41	2.37	2.31	2.20	2.26
Ácido láctico (g/L)	0.61	1.93	0.69	0.49	0.52	0.39
Ácido cítrico (g/L)	1.32	1.78	2.00	1.50	1.49	1.50
Grado alcohólico (% v/v)	14.03	13.02	13.83	13.78	13.54	14.30
Glicerol (g/L)	10.27	10.13	10.56	10.17	10.32	10.26
pH	4.04	3.93	3.83	3.88	3.88	3.85

Durante las primeras 48 horas de los ensayos se observó la síntesis de ácido láctico en todos los depósitos, siendo mayor (0.6 g/L) en los depósitos inoculados con BL. Durante la primera mitad de la FA se generaron aproximadamente 0.3 g/L de este ácido en los depósitos inoculados, pero esta cantidad disminuía durante la segunda mitad de la FA. Ello pudo deberse a la combinación de este ácido con el etanol sintetizado por la levadura durante la FA, lo que da lugar al éster lactato de etilo, que confiere aroma afrutado. Durante el periodo de almacenamiento en botella la cantidad de ácido láctico permaneció constante, excepto en el depósito L2 en el que aumentó a partir del día 20, alcanzándose una concentración final de casi 2 g/L (Tabla 26 y Figura 53A).

Durante las primeras 48 horas se observó una degradación parcial del ácido málico, la cual coincidió con la síntesis de ácido láctico. Esto fue consecuencia de la realización parcial de la FML, realizada bien por las BL inoculadas, bien por las autóctonas. Durante la FA se observó un aumento del ácido málico, lo cual indicó una síntesis del mismo por las levaduras que la llevaron a cabo. Varios autores han descrito la capacidad de ciertas levaduras para producir ácido málico, siendo *S. cerevisiae* una de ellas [265]. Durante el periodo de almacenamiento en botella la concentración de ácido málico se mantuvo prácticamente constante en todos los depósitos excepto en el L2, en el cual se observó degradación del mismo a partir del día 20 de la vinificación. Esta disminución del ácido málico coincide temporalmente con la producción de ácido láctico, indicando que se realizó la FML en este depósito (Figura 53B).

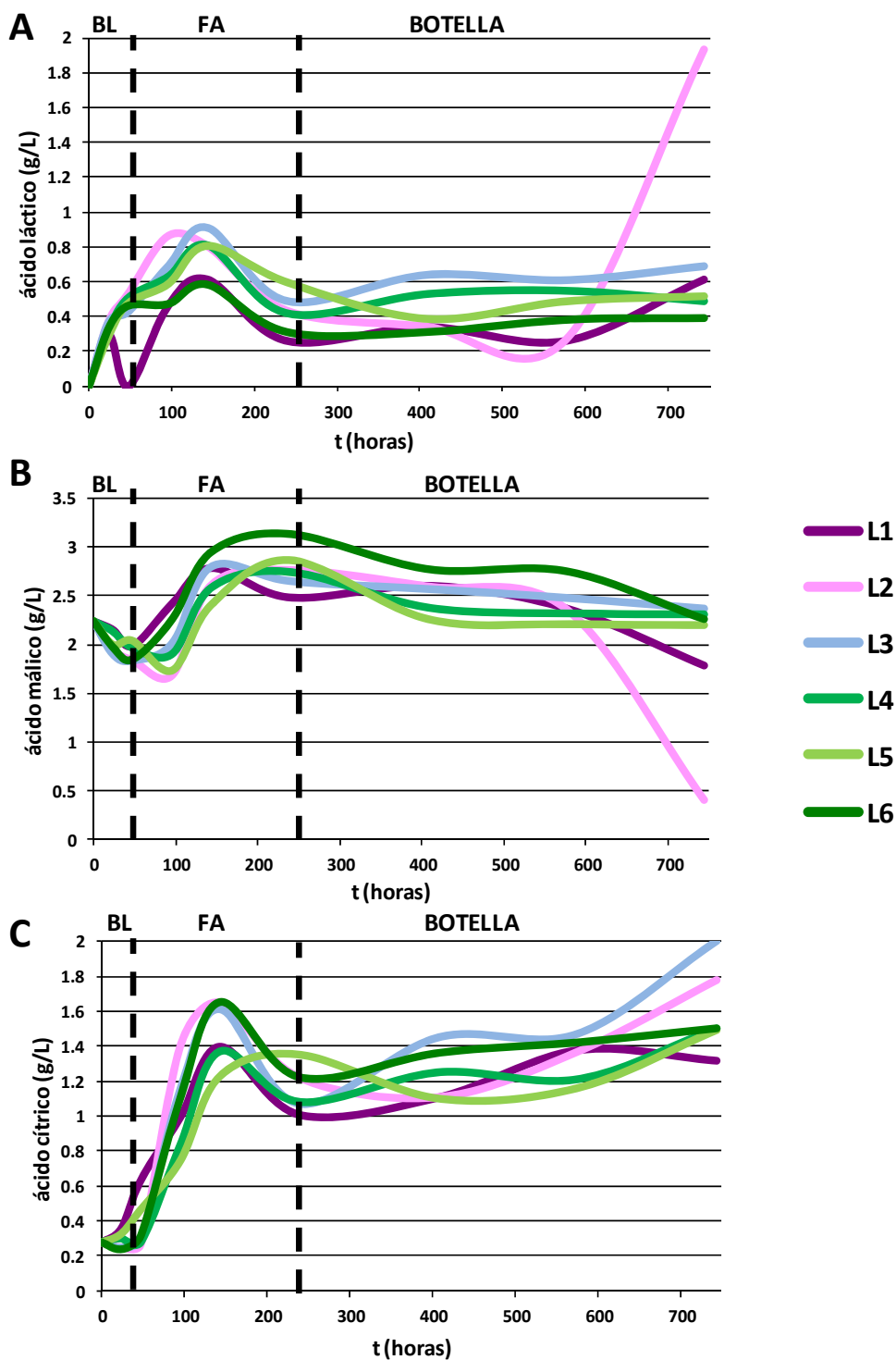


Figura 53. Evolución de los ácidos a lo largo de las vinificaciones. A) Evolución del ácido láctico. B) Evolución del ácido málico. C) Evolución del ácido cítrico. Depósito L1: Control no inoculado con BL pero si con Uvaferm VN®; depósito L2 y L3: inoculados con el preparado S4607; depósitos L4 y L5: inoculados con el preparado S4608; L6: Control no inoculado.

Resultados

En cuanto a la evolución del ácido cítrico, durante la primera mitad de la FA se produjo un aumento de este ácido ocasionado por las levaduras autóctonas (1.4 g/L). En cambio, durante la segunda mitad de la FA se produjo un descenso de aproximadamente 0.2-0.4 g/L de este ácido, excepto en el vino L5, debido probablemente a su consumo por BL. Durante el periodo de almacenamiento en botella se observó un aumento de 0.2-0.8 g/L en todos los vinos. Ello pudo ser consecuencia del metabolismo de las levaduras residuales, ya que los vinos se embotellaron sin estabilización ni filtrado (Figura 53C).

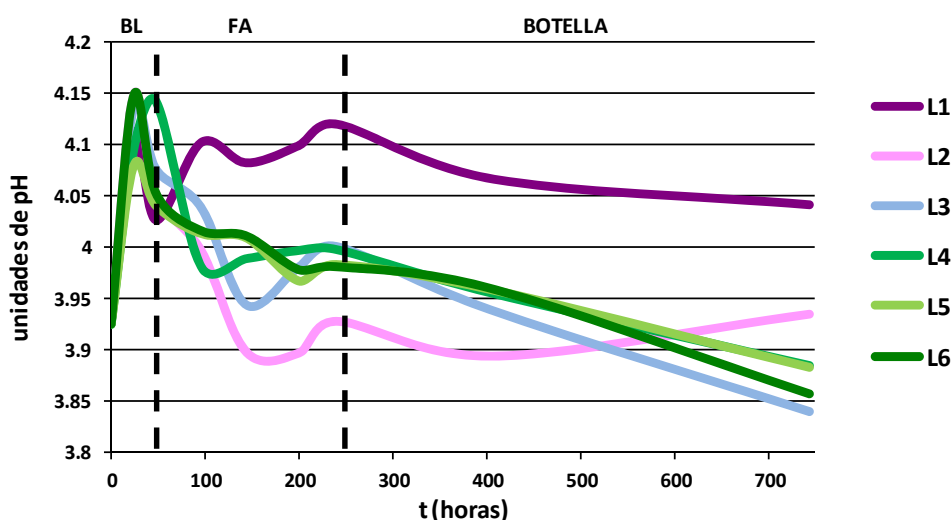


Figura 54. Evolución del pH a lo largo de las vinificaciones (ver códigos de colores en Figura 53).

Durante las primeras 48 horas de la vinificación se observó un aumento del pH en todos los casos de aproximadamente 0.2 unidades, debido a la degradación parcial de ácido málico por parte de las BL autóctonas o inoculadas que se observó durante este periodo. Durante el periodo correspondiente a la FA se produjo un descenso del pH de entre 0.1 y 0.2 unidades en todos los casos, excepto en el depósito L1 donde se mantuvo prácticamente constante. Este descenso de pH fue debido a la síntesis de ácido málico y cítrico por parte de las levaduras, tanto Uvaferm VN® como las autóctonas. Durante el periodo de almacenamiento en botella el pH descendió ligeramente debido a la síntesis de ácido cítrico por parte de las levaduras residuales, excepto en el depósito L2 donde se observó un pequeño aumento que coincidió con la degradación total de ácido málico vía FML (Figura 54).

La escasa síntesis de ácido láctico (aproximadamente 0.5 g/L) puede explicarse por la ausencia de crecimiento de las BL inoculadas durante la fase de acidificación, aunque fueron capaces de mantener la concentración inicial de células viables. Sin embargo, durante la FA la población viable disminuyó hasta alcanzar concentraciones de 10^3 UFC/mL en todos los ensayos, es decir, 3 órdenes de magnitud menos (Figura 55). El análisis de la implantación de las cepas inoculadas reveló resultados diferentes en los distintos ensayos. Así, la cepa 4607 en el depósito L2 representó el 40% del total de la población láctica a las 48 horas de su inoculación, mientras que fue del 100% al final de la FA. Tras la FA esta cepa fue desplazada por una cepa autóctona de *O. oeni* que fue la que llevó a cabo la FML. En cambio, la cepa 4607 en el depósito L3 constituyó el 60% de la población láctica a las 48 horas, sin embargo no se aisló al final de la FA. La menor presencia de esta bacteria durante la FA explica la diferencia en la síntesis de ácido láctico que se observa entre ambas réplicas del ensayo (L2 y L3). En el depósito L4 la cepa 4608 representó el 100% de las BL aisladas a lo largo de toda la vinificación, mientras que en el L5 se encontró al 90% a las 48 horas de ser inoculada pero sin embargo ya no se aisló al final de la FA. En cambio, en el depósito control (L1) y en el que se realizó una vinificación espontánea (L6) se aislaron BL de origen autóctono exclusivamente, como era de esperar. En L1 se aislaron cepas de *Lc. mesenteroides*, *L. plantarum* y *Staphylococcus epidermidis*. Esta última especie ha sido descrita recientemente como una potencial productora de histamina en vinos [266]. En el depósito L6 se aislaron cepas autóctonas de *Lc. mesenteroides* y *L. plantarum*. Esto nos indicó que la inoculación de las cepas 4607 y 4608 ocasionaba una inhibición de la microbiota láctica autóctona.

Se observó que los vinos inoculados con BL presentaban una ligera disminución de pH respecto al vino inoculado únicamente con levadura fermentativa, lo que se tradujo en un descenso de pH de entre 0.16 y 0.21 unidades. Esta disminución parece estar más relacionada con la síntesis de ácido cítrico por parte de las levaduras que por la de ácido láctico por las bacterias. Teniendo en cuenta que la FML causa un aumento de pH en los vinos de aproximadamente 0.2 unidades, el pH del vino control sería de 4.24 en el caso de que la hubiera realizado. Teniendo esto en cuenta, las condiciones que han permitido un mayor

Resultados

descenso de pH son las del depósito L2 ya que este vino, que sí ha realizado la FML, tendría un pH 0.31 unidades menor que el vino control no inoculado con BL.

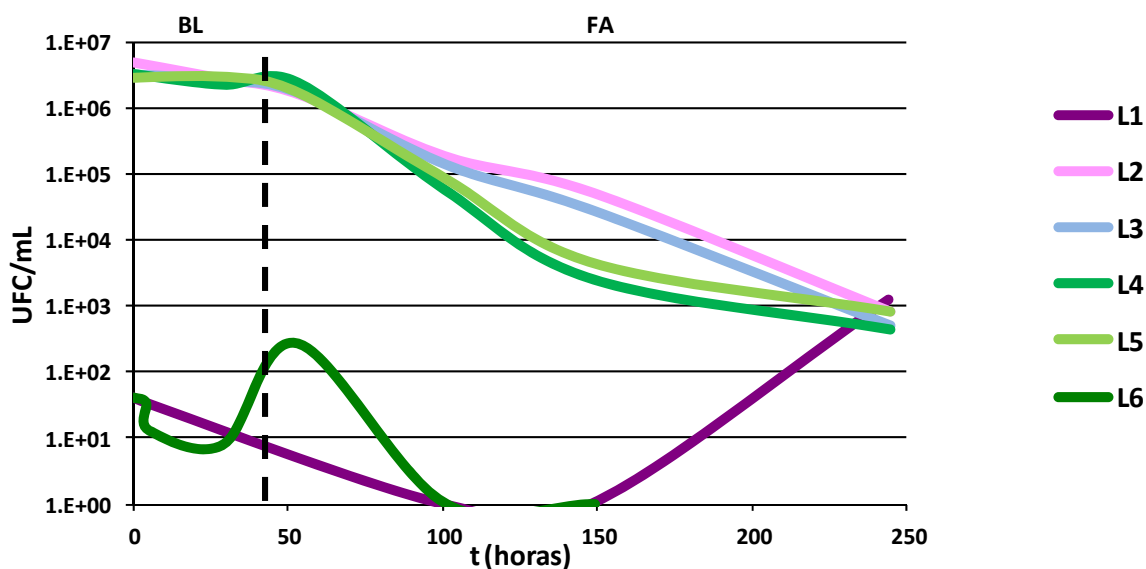


Figura 55. Cinética poblacional de las BL en las vinificaciones (ver leyenda Figura 53).

Un aspecto a destacar en este experimento fue la constatación de que las BL usadas para realizar la acidificación influían en el perfil aromático de los vinos. Mediante una cata se observó que los vinos inoculados con las BL seleccionadas mostraron mayor intensidad aromática, con más notas varietales y frutales. El gusto de estos vinos resultó más suave y con un sabor más persistente.

Las concentraciones de compuestos volátiles de los vinos finales se muestran en la Tabla 27. Cuando se compararon las concentraciones totales de aldehídos y cetonas entre vinos inoculados y sin inocular se observó una mayor concentración de éstos en el vino L6, en el que la FA se produjo de forma espontánea. Fue particularmente importante la concentración de diacetal en este vino. El diacetal es un metabolito que produce *S. cerevisiae* como producto secundario de la síntesis de los aminoácidos valina y leucina [99], y parece que algunas de las levaduras autóctonas presentes en el vino L6 lo producían. Sin embargo, los depósitos inoculados con bacterias (L2-L5) mostraron mayor cantidad de este grupo de compuestos que

el L1 a pesar de que todos habían sido fermentados con la misma levadura (Uvaferm VN®). Por tanto, las diferencias se debieron a las bacterias inoculadas que producen mayor cantidad de diacetal, de α y β binen y de vainillina que las bacterias autóctonas que se han desarrollado en el vino L1. También existen diferencias en el contenido en ésteres totales entre vinos inoculados (L2-L5) y no inoculados con BL. Esta diferencia fue muy notable en el caso del vino L2 y se debió sobre todo a los altos niveles de lactato de etilo que presentó este depósito. La razón que explica los altos niveles de este éster en el vino es que es el único en el que ha tenido lugar la FML que eleva la concentración de ácido láctico, uno de los precursores del lactato de etilo. La concentración de fenoles en los depósitos inoculados con bacterias (L2-L5) fue intermedia entre la encontrada en el depósito L1 (la más baja) y el L6 (la más alta). La síntesis de fenoles se achacan mayoritariamente a levaduras; en este caso las responsables de la más alta concentración serían las levaduras autóctonas del vino L6. Dado que el resto de vinos (L1-L5) fueron inoculados con la misma levadura, las diferencias en la concentración de fenoles entre L1 y el resto son achacables a las bacterias. En el caso de los alcoholes no se ve una clara influencia de las BL inoculadas sobre los mismos. Las concentraciones de terpenoles tampoco parecen haberse visto afectadas por la inoculación de las BL, lo cual no es de extrañar ya que estos compuestos proceden fundamentalmente de la uva [29]. En cuanto al aporte aromático de cada una de las cepas, la inoculación del preparado S4607 proporcionó vinos con mayores concentraciones de compuestos volátiles que aportaron aromas afrutados y lácteos como la vainillina (vainilla), isovaleriato (frutas), acetato de isoamilo (plátano) y lactato de etilo (afrutado, mantequilla, suave, lácteo). Estos vinos presentaron menores concentraciones de alcohol isoamílico (olor a disolvente) que los inoculados con el preparado S4608. Sin embargo, se detectaron menores concentraciones de decanoato de etilo (fruta) y etil hexanoato (manzana verde, fruta, violetas) que en otros vinos, con la excepción del vino L6. Los vinos inoculados con el preparado S4608 mostraron mayores concentraciones de los compuestos eugenol (clavo), isovaleriato (fruta), lactato de etilo (afrutado, mantequilla, suave, lácteo), pero también de 2-butanol (olor fuerte a alcohol), alcohol isoamílico (disolvente) y cis-3-hexanol (herbáceo). Se observó que estos vinos contenían menores concentraciones de decanoato de etilo (fruta) que el control.

