

ESTUDIO DE BIODIVERSIDAD Y SELECCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS EN VINOS TINTOS DE RIOJA

Carmen Tenorio¹, Isabel López¹, Rosa López¹, Pilar Santamaría¹, Patrocinio Garijo¹, Ana Rosa Gutierrez²

¹ Centro de Investigación y Desarrollo Agrario de la Rioja (CIDA). Ctra. Mendavia-Logroño Km 88 NA 134. Tf: 941291383. microbiologia.cida@larioja.org

² Departamento de Agricultura y Alimentación. Universidad de La Rioja. Madre de Dios 51 26006

Resumen:

Con el objetivo de llevar a cabo una selección de bacterias lácticas para la elaboración de vinos tintos en la D. O. Ca. Rioja, se han elegido 7 bodegas distribuidas en las tres subzonas de la denominación (Rioja Alta, Rioja Baja y Rioja Alavesa), en las que nunca se han utilizado inóculos comerciales de BL. Se ha seleccionado un depósito de cada bodega y se han tomado muestras en distintos momentos de la fermentación maloláctica: fin de fermentación alcohólica, plena FML y fin de FML. De cada muestra, se ha efectuado el recuento y aislamiento de 15 colonias de BL elegidas al azar para posteriormente llevar a cabo su identificación a nivel de especie y clon, mediante las técnicas de microbiología clásicas y biología molecular (PCR, PFGE).

Palabras clave: Bacterias lácticas, fermentación maloláctica espontánea.

1. INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente, la fermentación maloláctica (FML) se ha llevado a cabo por la flora espontánea de bacterias que acompaña a la uva y al vino, pero en ocasiones el proceso no se lleva a cabo, o no se hace en el momento adecuado, ni en óptimas condiciones, ya que son muchos los factores que influyen en el crecimiento y el desarrollo de las bacterias lácticas (BL) del vino. Desde hace años, existen numerosos trabajos acerca de un mejor control del proceso mediante la utilización de cultivos iniciadores seleccionados, para asegurar el completo desarrollo de la FML y controlar la calidad de los productos secundarios formados.

En la campaña de 2006 se ha iniciado un trabajo de selección de BL autóctonas de Rioja para la elaboración de vinos tintos. Es necesario disponer de estos cultivos, ya que además de mantener mejor la tipicidad de los vinos, la implantación, a veces problemática, mejora cuando se utilizan bacterias seleccionadas en el lugar de origen y adaptadas a las características del vino a sembrar.

Para desarrollar este trabajo, se han aislado en la campaña de 2006 bacterias en fermentaciones malolácticas espontáneas en 7 bodegas de Rioja. La identificación de estos aislamientos ha permitido estudiar la diversidad de cepas que han participado en ellas.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se han elegido 7 bodegas repartidas en las tres subzonas de la D.O. Ca. Rioja (Rioja Alta, Rioja Baja y Rioja Alavesa), en las que "nunca" se han utilizado inóculos comerciales de BL. Se seleccionó un depósito de cada bodega y se tomaron muestras en distintos momentos: fin de fermentación alcohólica (FA), plena (degradación del 60% del ácido málico) y fin de FML.

En todos los vinos se analizaron los parámetros químicos (pH, ° alcohólico (% v/v), ácido málico, ácido láctico,

acidez volátil y el color [intensidad de color (IC) e Índice de polifenoles totales (IPT).

El desarrollo de la FML se controló midiendo la degradación de ácido málico mediante test enzimático. De los distintos momentos elegidos, se tomó la muestra en frascos estériles y fue transportada al laboratorio para ser procesada. Las muestras fueron sembradas en el medio selectivo adecuado para el crecimiento de BL (MRS agar modificado) al que se le añadió pimaricina para inhibir el crecimiento de levaduras y azida sódica para inhibir el crecimiento de bacterias acéticas. Se efectuó el recuento y se aislaron 15 colonias de BL elegidas al azar para posteriormente llevar a cabo su identificación a nivel de especie y clon.

Para la identificación a nivel de especie se han utilizado técnicas de microbiología clásicas (tinción de gram, catalasa, API 50 CHL...) [3] [4] y biología molecular PCR específica de especie [1] [5]. Para llegar a nivel de clon, a todos los aislados se les ha sometido a la técnica de electroforesis por campos pulsantes (PFGE) [2] obteniendo así los distintos clones que han intervenido en la FML.

