

## EL PAPEL DE LOS MICROORGANISMOS EN LA ELABORACIÓN DEL VINO

### THE ROLE OF THE MICROORGANISMS IN WINEMAKING

### O PAPEL DOS MICROORGANISMOS NA ELABORACIÓN DO VIÑO

Mesas, J. M.<sup>1</sup>; Alegre, M. T.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Área de Tecnología de Alimentos

<sup>2</sup>Área de Microbiología

Escuela Politécnica Superior. Universidad de Santiago de Compostela. Campus de Lugo. E-27002 Lugo, España.

E-mail: jmesas@lugo.usc.es

Recibido: 8 Junio 1999; recibida versión revisada 1 Septiembre 1999; aceptado: 1 Septiembre 1999

Received: 8 June 1999; revised version received 1 September 1999; accepted: 1 September 1999

---

#### Abstract

This review contains a description of the key microorganisms involved in the process of winemaking and the most common problems due to unwanted side reactions. The review includes the main groups of microorganisms and their biochemical pathways that lead to a variety of modifications necessary to obtain the organoleptic properties of the wine. Finally the current trends on wine microbiology are included with special attention to the most relevant techniques used in genetic manipulation of these groups of microorganisms.

Keywords: Wine, winemaking, organoleptic properties, genetic manipulation.

#### Resumen

El presente artículo es una revisión divulgativa de los principales microorganismos implicados en la elaboración del vino y en las posibles alteraciones del mismo. En él se muestran los principales grupos de microorganismos y los mecanismos bioquímicos por los que se llevan a cabo las distintas transformaciones. Finalmente se tratan las tendencias actuales de la microbiología enológica destacando algunas de las principales técnicas empleadas en la manipulación genética de los microorganismos del vino.

Palabras clave: Vino, elaboración de vino, propiedades organolépticas, manipulación genética.

#### Resumo

O presente artigo é unha revisión divulgativa dos principais microorganismos implicados na elaboración do viño e nas posibles alteracións do mesmo. Nel móstran-se os principais grupos de microorganismos e os mecanismos bioquímicos polos que se levan a cabo as distintas transformacións. Finalmente trátanse as tendencias actuais da microbioloxía enolóxica destacando algunhas das principais técnicas empregadas na manipulación xenética dos microorganismos do viño.

Palabras clave: Viño, elaboración do viño, propiedades organolépticas, manipulación xenética.

## I.- INTRODUCCIÓN

Sin microorganismos no hay vino ya que son los responsables de la transformación del mosto de la uva en vino. En concreto son las levaduras las que por medio de un proceso bioquímico denominado fermentación alcohólica (F.A.) transforman los azúcares del mosto de la uva en etanol, CO<sub>2</sub> y otros compuestos químicos y con ello el mosto en vino.

Desde principios del siglo XX se sabe que en la elaboración de algunos vinos pueden intervenir, además de las levaduras, otros microorganismos cuya misión es transformar el ácido málico del vino en ácido láctico. Esta transformación, que es denominada fermentación maloláctica (F.M.L.) y que es llevada a cabo por diversas especies de bacterias lácticas, es considerada una fermentación de suavización del vino que conviene a todos los vinos tintos y a aquellos vinos blancos cuyo contenido en ácido málico sea muy elevado (Bravo, F., 1995; Herrero y García, 1997).

Actualmente sabemos que, si bien los agentes causantes de la transformación del zumo de la uva en vino son microorganismos, que consideramos por ello beneficiosos, también existen microorganismos que causan alteraciones en el vino y que consideramos por ello perjudiciales (Biol *et al.*, 1992; Suárez e Iñigo, 1992; Bourgeois y Larpent, 1995). Los microorganismos relacionados con el vino pueden ser distribuidos en 4 grupos (Suárez e Iñigo, 1992):

- (i) Las levaduras, que son las encargadas de realizar la F.A.
- (ii) Las bacterias lácticas, que llevan a cabo la F.M.L. A estos dos grupos dedicamos el presente artículo.
- (iii) Las bacterias acéticas, que junto con algunas levaduras y algunas bacterias lácticas son causantes de alteraciones en los vinos. A ellas nos referiremos al hablar de las enfermedades de los vinos.
- (iv) Los mohos, algunas de cuyas especies pueden desarrollarse sobre la uva y en las vides causando mermas importantes en la cantidad y en la calidad de la uva. No vamos a abordar el estudio de los mohos en este artículo por entender que son microorganismos más relacionados con la viticultura que con la enotecnia.

## II.- LAS LEVADURAS

### II.1.- CARACTERÍSTICAS GENERALES

Son hongos unicelulares pertenecientes en su mayor parte al grupo de los Ascomycetos, es decir, al grupo de hongos capaces de formar esporas contenidas en el interior de un asca.

Se hallan diseminadas por toda la naturaleza. Llegan a la uva por el viento y los insectos siendo retenidas en la pruina, una sustancia cerosa que recubre la piel de la uva. De ahí pasan al mosto cuando se rompe el grano de uva en las operaciones enológicas de estrujado y prensado.

Vistas al microscopio las distintas especies presentan formas muy variadas. Las hay elípticas (con forma de huevo) como las especies del género *Saccharomyces*; esféricas como *Torula*; alargadas como *Torulopsis stellata* y apiculadas (con forma de limón) como *Hanseniaspora* (Peynaud, 1989). Su morfología es uno de los caracteres utilizados en su clasificación, como también lo son entre otros su forma de reproducción y sus características bioquímicas (Barnett *et al.*, 1990; Navarre, 1994; De Rosa, 1997).

Su reproducción puede ser vegetativa (asexual) por gemación generalmente o por escisión. Cuando las condiciones son adversas la mayor parte de las levaduras pueden reproducirse sexualmente generando ascosporas.

Entre las diversas características bioquímicas utilizadas en la clasificación de las levaduras podemos citar (Quesada y Cenis, 1995; Suárez, 1997):

- (a) El tipo de azúcares que pueden fermentar.
- (b) El rendimiento en alcohol, las hay que para producir 1 grado de alcohol consumen de 17 a 18 g de azúcar, otras en cambio con menor rendimiento metabolizan de 21 a 22 g.
- (c) Su poder alcohológeno, o grado máximo de alcohol que pueden alcanzar, algunas detienen su actividad a los 5% Vol mientras que otras llegan a 17 o 18% Vol.
- (d) Productos secundarios de la fermentación.
- (e) Resistencia al anhídrido sulfuroso.
- (f) Capacidad para asimilar diferentes sustancias nitrogenadas.