Resultados

Tabla 26. Concentraciones de compuestos volátiles (mg/L) en los vinos tintos de Tempranillo inoculados con los preparados S4607 y S4608 y en vinos control no inoculados (L1-L6: ver leyenda Tabla 25).

	L1	L2	L3	L4	L5	L6
ALDEHIDOS Y CETONAS						
Diacetal	3.93±0.04	4.62±0.93	13.13±1.78	11.72±0.15	11.91±0.03	84.75±7.27
α-binen	0.13±0.03	0.09±0.01	0.36±0.07	0.61±0.12	0.89±0.00	0.46±0.30
β-binen	nd	nd	0.08±0.00	0.17±0.00	0.25±0.02	0.10±0.01
Vainillina	0.27±0.08	0.14±0.03	1.09±0.15	0.19±0.00	0.25±0.01	0.18±0.02
Totales	1.44±0.05	2.61±0.41		3.24±0.03		21.37±1.90
ÁCIDOS						
2-fenil acetato	nd	nd	0.16±0.00	nd	nd	0.19±0.01
Ac. decanoico	0.75±0.04	0.61±0.02	0.65±0.04	0.50±0.02	0.61±0.03	0.69±0.06
Totales	0.75±0.04	0.50±0.02		0.55±0.02		0.44±0.03
ÉSTERES						
Isovaleriato	0.04±0.00	nd	0.09±0.00	0.14±0.00	0.16±0.00	0.16±0.01
Acetato de	1.27±0.00	1.06±0.03	1.70±0.02	1.67±0.10	1.88±0.07	2.19±0.02
Etil hexanoato	1.51 ±0.01	1.28±0.13	1.31±0.00	1.57±0.02	1.51±0.03	1.48±0.10
Lactato de etilo	8.84±0.28	41.45±0.41	8.29±1.10	13.52±0.26	14.66±0.76	8.51±0.70
Hidroxibutirato	0.44±0.01	0.43±0.00	0.41±0.00	0.40±0.00	0.46±0.00	nd
Decanoato de	0.98±0.02	0.75±0.00	0.53±0.07	0.86±0.01	0.95±0.08	0.74±0.00
Succinato de etilo	4.62±0.11	4.97±1.03	4.34±0.03	4.59±0.16	4.77±0.01	5.10±0.06
Totales	2.52±0.06	5.35±0.21		3.36±0.10		3.03±0.14
TERPENOLES						
Linalol	0.50±0.56	0.45±0.06	0.42±0.13	0.46±0.00	0.48±0.01	0.42±0.08
FENOLES						
4-vinilfenol	1.33±0.24	1.85±0.02	1.24±0.47	nd	1.16±0.00	2.5±0.20
2-metoxifenol	nd	3.79±0.11	3.06±0.3	3.23±0.09	3.55±0.08	4.13±0.05
Eugenol	0.17±0.01	0.30±0.05	0.21±0.02	0.38±0.04	0.35±0.00	0.38±0.06
Totales	0.75±0.12	1.74±0.16		1.74±0.04		2.33±0.10
ALCOHOLES						
2-butanol	0.35±0.00	0.27±0.02	0.28±0.01	0.54±0.01	0.56±0.04	0.37±0.03
1-propanol	12.11±0.28	14.97±0.64	8.22±1.44	15.84±1.53	16.22±1.25	15.30±0.83
Alcohol isoamílico	604.87±8.48	553.16±5.40	529.66±4.54	759.78±7.82	755.68±8.75	624.42±7.65
Cis-3-hexenol	0.85±0.00	0.81±0.14	0.49±0.03	0.53±0.00	0.63±0.02	0.66±0.14
Propilenglicol	0.22±0.00	0.24±0.07	0.22±0.05	0.19±0.00	0.42±0.01	0.44±0.04
2-feniletanol	89.05±0.63	91.73±1.67	83.56±4.77	114.03±3.17	115.88±2.46	110.64±0.46
Totales	117.90±1.56	106.96±1.56		148.35±2.08		125.30±1.52

En resumen, la disminución del pH de los vinos de los depósitos L2-L5 se produjo fundamentalmente por la síntesis de ácidos málico y cítrico por las levaduras fermentadoras y no tanto por la síntesis de ácido láctico por las BL inoculadas. Aun así, los depósitos inoculados con los cultivos iniciadores bacterianos presentaron un pH menor durante la mayor parte del proceso de vinificación aunque no se produjo síntesis de ácido láctico por FL en ningún caso.

Sólo se realizó al completo la FML en el depósito L2 y fue llevada a cabo por una cepa autóctona de *O. oeni* y no por las BL inoculadas. Sin embargo, se observó que el patrón aromático de los vinos se modificó significativamente en los vinos inoculados con BL, que mostraron perfiles organolépticos diferentes a los de los vinos controles. También se detectaron diferencias organolépticas en los vinos producidos con cada preparado bacteriano.

6.3. Ensayos realizados en Enolab en el año 2011

Los objetivos de este ensayo fueron: a) evaluar el comportamiento de los preparados comerciales S4607 y S4608 para llevar a cabo la acidificación de un mosto rosado de la variedad Tempranillo y b) ver su repercusión en el perfil aromático de los vinos obtenidos. Esta experiencia se llevó a cabo en nuestro laboratorio en el mismo tipo de recipiente y en los mismos volúmenes que se utilizaron en la experiencia realizada en la bodega Dominio de la Vega (apartado 6.2). En este ensayo se inocularon los preparados comerciales S4607 y S4608, ambos a una concentración de 10^6 células/mL. Además, se llevó a cabo una vinificación control en la cual se inoculó la levadura Uvaferm VN® pero no BL. Estos ensayos se realizaron siguiendo el esquema indicado en la Figura 11.

En la Tabla 28 se muestran los resultados de los análisis físico-químicos de los vinos obtenidos en las distintas condiciones y en las Figuras 56 y 57 se han representado las evoluciones de los ácidos (láctico, málico y cítrico) y del pH, respectivamente, a lo largo de las vinificaciones.

Tabla 27. Resultados de los análisis físico-químicos de los vinos obtenidos en los diferentes ensayos semiindustriales realizados en Enolab (L1: Control no inoculado con BL pero si con Uvaferm VN®; L2, L3: inoculado con S4607; L4, L5: inoculado con S4608).

	L1	L2	L3	L4	L5
Azúcares residuales (g/L)	0.72	0.88	0.45	0.60	0.87
Ácido málico (g/L)	1.52	1.26	0	1.70	1.18
Ácido láctico (g/L)	0.18	0.31	2.02	0.40	0.30
Ácido cítrico (g/L)	0.63	0.36	0	0.43	0.38
Grado alcohólico (% v/v)	12.5	12.34	11.97	12.13	12.45
Glicerol (g/L)	9.16	8.41	9.07	8.94	8.40
pH	3.45	3.47	3.48	3.37	3.44

Resultados

Durante las primeras 48 horas se observó síntesis de ácido láctico (0.5 g/L) únicamente en los depósitos inoculados con BL. Durante la FA la concentración de este ácido se mantuvo prácticamente constante, excepto en el depósito L3 en el cual a partir del quinto día de vinificación aumentó la concentración de ácido láctico hasta 2 g/L (Figura 56A).

Durante las primeras 48 horas se observó una degradación parcial del ácido málico, la cual coincidió con la síntesis de ácido láctico. Esto fue consecuencia de una FML parcial producida por las BL inoculadas. Durante la FA se observó un aumento de ácido málico hasta el quinto día de la vinificación, lo cual indicó la síntesis del mismo por las levaduras que realizan la FA. Durante la segunda mitad de la FA la concentración de ácido málico se mantuvo constante excepto en el depósito L3 en el cual se observó la degradación total del mismo. Esta evolución resultó coincidente con la producción de ácido láctico durante el mismo periodo, indicando la realización de la FML en este depósito (Figura 56B).

En cuanto al ácido cítrico, su concentración aumentó hasta el quinto día de la vinificación alcanzando niveles de entre 0.5 y 1 g/L debido a su síntesis por la levadura Uvaferm VN® y las levaduras autóctonas. Durante la segunda mitad de la FA el ácido cítrico se consumió parcialmente en todos los depósitos, excepto en el L3 en el que se consumió totalmente seguramente por la bacteria que llevó a cabo la FML, dado la coincidencia de ambos fenómenos (Figura 56C).

En cuanto a la evolución del pH en las vinificaciones, durante las primeras 48 horas se observó un ligero descenso de unas 0.15 unidades. Esto fue debido principalmente a la síntesis de ácido cítrico por las levaduras autóctonas en L2-L5 y por la levadura Uvaferm VN® en el depósito L1. Durante la FA el pH se mantuvo prácticamente constante o aumentó ligeramente hasta el noveno día de la vinificación, momento a partir del cual descendió entre 0.1 y 0.2 unidades de pH. Esto pudo ser debido a la síntesis de ácido acético por bacterias acéticas que se desarrollaron durante esta etapa (Figura 57).

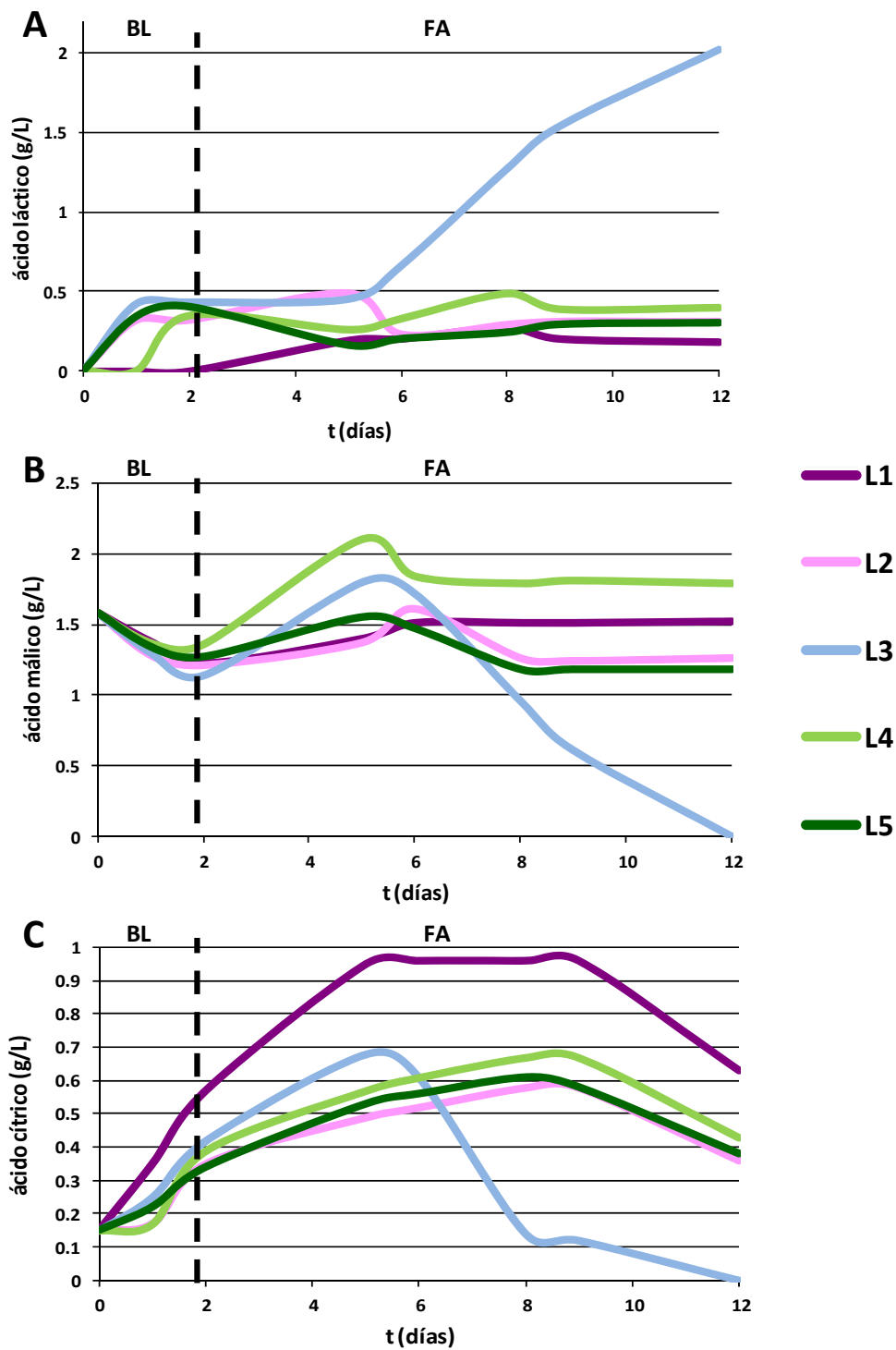


Figura 56. Evolución de los ácidos a lo largo de las vinificaciones. A) Evolución del ácido láctico. B) Evolución del ácido málico. C) Evolución del ácido cítrico. L1: Control no inoculado con BL pero si con Uvaferm VN®; L2, L3: inoculado con el preparado S4607; L4, L5: inoculado con el preparado S4608.

Resultados

La escasa síntesis de ácido láctico durante el periodo de acidificación puede explicarse por la ausencia de crecimiento de las BL inoculadas. Estas bacterias no fueron capaces de crecer durante la FA y poco a poco fue disminuyendo la población viable hasta quedar en concentraciones de 10^3 - 10^4 UFC/mL al final de la FA (Figura 58). La implantación de las cepas inoculadas fue distinta en los diferentes ensayos. En el depósito L2 la cepa 4607 constituyó el 100% de la población láctica al inicio y a mitad de la vinificación, pero al final de la FA fue desplazada por BL autóctonas, reduciéndose su presencia al 16%, y al 0% en el L3. En el depósito L3, se aisló una cepa autóctona de *O. oeni* al final de la FA, la cual llevó a cabo la FML. La cepa 4608 en el depósito L4 representó el 100% de la población láctica durante todo el proceso de vinificación. Lo mismo sucedió en el depósito L5, aunque en éste la presencia de la cepa 4608 se redujo al 30% al final de la FA. Se observó que en los depósitos inoculados con los preparados S4607 y S4608 (L2-L5) se aislaban las cepas inoculadas, mientras que en la vinificación del depósito control (L1) se aislaban BL de origen autóctono. En este último depósito se aislaron cepas de *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. mali* y *O. oeni* que no aparecían en ninguno de los otros. Del mismo modo que en los apartados 6.1 y 6.2 esto nos indicó que la inoculación de las cepas 4607 y 4608 ocasionaba una inhibición de la microbiota láctica autóctona.

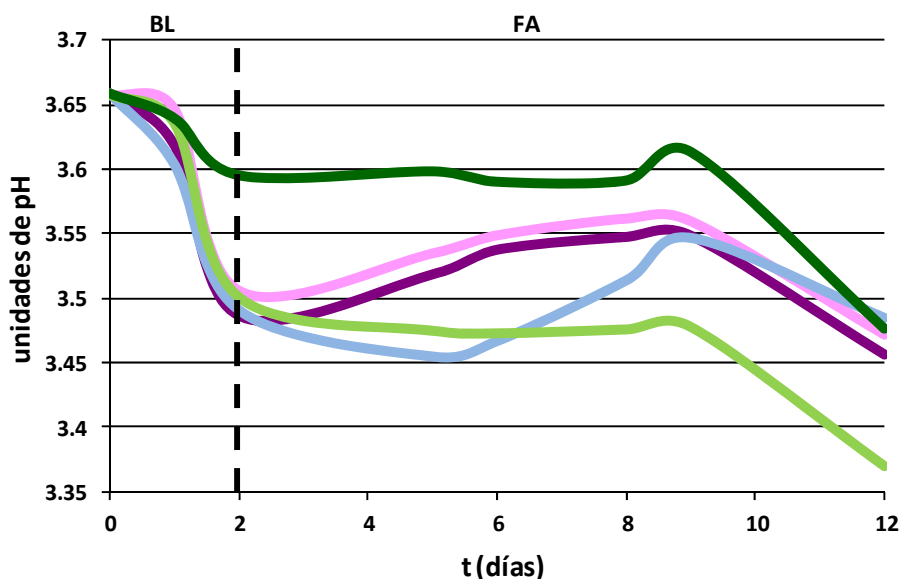


Figura 57. Evolución de pH a lo largo de las vinificaciones (ver código de colores en Figura 56).

