ZUBÍA Monográfico	7	119-126	Logroño	1995

FLORA LÁCTICA IMPLICADA EN LAS VINIFICACIONES DEL RIOJA-94: EVOLUCIÓN Y CARACTERIZACIÓN*

Julio Sáenz Fernández**
Carmen Torres Manrique**
Ana Rosa Gutiérrez Viguera**
Carmen Tenorio Rodríguez**
Susana Sanz Cervera**

RESUMEN

Las bacterias lácticas son importantes en vinificación, ya que son las responsables de la fermentación maloláctica. Se han estudiado los cambios producidos en la microflora durante el período de maduración de la uva y diferentes etapas de la vinificación en tres zonas de La Rioja. Las bacterias lácticas fueron prácticamente inexistentes durante la maduración de la uva y la fermentación alcohólica. Por su parte las levaduras alcanzaron poblaciones superiores a 10^9 UFC/mL (unidades formadoras de colonias/mL) durante esta última etapa. Sin embargo las bacterias lácticas empezaron a elevar su población una vez finalizada la fermentación alcohólica, siendo Lactobacillus plantarum *y* Leuconostoc mesenteroides *las especies mas abundantes.*

Palabras clave: bacterias lácticas, maduración, vinificación.

Lactic acid bacteria are important microorganisms in winemaking because they are responsible for malolactic fermentation. Changes in microflora during grape ripening and different winemaking periods have been studied in three areas of La Rioja. Lactic acid bacteria were practically nil during veraison and alcoholic fermentation, but levures reached levels greater than 10^9 CFU/mL during this fermentation. However, lactic acid bacteria began to rise their population when alcoholic fermentation was finished. Lactobacillus plantarum *and* Leuconostoc mesenteroides *were the most common lactic acid bacteria founded.*

Key words: lactic acid bacteria, grape ripening, winemaking

* Recibido el 19 de diciembre de 1994. Aprobado el 10 de marzo.
Este trabajo ha contado con una Ayuda concedida por el Instituto de Estudios Riojanos, en su convocatoria de 1994.

** Departamento de Agricultura y Alimentación. Universidad de La Rioja.

0. INTRODUCCIÓN

La principal transformación que sufren los mostos en su evolución a vino, es la fermentación alcohólica llevada a cabo por la acción de levaduras. Sin embargo, no son estos los únicos microorganismos que intervienen en la obtención de vinos de calidad. En especial en los vinos tintos que proceden de regiones frías, donde la maduración de la uva no es completa, su acidez se ve amortiguada mediante una segunda fermentación a la que se denomina fermentación maloláctica llevada a cabo por las bacterias lácticas. En esta segunda fermentación se produce el paso de ácido málico (dicarboxílico) a ácido láctico (monocarboxílico) con la consiguiente disminución en acidez total. La fermentación maloláctica puede emplearse como un método natural de reducción de la acidez del vino y por ello se considera generalmente deseable y es estimulada en regiones productoras de uvas ácidas (Beelman y Gallander, 1979). Este proceso va acompañado de una serie de reacciones secundarias que, convenientemente controladas redundan en un vino estable, con una notable mejora de sus características organolépticas (Rankine, 1972).

Durante el proceso de la fermentación alcohólica existe una competencia entre levaduras y bacterias lácticas por los nutrientes del mosto, viéndose afectada esta competencia por la evolución de los distintos parámetros fisco-químicos a lo largo de la fermentación alcohólica (García *et al.*, 1992; Lonvoud-Funel *et al.*, 1988).

El estudio de las bacterias lácticas presenta ciertas dificultades y, de hecho, en la bibliografía existen discrepancias en cuanto al método microbiológico más adecuado para aislarlas a partir del vino (Benkerroum *et al.*, 1993; Casas Asín *et al.*, 1991; Masqué, 1991).