### II.2.- CLASIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS

La clasificación de las levaduras es compleja y complicada aunque el desarrollo de nuevas técnicas clasificatorias basadas en la Biología Molecular, particularmente en el análisis de secuencias de ADN, ha permitido separar o reagrupar las especies (Quesada y Cenis, 1995).

Las levaduras pertenecen al Reino Fungi y dentro de él a la división Eumycota que agrupa a los denominados hongos verdaderos. Dentro de esta división las levaduras se incluyen en 2 de las 5 subdivisiones de los Eumycetos (Tabla 1), la Ascomycotina representada por las levaduras capaces de producir ascosporas, llamadas por ello esporógenas, y la Deuteromycotina representada por las levaduras incapaces de formar esporas llamadas por ello

**Tabla 1.-** Clasificación de los géneros de levaduras más frecuentes en mostos y vinos. (T. De Rosa, 1997).

I) <i>Levaduras esporógenas</i>	
subdivisión	ASCOMYCOTINA
clase	HEMIASCOMYCETES
orden	ENDOMYCETALES
familia	SACCHAROMYCETACEAE
subfamilias	SCHIZOSACCHAROMYCETOIDAE NADSONIOIDEAE SACCHAROMYCETOIDEAE
géneros	<i>Schizosaccharomyces</i> <i>Hanseniaspora</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Dekkera</i> <i>Hansenula</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Pichia</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Torulaspota</i> <i>Zygosaccharomyces</i>
II) <i>Levaduras no esporógenas</i>	
subdivisión	DEUTEROMYCOTINA
clase	BLASTOMYCETES
familia	CRYPTOCOCCACEAE
géneros	<i>Brettanomyces</i> <i>Candida</i> <i>Kloeckera</i>

asporógenas o no esporógenas. Los géneros de levaduras esporógenas, englobados todos ellos en la familia Saccharomycetaceae, se distribuyen en 3 subfamilias. Los de las levaduras no esporógenas constituyen la familia Cryptococcaceae. Conviene aclarar que los Deuteromicetos constituyen en realidad un "cajón de sastre" en el que se incluyen levaduras haploides que tienen su correspondiente fase diploide clasificada en los Ascomicetos. Así por ejemplo la especie *Kloeckera apiculata* es la fase imperfecta (o haploide) de la especie *Hanseniaspora uvarum*. Por lo tanto ambas especies son la misma. Asimismo conviene reseñar que por debajo de los taxones género y especie las levaduras pueden ser clasificadas en subespecies y variedades que a menudo adquieren el rango de especies tras nuevas revisiones taxonómicas, o por el contrario, varias especies son unificadas en una sola como subespecies de la misma con lo que la clasificación se complica aún más y se incrementa el número de sinonimias.

**II.3.- ESPECIES DE MAYOR RELEVANCIA ENOLOGICA**

Manteniendo la distinción hecha entre levaduras esporógenas y asporógenas (Navarre, 1994), a continuación se detallan algunas de las especies con mayor relevancia enológica.

Entre las levaduras esporógenas denominadas frecuentemente de segunda fase por aparecer en un estado avanzado de la F.A. y producir gran cantidad de etanol destacan:

*Saccharomyces cerevisiae* (*S. ellipsoideus*) es una de las más importantes en enología ya que es la responsable de la fermentación de la mayor parte de los azúcares del mosto. Su poder alcohológeno es elevado

(17°) y es bastante resistente al SO<sub>2</sub> (250 mg/L).

*Saccharomyces bayanus* (*S. oviformis*), semejante a la anterior resiste también 250 mg de SO<sub>2</sub>/L, pero su poder alcohológeno es mayor pudiendo superar los 18°. Es la levadura típica de las etapas finales de la fermentación y a menudo la responsable de refermentaciones de vinos embotellados.

*Saccharomyces acidifaciens* (*S. baillii*), con un poder alcohológeno de tan solo 10°, su principal característica es su elevada resistencia al SO<sub>2</sub> (250 a 400 mg/L) lo que le permite iniciar la fermentación en mostos muy sulfitados, comportándose en estos casos como levadura de primera fase.

*Torulaspota rosei* (*S. rosei*) tiene un poder alcohológeno de 8 a 14° y su principal característica es su capacidad para fermentar lentamente los azúcares con lo que los niveles de acidez volátil producidos son menores.

Entre las levaduras asporógenas, generalmente de primera fase, que se caracterizan por aparecer al principio de la F.A. y producir gran cantidad de compuestos secundarios enriquecedores del sabor y aroma del vino, destacan:

*Kloeckera apiculata*, es la forma imperfecta o haploide de *Hanseniaspora uvarum*. Junto con *S. cerevisiae* es la levadura más frecuentemente encontrada en los mostos. Su poder alcohológeno es muy bajo (4-5°) y también lo es su rendimiento en alcohol (21 a 22 g de azúcar/1° de alcohol). Produce mucha acidez volátil por lo que no es deseable en las fermentaciones. Se la elimina fácilmente con el sulfitado dada su baja resistencia al SO<sub>2</sub>.

*Candida stellata* (*Torulopsis stellata*, *T. bacillaris*) tiene un poder alcohológeno de 10 a 11° y se caracteriza fundamentalmente por aparecer con más frecuencia en mostos de uvas atacadas de podredumbre.

#### II.4.- UTILIZACIÓN DE LAS LEVADURAS EN VINIFICACIÓN

La fermentación del mosto suele desencadenarse de forma natural y espontánea a partir de las propias levaduras presentes en el mosto, a este tipo de fermentación se le denomina fermentación espontánea. Se caracteriza porque en el transcurso de la misma intervienen varias especies de levaduras, algunas de las cuales coexisten en el tiempo y otras se suceden secuencialmente en función de su poder alcohológeno. En la sucesión de especies primero suelen intervenir las levaduras de primera fase generalmente asporógenas y luego las de segunda fase en su mayoría esporógenas, de modo que *S. cerevisiae* domina durante la mayor parte del tiempo, pudiendo ser desplazado al final por *S. bayanus*.