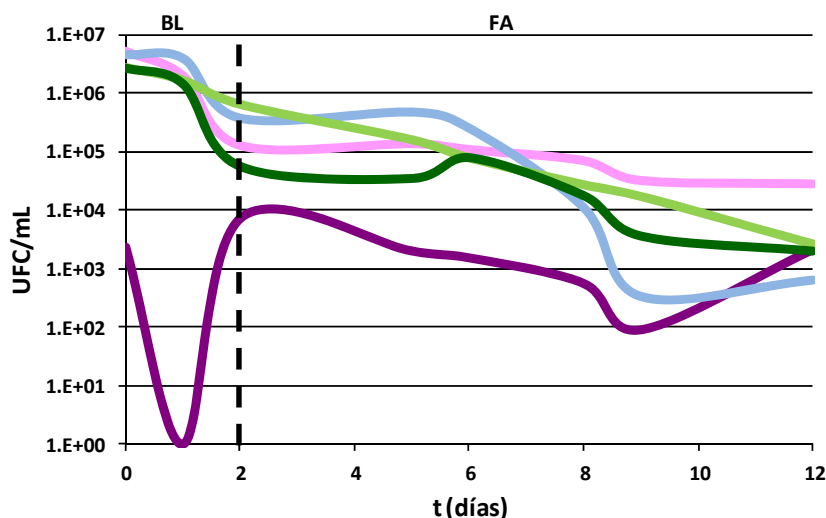


Figura 58. Cinética poblacional de las BL en las vinificaciones (ver código de colores en Figura 56).

No se produjo una acidificación significativa en los depósitos inoculados con BL respecto a la vinificación control. El mayor descenso de pH se obtuvo en el depósito L4. Esta disminución no estuvo relacionada con la síntesis de ácido láctico, sino con los mayores niveles de ácido málico y ácido cítrico que se registraron en este depósito. Estos ácidos fueron producidos por las levaduras.

En esta experiencia también fue notable el cambio en el perfil aromático de los vinos inoculados con BL. Mediante una cata también se observó que los vinos inoculados con las BL seleccionadas mostraron mayor intensidad aromática, con más notas varietales y frutales y que el gusto de estos vinos resultó más suave y con un sabor más persistente.

Las concentraciones de compuestos volátiles de los vinos finales se muestran en la Tabla 29. La concentración total de ésteres fue superior en los depósitos inoculados con BL como se vio en el experimento comentado en el apartado 6.2. Se sintetizaron entre 1.3 y 6 veces más ésteres en los depósitos inoculados con los preparados S4607 y S4608, respectivamente, que en el vino control. Se registró una concentración total de alcoholes en los vinos inoculados con BL ligeramente menor que en la vinificación control. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones totales de aldehídos, cetonas, ácidos, terpenoles y fenoles entre los depósitos inoculados y no inoculados con BL. Cabe

destacar la elevada síntesis de lactato de etilo en los vinos inoculados con la cepa 4607, consiguiéndose niveles medios de 87.90 mg/L de este compuesto frente a una concentración media de 6.36 en el vino control. En cuanto al aporte aromático de cada cepa, los vinos obtenidos con el preparado S4607 presentaron mayores concentraciones de compuestos volátiles que aportaron aromas afrutados y lácteos, sobre todo el lactato de etilo (afrutado, mantequilla, suave, lácteo), obteniéndose 85-90 mg/mL frente a 15.18 de media de la cepa 4608. Además se halló mayor concentración de fenil acetato (rosa, frutas), decanoato de etilo (frutas), etil hexanoato (manzana verde, frutas, violetas), succinato de etilo (melón) y eugenol (clavo) que en el vino control. Los vinos L2 y L3 mostraron mayores concentraciones de compuestos que confieren aromas desagradables como el 1-propanol, que huele a éter. Los vinos obtenidos tras la inoculación del preparado S4608 mostraron mayores concentraciones de compuestos volátiles agradables que el control como el succinato de etilo (melón), eugenol (clavo), fenil acetato (rosa, frutas) y etil hexanoato (manzana verde, frutas, violetas).

En resumen, no se observó disminución importante del pH de los vinos inoculados respecto al control, excepto en el vino del depósito L4 que disminuyó el pH en 0.1 unidades. No se observó una síntesis significativa de ácido láctico por FL durante el periodo de acidificación, tan sólo 0.5 g/L, aunque en el depósito L3 la concentración de este ácido aumentó en 1.5 g/L como consecuencia de la realización de la FML. Sin embargo, sí fue notable el cambio del perfil organoléptico de los vinos inoculados.

6.4. Ensayos realizados en Laboratorios Excell Iberica en el año 2011

El objetivo de este ensayo fue la evaluación del comportamiento de dos preparados liofilizados, S4607 y S4608, utilizados para acidificar mostos rosados y tintos de la variedad Tempranillo. También se analizó el efecto sobre la acidificación del tipo de mosto, concentración de inóculo y duración del periodo de acidificación previo a la FA, comparándose los resultados con los de vinificaciones tradicionales sin acidificación.

Tabla 28. Concentraciones de compuestos volátiles (mg/L) en los vinos rosados de Tempranillo inoculados con los preparados comerciales S4607 y S4608 y en el vino control no inoculado (ver leyenda Tabla 27).

	L1	L2	L3	L4	L5
ALDEHIDOS Y CETONAS					
Diacetal	8.75±0.087	8.54±1.19	8.74±0.10	9.80±0.52	7.53±0.34
α-binen	0.13±0.00	0.15±0.00	0.15±0.01	0.16±0.032	0.53±0.13
Vainillina	0.16±0.00	0.11±0.01	0.14±0.00	0.22±0.00	0.12±0.00
Totales	3.01±0.02	2.97±0.21		3.05±0.21	
ÁCIDOS					
2-fenil acetato	0.29±0.00	0.40±0.00	0.27±0.04	0.31±0.01	0.41±0.01
Ac. decanoico	0.98±0.06	0.67±0.05	0.93±0.02	1.10±0.15	0.50±0.10
Totales	0.63±0.03	0.56±0.02		0.57±0.06	
ÉSTERES					
Isovaleriato	0.08±0.00	0.08±0.00	0.10±0.00	0.08±0.00	0.09±0.01
Acetato de isoamilo	0.65±0.00	0.65±0.07	0.62±0.07	0.76±0.12	0.74±0.03
Etil hexanoato	1.26±0.05	1.77±0.01	1.26±0.03	1.10±0.16	1.80±0.01
Lactato de etilo	6.36±0.05	89.98±0.45	85.94±3.19	22.07±3.54	8.30±1.19
Decanoato de etilo	0.52±0.01	0.63±0.02	0.96±0.02	0.72±0.05	0.60±0.11
Succinato de etilo	10.25±0.14	11.18±0.75	37.71±2.17	17.13±0.68	10.21±1.63
Totales	3.18±0.04	19.23±0.56		5.29±0.62	
TERPENOS					
Linalol	0.42±0.00	0.21±0.00	0.51±0.05	0.48±0.05	0.36±0.13
FENOLES					
4-vinilfenol	1.80±0.01	2.18±0.05	nd	nd	1.82±0.30
2-metoxifenol	2.37±0.02	3.80±0.22	2.23±0.10	2.61±0.16	3.62±0.31
Eugenol	0.39±0.00	0.32±0.00	0.50±0.00	0.52±0.00	0.35±0.00
Totales	1.52±0.01	1.73±0.07		1.74±0.14	
ALCOHOLES					
2-butanol	0.28±0.00	0.32±0.02	0.29±0.00	0.34±0.03	0.36±0.05
1-propanol	3.95±0.01	5.50±0.13	7.55±0.97	6.96±0.98	5.38±0.70
Alcohol isoamílico	597.50±0.16	527.97±0.00	544.11±10.23	564.65±0.47	508.63±69.12
Cis-3-hexenol	0.30±0.01	0.25±0.00	0.28±0.00	0.29±0.02	0.28±0.02
2-feniletanol	122.71±5.17	105.96±6.83	118.83±5.36	134.82±2.16	99.80±0.13
Totales	144.94±1.07	131.2.35		132.15±7.36	

En todos los casos en los que se inocularon BL, éstas lo hicieron siguiendo la estrategia de inoculación previa (IP). En la vinificación en tinto se inocularon a una concentración de 10^6 células/mL y en las vinificaciones en rosado a 10^7 células/mL. En cuanto al periodo de acidificación se estableció un periodo de 24 horas en tintos y de 72 horas en rosados. Además, en cada caso se realizó un vino control inoculado con la levadura Uvaferm VN[®] pero no con BL acidificantes.

A. Vinificaciones en tinto

Estos ensayos se realizaron siguiendo el esquema indicado en la Figura 12. En la Tabla 30 se observan los resultados de los análisis físico-químicos de los vinos obtenidos en las distintas condiciones y en las Figuras 59 y 60 se han representado las evoluciones de los ácidos (láctico, málico y cítrico) y del pH, respectivamente, a lo largo de las vinificaciones.

Tabla 29. Resultados de los análisis físico-químicos de los vinos tintos obtenidos en los diferentes ensayos semiindustriales realizados en Laboratorios Excell Iberica en 2011 (D1: inoculado con S4608, D2: inoculado con S4607, D3: control no inoculado con *Lactobacillus* pero sí con la levadura Uvaferm VN® y la bacteria Lalvin VP41®).

	D1	D2	D3
Azúcares residuales (g/L)	0.31	0.32	0.32
Ácido málico (g/L)	0.14	0.14	0.14
Ácido láctico (g/L)	1.90	2.13	1.62
Ácido cítrico (g/L)	1.14	1.28	1.02
Grado alcohólico (% v/v)	15.33	15.35	14.87
Glicerol (g/L)	11.56	11.20	12.73
pH	4.03	4.01	4.15

Durante las primeras 48 horas se observó una síntesis de ácido láctico de entre 0.9 y 1.3 g/L sólo en los depósitos inoculados con BL. Durante la FA la concentración de este ácido aumentó ligeramente (D2 y D3) o disminuyó (D1). Tras la FA la concentración de ácido láctico aumentó en todos los depósitos hasta alcanzar una concentración final de entre 1.6 y 2.1 g/L (Figura 59A).

Durante las primeras 24 horas se observó una degradación parcial del ácido málico de entre 1 y 2 g/L sólo en los depósitos inoculados con BL, la cual coincidió con la síntesis de ácido láctico. Esto fue consecuencia de una FML parcial llevada a cabo por las BL inoculadas. Durante la FA se observó un aumento de 1 g/L de éste ácido en el depósito D1, lo cual indicó una síntesis del mismo por las levaduras que realizaron la FA, mientras que en el D2 se mantuvo constante. En el depósito D3 no hubo aumento de ácido málico durante la FA pero tras ella se produjo la degradación total del ácido málico 10 días después de la inoculación con la cepa de *O. oeni* Lalvin VP41®. Tras la FA en los depósitos D1 y D2 se llevó a cabo la degradación completa del ácido málico (Figura 59B). Esta evolución que experimentó el ácido málico

coincidió con la producción de ácido láctico, indicando que la síntesis de ácido láctico en esta etapa fue consecuencia de la realización de la FML (Figuras 59A y 59B).

La concentración de ácido cítrico aumentó durante toda la FA debido posiblemente a la síntesis del mismo por Uvaferm VN®. En cambio, tras la FA se observaron variaciones, ya que en el depósito D2 aumentó ligeramente (0.3 g/L), posiblemente por el metabolismo de levaduras residuales y en los depósitos D1 y D3 disminuyó su concentración entre 0.1 y 0.6, posiblemente por el metabolismo de BL (Figura 59C).

El pH descendió durante el periodo de acidificación y la FA, observándose un descenso del pH mucho más acusado en los depósitos inoculados con BL. Tras la FA se observa un aumento del mismo de aproximadamente 0.2 unidades en todos los depósitos (Figura 60).

Los resultados de evolución de ácidos y del pH son consecuencia de la cinética de crecimiento de las bacterias y de las levaduras. Así, durante las primeras 24 horas (periodo de acidificación) se observó que ambas cepas de BL aumentan su concentración en 0.5 órdenes de magnitud que provoca el aumento de ácido láctico y la disminución de ácido málico (Figura 61). Tras la inoculación de la levadura fermentativa, la población láctica disminuyó en D1, mientras que en D2 aumentó ligeramente durante la primera etapa de la FA, para luego disminuir hasta 10^2 UFC/mL. En esta etapa la concentración de ácido láctico aumentó en D2 y disminuyó ligeramente en D1, mientras que el ácido málico se mantuvo constante en D2 y aumentó en D1. Estos resultados se deben al balance entre ácido málico producido por la levadura y el consumido por la bacteria. Hay mayor descenso de ácido málico cuando la bacteria inoculada está creciendo (D2) y menor descenso cuando no. Ambas cepas inoculadas constituyeron el 100% de la población láctica a lo largo de toda la vinificación. Sin embargo, durante el periodo entre los días 20 y 50 en el que se completó el consumo del ácido málico, no se aislaron las cepas inoculadas, sino cepas autóctonas de *O. oeni*, las cuales resultaron responsables de la FML. En la vinificación D2 se observó un mayor mantenimiento de la población viable de BL que en D3, aunque no de las cepas inoculadas (Figura 61).

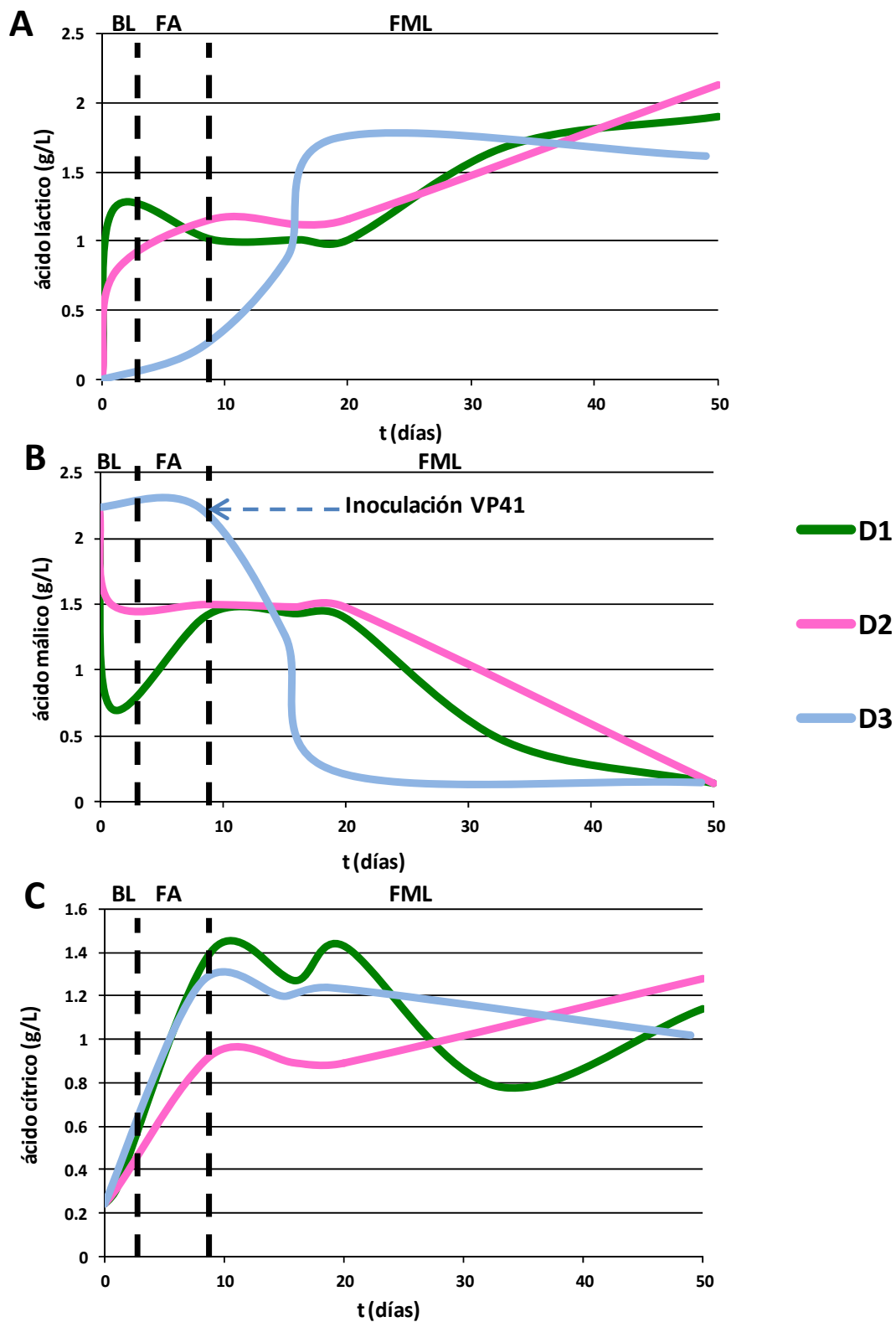


Figura 59. Evolución de los ácidos a lo largo de las vinificaciones. A) Evolución del ácido láctico. B) Evolución del ácido málico. C) Evolución del ácido cítrico. D1: inoculado con el preparado S4608, D2: inoculado con el preparado S4607, D3: control no inoculado con *Lactobacillus* pero sí con la levadura Uvaferm VN® y la bacteria Lalvin VP41®.