La fermentación maloláctica no es completamente deseable o indeseable en términos absolutos. Su favorecimiento o inhibición dependerá del mosto de partida, de la cepa, de las condiciones ambientales y sobre todo, del tipo de vino que se pretenda conseguir. En general la inhibición de este proceso es relativamente sencilla si se toman las medidas higiénicas convenientes como pueden ser un sulfitado adecuado, un menor contacto del mosto con las lías, etc. De hecho ésta es la práctica más extendida en las vinificaciones de Rioja, zona en la que hasta el momento la presencia de bacterias lácticas en vino era contemplada como un posible factor de alteración y no como un agente estabilizador potencial, cuya acción controlada conllevaría una mejora de las características organolépticas del vino. Sin embargo, aunque esta inhibición puede ser de gran interés en la producción de determinados tipos de vino, la impredicibilidad de una fermentación maloláctica espontánea ha llevado a numerosos investigadores al estudio de los mecanismos de control de la misma, así como las condiciones en las cuales se obtenga una fermentación maloláctica limpia. Hoy en día, la tendencia en enología es la de permitir o incluso favorecer la realización de la fermentación maloláctica controlada con objeto de conseguir la estabilización del vino. Resulta pues de gran interés el estudio de este proceso en las condiciones de vinificación de La Rioja y de los microorganismos implicados en el mismo. En este trabajo se presentan los resultados iniciales obtenidos en el estudio de la evolución de la población microbiana (levaduras y bacterias lácticas) durante el proceso de vinificación habitual en Rioja.

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Toma de muestra

a) Maduración de la uva: Se eligieron 3 parcelas de viña representativas de diferentes subzonas en La Rioja, Aldeanueva de Ebro, Villalba de Rioja y Agoncillo (finca Valde-

gón). La variedad de uva en todos los casos fue Tempranillo. Las tomas de muestra se realizaron semanalmente a partir del envero hasta la vendimia.

b) Fermentación alcohólica (Fase I): Las uvas procedentes de la vendimia de las parcelas citadas se vinificaron independientemente en depósitos de 500 litros en la bodega experimental del C.I.A. Durante este período se realizaron 3 tomas de muestra: a las 24 horas de uncubado, en fermentación tumultuosa y al final de la fermentación.

c) Vino (Fase II): Una vez descubado el vino, se siguieron tomando muestras semanalmente hasta que fue sulfitado y almacenado.

1.2. Procesamiento de las muestras

Las muestras de uvas fueron procesadas de la siguiente manera: 25 uvas fueron maceradas en 100 mL de solución salina estéril durante 24 horas y posteriormente se centrifugaron 25 mL de dicha solución, sembrándose el precipitado en los medios cloranfenicol-glucosa-agar (CGA) (BioKar Diagnostic) con difenilo para el recuento de levaduras y en los medios MRS-agar (BioMérieux) y MSE-agar (BioKar Diagnostic) suplementados con nistatina (25 µg/mL) para el aislamiento e identificación de bacterias lácticas. La incubación de los medios MRS y MSE se realizó a 35°C durante 48 horas en microaerofilia.

Las muestras de mosto y vino fueron procesadas asimismo para el recuento de levaduras en medio CGA. Para el recuento e identificación de bacterias lácticas, las muestras fueron sometidas a una primera centrifugación (1.000 rpm, 3 minutos) con objeto de eliminar levaduras, y posteriormente a una segunda centrifugación (3.000 rpm, 5 minutos) para recoger las posibles bacterias presentes en la muestra, las cuales fueron sembradas en los medios MRS-agar y MSE-agar como se comentó anteriormente.