En ocasiones la conjunción de un sulfitado excesivo y bajas temperaturas retardan el inicio de la fermentación. En estos casos, y en aquellos en los que el vinicultor desea conducir la F.A. con un tipo concreto de levaduras, se recurre a la adición de levaduras al mosto. Se pueden emplear o bien levaduras autóctonas, preparando lo que se ha dado en llamar un pie de cuba, o bien levaduras comerciales. En el primer caso se parte de una fracción pequeña de la propia vendimia, las uvas más sanas, cuyo mosto se deja fermentar espontáneamente. Cuando la fracción está en plena fermentación puede ser utilizada como inóculo para el resto del mosto. En el segundo caso se suele recurrir al empleo de las denominadas levaduras secas activas (LSA). Bajo el aspecto de polvos secos, que a menudo deben ser rehidratados en agua tibia antes de su utilización, las LSA son levaduras deshidratadas generalmente pertenecientes a las especies *S. cerevisiae* y *S. bayanus*.

### III.- LA FERMENTACIÓN ALCOHOLICA (F.A.)

Podemos definir la F.A. como el proceso bioquímico por el cual las levaduras transforman los azúcares del mosto en etanol y CO<sub>2</sub> (Zambonelli, 1988; Navarre, 1994). Para que la F.A. tenga lugar, el mosto ha de hallarse en condiciones de limitación de oxígeno.

En condiciones de aerobiosis las levaduras se multiplican abundantemente con un rendimiento en biomasa muy alto ya que se consigue 1 g de levadura por cada 4 g de azúcares consumidos.

En anaerobiosis las levaduras realizan la F.A., es decir degradan los azúcares de forma incompleta generando etanol, CO<sub>2</sub> y energía. En estas condiciones el rendimiento en biomasa es de tan sólo 1 g de levadura por cada 100 g de azúcares consumidos.

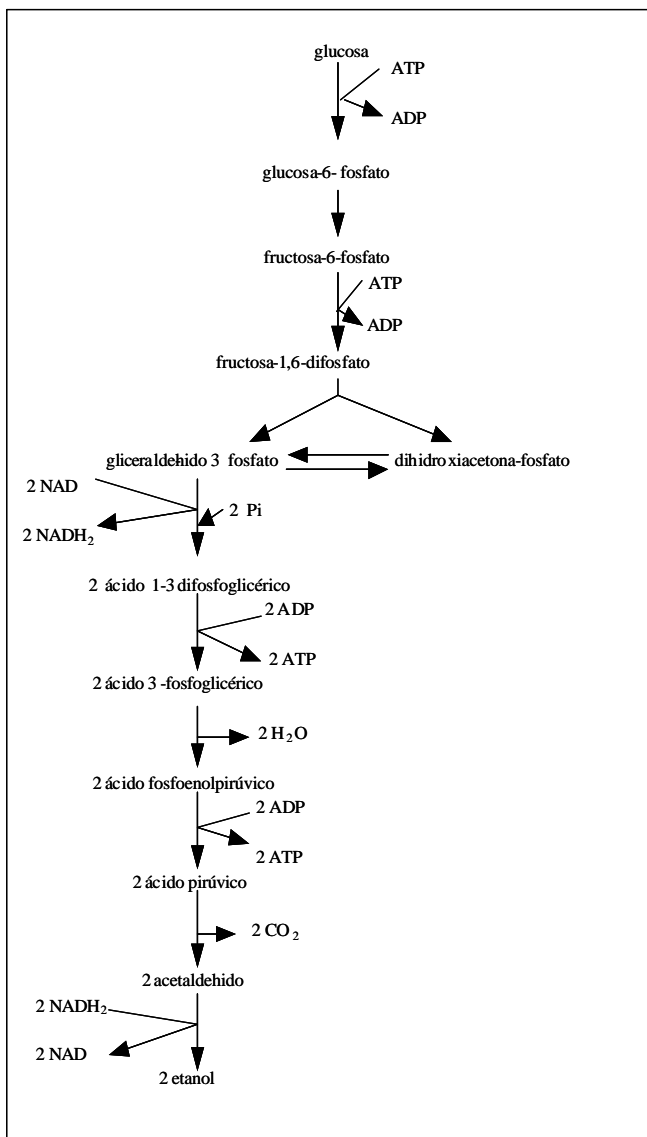


Figura 1. Secuencia de reacciones de la fermentación alcohólica.

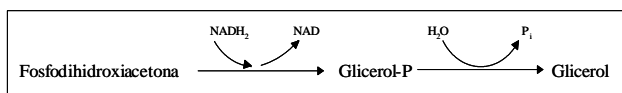
### III.1.- MECANISMO BIOQUÍMICO DE LA F.A.

La secuencia de reacciones enzimáticas por las que las levaduras transforman los azúcares del mosto en etanol y CO<sub>2</sub> se indican en la figura 1.

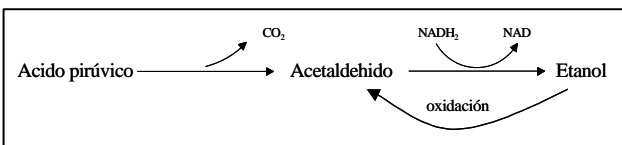
### III.2.- PRODUCTOS SECUNDARIOS DE LA F.A.

Durante la F.A., además de etanol y CO<sub>2</sub> se produce cierta cantidad de otros compuestos, que en gran medida contribuyen al sabor y aroma final del vino (Peynaud, 1989; Navarre, 1994; Suárez, 1997). Los más significativos son los siguientes:

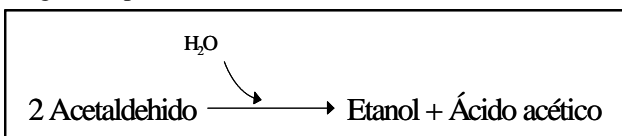
**1. Glicerol.-** Cuantitativamente es el segundo componente mayoritario del vino después del etanol. Se encuentra en cantidades de 6 a 10 g/L y a él se atribuyen los caracteres de suavidad y aterciopelado del vino. Se genera a partir de la fosfodihidroxiacetona por reducción y defosforilación de la misma.



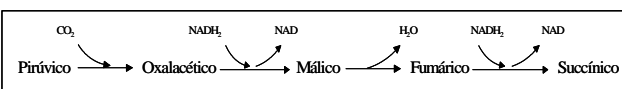
**2. Acetaldehído.-** Aparece durante la F.A. por descarboxilación del ácido pirúvico, aunque también puede proceder de la oxidación del etanol. En exceso provoca en el vino la denominada maderización o gusto oxidado.