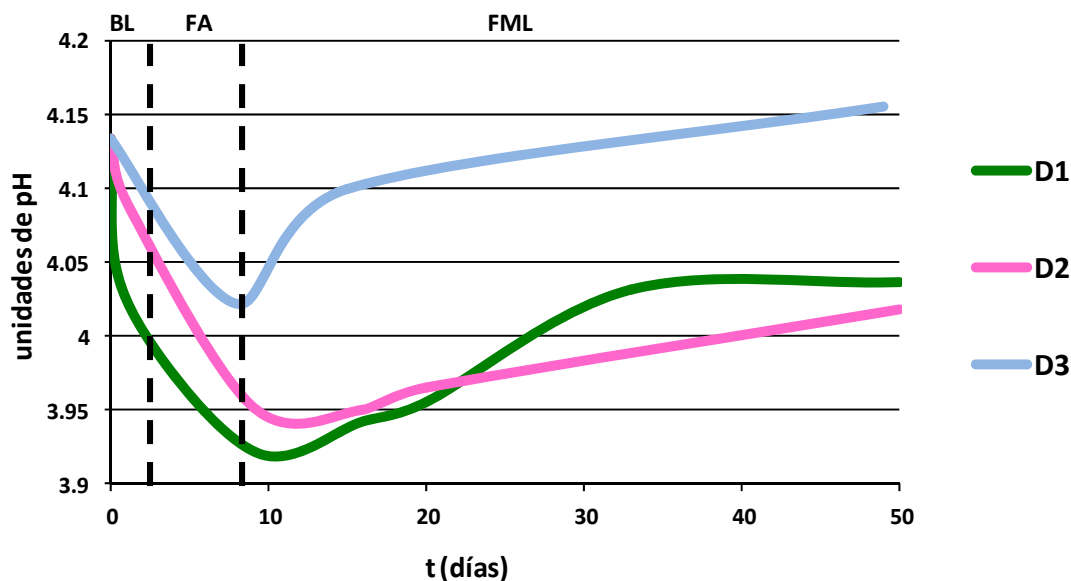


Figura 60. Evolución de pH a lo largo de las vinificaciones en tinto (ver leyenda Figura 59).

Ello posiblemente afectó al crecimiento de la levadura fermentativa y por ello a la síntesis de ácido cítrico. Sin embargo, en la vinificación D1 la población viable de BL disminuyó rápidamente, lo que se tradujo en una menor competencia con la levadura que pudo crecer más y por ello producir más ácido cítrico.

En las vinificaciones en tinto se produjeron mayores descensos de pH en los depósitos inoculados con BL. Estos descensos de pH se iniciaron en el periodo de acidificación con BL y continuaron hasta la finalización de la FA, produciéndose una disminución de pH de aproximadamente 0.2 unidades con respecto a la vinificación control. Esta disminución del pH fue debida probablemente a la síntesis de ácido cítrico por parte de la levadura Uvaferm VN®. Tras la FA, se observó en todos los casos un aumento del pH, causado por la realización de la FML, ya que coincidió con un descenso del ácido málico y un aumento de la concentración de ácido láctico. Los pHs finales de los vinos inoculados con las cepas 4607 y 4608 fueron 0.1 unidades de pH menores que el vino control, debido a las mayores concentraciones de ácidos láctico y cítrico que presentaron.

Resultados

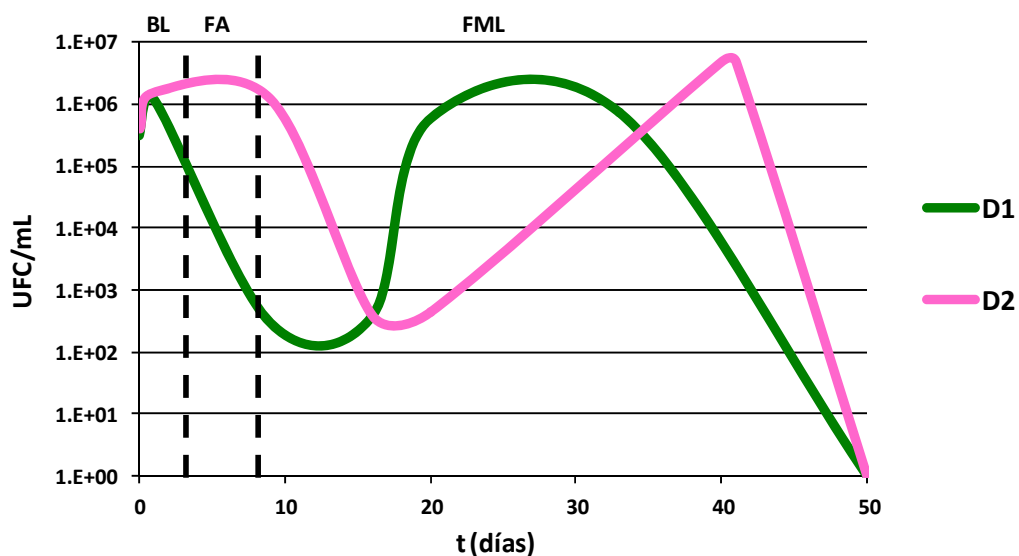


Figura 61. Evolución de la población láctica total de las BL durante las vinificaciones en tinto (ver leyenda Figura 59).

B. Vinificaciones en rosado

Estos ensayos se realizaron siguiendo el esquema indicado en la Figura 13. En la Tabla 31 se muestran los resultados de los análisis físico-químicos de los vinos obtenidos en las distintas condiciones y en las Figuras 62 y 63 se han representado la evolución de los ácidos (láctico, málico y cítrico) y del pH, respectivamente, a lo largo de las vinificaciones.

Tabla 30. Resultados de los análisis físico-químicos de los vinos rosados obtenidos en los diferentes ensayos semiindustriales realizados en Laboratorios Excell en el 2011. D5: inoculado con el preparado S4608, D6: inoculado con el preparado S4607, D7: control no inoculado con BL pero sí con la levadura Uvaferm VN®.

	D5	D6	D7
Azúcares residuales (g/L)	2.28	3.17	1.93
Ácido málico (g/L)	1.71	1.30	2.29
Ácido láctico (g/L)	0.82	0.96	0.30
Ácido cítrico (g/L)	0.27	0.25	0.24
Grado alcohólico (% v/v)	15.60	15.35	15.33
Glicerol (g/L)	8.60	8.09	8.62
pH	3.65	3.67	3.56

Durante las primeras 72 horas se observó una síntesis de ácido láctico de 0.4 g/L sólo en el depósito D6. Durante la FA y tras ella la concentración de este ácido aumentó entre 0.2 y

0.5 g/L, alcanzándose los niveles más altos de ácido láctico al final del ensayo en los depósitos inoculados con BL (Figura 62A).

Durante las primeras 72 horas de la vinificación el ácido málico disminuyó en todos los vinos pero más acusadamente en los depósitos inoculados con BL, consumiéndose en este periodo entre 0.2 y 0.5 g/L del mismo. Durante la FA y posteriormente, este ácido siguió disminuyendo ligeramente, consumiéndose cantidades comprendidas entre 0.5 y 2 g/L. En ningún caso se consumió totalmente el ácido málico.

La variación del ácido cítrico fue mínima en todos los ensayos, disminuyendo ligeramente la concentración de este ácido a lo largo de la vinificación (máximo 0.04 g/L).

Durante las primeras 72 horas de la vinificación se observó un mayor descenso del pH en los vinos inoculados que en el control. Durante la FA se observó un aumento del pH en los vinos inoculados, mientras que en el vino control se mantuvo prácticamente constante. Tras la FA siguió incrementándose el pH en los inoculados, a diferencia de lo que ocurría en el experimento control donde se mantuvo prácticamente constante. Este aumento de pH coincidió con la degradación del 50% del ácido málico por FML en D5 y D6 al final de los experimentos (Figura 63).

La viabilidad de las BL inoculadas descendió acusadamente tras su inoculación en mosto hasta alcanzar niveles de 10^3 - 10^5 UFC/mL al final del periodo de acidificación (24 horas) y de 10^1 - 10^3 UFC/mL al final de la FA (Figura 64). Posteriormente siguió descendiendo. Esta elevada mortalidad pudo ser consecuencia de una elevada concentración de SO_2 en el mosto inicial. En los depósitos D5 y D6 a las 72 horas de su inoculación las cepas 4608 y 4607, respectivamente, constituyeron el 100% respecto al resto de la población láctica total. A mitad de la FA la cepa 4607 constituyó el 100% de la población láctica en el depósito D6, mientras

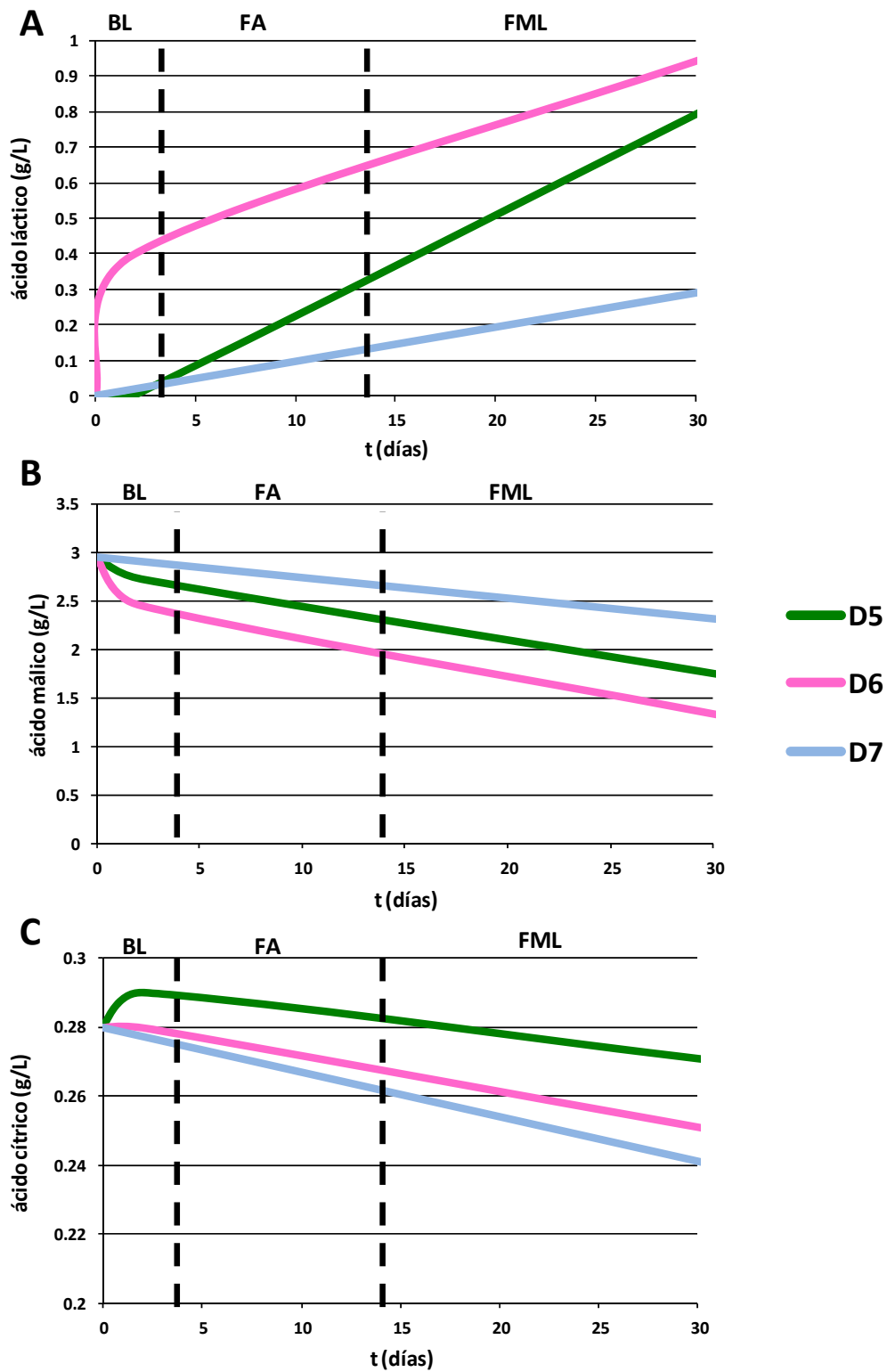


Figura 62. Evolución de los ácidos a lo largo de las vinificaciones. A) Evolución del ácido láctico. B) Evolución del ácido málico. C) Evolución del ácido cítrico. D5: inoculado con el preparado S4608, D6: inoculado con el preparado S4607, D7: control no inoculado con BL pero sí con la levadura Uvaferm VN®.

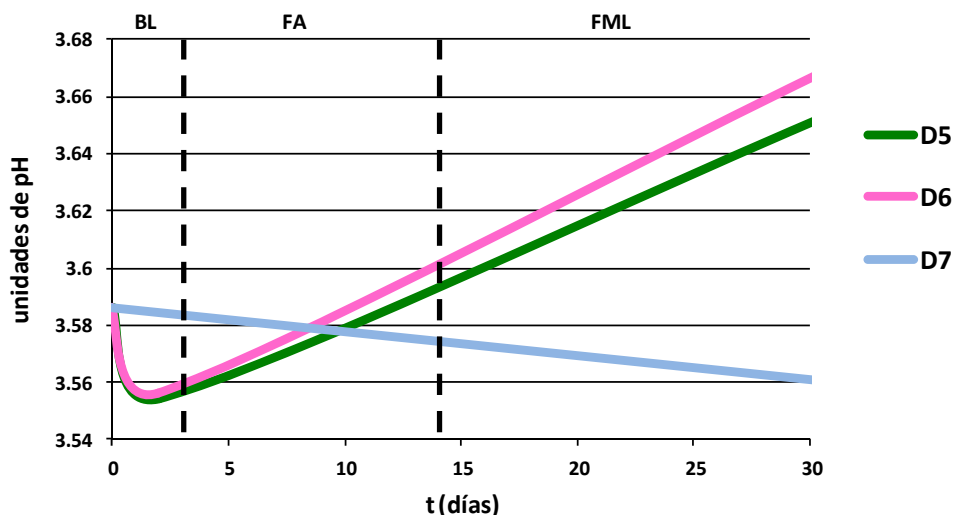


Figura 63. Evolución de pH a los largo de las vinificaciones en rosado (ver leyenda Figura 62).

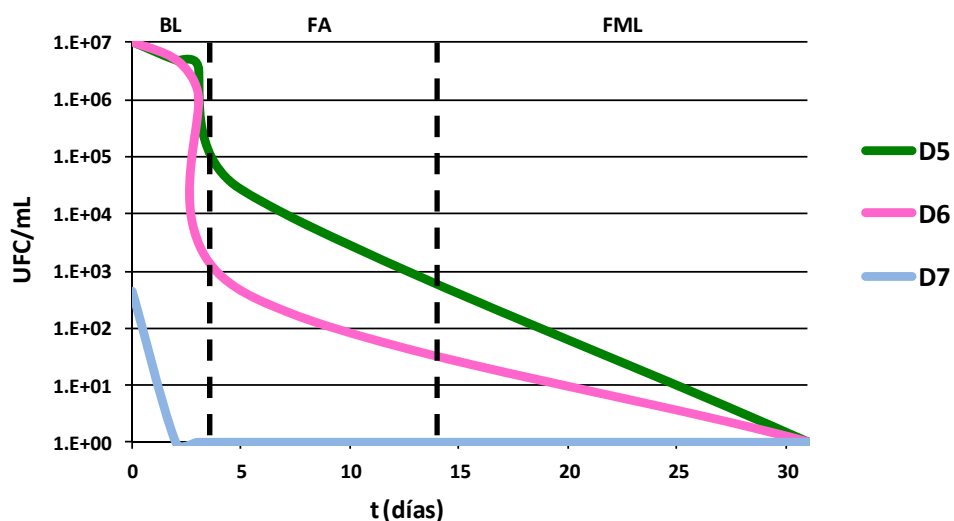


Figura 64. Cinética poblacional de la población láctica BL durante las vinificaciones en rosado (ver leyenda Figura 67).

que la cepa 4608 estuvo representada en un 90% en el D5. Al final de la FA, se observó que la cepa 4607 sólo estaba presente en un porcentaje del 30%, mientras que la cepa 4608 ya no se aisló en esta etapa. En la etapa correspondiente a la FML no se aisló ninguna de las bacterias inoculadas, sino una cepa autóctona de *O. oeni* responsable de la realización de la misma.

Los pHs de los vinos inoculados con BL fueron superiores en 0.1 unidades al del vino control, a pesar de que en estos se habían producido entre 0.5 y 0.7 g/L de ácido láctico. Esto puede explicarse porque en ellos se produjo una mayor degradación del ácido málico que en

Resultados

el control, lo que hace que aumente el pH en lugar de disminuir. Además, en este caso los niveles de ácido cítrico resultaron muy similares en todos los vinos tanto inoculados como no inoculados.