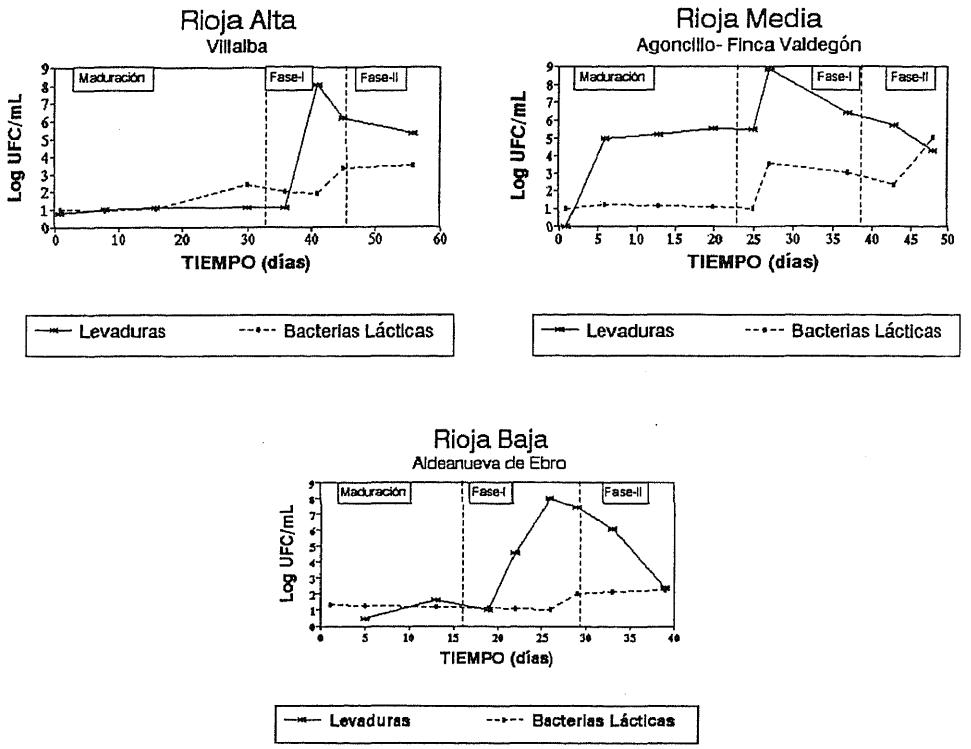
1.3. Identificación de bacterias lácticas

Las colonias aisladas en los medios MRS-agar y MSE-agar fueron sometidas a identificación bioquímica a través de las pruebas recomendadas por distintos autores (Facklam *et al.*, 1989; Mackey *et al.*, 1993) entre las que se incluyen: gram, oxidasa, catalasa, PYR, desaminación de la arginina, hidrólisis de bilis/esculina, crecimiento en 6,5% de ClNa y a diferentes temperaturas, resistencia a vancomicina y teicoplanina, producción de gas a partir de glucosa, así como la fermentación de distintos azúcares a través del sistema de identificación API 50 CH (BioMérieux), y API 20 STREP (BioMérieux) en el caso del género *Enterococcus*.