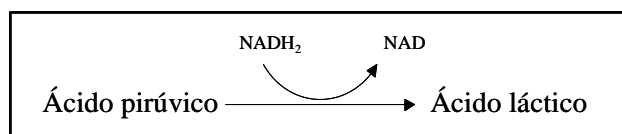
**3. Ácido acético.-** Componente mayoritario de la acidez volátil se produce por la condensación de 2 moléculas de acetaldehído, aunque puede tener otros orígenes no relacionados con la F.A. En exceso transmite al vino gusto a picado.



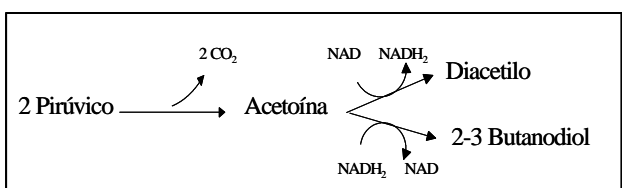
**4. Ácido succínico.-** Presente siempre en el vino transmite a éste el típico sabor entre salado y amargo que caracteriza a las bebidas fermentadas. Procede de la carboxilación del ácido pirúvico y posteriores reacciones redox.



**5. Acido láctico.-** Procede de la hidrogenación del pirúvico, aunque puede tener su origen en intervenciones bacterianas.



**6. Acetoína, diacetilo y 2-3 butanodiol.-** Son los metabolitos del ciclo diacetilo-acetoínico. Siempre presentes en el vino, en exceso transmiten sabores lácteos y amargos no deseables. Tienen su origen en la condensación y descarboxilación de 2 moléculas de ácido pirúvico.



**7. Otros compuestos.-** Con origen en los azúcares se forman diversos ácidos cuantitativamente minoritarios como cítrico, propiónico, fumárico y fórmico. Con origen en las sustancias nitrogenadas se forman alcoholes superiores como isoamílico e isopropílico que proceden de la desaminación y descarboxilación de los aminoácidos. Por combinación entre ácidos y alcoholes se generan ésteres con fuerte repercusión en el buqué final del vino, siendo el acetato de etilo el que tiene una repercusión mayor.

### III.3.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA F.A.

Existen diversos factores tanto físicos como químicos que inciden positiva o negativamente en el transcurso de la F.A., ya sea actuando sobre el desarrollo de las levaduras, ya sea incidiendo directamente sobre la propia F.A. (Navarre, 1994). Los más relevantes son los siguientes:

**La temperatura.-** A mayor temperatura la F.A. transcurre más rápidamente, sin embargo es menos pura. Se produce menos etanol y más cantidad de compuestos secundarios que a menudo no conllevan mejora de la calidad del vino. Por otro lado las levaduras tienen en los 30°C su temperatura óptima de desarrollo. Por encima de los 35°C la actividad decrece rápidamente y en torno a los 45°C mueren. Por debajo de 10°C la mayor parte de las levaduras silvestres son inactivas.

**El oxígeno.-** Aunque la F.A. es un proceso anaeróbico las levaduras mantienen una leve respiración utilizando para ello el oxígeno combinado a moléculas del mosto. En caso de carencia de este oxígeno pueden requerirse remontados del mosto con aireación para evitar la parada de la F.A.

**Los nutrientes.-** Por un lado están los azúcares, que son fuente de carbono y de energía para las levaduras y que deben encontrarse en concentración superior a 20 g/L para que la F.A. transcurra a su velocidad máxima. Por otro están las sustancias nitrogenadas, las sales y los factores de crecimiento (vitaminas) que normalmente se hallan en el mosto en concentración suficiente para el desarrollo de las levaduras. Sin embargo en casos de vendimias atacadas de podredumbre en las que los mohos han consumido parte de estos nutrientes, puede ser necesario adicionar al mosto complejos vitamínicos y sales de amonio.

**Los compuestos químicos de acción negativa.-** Por un lado la acumulación de los propios productos de la F.A. pueden ralentizarla. Por otro lado, esos mismos compuestos junto a otros presentes en el mosto de forma natural (taninos) o artificial (pesticidas, SO<sub>2</sub>, etc.) pueden actuar como inhibidores del crecimiento de las levaduras.

## IV.- LAS BACTERIAS LÁCTICAS DEL VINO

### IV.1.- CARACTERES GENERALES

Las bacterias lácticas son un grupo no taxonómico de bacterias que agrupa a todas aquellas bacterias capaces de producir ácido láctico a partir de azúcares. Dentro de este grupo hay especies capaces de desarrollarse en el vino a pesar de ser un medio inhóspito dado su contenido en alcohol y su bajo pH. A estas especies se las denomina bacterias lácticas del vino (Delfini, 1983; Peynaud, 1989; Fleet, 1993). A su vez algunas de estas especies son capaces, bajo determinadas condiciones, de transformar el ácido málico del vino en ácido láctico; el proceso se denomina fermentación maloláctica (F.M.L.) y las especies capaces de hacerlo se denominan bacterias de la fermentación maloláctica o bacterias malolácticas.

Muy abundantes en la naturaleza, las bacterias lácticas también llegan a la uva por el viento y los insectos y de ahí pasan al mosto durante el estrujado y prensado de la uva. Sin embargo lo más frecuente es que las bacterias lácticas presentes en mostos y vinos procedan de los utensilios y recipientes vinarios de las propias bodegas.

Su morfología cocoide o bacilar junto a sus características bioquímicas son los caracteres más frecuentemente utilizados en su clasificación, aunque hoy se recurre también a técnicas más modernas como la de análisis de fragmentos de ADN.

Entre las características bioquímicas utilizadas destaca la pureza fermentativa de los azúcares, lo que permite agrupar estas bacterias en homofermentativas, aquellas que llevan a cabo una fermentación láctica pura generando exclusivamente ácido láctico y heterofermentativas, aquellas que a partir de azúcares producen, además de ácido láctico, gran cantidad de CO<sub>2</sub> y otros compuestos como etanol, ácido acético, succínico, manitol, etc. La utilización de las pentosas como xilosa y arabinosa, la de otros azúcares, y el metabolismo de otros compuestos como los ácidos málico, cítrico y tartárico son utilizados para clasificar las distintas especies (Tabla 2).

De todas estas especies la más frecuentemente aislada en los vinos en plena F.M.L. es *Leuconostoc oenos* a la que actualmente se denomina *Oenococcus oeni* a raíz de los trabajos de Dicks *et al.* (1995). Esta especie, considerada la principal responsable de la F.M.L. de los vinos es hoy uno de los microorganismos más estudiados en el campo de la viticultura (Lonvaud-Funel *et al.*, 1993; Guzzo *et al.*, 1998; Alegre *et al.*, 1999).