3. RESULTADOS

Los resultados analíticos de los vinos antes y después de la FML (Tabla 1), mostraron que en general los vinos tuvieron elevados pH y contenidos de ácido málico acordes con la variedad tempranillo. La acidez volátil, como es de esperar, aumentó durante la degradación maloláctica, siendo más apreciable en los vinos 4 y 7. La disminución de la intensidad de color varió en función de las bodegas y es de destacar que fue menor para los vinos en los que la FML fue más larga (Tabla 2).

De todos los muestreos realizados, se han obtenido un total de 271 aislados, que han sido identificados siguiendo la metodología descrita anteriormente. Los recuentos obtenidos de BL para cada bodega y en cada momento del muestreo efectuado, así como las identificaciones quedan reflejados en la Tabla 2:



Tabla 1a. Datos analíticos obtenidos en cada bodega antes y después de la FML.

BODEGA	1		2		3		4	
	Fin FA	Fin FML	Fin FA	Fin FML	Fin FA	Fin FML	Fin FA	Fin FML
^o OH	14,7	13,3	13,3	14,0	14,0	13,7	13,7	13,3
pH	3,76	3,88	3,74	3,83	3,59	3,87	3,89	3,83
Ac. Málico (g/l)	1,84	0,02	2,29	1,04	1,86	0,36	2,87	0,26
Ac. Láctico (g/l)	0,46	1,27	0,47	1,81	0,28	0,81	0,26	2,14
Acidez volátil (g/l acético)	0,36	0,46	0,28	0,46	0,56	0,56	0,39	0,81
IC	19,7	15,6	11,3	8,73	24,3	29,9	21,3	15,7
IFT	73,6	71,7	82,3	90,2	86,4	83,9	71,9	64,6

Tabla 1b. Datos analíticos obtenidos en cada bodega antes y después de la FML.

BODEGA	5		6		7	
	Fin FA	Fin FML	Fin FA	Fin FML	Fin FA	Fin FML
^o OH	13,6	13,5	13,5	14,2	14,2	13,9
pH	3,61	3,72	3,42	3,55	3,82	3,89
Ac. Málico (g/l)	2,38	0,66	2,30	0,36	2,44	0,87
Ac. Láctico (g/l)	0,27	1,84	0,22	2,89	0,32	1,81
Acidez volátil (g/l acético)	0,15	0,37	0,36	0,52	0,41	0,60
IC	16,6	18	18,9	18,3	13,3	17
IFT	65,9	64,1	58,7	57,6	68,2	57,9

Tabla 2. Resultados obtenidos en las bodegas muestreadas durante la FML: Bacterias viables (UFC/ml) y especies presentes (%) en distintos momentos de la FML.

Momentos	Fin FA	Plena FML	Fin FML	Duración de la FML
BODEGA 1				
Recuento (UFC/ml)	5.0 x 10 ⁵	2.4 x 10 ⁷	5.2 x 10 ⁷	10 Días
Especies encontradas	<i>O.oeni</i> 86 % <i>Lb.acidophilus</i> 14%	<i>O.oeni</i> 100 %	<i>O.oeni</i> 100 %	
BODEGA 2				
Recuento (UFC/ml)	5.0 x 10 ⁴	3.5 x 10 ⁷	8.8 x 10 ⁷	7 Días
Especies encontradas	<i>O.oeni</i> 100 %	<i>O.oeni</i> 100 %	<i>O.oeni</i> 100 %	
BODEGA 3				
Recuento (UFC/ml)	3.0 x 10 ¹	4.0 x 10 ⁴	1.47 x 10 ⁷	112 Días
Especies encontradas	<i>L.plantarum</i> 100%	<i>O.oeni</i> 100 %	<i>O.oeni</i> 100 %	
BODEGA 4				
Recuento (UFC/ml)	3.5 x 10 ³	4.85 x 10 ⁷	3.35 x 10 ⁷	19 Días
Especies encontradas	<i>O.oeni</i> 100 %	<i>O.oeni</i> 100 %	<i>O.oeni</i> 100 %	
BODEGA 5				
Recuento (UFC/ml)	6.38 x 10 ⁴		3.6 x 10 ⁷	11 Días
Especies encontradas	<i>O.oeni</i> 100 %		<i>O.oeni</i> 100 %	
BODEGA 6				
Recuento (UFC/ml)	4.2 x 10 ⁷	1.07 x 10 ⁷	3.35 x 10 ⁷	77 Días
Especies encontradas	<i>O.oeni</i> 87 % <i>Lactobacillus</i> sp. 13	<i>O.oeni</i> 100 %	<i>O.oeni</i> 100 %	
BODEGA 7				
Recuento (UFC/ml)	2.4 x 10 ²	3.5 x 10 ⁶	1.56 x 10 ⁷	26 Días
Especies encontradas	<i>O.oeni</i> 100 %	<i>O.oeni</i> 100 %	<i>O.oeni</i> 100 %	