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

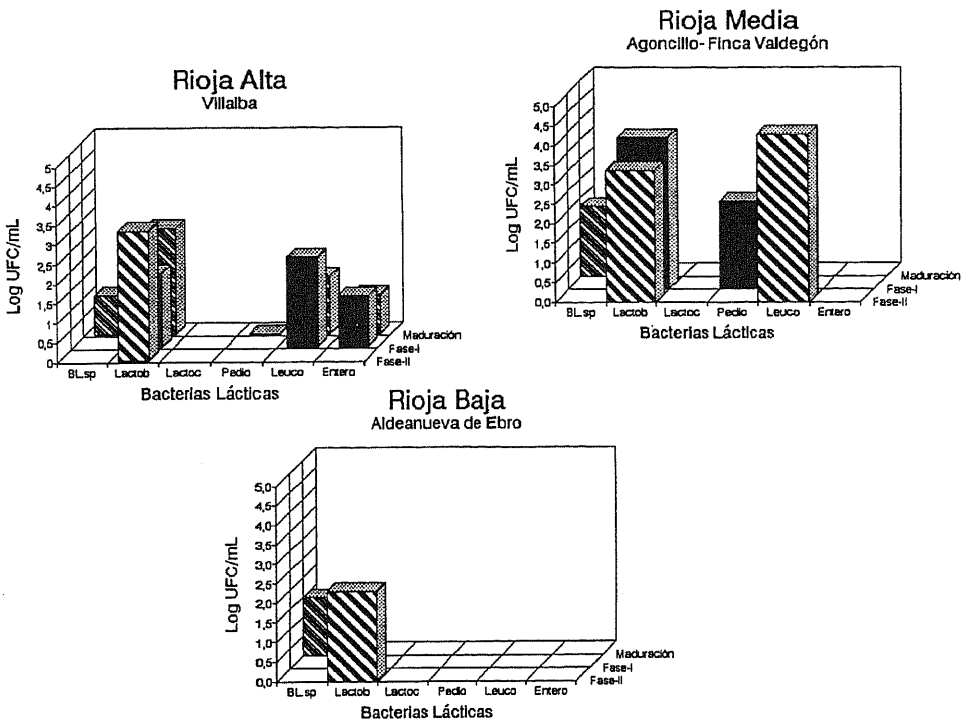
La Figura I muestra la evolución de los dos tipos de microorganismos que intervienen durante la vinificación. Puede observarse que para las tres vinificaciones seguidas, las levaduras se mantuvieron en poblaciones relativamente estables durante el período de maduración, experimentando un gran aumento durante la primera fase de vinificación que coincidió con la fermentación alcohólica. Posteriormente experimentaron un paulatino descenso durante la segunda fase de vinificacion, una vez consumidos la mayor parte de los azúcares presentes en el mosto. Esta evolución de la población de levaduras ha sido descrita por distintos autores (Ribereau-Gayon, 1985). Las diferencias en la evolución de levaduras observadas en las tres zonas estudiadas pueden ser atribuidas a las condiciones ecológicas del cultivo de la viña (Delteil, 1990; Ferreira y Bison, 1992; Guerzoni *et al.*, 1989).

Figura I: Evolución de las poblaciones de levaduras y bacterias lácticas durante las vinificaciones estudiadas en las tres zonas de muestreo.



Con respecto a las bacterias lácticas, su escasa población apenas aumentó durante el período de maduración de la uva (10 UFC/mL) observándose un ligero incremento durante la primera fase de vinificación, incremento que se acentuó durante la segunda fase. Según los distintos autores (Wibowo *et al.*, 1985; Vallart *et al.*, 1992), la fermentación maloláctica comienza cuando la población de bacterias lácticas alcanza un valor de 10^6 UFC/mL. En las tres vinificaciones estudiadas, este nivel no se alcanzó, no pudiendose afirmar por tanto, que la fermentación maloláctica se hubiese iniciado. Sin embargo, es clara la tendencia creciente de la población de bacterias lacticas que es indicativa de la evolución natural hacia la realización natural de dicha transformación microbiológica, que fue inhibida en estos casos por la corrección del nivel de sulfuroso para el almacenamiento de los vinos y por la baja temperatura reinante en las bodegas en las fechas en que finalizaron las fermentaciones alcohólicas (García *et al.*, 1992).

Figura II: Evolución de los diferentes géneros de bacterias lácticas durante las vinificaciones estudiadas en las tres zonas de muestreo:
Lactob: Lactobacillus; Lactoc: Lactococcus; Pedio: Pediococcus; Leuco: Leuconostoc; Entero: Enterococcus.



En lo referente a los distintos géneros de bacterias lácticas presentes en los procesos de vinificación estudiados (Figura II), se puede observar cómo en Villalba, la población claramente predominante durante la maduración de las uvas fueron los *Lactobacillus*, aunque también se aislaron minoritariamente *Pediococcus* y *Leuconostoc*. La misma tendencia se encontró en muestras procedentes de Cenicero (datos no mostrados). En Agoncillo (Valdegón), la reducida flora láctica aislada fue identificada predominantemente dentro del género *Lactococcus*. Sin embargo, en el muestreo llevado a cabo en Aldeanueva la escasa población de bacterias lácticas encontradas no pudo ser identificada como ninguno de estos géneros.