### IV.2.- UTILIZACIÓN DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS EN VINIFICACIÓN

El interés enológico de las bacterias lácticas deriva de la capacidad que poseen algunas de sus especies para realizar la F.M.L. (Delfini, 1983; Peynaud, 1989). A éstas

**Tabla 2.-** Especies de bacterias lácticas encontradas en el vino. (E. Peynaud, 1989).

Cocos homofermentativos:	<i>Pediococcus cerevisiae</i>
Cocos heterofermentativos:	<i>Leuconostoc gracile</i> <i>Leuconostoc oenos</i>
Bacilos homofermentativos:	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Streptobacterium sp.</i>
Bacilos heterofermentativos:	<i>Lactobacillus hilgardii</i> <i>Lactobacillus fructivorans</i> <i>Lactobacillus desidiosus</i> <i>Lactobacillus brevis</i>

se las denomina coloquialmente "bacterias útiles" y se caracterizan por su incapacidad para metabolizar ácido tartárico y glicerol, producir poca acidez volátil y resistir los bajos pHs siendo selectivas en estas condiciones para la utilización de ácido málico frente a los azúcares. Dentro de ellas predominan los cocos heterofermentativos. Existen, sin embargo, otras bacterias lácticas denominadas "perjudiciales" que se caracterizan por metabolizar preferentemente los azúcares, el ácido tartárico y el glicerol y elevar la acidez volátil causando con ello las enfermedades del vino que se citan en un apartado posterior, dentro de ellas predominan los lactobacilos.

La F.M.L. suele desencadenarse espontáneamente al finalizar la F.A. o algún tiempo después cuando las condiciones sean favorables a las bacterias lácticas (Bravo, 1995). Si la F.M.L. no conviene a un vino puede impedirse trasegando y sulfitando el vino tras finalizar la F.A. Con ello se evita además de la F.M.L. los riesgos de enfermedades causadas por las "bacterias perjudiciales". Si por el contrario se desea que un vino pase la F.M.L. y esta no se desencadena, pese a ser favorables las condiciones, habrá que adicionar "bacterias útiles" al vino. Entre las distintas formas de inóculo se citan: a) La mezcla de estos vinos con otros en plena F.M.L.; b) La utilización de las lías de vinos que acaben de pasar la F.M.L.; c) La utilización de cultivos puros comerciales. En este último caso el mercado proporciona diferentes preparados entre los que se está imponiendo el empleo de cepas de *Oenococcus oeni* seleccionadas por su resistencia al bajo pH, al alto grado alcohólico y por su posibilidad de adición directa al vino sin reactivación previa.

## V.- LA FERMENTACION MALOLÁCTICA (F.M.L.)

La fermentación maloláctica es una segunda fermentación que, a no ser que se impida, la sufren los vinos jóvenes cuando ha terminado o está a punto de terminar la F.A. (Delfini, 1983; Bravo, 1995).

Bioquímicamente es un proceso llevado a cabo por las bacterias lácticas que consiste en la transformación del ácido málico del vino en ácido láctico más CO<sub>2</sub>, de ahí el nombre de maloláctica.

Enológicamente va a tener importantes consecuencias para el vino ya que: a) le va a dar estabilidad, pues mientras haya ácido málico en un vino éste es inestable; b) le va a proporcionar un afinamiento del gusto debido a que el ácido málico, más agresivo, da paso al ácido láctico que es más suave; c) se va a producir una pérdida de acidez debida a que un diácido se convierte en un monoácido. Esta pérdida de acidez conlleva cambios importantes en las propiedades organolépticas del vino, tanto en el color como en el sabor y el aroma.

Junto a estos cambios, considerados positivos y deseables en muchos vinos, se producen otros menos deseables que conviene controlar, son el incremento de acidez volátil, que se debe básicamente a la transformación del ácido cítrico en ácido acético por las mismas bacterias lácticas y la aparición de aminas biógenas, debidas principalmente al desarrollo de pediococos.

## V.1. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA F.M.L.

El hecho de que se dé o no F.M.L. en un vino joven depende de una serie de factores que de forma resumida se detallan a continuación (Peynaud, 1989).

### 1.- El ciclo bacteriano.

El ciclo bacteriano pasa por tres fases. Una primera fase de multiplicación, que coincide con el inicio del encubado del mosto. En ella las bacterias se multiplican en paralelo con las levaduras. La producción de etanol y el consumo de nutrientes por parte de las levaduras paraliza el crecimiento de las bacterias que ven mermada su población desde aproximadamente  $10^5$  a  $10^2$  bacterias/mL. Sigue una segunda fase denominada fase de latencia, en la que las bacterias se van adaptando al nuevo medio en espera de condiciones más favorables para su desarrollo. Esta fase puede durar desde unos días o unas semanas hasta varios meses. Cuando las condiciones son idóneas tiene lugar la tercera fase, en realidad una segunda fase de multiplicación, en la que influyen notoriamente la temperatura y las levaduras que al finalizar la F.A. mueren y cuando la población bacteriana alcanza valores de  $10^6$  bacterias/mL inician la F.M.L. que culmina en general con el agotamiento del ácido málico presente en el vino. Finalizada la F.M.L. la población bacteriana vuelve a decrecer para situarse en valores residuales de  $10^2$  bacterias/mL.

### 2.- El pH.

El pH influye en la F.M.L. en dos sentidos. Por un lado, actuando sobre la multiplicación de las bacterias lácticas ya que éstas tienen su pH óptimo de desarrollo comprendido entre 4.2 y 4.5. Teniendo en cuenta que el pH de un mosto-vino puede oscilar entre 2.8 y 3.8, cuanto más bajo sea éste mayor será la dificultad para el desarrollo de las bacterias. Por otro lado, el pH determina el tipo de sustrato que van a

metabolizar las bacterias lácticas. En general a pHs más bajos utilizan ácido málico aunque haya azúcares residuales en el vino y a pHs más altos suelen utilizar con preferencia los azúcares.

### 3.- La temperatura.

La F.M.L. presenta su actividad máxima entre 20°C y 25°C. A 15°C y a 30°C la F.M.L. es lenta, pero mientras que por encima de 30°C puede llegar a pararse por completo, por debajo de 15°C puede continuar siempre que haya arrancado a temperaturas mayores. En cualquier caso la F.M.L. debe realizarse a 18°C como máximo para evitar que las bacterias lácticas ataquen a otros compuestos distintos del ácido málico e incrementen con ello la acidez volátil.