El recuento de las colonias de BL aisladas al final de la FA, mostró que en función de las bodegas, su nº oscilaba entre 1 y 5 unidades logarítmicas. Los mayores recuentos se obtuvieron en los vinos en los que en este momento se había degradado parte del ácido málico (1 y 2), ya que se detectó cierta concentración de ácido láctico (Tabla 1). Esta situación no implicó necesariamente una mayor formación de acidez volátil, pero sugiere cierta superposición entre la FA y la FML.

A excepción de la bodega 3, la especie dominante en los vinos al final de la FA fue *O. oeni*.

En el momento de máxima degradación de ácido málico, en 4 de las bodegas se obtuvieron recuentos del orden de 10⁷ UFC/ml. En la bodega 3 fue mucho menor, lo que dio origen a una FML muy larga (112 días), que no se tradujo en una mayor producción de acidez volátil, y que además dio lugar al menor porcentaje de disminución de la IC durante la transformación maloláctica.

Al final de la FML, la población de BL fue muy elevada en todas las bodegas, con lo que se comprueba la necesidad de estabilización temprana de los vinos para evitar consecuencias desagradables por parte de las bacterias que ya han degradado todo el ácido málico y podrían degradar otros componentes del vino.

La diversidad clonal de *O. oeni* varió en función de la bodega (Tabla 3), destacando la bodega 1 por ser en la que menor diversidad se encontró y la bodega 2 por la que más.

En general, fue baja en los vinos al final de FA y se aumento considerablemente durante el proceso fermentativo cambiando además los clones a medida que la FML evoluciona.

Tabla 3. Clones de *O. oeni* encontrados en las distintas bodegas.

BODEGAS	Nº DE CLONES			
	Fin FA	Plena	Fin FML	Total
1	2	2	4	5
2	4	10	10	24
3	0	7	3	10
4	1	3	7	9
5	6	-	10	13
6	4	4	6	12
7	-	5	7	12

4. CONCLUSIONES

La cepa predominante en todas las fermentaciones fue *Oenococcus oeni*. Al estudiar la diversidad clonal en cada momento de muestreo de las cepas de *Oenococcus* encontradas, se ha observado una mayor diversidad al fin de la FML

5. BIBLIOGRAFÍA

1. BENEDEUCE, L., SPANO, G., VERNILE, A., TARANTINO, D. AND MASSA, S. 2004. **Molecular characterization of lactic acid populations associated with wine spoilage.** *J. Basic Microbiol.* 44 (1): 10-16.
2. BIRREN, B. AND E. LAI. 1993. **Preparation of DNA for pulsed field analysis.** In **Pulsed field electrophoresis. A practical guide.** Academic Press, Inc. San Diego, Ca.
3. HOLT, J. G., N. R. KRIEG, P. H. A. SNEATH, J. T. STALEY AND S. T. WILLIAMS. 2000. **Bergey's manual of determinative bacteriology.** W. R. Hensyl (ed.), 9th ed., *Williams and Wilkins, Baltimore, Md.*
4. HOLT, J. G., N. R. KRIEG, P. H. A. SNEATH, J. T. STALEY AND S. T. WILLIAMS. 1994. In: **Bergey's manual of determinative bacteriology** (9th ed.) Hensyl, W. R. (Ed.), *Williams and Wilkins, Baltimore, Md.*
5. ZAPPAROLI, G., TORRIANI, S., PESENTE, P. AND DELLAGLIO, F. 1998. **Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine.** *Lett. Appl. Microbiol.* 27 (5): 243-246.