Durante la Fase I, coincidente con la fermentación alcohólica, el género predominante en Agoncillo fue *Lactobacillus* que no había sido aislado durante la maduración, apareciendo *Pediococcus* como género minoritario. Sin embargo, durante la fermentación alcohólica de los mostos de Villalba, *Lactobacillus* se mostró como género secundario pre-

dominando el género *Leuconostoc*. En esta vinificación, resulta destacable el aislamiento del género *Enterococcus* teniendo en cuenta el grado alcohólico que se alcanza en esta etapa. En el estudio de la población láctica en la Fase I de la vinificación seguida en Aldeanueva, la flora contaminante (perteneciente al género *Bacillus*) impidió el estudio de la posible flora láctica.

Es la Fase II, en la que es apreciable un aumento de la población láctica, la etapa en la que se imponen los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* como principales responsables de la fermentación maloláctica espontánea. Así en Agoncillo es el género *Leuconostoc* el que adquiere una mayor preponderancia seguido de *Lactobacillus*. Tanto en Aldeanueva como en Villalba, son las bacterias del género *Lactobacillus* las aisladas de forma mayoritaria en esta fase.

La Tabla 1 recoge las distintas especies identificadas en cada etapa de las vinificaciones estudiadas. Resulta destacable la presencia de la especie *Lactobacillus plantarum* en la Fase II del estudio siendo en los casos de Aldeanueva y Villalba la única especie aislada; asimismo, también fue aislada en Agoncillo en esta misma etapa, si bien en este caso acompañada de *Leuconostoc mesenteroides*. Estos resultados coinciden con los obtenidos en vinos de Jerez por Casas *et al.* (1991), donde el 62% de las bacterias aisladas pertenecen al género *Lactobacillus,* representando *Lactobacillus plantarum* el 50%. Por otro lado en vinificaciones con uva de la variedad Tempranillo realizadas en Navarra y Rioja, Suarez *et al.* (1994) señalan a *L. plantarum* y *Leuconostoc dextranicum* como especies mayoritarias.

Tabla 1: Especies de bacterias lácticas aisladas durante las tres vinificaciones estudiadas

	Aldeanueva			Valdegón			Villalba			Cenicero		
Cepa aislada	U	I	II	U	I	II	U	I	II	U	I	II
Lactobacillus plantarum			*		*	*	*	*	*	*		
Lactobacillus brevis					*							
Lactobacillus sp							*			*		
Lactococcus lactis				*						*		
Pediococcus pentosauceus					*		*					
Leuconostoc mesenteroides						*		*				
Leuconostoc lactis							*					
Enterococcus faecalis								*				
Enterococcus faecium							*					

U: Aisladas en uvas durante el proceso de maduración; I: Aisladas durante la Fase I de la vinificación; II: Aisladas durante la Fase II de la vinificación (ver texto)

Ninguna de estas especies, a excepción de *Lactobacillus plantarum* aislado durante la maduración en Villalba, fue encontrada en las etapas previas, al inicio de la fermentación maloláctica, hecho que podría explicarse como una contaminación en la propia bodega (Wibowo *et al.*, 1985).

Hay autores que consideran la conveniencia de utilizar bacterias lácticas autóctonas, previamente seleccionadas, para la realización de la fermentación maloláctica de un determinado vino, frente a la utilización de cepas comerciales ampliamente difundidas y que tienden hacia la homogeneización de características en los distintos vinos frente a la tendencia actual de la singularización y la calidad. En la actualidad, la inoculación en vinos se realiza con cepas comerciales pertenecientes principalmente a la especie *Leuconostoc oe-*

nos (Avedovech *et al.*, 1992). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo apuntan hacia cepas del género *Lactobacillus* como mayoritarias en la fermentación maloláctica espontánea en la D.O.C. Rioja, mientras que *L. oenos* ni siquiera ha sido aislada en las vinificaciones estudiadas. Todo ello indica la necesidad de seleccionar cepas de bacterias lácticas autóctonas adaptadas a las características de vinificación de nuestra zona para el mantenimiento de la tipicidad propia de los vinos de Rioja.