### 4.- La aireación.

La aireación es tal vez el factor menos importante ya que entre las bacterias lácticas hay microaerófilas y anaerobias facultativas, por lo tanto en general conviene cierta aireación para favorecer el proceso, pero nunca saturación con oxígeno ya que retardaría la F.M.L. Suele ser suficiente con el oxígeno captado durante el descube del vino.

### 5.- Los nutrientes.

Las bacterias lácticas tienen mayor número de requerimientos nutricionales que las levaduras. De hecho presentan múltiples auxotrofías tanto entre los aminoácidos y vitaminas, como entre las bases nitrogenadas, requieren además sales minerales que contengan manganeso, magnesio y potasio. Los vinos no siempre contienen suficiente cantidad de estos nutrientes, lo que puede provocar retardo o incluso ausencia de F.M.L.

### 6.- El grado alcohólico.

Las bacterias lácticas del vino son resistentes al etanol, de hecho se desarrollan y sobreviven en el vino, sin embargo a medida que aumenta el grado alcohólico se dificulta su crecimiento y con ello la F.M.L. Los cocos suelen ser menos resistentes al grado alcohólico que los bacilos, motivo por el cual el grado alcohólico suele ser un importante factor a tener en cuenta cuando se utilizan como cultivos iniciadores preparados comerciales a base de cocos.

### 7.- El sulfitado.

Las bacterias lácticas son muy sensibles al  $\text{SO}_2$ , tanto más cuanto más ácido sea el vino. Así por ejemplo en regiones frías, donde el vino suele ser muy ácido, 5 g de  $\text{SO}_2/\text{HL}$  de mosto pueden impedir la F.M.L.; en regiones templadas se requieren de 10 a 15 g de  $\text{SO}_2/\text{HL}$  de mosto para impedir la F.M.L.; en regiones cálidas, donde el vino es muy poco ácido, 20 g de  $\text{SO}_2/\text{HL}$  de mosto pueden ser insuficientes para impedir la F.M.L.

## VI.- ENFERMEDADES DEL VINO

Las alteraciones del vino pueden tener su origen en factores físico-químicos, en cuyo caso suelen denominarse quebras, o pueden tener su origen en la acción de microorganismos en cuyo caso hablamos de enfermedades (Peynaud, 1989; Biol *et al.*, 1992; Navarre, 1994). Éstas a su vez pueden ser aerobias o anaerobias.

### VI.1.- ENFERMEDADES AEROBIAS

Pueden ser debidas a levaduras que provocan la enfermedad denominada la flor o pueden ser debidas a bacterias acéticas, en cuyo caso provocan la enfermedad denominada picado acético.

**La flor.-** Se produce en vinos de baja graduación alcohólica (9% Vol), que estén almacenados en recipientes parcialmente vacíos, como consecuencia del contacto del vino con el aire. Se caracteriza por la aparición en la superficie del vino de un velo blanquecino que es debido a la proliferación de la levadura elíptica *Candida mycoderma*. Esta levadura provoca la oxidación del etanol y de los ácidos orgánicos generando CO<sub>2</sub>, agua y acetaldehído, por lo que los vinos se vuelven aguados y maderizados.

**El picado acético.-** Es una de las enfermedades más graves ya que conduce al avinagramiento del vino. Se caracteriza por la aparición en la superficie del vino de un velo gris-rosado que es debido a la proliferación de bacterias acéticas, siendo la más común *Acetobacter aceti*. Las bacterias acéticas oxidan el etanol generando ácido acético, acetaldehído y agua. A su vez el ácido acético puede combinarse con el etanol dando acetato de etilo que es el verdadero responsable del olor a picado. Los vinos atacados por esta enfermedad van perdiendo grado alcohólico y color y van ganando acidez volátil, haciéndose inconsumibles a partir de aproximadamente 1 g de ácido acético/L.

Ambas enfermedades pueden ser prevenidas practicando el correcto relleno de los envases, manteniendo una higiene rigurosa en la bodega y sulfitando convenientemente mostos y vinos.

### VI.2. ENFERMEDADES ANAEROBIAS

Se distinguen de las anteriores en que los microorganismos responsables no se desarrollan en la superficie del vino sino en el interior del mismo, en ausencia de oxígeno. Asimismo se distinguen también porque no se produce la oxidación del etanol sino utilización de otros compuestos como azúcares residuales, ácidos orgánicos y glicerol. Pueden también ser causadas por levaduras o por bacterias, en este caso bacterias lácticas.

**1. Causadas por levaduras.-** Pueden ser las propias levaduras de la vinificación, por ejemplo *S. cerevisiae* y

*S. bayanus*, las cuales pueden provocar refermentaciones de los azúcares residuales en el vino embotellado. Se genera así una turbidez que deprecia la calidad del vino. Pueden ser levaduras de contaminación por ejemplo especies del género *Pichia*, capaces de utilizar los azúcares residuales para generar acidez volátil, o por ejemplo especies del género *Brettanomyces* que producen acetamida a partir de azúcares dando el denominado "sabor a ratón".

**2. Causadas por bacterias.-** Las bacterias responsables de las enfermedades anaeróbicas del vino son las bacterias lácticas consideradas perjudiciales entre las que predominan los bacilos heterofermentativos. Según el tipo de sustrato utilizado y el tipo de producto generado se pueden diferenciar cuatro enfermedades: el picado láctico, la vuelta, el amargo y la grasa.

**El picado láctico.-** Se produce como consecuencia de la utilización de los azúcares residuales de un vino por todo tipo de bacterias lácticas del vino (perjudiciales o útiles) para generar ácido láctico, acético y manitol lo que transmite al vino un sabor agrídulce. Los vinos en los que se ha parado accidentalmente la F.A. son más propensos a este tipo de enfermedad.

**La vuelta.-** Consiste en la utilización del ácido tartárico por las denominadas bacterias perjudiciales (principalmente bacilos) para dar ácido láctico, ácido acético y CO<sub>2</sub>. El vino pierde acidez total, concretamente acidez fija, y gana en acidez volátil, depreciándose notablemente su calidad.