En resumen, en este experimento se obtuvieron mayores descensos de pH en las vinificaciones en tinto que en las de rosado, a pesar de que las bacterias se habían inoculado a menor concentración y de que se había dejado pasar un periodo de tiempo de acidificación más corto antes de inocular la levadura fermentativa. En los vinos rosados no se observó acidificación, registrándose incluso un pH superior en los vinos inoculados con BL debido a la degradación parcial del ácido málico y a la ausencia de ácido láctico sintetizado por FL. En la vinificación en tinto las bacterias inoculadas crecieron durante las primeras 48 horas, sintetizando entre 0.9 y 1.13 g/L de ácido láctico. Las mayores concentraciones de láctico y de cítrico en estos vinos explican la disminución de pH conseguida.

Discusión



La acidificación biológica con BL, objetivo de este trabajo, supone numerosas ventajas frente a otros procedimientos que se han utilizado hasta el presente.

Así, esta metodología evita los inconvenientes que presenta la adición al vino de ácidos orgánicos de síntesis como el tartárico, el cítrico o el láctico, utilizados de forma habitual [58]. El ácido láctico sintetizado por las BL no precipita en forma de cristales como el ácido tartárico y no es susceptible de degradación microbiana, al contrario que el ácido cítrico. Además, la cantidad de ácido láctico sintetizada por los microorganismos durante la vinificación no está legislada, pudiéndose sobrepasar el límite de 3 g/L que establece la legislación para la adición de ácido láctico exógeno para alcanzar los valores de acidificación deseados [58]. Dicha ausencia de legislación supone una gran ventaja frente a los comentados métodos químicos pero también frente a los métodos físicos, ya que éstos se encuentran legislados del mismo modo. Otra gran ventaja añadida es la aplicación de esta metodología a vinificaciones ecológicas en las que no está autorizado el empleo de sustancias químicas de síntesis pero sí pueden utilizarse microorganismos para conseguir el fin deseado.

Dentro de las estrategias de acidificación biológica desarrolladas hasta el momento, el uso de BL supone ciertas ventajas con respecto al de otros microorganismos utilizados hasta el momento, como las levaduras productoras de ácidos. Se han seleccionado cepas de levaduras productoras de elevadas cantidades de ácidos para incrementar la acidez de los vinos. Se han utilizado cepas de *S. cerevisiae* productoras de ácido málico para llevar a cabo la FA [267]. También se han usado cepas de *Zygosaccharomyces rouxii* [268], *Saccharomyces uvarum* [269], *Saccharomyces bayanus* [270] y *Kluyveromyces thermotolerans* [271]) productoras de ácido málico inoculándolas previamente a *S. cerevisiae* en la vinificación. Los vinos resultantes de su aplicación fueron más ácidos, pero poseían el sabor herbáceo del ácido málico y presentaban mayor inestabilidad microbiológica al ser este ácido susceptible de degradación. También se han utilizado levaduras no-*Saccharomyces* (*Torulaspota delbrueckii*) productoras de ácido láctico en coinoculación con *S. cerevisiae* [272]. De esta manera también se ha conseguido aumentar la acidez de los vinos mejorando a su vez el aroma y el gusto, resultando más suave y lácteo. Sin embargo, esta estrategia también plantea inconvenientes, ya que en algunos casos se han observado paradas fermentativas como consecuencia de

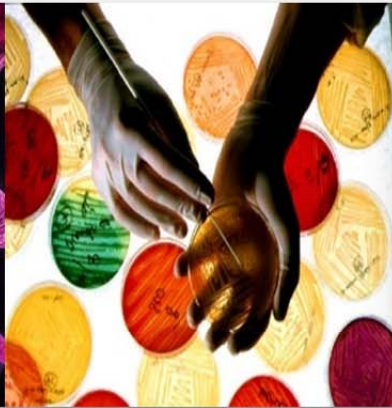
Discusión

incompatibilidad entre la cepa acidificante y la que lleva a cabo la FA. El éxito o fracaso de esta estrategia depende de las combinaciones de cepas de levaduras, variedades de uva, etc. [273, 274]. Además, tradicionalmente las levaduras no-*Saccharomyces* se han considerado productoras de metabolitos con incidencia negativa sobre la calidad del vino, por lo que se las ha catalogado como levaduras alterantes. Entre estos metabolitos destacan el ácido acético, el acetaldehído, la acetoína y el acetato de etilo. Otras levaduras acidificantes se han creado mediante técnicas de ingeniería genética [244]. Sin embargo, estas levaduras transgénicas sólo están disponibles en EE.UU y Canadá, y además ni el consumidor ni los enólogos en general aceptan la aplicación de este tipo de microorganismos. En cambio, la utilización de BL para la acidificación está autorizada y éstas no suelen causar alteraciones organolépticas, sobre todo si se hace un buen programa de selección de la bacteria, a excepción del picado láctico que en este caso sería un efecto modulado y controlado.

En este trabajo, tras la realización de muchos ensayos, se ha desarrollado una metodología de fácil aplicación a nivel industrial. Esta metodología está basada en la inoculación en mosto de cultivos iniciadores liofilizados de BL productoras de ácido láctico antes de la FA. En la aplicación de la técnica a nivel de laboratorio se obtuvieron resultados favorables, pero la aplicación a nivel semiindustrial no consiguió resultados tan buenos como los que eran esperables a partir de los ensayos en el laboratorio, al igual que ocurrió en el trabajo previo de Val y col [247]. Las razones que explican este hecho abren nuevos temas de investigación. Parece existir una inhibición de la actividad metabólica bacteriana, cuyas razones deben dilucidarse y en base a ello queda plantear alternativas que minimicen este efecto inhibitor. Lo que sí fue incontestable fue la mejora del perfil organoléptico que experimentaron los vinos inoculados con las BL seleccionadas. Los cambios en el perfil organoléptico podrían dirigirse a conveniencia del enólogo utilizando cepas con características adecuadas. Otra línea de investigación derivada de los resultados de este trabajo es la posible aplicación de cultivos iniciadores de BL para controlar el desarrollo de microbiota autóctona de forma natural, sin necesidad de recurrir a compuestos de tipo químico como el SO₂, lo cual es de gran interés para producir vinos ecológicos. Estos cultivos iniciadores podrían actuar de manera similar a Primaflora (Immélé), que es un producto de reciente comercialización en

Francia para uso en vinificaciones ecológicas y que está compuesto por una mezcla de levaduras *Saccharomyces* y No-*Saccharomyces*, y BL como *Lactobacillus* y *Oenococcus*.

Conclusiones



- Se han conseguido dos cepas, Enolab 4607 y Enolab 4608, pertenecientes a la especie *L. plantarum* útiles para su aplicación en el proceso de acidificación biológica de vinos. A nivel de laboratorio, las cepas seleccionadas presentaron una buena capacidad de crecimiento en mosto, una alta capacidad para disminuir el pH del mismo, una buena capacidad de sintetizar elevadas cantidades de ácido láctico por FL, una buena aptitud para realizar la FML durante el periodo de crecimiento, una elevada resistencia al SO₂ y a la lisozima y además demostraron ser incapaces de producir aminas biógenas en medio sintético.
- Se ha conseguido obtener preparados liofilizados industriales altamente efectivos de las cepas seleccionadas. Se comprobó que la rehidratación previa del preparado con OptiMalo Plus® o Nutrient Vit End® al 2% proporcionaba los mejores resultados sobre el crecimiento de la cepa en mosto y sobre la acidificación.
- Se comprobó que la mejor estrategia para conseguir la acidificación era la inoculación de los preparados 48 horas antes de la inoculación de la levadura comercial.
- Se demostró que el tipo de levadura para llevar a cabo la FA tenía influencia sobre el grado de acidificación conseguida por las bacterias, siendo más adecuada Uvaferm VN®, productora de ácido málico y cítrico.
- El proceso de acidificación biológica desarrollado fue más efectivo en mostos de pH elevado, con baja concentración de microbiota autóctona y de polifenoles y en ausencia o bajas concentraciones de lisozima y SO₂.
- A nivel de laboratorio, se consiguió disminuir el pH del vino final en 0.3 unidades, sintetizándose entre 7 y 8 g/L de ácido láctico por FL.

Conclusiones

- En las vinificaciones semiindustriales no se consiguió un grado de acidificación semejante al obtenido en el laboratorio, a pesar de que las BL inoculadas mantuvieron su viabilidad durante el proceso de acidificación y de que se implantaron frente a la microbiota autóctona. Tampoco consiguieron completar totalmente la FML. Ambas cosas indican que la actividad metabólica de las BL estaba inhibida. En cambio, sí se observaron importantes modificaciones organolépticas en los vinos inoculados con estos cultivos iniciadores, siendo éstas diferentes en función de la cepa inoculada. También se observó en los vinos inoculados la inhibición del crecimiento de la microbiota láctica autóctona durante la vinificación.

Bibliografía



1. Ruiz, P. *Biodiversidad de la microbiota láctica presente en la FML de vinos tintos de la variedad Cencibel: Caracterización molecular y tecnológica para la selección de cepas*. Tesis Doctoral. 2010. Universidad de Castilla La Mancha, Toledo.
2. Boulton, R. *The relationships between total acidity, titratable acidity and pH in grape tissue*. *Vitis*, 1980. 19: p. 113-120.
3. Orla-Jensen, S. *The lactic acid bacteria*. 1919. Fred Host and Son, Copenhagen.
4. Sharpe, M.E. *Identification of the lactic acid bacteria*. En: *Identification methods for microbiologists*. 1979. Skinner, F.A., Lovelock, D.W., Academic Press, London. 2ª Edición, p. 233-259.
5. Ribéreau-Gayon, J., Dubordieu, D., Donèche, B. y Lonvaud, A. *Handbook of Enology. Vol I. The microbiology of wine and vinifications*. 2000. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, UK.
6. Holt, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2. Gram-positive bacteria other than Actinomycetes*. 1986. Williams and Wilkins, Baltimore. 1ª Edición.
7. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. y Williams, S.T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 1994. Williams and Wilkins, Baltimore. 9ª Edición.
8. Collins, M.D., Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S. y Williams, A.M. *16S ribosomal ribonucleic acid sequence analysis of lactococci and related taxa. Description of Vagococcus fluvialis gen. nov. sp. nov.* *Journal Applied Bacteriology*, 1989. 67: p. 453-460.
9. Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., Feresu, S. y Jones, D. *Classification of Lactobacillus divergens, Lactobacillus piscicola, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, Carnobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1987. 37: p. 310-316.
10. Collins, M.D., Wallbanks, S. y Williams, A.M. *The phylogeny of Aerococcus and Pediococcus as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of Tetragenococcus gen. nov.* *FEMS Microbiology Letters*, 1990. 70: p. 255-262.
11. Collins, M.D., Samelis, J., Metaxopoulos, J. y Wallbanks, S. *Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus Weissella for the Leuconostoc paramesenteroides group of species*. *Journal of Applied Bacteriology*, 1993. 75: p. 595-603.
12. Dicks, L.M.T., Dellaglio, F. y Collins, M.D. *Proposal to reclassify Leuconostoc oenos as Oenococcus oeni [corrig.] gen. nov., comb. nov.* *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995. 45: p. 395-397.
13. Antunes, A., Rainey, F.A., Nobre, M.F., Schumann, P., Ferreira, A.M., Ramos, A., Santos, H. y da Costa, M.S. *Leuconostoc ficulneum sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from a ripe*

- fig*, and reclassification of *Lactobacillus fructosus* as *Leuconostoc fructosum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002. 52(2): p. 647-655.
14. Leisner, J.J., Vancanneyt, M., Van der Meulen, R., Lefebvre, K., Engelbeen, K., Hoste, B., Laursen, B.G., Bay, L., Rusul, G., De Vuyst, L. y Swings, J. *Leuconostoc durionis* sp. nov., a heterofermenter with no detectable gas production from glucose. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005. 55(3): p. 1267-1270.
 15. Chambel, L., Chelo, I.M., Ze-Ze, L., Pedro, L.G., Santos, M.A. y Tenreiro, R. *Leuconostoc pseudoficulneum* sp. nov., isolated from a ripe fig. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006. 56(6): p. 1375-1381.
 16. Endo, A. y Okada, S. *Reclassification of the genus Leuconostoc and proposals of Fructobacillus fructosus* gen. nov., comb. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008. 58(9): p. 2195-2205.
 17. Axelsson, L. *Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology*. En: *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects*. 1998. Eds. Salminen, S. y Von Wright, A., Marcel Dekker, Inc., New York, Based, Hong Kong. 2ª Edición, pp. 1-72. 1998.
 18. du Toit, M., Engelbrecht, L., Lerm, E. y Krieger-Weber, S. *Lactobacillus: the Next Generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures—an Overview*. *Food and Bioprocess Technology*, 2011. 4(6): p. 876-906.
 19. Mesas, J.M., Rodríguez, M.C. y Alegre, M.T. *Characterization of lactic acid bacteria from musts and wines of three consecutive vintages of Ribeira Sacra*. *Letters in Applied Microbiology*, 2011. 52(3): p. 258-268.
 20. Dicks, L.M.T. y Endo, A. *Taxonomic status of lactic acid bacteria in wine and key characteristics to differentiate species*. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 2009. 30: p. 72-90.
 21. Krieger-Weber, S. *Application of yeast and bacteria as starter cultures*. En: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. 2009. Ed. König, H., Uden, G., y Fröhlich, J. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 3-30.
 22. Endo, A. y Okada, S. *Lactobacillus satsumensis* sp. nov., isolated from mashes of shochu, a traditional Japanese distilled spirit made from fermented rice and other starchy materials. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005. 55(1): p. 83-85.
 23. Liu, B. y Dong, X. *Lactobacillus pantheris* sp. nov., isolated from faeces of a jaguar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002. 52(5): p. 1745-1748.
 24. Rodas, A.M., Chenoll, E., Macian, M.C., Ferrer, S., Pardo, I. y Aznar, R. *Lactobacillus vini* sp. nov., a wine lactic acid bacterium homofermentative for pentoses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006. 56(3): p. 513-517.

25. Mañes-Lázaro, R., Ferrer, S., Rodas, A.M., Urdiain, M. y Pardo, I. *Lactobacillus bobalius sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from Spanish Bobal grape must*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008. 58(12): p. 2699-2703.
26. Mañes-Lázaro, R., Ferrer, S., Rosselló-Mora, R. y Pardo, I. *Lactobacillus uvarum sp. nov. - A new lactic acid bacterium isolated from Spanish Bobal grape must*. Systematic and Applied Microbiology, 2008. 31(6-8): p. 425-433.
27. Mañes-Lázaro, R., Ferrer, S., Rosselló-Mora, R. y Pardo, I. *Lactobacillus oeni sp. nov., from wine*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009. 59(8): p. 2010-2014.
28. Lonvaud-Funel, A. *Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine*. Antonie van Leeuwenhoek, 1999. 76: p. 317-331.
29. Flanzy, C. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. 2000. Ed. AMV, Madrid.
30. Lafon-Lafourcade, S., Carre, E. y Ribéreau-Gayon, P. *Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines*. Applied Environmental Microbiology, 1983. 46: p. 874-880.
31. Cañas, P.M.I., Pérez, P.R., Prieto, S.S. y Herreros, M.L.P. *Ecological study of lactic acid microbiota isolated from Tempranillo wines of Castilla-La Mancha*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009. 108(3): p. 220-224.
32. Cabanis, J.C., M. T. Cabanis, M.T., Cheynier, V., y Teissendré P.L. *Tablas de composición*. En: *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*. 2000. Ed. AMV, Madrid. p. 218-231.
33. Ribéreau- Gayon, J., Dubordieu, D., Donèche, B. y Lonvaud, A. *Metabolism of Lactic Acid Bacteria*. En: *Handbook of Enology. Vol. 1. The Microbiology of Wine and Vinifications*. 2006, John Wiley & Sons, Ltd. p. 139-160.
34. Fleet, G.H. *Wine: Microbiology and Biotechnology*. 1993. Harwood Academic Publishers, Switzerland.
35. Uden, G. y Zaunmüller, T. *Metabolism of sugars and organic acids by lactic acid bacteria from wine and must*. En: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Ed. König, H. Uden, G. y Fröhlich, J. 2009, Springer. p. 135-148.
36. Dives, M., Feuillat, M., Cavin, J.F., Guilloux-Benatier, M. y Guzzo, J. *Bacterias lácticas en enología*. En: *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Ed. Flanzy, C. 2003. p. 323-343.
37. Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., y Dubourdieu, D. *Organic acids of wine*. En: *Handbook of Enology Vol 2. Part One. The Chemistry of wine. Stabilization and Treatments*. 2006, John Wiley & Sons, Ltd. p. 3-50.
38. Kunkee, R.E. *Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making*. FEMS Microbiology Letters, 1991. 88(1): p. 55-72.