Así pues, desde el punto de vista microbiológico, las vinificaciones de Rioja en sus tres subzonas siguen una tendencia natural hacia la realización de la fermentación maloláctica. Si bien esta fermentación ha sido momentáneamente inhibida en los casos estudiados mediante la adición de antisépticos, sería deseable el seguimiento de la evolución microbiana natural para conocer como afecta a las características organolépticas y físico-químicas de los vinos producidos en nuestra zona.

3. BIBLIOGRAFÍA

AVEDOVECH, R., McDANIEL, M., WATSON, B. y SANDINE, W. (1992). An evaluation of combinations of wine yeast and *Leuconostoc oenos* strains in malolactic fermentation of Chardonnay wine. Am. J. Enol. Vitic. 43, 253-260.

BEELMAN, R.B. y GALLANDER, J.F. (1979). Wine deacidification. Adv. Food Res. 25, 1-44.

BENKERROUM, N., MISBAH, M., SANDINE, W.E. y TANTAQUI ELARAKI, A. (1993). Devolpment and use of a selective medium for isolation of *Leuconostoc* spp. from vegetables and dairy products. Appl. Environ. Microbiol. 59, 607-609.

CASAS ASÍN, J.A., ARNEDO RODRÍGUEZ, J. y GARCÍA MÁIQUEZ, E. (1991). Las bacterias lácticas en los vinos de Jerez. Vitivinicultura.7, 32-36.

DELTEIL, D. (1990). Le levurage en oenologie. Institut Cooperatif du vin. Doc. 6/90

FACKLAN, R., HOLLIS, D. y COLLINS, M.D. (1989). Identification of gram-positive coccal and coccobacillary vancomycin-resistant bacteria. J. Clin. Microbiol. 27, 724-730.

FERREIRA, F. y BISSON, L.F. (1992). Nitrogen suplementation of grape juice. I. Effect on amino acid utilization during fermentation. Am. J. Enol. Vitic. 43 (1), 1-10.

GARCÍA, M.J., ZÚÑIGA, M. y URUBURU, F. (1992). Revision: el metabolismo y el control de las bacterias lácticas en vino. Rev. Esp. Cien y Tecn. Alim. 32 (3), 233-268.

GUERZONI, E., SOLARI, C. y MARCHETTI, R. (1989). Effect of the nutrient evolution during grape ripening on the alcoholic fermentation dynamics. Sciences des Aliments, 9, 267-284.

LONVAUD-FUNEL, A., MASCLEF, J.P., JOYEUX, A. y PARASKEVOPOULOS, Y. (1988). Étude des interactions entre levures et bactéries lactiques dans le mout de raisin. Connaissance Vigne Vin. 22, 11-23.

MACKEY, T., LEJEUNE, V., JANSSENS, M. y WAUTERS, G. (1993). Identification of vancomycin-resistant lactic bacteria isolated from humans. J. Clin. Microbiol. 31, 2499-2501.

MASQUE, M.C., GUARDIOLA, S y BORDONS, A. (1991). Control de la fermentación maloláctica. Vitivinicultura. 11-12, 64-68

RANKINE, B.C. (1972). Influence of yeast strain and malolactic fermentation on composition and quality of table wines. Am. J. Enol. Vitic. 23, 152-158.

RIBEREAU-GAYON, P. (1985). New devolopments in wine microbiology. Am. J. Enol. Vitic. 39, 83-90.

SUÁREZ, J.A., GONZÁLEZ, M.C., CALLEJO, M.J., COLOMO, B. y GONZÁLEZ, A. (1994). Contribution to the study of varietal wines from Rioja and Navarra. Microbial growth trends during grape maturation. Bulletin de L'O.I.V. 759-760, 388-406

VALLART, B., REVERSAT, E. y PATAUX, F. (1992). Optimisation d'une souche de bactéries lactiques sélèctionées. Revue des Oenologges. 65, 32-36.

WIBOWO, D., ESCHENBRUCH, R., DAVIS, C.R., FLEET, G.H. y LEE, T.H. (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a rewiew. Am. J. Enol. Vitic. 36, 302-313.