**Enfermedad del amargo.-** Típica de vinos tintos viejos embotellados, se caracteriza por la aparición en ellos de un sabor amargo que es debido a la transformación del glicerol en acroleína por las bacterias lácticas y posterior combinación de la acroleína con los polifenoles del vino.

**La grasa.-** El vino atacado de esta enfermedad presenta un aspecto ahilado y aceitoso, que es debido a la presencia en el mismo de polisacáridos. Estas moléculas producidas principalmente por especies del género *Leuconostoc* forman entramados que espesan el vino dándole el aspecto gelatinoso que le caracteriza.

La mejor forma de prevenir las enfermedades anaeróbicas, es el empleo correcto de las técnicas enológicas como son el sulfitado, las filtraciones, evitar los azúcares residuales y las temperaturas elevadas durante la conservación del vino, y la vigilancia constante de una higiene rigurosa.

## VII.- TENDENCIAS ACTUALES DE LA MICROBIOLOGÍA ENOLÓGICA

Las investigaciones actuales sobre los microorganismos del vino, se centran en dos aspectos fundamentales: a) el diseño de cultivos iniciadores, los



denominados "starters" y b) el desarrollo de nuevas técnicas de identificación microbiana (Fleet, 1993; Kreuz, 1993; Farris, 1995; Suárez, 1997). En el primer caso el objetivo es disponer de nuevas cepas de microorganismos con características específicas para procesos concretos, y en el segundo disponer de técnicas de identificación rápidas y seguras que permitan hacer un seguimiento de las poblaciones microbianas inoculadas en las fermentaciones.

### VII.1.- CARACTERÍSTICAS ENOLÓGICAS DE LOS CULTIVOS INICIADORES

Las características enológicas deseables para los cultivos iniciadores, ya sean de levaduras o de bacterias lácticas, se pueden agrupar en características comunes a todos ellos y características particulares de algunas cepas de levaduras. En el grupo de las comunes se pueden citar las siguientes:

**Curva de crecimiento.-** Un "starter" óptimo debe iniciar su fase exponencial de crecimiento en el menor tiempo posible y ser capaz de competir con la flora presente en el mosto-vino. Debe además ser posible su adición directa al mosto-vino, sin necesidad de realizar cultivos previos, ya que ello facilita las labores enológicas.

**Resistencia a factores adversos (SO<sub>2</sub>, etanol, fitofármacos, bajo pH, etc.).-** La resistencia a estos factores le permite al "starter" enológico desarrollarse en un medio que en principio le es hostil.

**Poder fermentativo.-** A un buen cultivo iniciador se le debe exigir un alto poder alcohológeno, si se trata de una levadura vínica, y una elevada actividad maloláctica, si se trata de una bacteria láctica. No conviene olvidar que el principal objetivo de los "starters" es llevar a cabo el proceso para el que han sido diseñados con el mayor rendimiento posible.

**Producción de metabolitos.-** En apartados anteriores se ha visto con cierto detalle que durante los procesos fermentativos, además de los productos principales, se producen otros metabolitos secundarios. Estos pueden ser deseables como el glicerol, o indeseables como el ácido acético, las aminas biógenas y los dextranos. En el diseño de buenos cultivos iniciadores se busca siempre incrementar en lo posible la producción de metabolitos enriquecedores de la calidad organoléptica del vino y reducir hasta la nulidad la producción de metabolitos no deseables. En este sentido a las bacterias lácticas se les exige además que no metabolicen el ácido cítrico, el ácido tartárico y el glicerol.

**Liberación de aromas.-** Una tendencia muy reciente en el diseño de nuevas cepas enológicas, consiste en seleccionar aquellas que poseen elevada actividad  $\beta$ -glucosidasa ya que esta enzima hidroliza los precursores de aromas procedentes de la uva, que

suelen ser terpenos unidos por enlace  $\beta$ -glucosídico a un resto azucarado, liberando con ello el verdadero compuesto aromático, que es el terpeno libre.

En el grupo de las características enológicas particulares de levaduras, que son deseables para aplicaciones concretas se pueden citar las siguientes:

**Caracter floculante.-** Es la propiedad de algunas levaduras de aglomerarse, es decir unirse unas a otras durante la F.A. o al finalizar ésta y dar flóculos o grumos que sedimentan en el fondo del recipiente. Este carácter es buscado en cepas destinadas a la elaboración de vinos espumosos por el método tradicional ya que facilita las operaciones de eliminación de las mismas.

**Carácter filmógeno.-** Se denomina también carácter flor y es la capacidad que poseen algunas levaduras para generar un velo en la superficie de los vinos de alta graduación alcohólica. Se desea este carácter en la elaboración de los vinos de Jerez.

**Poder desacidificante.-** La desacidificación biológica de los vinos llevada a cabo por las bacterias lácticas mediante la F.M.L., tiene una alternativa en el empleo de las levaduras desacidificantes. A tal efecto se suelen emplear especies del género *Schizosaccharomyces* capaces de realizar la denominada fermentación maloalcohólica, consistente en transformar directamente ácido málico en etanol. También se está intentando la transferencia de material genético de las bacterias malolácticas a *Saccharomyces cerevisiae* con el fin de lograr una cepa que realice la F.A. y F.M.L. de forma simultánea.

**Criolevaduras.-** Son levaduras seleccionadas por su capacidad para llevar a cabo la F.A. a temperaturas muy bajas (6-10°C). Su principal interés está en los países de climas fríos en donde a menudo la F.A. no arranca o con frecuencia se para dejando las fermentaciones incompletas.

**Factor "killer".-** Es la característica de algunas cepas capaces de producir una proteína "asesina" que destruye a otras cepas permitiendo a la poseedora de este carácter dominar el cultivo. El factor "killer" es específico para cada cepa de modo que una cepa A puede ser "killer" para una cepa B y ésta a su vez ser "killer" para otra cepa. Este carácter, en principio ventajoso para un cultivo "starter", tiene muchos detractores en la industria enológica, ya que una vez establecidas cepas con factor "killer" en una bodega es difícil erradicarlas.

### VII.2.- TÉCNICAS DE SELECCIÓN Y MEJORA DE CEPAS ENOLÓGICAS

Para conseguir nuevos cultivos iniciadores que posean alguna de las características anteriormente mencionadas, existen diversas técnicas encaminadas a

la selección y mejora de cepas enológicas. Entre las más empleadas destacan las siguientes (Farris, 1995; Kreuz, 1993; Suárez, 1997):

**Selección clonal.-** Es la técnica más antigua y más difundida aunque no por ello menos eficaz. Consiste en aislar individuos de entre una amplia población de cepas autóctonas y analizar a nivel de laboratorio si poseen las características deseadas. Seleccionados los mejores, se hacen con ellos cultivos puros que se ensayan a nivel industrial. Tras garantizar su estabilidad en el tiempo, pueden ser comercializados como cultivos "starters".