Bibliografía

39. Caspritz, G. y Radler, F. *Malolactic enzyme of Lactobacillus plantarum. Purification, properties, and distribution among bacteria*. Journal of Biological Chemistry, 1983. 258(8): p. 4907-4910.
40. Spettoli, P., Nuti, M.P. y Zamorani, A. *Properties of malolactic activity purified from Leuconostoc oenos ML-34 by affinity chromatography*. Applied of Environmental Microbiology, 1984. 48: p. 900-901.
41. Henick-Kling, T. *Growth and metabolism of Leuconostoc oenos and Lactobacillus plantarum in wine*. Tesis Doctoral. 1986. University of Adelaide, South Australia.
42. Costello, P.J. *The chemistry of malolactic fermentation. En: Malolactic fermentation in wine*. 2005. Ed. Lallemand Inc., Montréal, Canadá. P. 4:1-4:11.
43. Cox, D.J. y Henick-Kling, T. *Chemiosmotic energy from malolactic fermentation*. Journal of Bacteriology, 1989. 171: p. 5750-5752.
44. Henick-Kling, T. *Malolactic fermentation. En: Wine: Microbiology and Biotechnology*, 1993. Harwood Academic Publishers, Switzerland. p. 289-326.
45. Versari, A., Parpinello, G.P., y Cattaneo, M. *Leuconostoc oenos and malolactic fermentation in wine: a review*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 1999. 23(6): p. 447-455.
46. López, R. *Control de la fermentación maloláctica en vinos tintos de Rioja. Influencia en su calidad higiénica, fisico-química y sensorial*. Tesis Doctoral. 2009. Universidad de La Rioja, Logroño.
47. Lonvaud-Funel, A. *Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine*. Antonie van Leeuwenhoek, 1999. 76: p. 317 - 331.
48. Ugliano, M., Genovese, A. y Moio, L. *Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of Oenococcus oeni*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2003. 51(17): p. 5073 -5078.
49. Pripis-Nicolau, L., Revel, G., Bertrand, A. y Lonvaud-Funel, A. *Methionine catabolism and production of volatile sulphur compounds by Oenococcus oeni*. Journal of Applied Microbiology, 2004. 96(5): p. 1176-1184.
50. Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donéche, B. y Lonvaud, A. *Microbiología del vino. Vinificaciones. En: Tratado de Enología I*. 2003, Ed. Hemisferio Sur, Paris. p. 161-155.
51. Ribéreau-Gayon, J., Dubordieu, D., Donèche, B., y Lonvaud, A. *Metabolism of lactic acid bacteria. En: Handbook of Enology. The Microbiology of wine and vinifications*. 2006, John Wiley & Sons, Ltd. p. 139-157.

52. Bartowsky, J. y Henschke, A. *The "buttery" attribute of wine diacetyl desirability, spoilage and beyond*. *International Journal of Food Microbiology*, 2004. 96: p. 235-252.
53. Harvey, R. y Collins, E. *Roles of citrate and acetoin in the metabolism of Streptococcus diacetilactis*. *Journal of Bacteriology*, 1963. 86: p. 1301-1307.
54. Ramos, A. y Santos, H. *Citrate and sugar cofermentation in Leuconostoc oenos, α ^{13}C nuclear magnetic resonance study*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996. 62: p. 2577-2588.
55. Liu, S.-Q. *Malolactic fermentation in wine - beyond deacidification*. *Journal of Applied Microbiology*, 2002. 92(4): p. 589-601.
56. Chauvet, J., Brechot, P., Dubois, C. y Dupuy, P. *Stimulation de la croissance dans le vin d'une flore malolactique par les acides malique et citrique*. *Science Alimentaire*, 1982. 2(4): p. 495-504.
57. Liu, S.Q., Davis, C.R. y Brooks, J.D. *Growth and metabolism of selected lactic acid bacteria in synthetic wine*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1995. 46(2): p. 166-174.
58. Hidalgo, J. *Tratado de Enología*. 2003. Ed. AMV, Madrid.
59. Lonvaud-Funel, A. *Bacterias lácticas y fermentación maloláctica*. En: *Informe Técnico de III Encuentro Enológico: "Fermentación Maloláctica"*. Ed. Fundación para la Cultura del Vino. Madrid 15 Marzo de 2006. pp. 22-29.
60. Martineau, B. y Henick-Kling, T. *Performance and diacetyl production of commercial strains of malolactic bacteria in wine*. *Journal of Applied Bacteriology*, 1995. 78: p. 526-536.
61. Radler, F. *The metabolism of organic acids by lactic acid bacteria*. En: *Lactic acid bacteria in beverages and foods*. 1975. Ed. Carr, J.G., Cutting, C.U., Whiting, G.C. Academic Press, New York, p. 17-27.
62. Henick-Kling, T. *Yeast and bacterial control in winemaking*. En: *Modern methods of plant analysis. Vol 6*. 1988. Ed. Linskens, H.F. y Jackson, J.F. New Series, p. 296-316.,
63. Izquierdo, P.M., García, E., Gómez, S., Fernández, M. y Palop, M.L. *Aminoacids and biogenic amines during spontaneous malolactic fermentation in Tempranillo red wines*. *Journal Food Composition and Analysis*, 2008. 21: p. 731-735.
64. Thomas, T.D. y Mills, O.E. *Proteolytic enzymes of starter bacteria*. *Netherland Milk Dairy Journal*, 1981. 35: p. 255-273.
65. Spano, G., Russo, P., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Alexandre, H., Grandvalet, C., Coton, E., Coton, M., Barnavon, L., Bach, B., Rattray, F., Bunte, A., Magni, C., Ladero, V., Alvarez, M., Fernandez, M., Lopez, P., de Palencia, P.F., Corbi, A., Trip, H. y Lolkema, J.S. *Biogenic amines in fermented foods*. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2010. 64(S3): p. S95-S100.

Bibliografía

66. Desportes, C., Charpentier, M., Duteurte, B. y Maujean, A. *Liquid chromatographic fractionation of small peptides from wine*. Journal of Chromatography A, 2000. 893: p. 281-291.
67. Remize, F., Gaudin, A., Kong, Y., Guzzo, J., Alexandre, H., Krieger, S. y Guilloux-Benatier, M. *Oenococcus oeni preference for peptides: qualitative and quantitative analysis of nitrogen assimilation*. Archives of Microbiology, 2006. 185(6): p. 459-469.
68. Ritt, J.-F., Remize, F., Grandvalet, C., Guzzo, J., Atlan, D. y Alexandre, H. *Peptidases specific for proline-containing peptides and their unusual peptide-dependent regulation in Oenococcus oeni*. Journal of Applied Microbiology, 2009. 106(3): p. 801-813.
69. Halász, A., Baráth, Á., Simon-Sarkadi, L. y Holzapfel, W. *Biogenic amines and their production by microorganisms in food*. Trends in Food Science and Technology, 1994. 5(2): p. 42-49.
70. Shalaby, A.R. *Significance of biogenic amines to food safety and human health*. Food Research International, 1996. 29(7): p. 675-690.
71. Silla Santos, M.H. *Biogenic amines: their importance in foods*. International Journal of Food Microbiology, 1996. 29(2-3): p. 213-231.
72. Bover-Cid, S. y Holzapfel, W.H. *Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria*. International Journal of Food Microbiology, 1999. 59: p. 391-396.
73. ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L. y Huis in't Veld, J.H. *Occurrence and formation of biologically active amines in foods*. International Journal of Food Microbiology, 1990. 11: p. 73-84.
74. Landete, J.M., Ferrer, S., Polo, L. y Pardo, I. *Biogenic amines in wines from three Spanish regions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. 53(4): p. 1119-1124.
75. Landete, J.M., Ferrer, S. y Pardo, I. *Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine*. Food Control, 2007. 18(12): p. 1569-1574.
76. Moreno-Arribas, V., Torlois, S., Joyeux, A., Bertrand, A. y Lonvaud-Funel, A. *Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine*. Journal of Applied Microbiology, 2000. 88(4): p. 584-593.
77. Landete, J.M., Pardo, I. y Ferrer, S. *Tyramine and phenylethylamine production among lactic acid bacteria isolated from wine*. International Journal of Food Microbiology, 2007. 115(3): p. 364-368.
78. Landete, J.M., Ferrer, S. y Pardo, I. *Which lactic acid bacteria are responsible of histamine production in wine?* Journal of Applied Microbiology, 2005. 99(3): p. 580-586.

79. Landete, J.M., Arena, M.E., Pardo, I., Manca de Nadra, M.C. y Ferrer, S. *The role of two families of bacterial enzymes in putrescine synthesis from agmatine via agmatine deiminase*. International Microbiology, 2010. 13(4): p. 169-177.
80. Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. y Vidal-Carou, M.C. *Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid-decarboxylase starter culture for fermentation of fuet sausages*. Journal of Food Protection, 2000. 63: p. 237-243.
81. Seseña, S., Sánchez, I. y Palop, L. *Characterization of Lactobacillus strains and monitoring by RAPD-PCR in controlled fermentations of "Almagro" eggplants*. International Journal of Food Microbiology, 2005. 104(3): p. 325-335.
82. Liu, S.Q. y Pilone, G.J. *A review: arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance*. Journal of Applied Microbiology, 1998. 84(3): p. 315-327.
83. Mira de Orduña, R., Patchett, M.L., Liu, S.-Q. y Pilone, G.J. *Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria Lactobacillus buchneri and Oenococcus oeni at different pH values and arginine concentrations*. Applied and Environmental Microbiology, 2001. 67(4): p. 1657-1662.
84. Arena, M.E., de Nadra, M.C.M. y Muñoz, R. *The arginine deiminase pathway in the wine lactic acid bacterium Lactobacillus hilgardii X₁B: structural and functional study of the arcABC genes*. Gene, 2002. 301: p. 61-66.
85. Suárez, J.A. y Iñigo, B. *Microbiología Enológica. Fundamentos de vinificación*. 2004. 3ª Edición. Ed.Mundi-Prensa, Madrid.
86. Mira de Orduna, R., Patchett, M.L., Liu, S.Q. y Pilone, G.J. *Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria Lactobacillus buchneri and Oenococcus oeni at different pH values and arginine concentrations*. Applied and Environmental Microbiology, 2001. 67(4): p. 1657-1662.
87. Liu, S.-Q., Pritchard, G.G., Hardman, M.J. y Pilone, G.J. *Arginine catabolism in wine lactic acid bacteria: Is it via the arginine deiminase pathway or the arginase-urease pathway?* Journal of Applied Bacteriology, 1996. 81: p. 486-492.
88. Muñoz, R., Moreno-Arribas, M.V. y De las Rivas, B. *Alteraciones sensoriales del vino producidas por bacterias lácticas*. En: "Microbiología del vino". 2005. Ed. AMV, Madrid. p. 262-272.
89. Ebeler, S.E. *Analytical chemistry: unlocking the secrets of wine flavor*. Food Reviews International, 2001. 17: p. 45-64.
90. Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. y Dubourdieu, D. *Alcohols and other volatile compounds*. En: *Handbook of Enology*. 2000. Ed. Ribereau-Gayon, P. y col., Wiley. p. 41-54.

Bibliografía

91. Delaquis, P., Cliff, M., King, M., Giraud, B., Hall, J. y Reynolds, A. *Effect of two commercial malolactic cultures on the chemical and sensory properties of Chancellar wines vinified with different yeast and fermentation temperatures*. American Journal of Enology and Viticulture, 2000. 51: p. 42-48.
92. de Revel, G., Marin, N., Pripis-Nicolau, L., Lonvaud-Funel, A. y Bertand, A. *Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence of wine aroma*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. 47: p. 4003-4008.
93. Osborne, J.P., Mira de Orduña, R., Pilone, G.J. y Liu, S. *Acetaldehyde metabolism of wine lactic acid bacteria*. FEMS Microbiology Letters, 2000. 191: p. 51-55.
94. Moreno-Arribas, M.V. y Polo, M.C. *Volatile and aroma compounds*, En: *Wine Chemistry and Biochemistry*. 2009. Ed. Moreno-Arribas, M.V. y Polo, M.C. Springer Science. p. 249-416.
95. Grimaldi, A., McLean, H. y Jiranek, V. *Identification and partial characterization of glycosidic activities of commercial strains of the lactic acid bacterium, Oenococcus oeni*. American Journal of Enology and Viticulture, 2000. 51(4): p. 362-364.
96. de Cort, S., Shantha Kumara, H.M.C. y Verachert, H. *Localization and characterization of alpha-glucosidase activity in Lactobacillus brevis*. Applied and Environmental Microbiology, 1994. 60: p. 3074-3078.
97. Cavin, J.F., Andioc, V., Etievant, P.X. and Diviès, C. *Ability of wine lactic acid bacteria to metabolize phenol carboxylic acids*. Am. J. Enol. Vitic., 1993. 44: p. 76-80.
98. Gury, J., Barthelmebs, L., Tran, N.P., Diviès, C. y Cavin, J.F. *Cloning, deletion, and characterization of PadR, the transcriptional repressor of the phenolic acid decarboxylase-encoding padA gene of Lactobacillus plantarum*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. 70: p. 2146-2153.
99. Bartowsky, E.J. y Pretorius, I.S. *Microbial formation and modification of flavor and off-flavor compounds in wine*. En: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. 2009. Ed. König, H., Uden, G. y Frölich, J. Springer. p. 209-232.
100. Ribereau-Gayon, P. *Lactic acid bacteria development in wine*, En: *Handbook of Enology. The Microbiology of wine and vinifications*. 2006. John Wiley & Sons, Ltd. p. 161-182.
101. Bousbouras, G.E. y Kunkee, R.E. *Effect of pH on malo-lactic fermentation in wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 1971. 22: p. 121-126.
102. Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C.R., Fleet, G.H. y Lee, T.H. *Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review*. American Journal of Enology and Viticulture, 1985. 36: p. 302-313.

- 103.** Lafon-Lafourcade, S. y Peynaud, E. *Sur l'action antibactérienne de l'anhydride sulfureux sous forme libre et sous forme combinée*. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 1974. 8: p. 187-203.
- 104.** Bartowsky, E.J. *Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it*. *Letters of Applied Microbiology*, 2009. 48(2): p. 149-156.
- 105.** Bauer, R. y Dicks, L.M.T. *Control of malolactic fermentation in wine. A review*. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 2004. 25: p. 74-88.
- 106.** Kyne, A. y Gertsen-Briand, S. *Guía para resolver problemas, En: Informe Técnico III Encuentro Enológico: "Fermentación Maloláctica"*. Ed. Fundación para la Cultura del Vino. Madrid, 15 de marzo de 2006. p. 47-50.
- 107.** Boidron, A.M. *Etude de l'antagonisme entre les levures et les bactéries du vin*. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 1969. 3: p. 315-378.
- 108.** Fornachon, J.C.M. *Influence of different yeasts on the growth of lactic acid bacteria in wine*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1968. 19: p. 374-378.
- 109.** Gilis, J-J., Delia-Dupuy, M.-L. y Strehaiano, P. *Étude qualitative et quantitative des interactions entre Saccharomyces cerevisiae et Leuconostoc oenos*. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 1996. 30: p. 151-157.
- 110.** Lafon-Lafourcade, S. *De la fermentescibilité malolactique des vins: interaction levures-bactéries*. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 1973. 7: p. 203-207.
- 111.** Lemaesquier, H. *Inter-relationships between strains of Saccharomyces cerevisiae from the Champagne area and lactic acid bacteria*. *Letters in Applied Microbiology*, 1987. 4: p. 91-94.
- 112.** Mayer, M.K. *Progrès récents dans la connaissances des phénomènes microbiologiques en vinification*. *Boletín de la O.I.V.*, 1978. 51: p. 269-280.
- 113.** Wibowo, D., Fleet, G.H., Lee, T.H. y Eschenbruch, R.E. *Factors affecting the induction of malolactic fermentation in red wines with Leuconostoc oenos*. *Journal Applied Bacteriology*, 1988. 64: p. 421-428.
- 114.** Leon, M.t., Dicks, S.T., y Endo, A. *Microbial Interactions, En: Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. 2009. Ed. König, H., Uden, G. y Frölich, J. Springer. p. 335-350.
- 115.** Alexandre, H., Costello, P.J., Remize, F., Guzzo, J. y Guilloux-Benatier, M. *Saccharomyces cerevisiae-Oenococcus oeni interactions in wine: current knowledge and perspectives*. *International Journal of Food Microbiology*, 2004. 93(2): p. 141-154.
- 116.** Beelman, R.B., Keen, R.M., Banner, M.J. y King, S.W. *Interactions between wine yeast and malolactic bacteria under wine conditions*. *Developments in Industrial Microbiology*, 1982. 23: p. 107-121.