**Selección de mutantes.-** Consiste en partir de cultivos puros de cepas poseedoras de buenas características enológicas y someterlas a la acción de agentes mutágenos. Los mutantes obtenidos se ensayan individualmente para nuevas características procediendo como en el caso anterior. Esta técnica aplicada a las levaduras requiere garantizar la reproducción asexual y eliminar su capacidad de reproducción sexual para evitar posibles contaminaciones genéticas de nuestra cepa de interés provocadas por la presencia de otras esporas sexuales.

**Hibridación de cepas.-** Consiste en provocar la fusión, ya sea sexual o asexualmente, de células procedentes de cepas con características enológicas distintas y analizar en los descendientes la presencia conjunta de las características de ambas cepas. A partir de ahí el proceso previo a la comercialización sería como el descrito en los casos anteriores.

**Transformación.-** Consiste en introducir, mediante las técnicas de ingeniería genética, ADN procedente de otro organismo en la cepa microbiana que deseamos convertir en un "starter". Si la cepa receptora expresa y mantiene el nuevo ADN y éste le confiere la característica deseada, pasaríamos de los ensayos de laboratorio a la escala industrial y a su posterior comercialización como se ha descrito con anterioridad.

### VII.3.- TÉCNICAS MODERNAS DE IDENTIFICACIÓN DE CEPAS

Las técnicas clásicas de identificación de microorganismos, basadas en pruebas bioquímicas, son lentas y a menudo sólo nos permiten llegar a determinar la especie microbiana, pero no las variedades o cepas de una misma especie. En las últimas décadas se han desarrollado nuevas técnicas basadas en el análisis de ADN microbiano, que permiten diferenciar de forma rápida y segura distintas cepas de una misma especie, lo que es especialmente útil en el seguimiento de procesos fermentativos en los que se utilizan "starters". Las técnicas más utilizadas en este sentido son las siguientes (Kreuz, 1993; Fleet, 1993; Quesada y Cenis, 1995; Suárez, 1997):

**Electroforesis de ADN en gel de agarosa.-** Consiste en extraer el ADN de los microorganismos, cortarlo en sitios específicos por medio de unos enzimas denominados de restricción, depositar los fragmentos de ADN en un gel de agarosa y someterlo a un campo eléctrico. Los fragmentos de ADN se desplazan en función de su tamaño dando patrones concretos para cepas concretas.

**Electroforesis en campo pulsante (PFGE).-** La técnica es semejante a la anterior salvo porque el gel de agarosa que contiene los fragmentos de ADN es sometido a la acción alternante de dos campos eléctricos, lo que permite separar fragmentos de ADN de tamaño 1000 veces mayor que en el caso anterior.

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).-** Es una técnica que permite amplificar pequeñas cantidades de ADN en tubo de ensayo. Una vez amplificado dicho ADN puede ser analizado mediante las dos técnicas mencionadas anteriormente.

### BIBLIOGRAFÍA

- Alegre, M. T.; Rodríguez, M. C.; Mesas, J. M. 1999. Nucleotide sequence analysis of pRS1, a cryptic plasmid from *Oenococcus oeni*. *Plasmid* **41**, 128-134.
- Barnett, J. A.; Payne, R. W.; Yarrow, D. 1990. Yeasts: characteristics and identification. (2nd ed.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Biol, H.; Broussous, Ph.; Cassignard, R.; Cuinier, Cl.; Durand, R.; Gaillard, M.; Mezières, G.; Poulard, A.; Rey, Ch. 1992. La higiene en enología. De la vendimia al embotellado. Ed. Dionysos, Barcelona.
- Bourgeois, C. M.; Larpent, J. P. 1995. Microbiología alimentaria. Vol II. Fermentaciones alimentarias. Ed. Acribia, Zaragoza.
- Bravo, F. 1995. Del vino y otros temas. Ed. Eypasa, Madrid.
- De Rosa, T. 1997. Tecnología de los vinos blancos. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Delfini, C. 1983. Studio sull'attività biologica della schizoflora lattica nei mosti e nei vini. I. Contributo. *Vigne Vine* **10**, 67-74.
- Dicks, L. M. T.; Dellaglio, F.; Collins, M. D. 1995. Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**, 395-397.
- Farris, G. A. 1995. El uso de levaduras seleccionadas en enología. Características tecnológicas y de calidad. *VitiViticultura* **3-4**, 43-45
- Fleet, G. H. 1993. Wine microbiology and biotechnology. Harwood Academic Publishers, Switzerland.
- Guzzo, J.; Jobin, M. Ph.; Diviès, Ch. 1998. Increase of sulfite tolerance in *Oenococcus oeni* by means of acidic adaptation. *FEMS Microbiology Letters* **160**, 43-47.
- Herrero, C.; García, S. 1997. Viticultura y enología: estado actual y perspectivas. Servicio Publicaciones. Diputación Provincial de Lugo.
- Kreuz, R. 1993. Nuevos desarrollos en la aplicación de levaduras en enología y panadería. *Alimentación Equipos y Tecnología*. **Marzo**, 98-102.
- Lonvaud-Funel, A.; Nielsen, J.C.; Prah, C. 1993. Control of malolactic fermentation. Development of lactic acid bacteria for direct inoculation into wine. Synthesis Report to the C.E.C. pp 1-17.
- Navarre, C. 1994. L'oenologie. 4ª ed. Ed. Lavoisier Tec. & Doc., París.
- Peynaud, E. 1989. Enología práctica. Conocimiento y elaboración del vino. 3ª ed. Ed. Mundi Prensa, Madrid.
- Quesada, M. P.; Cenis, J. L. 1995. Identificación de levaduras vínicas. Métodos basados en el estudio del ADN. *VitiViticultura* **7-8**, 52-55.
- Suárez, J. A. 1997. Levaduras vínicas. Funcionalidad y uso en bodega. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Suárez, J. A.; Iñigo, B. 1992. Microbiología enológica. Fundamentos de vinificación. 2ª ed. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Zambonelli, C. 1988. Microbiologia e biotecnologia dei vini. Ed. Edagricole, Bologna.