Bibliografía

117. Capucho, I. y Sanromao, M.V. *Effect of ethanol and fatty acids on malolactic activity of Leuconostoc oenos*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1994. 42: p. 391-395.
118. Fleet, G.H. *Yeast interactions and wine flavour*. International Journal of Food Microbiology, 2003. 86(1-2): p. 11-22.
119. Dott, W., Heinzl, M. y Trüper, H.G. *Sulfite formation by wine yeasts: I. Relationships between growth, fermentation and sulfite formation*. Archives of Microbiology, 1976. 107: p. 289-292.
120. Eschenbruch, R. *Sulfite and sulfide formation during winemaking-a review*. American Journal of Enology and Viticulture, 1974. 25(3): p. 157-161.
121. Rankine, B.C. y Pocock, K.F. *Influence of yeast strain on binding of SO₂ in wines and on its formation during fermentation*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1969. 20: p. 104-109.
122. Suzzi, G., Romano, P. y Zambonelli, C. *Saccharomyces strain selection in minimizing SO₂ requirement during vinification*. American Journal of Enology and Viticulture, 1985. 36: p. 199-202.
123. Britz, T.J. y Tracey, R.P. *The combination effect of pH, SO₂, ethanol and temperature on the growth of Leuconostoc oenos*. Journal of Applied Bacteriology, 1990. 68: p. 23-31.
124. Guerzoni, M.E., Sinigaglia, M., Gardini, F., Ferruzzi, M. y Torriani, S. *Effects of pH, temperature, ethanol, and malate concentration on Lactobacillus plantarum and Leuconostoc oenos - modelling of the malolactic activity*. American Journal of Enology and Viticulture, 1995. 46(3): p. 368-374.
125. Dick, K.J., Molan, P.C. y Eschenbruch, R. *The isolation from Saccharomyces cerevisiae of two antibacterial cationic proteins that inhibit malolactic bacteria*. Vitis, 1992. 31: p. 105-116.
126. Comitini, F., Ferretti, R., Clementi, F., Mannazzu, I. y Ciani, M. *Interactions between Saccharomyces cerevisiae and malolactic bacteria: preliminary characterization of a yeast proteinaceous compounds active against Oenococcus oeni*. Journal of Applied Microbiology, 2005. 99(1): p. 105-111.
127. Nehme, N., Mathieu, F. y Taillandier, P. *Quantitative study of interactions between Saccharomyces cerevisiae and Oenococcus oeni strains*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2008. 35(7): p. 685-693.
128. Osborne, J.P. y Edwards, C.G. *Inhibition of malolactic fermentation by a peptide produced by Saccharomyces cerevisiae during alcoholic fermentation*. International Journal of Food Microbiology, 2007. 118(1): p. 27-34.

129. Caridi, A. y Corte, V. *Inhibition of malolactic fermentation by cryotolerant yeasts*. Biotechnolgy Letters, 1997. 19(8): p. 723-726.
130. Lonvaud-Funel, A., Joyeux, A. y Desens, C. *Inhibition of malolactic fermentation of wines by products of yeast metabolism*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1988. 44(2): p. 183-191.
131. Lonvaud-Funel, A., Masclef, J.P., Joyeux, A. y Paraskevopoulos, Y. *Étude des interactions entre levures et bactéries lactiques dans le moût de raisin*. Connaissance de la Vigne et du Vin, 1988. 22: p. 11-24.
132. Guilloux-Benatier, M., Alexandre, H., Remize, F., Augagneur, Y., Valat, W. y Guzzo, J. *Incidence du métabolisme azoté levurien sur Oenococcus oeni*. Actualités Oenologiques 2003. VIIème Symposium International d'oenologie, 19-21 Juin 2003, Bordeaux, France.
133. Guilloux-Benatier, M., Son, H.S., Bouhier, S. y Feuillat, M. *Oxidasic and peptidasic activities in Leuconostoc oenos during bacterial growth - influence of macromolecules of yeasts*. Vitis, 1993. 32: p. 51-57.
134. King, S.W. y Beelman, R.B. *Metabolic interactions between Saccharomyces cerevisiae and Leuconostoc oenos in a model grape juice - wine system*. American Journal of Enology and Viticulture, 1986. 37: p. 53-60.
135. Chowdhury, H., Watier, D., Leguerinel, I. y Hornez, J.-P. *Effect of Pectinatus cerevisiiphilus on Saccharomyces cerevisiae concerning its growth and alcohol production in wort medium*. Food Microbiology, 1997. 14: p. 265-272.
136. Edwards, C.G., Beelman, R.B., Bartley, C.E. y McConnel, A.L. *Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification*. American Journal of Enology and Viticulture, 1990. 41: p. 48-56.
137. Fleet, G.H., Lafon-Lafourcade, S. y Ribereau-Gayon, P. *Evolution of yeast and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines*. Applied and Environmental Microbiology, 1984. 48: p. 1034-1038.
138. Krieger, S. *Starter cultures for malolactic fermentation - time of inoculation proceedings*. Proceedings of the 13th International Oenology Symposium; 9-12 June 2002. Montpellier, France, International Association of Oenology, Management and Wine Marketing, p. 77-91.
139. Semon, M.J., Edwards, C.G., Forsyth, D. y Dinn, C. *Inducing malolactic fermentation in Chardonnay musts and wines using different strains of Oenococcus oeni*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2001. 7: p. 52-59.
140. Ouwehand, A.C. *Antimicrobial components from lactic acid bacteria*. En: *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional aspects*. 1998. Ed. Salminen, S., Von Wright, A. Marcel Dekker Inc., New York, USA. p. 139-159.

Bibliografía

141. Byczkowsky, J.Z. y Gessner, T. *Biological role of superoxide ion-radical*. International Journal of Biochemistry, 1988. 20: p. 569-580.
142. Jay, J.M. *Modern food microbiology*. 1986. Van Nostrand Reinhold, Nueva York.
143. Klaenhammer, T.R. *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Biochimie, 1988. 70: p. 337-349.
144. Schillinger, U. *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. En: *Biotechnology and Food safety*. 1990. Ed. Bills, D.D. y Kung, S. Butterworth-Heinemann, Stoneham, Massachusetts, p. 55-74.
145. Daeschel, M.A. *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. En: *Food Biopreservatives of Microbial Origin*. 1992. Ed. Ray, B. y Daeschel, M. CRC Press, Inc., Boca Ratón, Florida, p. 323-345.
146. Bruno, M.E., Kaiser, A. y Montville, T.J. *Depletion of the proton motive force by nisin in Listeria monocytogenes cells*. Applied of Environmental Microbiology, 1992. 58: p. 2255-2259.
147. Diep, D.B. y Nes, I.F. *Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria*. Current Drug Targets, 2002. 3: p. 107-122.
148. Eijsink, V.G.H., Axelsson, L., Diep, D.B., Håvarstein, L.S., Holo, H. y Nes, I.F. *Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria, an example of biological warfare and communication*. Antonie Leeuwenhoek, 2002. 81: p. 639-654.
149. Settanni, L. y Corsetti, A. *Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation*. International Journal of Food Microbiology, 2008. 121(2): p. 123-138.
150. Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M.A., Stevanovic, S., y Nes, I.F. *Plantaricin W from Lactobacillus plantarum belongs to a new family of two peptide lantibiotics*. Microbiology, 2001. 147: p. 643-651.
151. Rojo-Bezares, B., Saenz, Y., Navarro, L., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F. y Torres, C. *Coculture-inducible bacteriocin activity of Lactobacillus plantarum strain J23 isolated from grape must*. Food Microbiology, 2007. 24(5): p. 482-491.
152. Navarro, L., Rojo-Bezares, B., Saenz, Y., Díez, L. y Zarazaga, M. *Comparative study of the pln locus of the quorum-sensing regulated bacteriocin producing L. plantarum J51 strain*. International Journal of Food Microbiology, 2008. 128: p. 390-394.
153. Strasser de Saad, A.M. y Manca de Nadra, M.C. *Characterization of bacteriocin produced by Pediococcus pentosaceus from wine*. Journal of Applied Bacteriology, 1993. 74: p. 406-410.
154. Yurdugül, S. y Bozoglu, F. *Studies on an inhibitor produced by lactic acid bacteria of wines on the control of malolactic fermentation*. European Food Research and Technology, 2002. 215(1): p. 38-41.

155. Nel, H.A., Bauer, R., Wolfaardt, G.M. y Dicks, L.M.T. *Effect of bacteriocins pediocin PD-1, plantaricin 423, and nisin on biofilms of Oenococcus oeni on a stainless steel surface*. American Journal of Enology and Viticulture, 2002. 53(3): p. 191-196.
156. Bauer, R., Nel, H.A. y Dicks, L.M.T. *Pediocin PD-1 as a method to control growth of Oenococcus oeni in wine*. American Journal of Enology and Viticulture, 2003. 54: p. 86-91.
157. Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Zarazaga, M., Torres, C. y Ruiz-Larrea, F. *Antimicrobial activity of nisin against Oenococcus oeni and other wine bacteria*. International Journal of Food Microbiology, 2007. 116: p. 32-36.
158. Knoll, C., Divol, B. y du Toit, M. *Genetic screening of lactic acid bacteria of oenological origin for bacteriocin-encoding genes*. Food Microbiology, 2008. 25(8): p. 983-991.
159. Bartowsky, E.J. *Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it*. Letters in Applied Microbiology, 2009. 48(2): p. 149-156.
160. Vivas, N., Lonvaud-Funel, A. y Glories, Y. *Effect of phenolic acids and anthocyanins on growth, viability and malolactic activity of a lactic acid bacterium*. Food Microbiology, 1997. 14(3): p. 291-300.
161. Vivas, M., Augustin, M. y Lonvaud-Funel, A. *Influence of oak wood and grape tannins on the lactic acid bacterium Oenococcus oeni (Leuconostoc oenos 8413)*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1997. 80: p. 1675-1678.
162. Vivas, M., Lonvaud-Funel, A., Glories, Y. y Augustin, M. *Effect of malolactic fermentation in barrels and tanks on red wine composition and quality*. Practical Winery and Vineyard, 1997. May/June: p. 68-77.
163. H., R., Landete, J.M., De las Rivas, J.A. y Muñoz, R. *Las bacterias lácticas y los compuestos fenólicos del vino*. Vinoteq, 2007. 36: p. 26-30.
164. Figueiredo, A.R., Campos, F., de Freitas, V., Hogg, T. y Couto, J.A. *Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of Oenococcus oeni and Lactobacillus hilgardii*. Food Microbiology, 2008. 25(1): p. 105-112.
165. Ribereau-Gayon, J., Peynaud, E., Ribereau-Gayon, P. y Sudraud, P. *Traité d'oenologie. Sciences et techniques du vin. Tome II*. 1975, Paris.
166. Dietrich, H. y Pour, M.S. *Influence of phenolic compounds and tannins on wine-related microorganisms*, En: *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. 2009. Ed. König, H., Uden, G. y Frölich, J. Springer. p. 307-334.
167. Ribereau-Gayon, J., Dubourdieu, D., Doneche, B. y Lonvaud, A. *Traité d'Oenologie. Tome 1. Microbiologie du vin. Vinifications*. 1998. Ed. Dunod. Paris.

Bibliografía

- 168.** Landete, J.M., Rodriguez, H., De las Rivas, B. y Muñoz, R. *High-adeed-value antioxidants obtained from the degradation of wine phenolic by Lactobacillus plantarum*. Journal of Food Protection, 2007. 70: p. 2670-2673.
- 169.** Alberto, M.R., Gomez-Cordoves, C. y Manca de Nadra, M.C. *Metabolism of gallic acid and catequin by Lactobacillus hilgardii from wine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. 52: p. 6465-6469.
- 170.** Bartowsky, E.J., Costello, P.J., Villa, A. y Henschke, P.A. *The chemical and sensorial effects of lysozyme addition to red and white wines over six months cellar storage*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2004. 10: p. 143-150.
- 171.** Delfini, C., Cersosimo, M., Del Prete, V., Strano, M., Gaetano, G., Pagliara, A., y Ambró, S. *Resistance screening assay of wine lactic acid bacteria on lysozyme: efficacy of lysozyme in unclarified grape musts*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. 52: p. 1861-1866.
- 172.** Roure, F. *Lysozime: une protéine animale qui peut diminuer les dose de SO₂ et les teneurs en amines biogènes*. Revue française d'oenologie, 2005. 210: p. 32-34.
- 173.** Bordons, A. *Las bacterias lácticas del vino y la fermentación maloláctica*, En: *Criterios de valoración de la calidad de la uva*. 1997, Haro. p. 9-31.
- 174.** Buckenhüskes, H.J. *Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities*. FEMS Microbiology Reviews, 1993. 12: p. 253-272.
- 175.** Degre, R. *Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria*, En: *Wine Microbiology and Biotechnology*. 1993. p. 421-447.
- 176.** Prah, C. *A method of inducing the decarboxylation of malic acid in must or fruit juice*. 1989. Patent WO 89/06685.
- 177.** Beelman, R.B., McArdle, F.J. y Duke, G.R. *Comparison of Leuconostoc oenos strains ML-34 and PSU-1 to induce malo-lactic fermentation in Pennsylvania red table wines*. American Journal of Enology and Viticulture, 1980. 31: p. 269-276.
- 178.** Nielsen, J.C., Prah, C. y Lonvaud-Funel, A. *Malolactic fermentation in wine by direct inoculation with freeze-dried Leuconostoc oenos cultures*. American Journal of Enology and Viticulture, 1996. 47(1): p. 42-48.
- 179.** Pilatte, E. y Prah, C. *Biological deacidification of acide grape varieties by inoculation on must with a freeze-dried culture of Lactobacillus plantarum*. Annual Meeting ASEV, San Diego, California. Ed. Rautz, J. 1-2 de Julio 1997.
- 180.** Navascués, E. *Aminas biógenas en el vino. Estrategias para evitar su generación*. Elaboración del vino y salud, 2005. p. 29-37.

181. Blateyron, L., Bonnefond, C. y Granes, D. *Maîtrise des fermentations malolactiques des vins rouges vinifiés en macération traditionnelle: Etude expérimentale de facteurs technologique jouant un rôle sur la fermentescibilité des vins*. Proceedings XXX O.I.V. World Congress, Budapest, 10-16 June 2007.
182. Gindreau, E. y Augustin, C. *Nouveautés dans les levains malolactiques*. Révue des Oenologues, 2007. 122: p. 13-15.
183. Krieger, S., Deleris, M. y Heras, J.M. *Cultivos iniciadores malolácticos en forma seca activa. Un enfoque rentable y eficiente para el control de las fermentaciones malolácticas*. Ibercide, 2010. p. 1-7.
184. Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., Jorganes, F. y Muñoz, R. *Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine*. International Journal of Food Microbiology, 2003. 84(1): p. 117-123.
185. Bartowsky, E.J. *Oenococcus oeni and malolactic fermentation – moving into the molecular arena*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2005. 11(2): p. 174-187.
186. G-Alegria, E., Lopez, I., Ruiz, J.I., Saenz, J., Fernandez, E., Zarazaga, M., Dizy, M., Torres, C., y Ruiz-Larrea, F. *High tolerance of wild Lactobacillus plantarum and Oenococcus oeni strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol*. FEMS Microbiology Letters, 2004. 230(1): p. 53-61.
187. Izquierdo, P.M., García, E., Martínez, J. y Chacón, J.L. *Selection of lactic bacteria to induce malolactic fermentation in red wine of cv. Cencibel*. Vitis, 2004. 43(2): p. 149-153.
188. Fumi, M.D., Krieger, S., Bou, M., Silva, A. y du Toit, M. *Una nueva generación de bacterias malolácticas para vinos con pH elevado*. Enoviticultura, 2010. 6: p. 34-38.
189. Velázquez, J.B., Calo, P., Longo, E., Cansado, J., Sieiro, C. y Villa, T.G. *Effect of L-malate, D-glucose and L-lactate on malolactic fermentation and growth of Lactobacillus plantarum and Lactobacillus curvatus wild strains isolated from wine*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1991. 71: p. 363-366.
190. Bravo-Ferrada, B.M., Hall, G., Holmann, A., Delfederico, L., Valdés, D., Curilén, Y. y Caballero, A. *Caracterización y propiedades tecnológicas de aislamientos de Lactobacillus plantarum y Oenococcus oeni: selección de bacterias malolácticas autóctonas de la Patagonia Argentina*, En: XI Congreso Nacional de Investigación Enológica. Jerez de la Frontera. 2011.
191. Lucio, O., Ferrer, S., Krieger, S., Heras, J.M. y Pardo, I. *Selección de cepas del género Lactobacillus como cultivo iniciador de la fermentación maloláctica en vinos de baja acidez*, En: XI Congreso de Investigación Enológica. Jerez de la Frontera, 2011.
192. Délérís-Bou, M. y Krieger-Weber, S. *A new generation of liophilized preparations to manage the malolactic fermentation of wines with high pH*. 2009. Ed. Lallemand Inc. www.lallemandwine.com.

Bibliografía

193. Sieczkowsky, N. *Maîtrise et intérêt de la co-inoculation levures-bactéries*. Revue française d'oenologie, 2004. 207: p. 24-28.
194. Palacios, A., Krieger, S., Suárez, C. y Heras, J.M. *La fermentación maloláctica: objetivos y variables de control*. Curso de verano de viticultura y enología en la D.O Ribera del Duero, 2006. p. 45-54.
195. Franco, E. *Fermentación maloláctica con uvas y vinos de Aragón. Inducción en uvas con *Lactobacillus plantarum* y en vinos con *Leuconostoc oenos**. Vitivinicultura, 1992. 9-10: p. 54-57.
196. Masqué, M.C., Bordons, A. y Guardiola, S. *La fermentación maloláctica en vinos*. Ibérica, tecnología de alimentos, 1994. p. 92-96.
197. Prahl, C., Lonvaud-Funel, A., Korsgaard, E.M. y Joyeux, A. *Étude d'un nouveau procédé de déclenchement de la fermentation malolactique*. Connaissance de la Vigne et du Vin, 1988. 22(3): p. 197-207.
198. Theodore, D. *Los tipos de vino y el momento óptimo para la inoculación. Cómo controlar el proceso*, En: *Fermentación maloláctica*. 2006. Ed. Fundación para la cultura del vino: III Encuentro Enológico.
199. Comitini, F. y Ciani, M. *The inhibitory activity of wine yeast starter on malolactic bacteria*. Annals of Microbiology, 2007. 57(1): p. 61-66.
200. Costello, P.J., Henschke, P.A. y Markides, A.J. *Standardized methodology for testing malolactic bacteria and wine yeast compatibility*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2003. 9: p. 127-137.
201. Larsen, J.T., Nielsen, J.C., Kramp, B., Richelieu, M., Bjerring, P., Riisager, M.J., Arneborg, N., y Edwards, C.G. *Impact of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* on malolactic fermentations by *Oenococcus oeni**. American Journal of Enology and Viticulture, 2003. 54(4): p. 246-251.
202. Reguant, C., Carreté, R., Constantí, M. y Bordons, A. *Population dynamics of *Oenococcus oeni* strains in a new winery and the effect of SO₂ and yeast strain*. FEMS Microbiology Letters, 2005. 246(1): p. 111-117.
203. Vila, J., Rodríguez, J.M., Fernández, E. y Hernanz, M.C. *Strategies for the enhancement of malolactic fermentation in the new climate conditions*. Current Research Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 2010. p. 920-929.
204. Masqué, M.C., Romero, S.V., Rico, S., Elórduy, X., Puig, A., Capdevila, F., Suárez, C., Heras, J.M. y Palacios, A.T. *Coinoculación de levaduras y bacterias lácticas para la mejora organoléptica de los vinos y la reducción de la producción de aminos biogénos durante la fermentación maloláctica*. International Symposium Microbiology and Food Safety of Wine, 2007.

- 205.** Jussier, D., Dubé Morneau, A. y Mira de Orduña, R. *Effect of simultaneous inoculation with yeast and bacteria on fermentation kinetics and key wine parameters of cool-climate Chardonnay*. Applied Environmental Microbiology, 2006. 72(1): p. 221-227.
- 206.** López, R., Garijo, P., Gutierrez, A.R., Temorio, C., López, I. y Santamaría, P. *Experiencias de inoculación de bacterias lácticas en distintos momentos de la elaboración de vinos tintos de Rioja (España)*. XXX OIV World Congress, 2007.
- 207.** Fulcrand, H., Cheyner, V., Oszmiansky, J. y Moutounet, M. *An oxidized tartaric acid residue as a new bridge potentially competing with acetaldehyde in flavan-3-ol condensation*. Phytochemistry, 1997. 46: p. 223-227.
- 208.** Maury, C.H., Clark, A. y Scollary, G. *Determination of the impact of bottle colour and phenolic concentration on pigment development in white stored under external conditions*. Analytica Chimica Acta, 2010. 660: p. 81-86.
- 209.** Cheyner, V., Osse, C. y Rigaud, J. *Oxidation of grape juice phenolic compounds in model solutions*. Journal of Food Science, 1988. 53: p. 1729-1732.
- 210.** Curiel, J.A., Muñoz, R. y López de Felipe, F. *Lactobacillus plantarum y prevención del pardeamiento*. La Semana Vitivinícola, 2011. 3356: p. 2249-2255.
- 211.** Razmkhab, S., López, A., Ortega, J., Mayen, M., Mérida, J. y Medina, M. *Adsorption of phenolic compounds in white wines by yeasts and their cell walls*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2002. 50: p. 7432-7437.
- 212.** Morata, A., Gómez-Cordovés, M.C., Suberviola, L., Bartolomé, B., Colomo, B. y Suárez, J. *Adsorption of anthocianins by yeast cell wall during the fermentation of red wine*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2003. 51: p. 4084-4088.
- 213.** Mazauric, J.P. y Salmon, J.M. *Interactions between yeast lees and wine polyphenols during simulation of wine aging. I. Analysis of remnant polyphenolic compounds in the resulting wines*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2005. 53: p. 5647-5653.
- 214.** Mazauric, J.P. y Salmon, J.M. *Interactions between yeast lees and wine polyphenols during simulation of wine aging. II. Analysis of desorbed polyphenols compounds from yeast lees*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2006. 54: p. 3876-3881.
- 215.** Curiel, J.A., Muñoz, R. y López de Felipe, F. *Delaying effect of a wine Lactobacillus plantarum strain on the coloration and xanthylum pigment formation occurring in (+)-catechin and (-)-epicatechin wine model solutions*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2010. 58: p. 11318-11324.
- 216.** Mira de Orduña, R. *Climate change associated effects on grape and wine quality and production*. Food Research International, 2010. 43: p. 1844-1855.

Bibliografía

- 217.** Hidalgo, J. *Tecnología de elaboración y soluciones enológicas al aumento de pH en los vinos debido al potasio*, En: *II Encuentro Enológico de la Fundación para la cultura del vino*. Madrid, 2005
- 218.** Sigler, J. *In den Zeiten des Klimawandels: Von der Sübreserve zur Sauerreserve?* Der Badische Winzer, 2008. 33: p. 21-25.
- 219.** Petrie, P.R. y Sadras, V.O. *Advancement of grapevine maturity in Australia between 1993 and 2006: Putative causes, magnitude of trends and viticultural consequences*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2008. 14: p. 33-45.
- 220.** Ganichot, B.M. *Evolution de la date des vendanges dans les Côtes du Rhône*. Gemes Recontres Rhodaniennes. Ed. Institut Rhodanien. Orange, France, 2002. pp. 38-41.
- 221.** Adams, D.O. *Phenolics and ripening in grape berries*. American Journal of Enology and Viticulture, 2006. 57: p. 249-256.
- 222.** Coombe, B. *Influence of temperature on composition and quality of grapes*. Proceedings of the International symposium on grapevine canopy and vigor management. 1987. Vol. XXII IHC. Davis, USA. p. 23-25.
- 223.** Ollat, N., Diakou-Verdin, P., Carde, J.P., Barrieu, F., Gaudillere, J.P. y Moing, A. *Grape berry development: A Review*. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 2002. 36: p. 109-131.
- 224.** Winkler, A.J., Cook, J.A., Kliewer, W.M. y Lider, L.A. *General viticulture*. 1974. University of California Press, Los Angeles.
- 225.** Hale, C.R. *Relation between potassium and malate and tartrate contents of grape berries*. Vitis, 1977. **16**: p. 9-19.
- 226.** Williams, L.E. y Biscay, P.J. *Partitioning of dry-weight, nitrogen, and potassium in Cabernet Sauvignon grapevines from anthesis until harvest*. American Journal of Enology and Viticulture, 1991. **42**: p. 113-117.
- 227.** Buttrose, M.S., Hale, C.R. y Kliewer, W.M. *Effect of temperature on composition of Cabernet Sauvignon berries*. American Journal of Enology and Viticulture, 1971. 22: p. 71-75.
- 228.** Downey, M.O., Dokoozlian, N.K. y Krstic, M.P. *Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research*. American Journal of Enology and Viticulture, 2006. 57: p. 257-268.
- 229.** Belancic, A., Agosin, E., Ibacache, A., Bordeu, E., Bayumes, R. y Razungles, A. *Influence of sun exposure on the aromatic composition of Chilean Muscat grape cultivars Moscatel de Alejandria and Moscatel rosada*. American Journal of Enology and Viticulture, 1997. 48: p. 181-186.

- 230.** Reynolds, A.G. y Wardle, D.A. *Significance of viticultural and enological practices on monoterpene flavorants of British Columbia-grown Vitis Vinifera berries and juices*. Wein Wissenschaft, 1993. 48: p. 194-202.
- 231.** Blanchard, L., Darriet, P. y Dubourdieu, D. *Reactivity of 3-mercaptohexanol in red wine: Impact of oxygen, phenolic fractions, and sulfur dioxide*. American Journal of Enology and Viticulture, 2004. 55: p. 115-120.
- 232.** Coulter, A.D., Henschke, P.A., Simos, C.A. y Pretorius, I.S. *When the heat is on, yeast fermentation runs out of puff*. Australian and New Zealand Wine Industry Journal, 2008. 23: p. 26-30.
- 233.** Graca da Silveira, M., Vitoria San Romao, M., Loureiro-Dias, M.C., Rombouts, F.M. y Abee, T. *Flow cytometric assessment of membrane integrity of ethanol-stressed Oenococcus oeni cells*. Applied and Environmental Microbiology, 2002. 68(12): p. 6087-6093.
- 234.** Fugelsang, K.C., Edwards y Charles G. *Practical Applications and Procedures*. Wine Microbiology-Food Science Journals, books and Online Media. Springer, 2007. p. 396.
- 235.** Arvik, T. y Henick-Kling, T. *Brettanomyces bruxellensis occurrence, growth, and effect on wine flavor*. Practical Winery and Vineyard, 2002. p. 1-8.
- 236.** Couto, J.A., Campos, F.M., Figueiredo, A.R. y Hogg, T.A. *Ability of lactic acid bacteria to produce volatile phenols*. American Journal of Enology and Viticulture, 2006. 57: p. 166-171.
- 237.** Liu, S.-Q. y Piloni, G.J. *An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications*. International Journal of Food Science and Technology, 2000. 35: p. 49-61.
- 238.** Blesa, J., Soriano, J.M. y Manes, J. *Factors affecting the presence of ochratoxin A in wines*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2006. 46: p. 473-478.
- 239.** Boulton, R.b., Singleton, V.N., Bisson, L.F. y Kunkee, R.E. *Principles and practices of winemaking*. 1996. Ed. Chapman and Hall, New York.
- 240.** Ough, C.S. *Some effects of temperature and SO₂ on wine during simulated transport or storage*. American Journal Enology Viticulture, 1985. 36: p. 18-22.
- 241.** Ramey, D.D. y Ough, C.S. *Volatile ester hydrolysis or formation during storage of model solutions and wines*. Agricultural and Food Chemistry, 1980. 28: p. 928-934.
- 242.** Franco, E. *pH y equilibrio iónico en mostos y vinos. Su importancia y factores que influyen*. www.enologos.com. Boletín electrónico 2007-08-30.
- 243.** Moscoso, A. *Aplicaciones enológicas del ácido láctico*. La Semana Vitivinícola, 2011. 3353: p. 2239-2242.

Bibliografía

244. Dequin, S. y Barre, P. *Mixed lactic acid-alcoholic fermentation by Saccharomyces cerevisiae expressing the Lactobacillus casei L(+)-LDH*. Nature Biotechnology, 1994. 12: p. 173-177.
245. Dequin, S., Baptista, E. y Barre, P. *Acidification of grape musts by Saccharomyces cerevisiae wine yeast strains genetically engineered to produce lactic acid*. American Journal of Enology and Viticulture, 1999. 50(1): p. 45-50.
246. Uthurry, C.A., Navascués López-Cordón, E., González, U. y Suarez Lepe, J.A. *Levaduras aptas para acidificación biológica de mostos de zonas cálidas*. XI Congreso Nacional de Enólogos, 2005.
247. Val, P., Ferrer, S. y Pardo, I. *Acidificación biológica de vinos con bajo contenido en ácidos*. Enólogos, 2002. 20: p. 35-42.
248. Herranz, M.D. Talanta, 1999. 50: p. 413.
249. Cocito, C., Gaetano, G. y Delfini, C. *Rapid extraction of aroma compounds in must and wine by means of ultrasounds*. Food Chemistry, 1995. 52: p. 311-320.
250. Rodas, A.M., Ferrer, S. y Pardo, I. *16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine*. Systematic and Applied Microbiology, 2003. 26(3): p. 412-422.
251. Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M. y Böttger, E.C. *Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA*. Nucleic Acids Research, 1989. 17(19): p. 7843-7853.
252. Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª Edición*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York., 1989.
253. Cocconcelli, P.S., Porro, D., Galandini, S. y Senini, L. *Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci*. Letters in applied microbiology, 1995. 21: p. 376-379.
254. Rodas, A.M., Ferrer, S. y Pardo, I. *Polyphasic study of wine Lactobacillus strains: taxonomic implications*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005. 55(1): p. 197-207.
255. Peña-Gallego, A., Hernández-Orte, P., Cacho, J. y Ferreira, V. *Biogenic amine determination in wines using solid-phase extraction: A comparative study*. Journal of Chromatography A, 2009. 1216(15): p. 3398-3401.
256. Condon, S. *Responses of lactic acid bacteria to oxygen*. FEMS Microbiology Reviews, 1987. 46: p. 269-280.
257. Rodas, A., Chenoll, E., Macian, M., Ferrer, S., Pardo, I. y Aznar, R. *Lactobacillus vini sp. nov., a wine lactic acid bacterium homofermentative for pentoses*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006. 56: p. 513-517.

258. Dellaglio, F., de Roissart, H., Torriani, S., Curk, M.C. y Janssens, D. *Caractéristiques générales des bactéries lactiques*. En: *Bactéries Lactiques*. Vol I. 1994. Ed. de Roissart, H. y Luquet, F. M. Lorica, Uriage, France. p. 25-116.
259. Arena, M., Fiocco, D., Manca de Nadra, M., Pardo, I. y Spano, G. *Characterization of a Lactobacillus plantarum strain able to produce tyramine and partial cloning of a putative Tyrosine Decarboxylase Gene*. *Current Microbiology*, 2007. 55(3): p. 205-210.
260. Krieger, S. y Arnink, K. *Malolactic fermentation - A review of recent research on timing of inoculation and possible yeast-bacteria combinations*. 32nd Annual New York Wine Industry Workshop, 2003.
261. Murphy, M.G., O'Connor, L. y Condon, S. *Oxygen dependent lactate utilization by Lactobacillus plantarum*. *Archives of Microbiology*, 1985. 141: p. 75-79.
262. Su, J., Wang, T., Wang, Y., Li, Y.-Y. y Li, H. *The use of lactic acid-producing, malic acid-producing, or malic acid-degrading yeast strains for acidity adjustment in the wine industry*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014. 98(6): p. 2395-2413.
263. Gatti, M., Bernini, V., Lazzi, C. y Neviani, E. *Fluorescence microscopy for studying the viability of micro-organisms in natural whey starters*. *Letters in Applied Microbiology*, 2006. 42: p. 338-343.
264. Kunji, E.R., Ubbink, T., Matin, A., Poolman, B. y Konings, W.N. *Physiological responses of Lactococcus lactis ML3 to alternating conditions of growth and starvation*. *Archives of Microbiology*, 1993. 159: p. 372-379.
265. Calderón, F., Navascués, E., Varela, F., González, M.C. y Colomo, B. *Selección de levaduras autóctonas productoras de ácido málico para la acidificación de vinos*. *Semana Vitivinícola*, 1999. 2759: p. 2158-2163.
266. Benavent, Y., Berbegal, C., Lucio, O., Pardo, I. y Ferrer, S. *Isolation of a Staphylococcus epidermidis strain producing histamine in red wine after malolactic fermentation*. V International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. BiomicroWorld 2013, Madrid.
267. Wang, X., Gong, C.S. y Tsao, G.T. *Production of L-malic acid via biocatalysis employing wild-type and respiratory-deficient yeasts*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1998. 70-72: p. 845-852.
268. Taing, O. y Taing, K. *Production of malic acid and succinic acids by sugar-tolerant yeast Zygosaccharomyces rouxii*. *European Food Research and Technology*, 2007. 224: p. 343-347.
269. Coloretti, F., Zambonelli, C., Castellari, L., Tini, V. y Rainieri, S. *The effect of DL-malic acid on the metabolism of L-malic acid during wine alcoholic fermentation*. *Food Technology and Biotechnology*, 2002. 40(4): p. 317-320.

Bibliografía

- 270.** Presecki, A.V. y Vasic-Racki, D. *Production of L-malic acid by permeabilized cells of commercial Saccharomyces sp. strains*. Biotechnology Letters, 2005. 27: p. 1835-1839.
- 271.** Kapsopoulou, K., Kapaklis, A. y Spyropoulos, H. *Growth and fermentation characteristics of a strain of the wine yeast Kluyveromyces thermotolerans isolated in Greece*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005. 21: p. 1599-1602.
- 272.** Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I. y Dubourdieu, D. *Impact of mixed Torulaspora delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae culture on high-sugar fermentation*. International Journal of Food Microbiology, 2008. 122: p. 312-320.
- 273.** Ciani, M., Beco, L. y Comitini, F. *Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations*. International Journal of Food Microbiology, 2006. 108: p. 123-133.
- 274.** Fleet, G.H. *Wine yeasts for the future*. FEMS Yeast Research, 2008. 8(7): p. 979-995.