

IMPOSICIÓN DE *Oenococcus oeni* CEPA "UVAFERM ALPHA" (LALLEMAND) EN FERMENTACIONES MALOLÁCTICAS DE VINOS TINTOS DE CRIANZA. RELACIÓN CON EL SISTEMA DE INOCULACIÓN: SIEMBRA DIRECTA Y USO DE PIE DE CUBA.

Paola Olmos Rizzo¹, Anna Puig Pujol¹, Antonio Palacios García^{2,3}; Carlos Suárez Martínez², Santiago Mínguez Sanz^{1,4}

¹ Institut Català de la Vinya i el Vi, Estació de Viticultura i Enologia. Amàlia Soler 27-29 (08720) Vilafranca del Penedès. polmos@gencat.net.

² Lallemand, C/ Muntaner 281, (08021), Barcelona. apalacios@lallemand.com, csuarez@lallemand.com

³ Universidad de la Rioja, ⁴ Universidad Autónoma de Barcelona

1.- RESUMEN:

La utilización de bacterias lácticas comerciales como iniciadoras de la fermentación maloláctica (FML) es una estrategia utilizada por los elaboradores para asegurar el buen funcionamiento del proceso y minimizar los riesgos de producción de ciertos metabolitos como aminos biógenos, carbamato de etilo, etc. Actualmente, comprobar si la cepa estéril se impone sobre la flora autóctona es posible de manera rápida y fiable mediante la aplicación de técnicas moleculares. En estudios previos realizados en nuestro centro se observó que la cepa inoculada no siempre llega a imponerse totalmente sobre la flora autóctona durante la FML. El objetivo del presente trabajo fue observar si el sistema de inoculación influye en el nivel de imposición de la cepa estéril.

Se realizaron fermentaciones malolácticas a escala industrial. Los vinos se inocularon con *Oenococcus oeni* cepa "Uvaferm Alpha" (Lallemand) con dos sistemas diferentes de inoculación: siembra directa y pie de cuba. Posteriormente, se evaluó el porcentaje de imposición de dicha cepa sobre la flora autóctona presente en el vino mediante una metodología basada en la utilización de RAPD-PCR.

Los porcentajes de imposición de la cepa inoculada variaron entre 46% y 100%. El sistema de siembra directa del estéril presentó mayores porcentajes de imposición de la cepa inoculada respecto al sistema de inoculación por pie de cuba.

2.- MATERIALES Y MÉTODOS:

Vinificaciones

El ensayo se realizó a escala industrial en una bodega riojana, partiendo de uvas de la variedad tempranillo. Las vinificaciones y el sistema de siembra se realizaron de acuerdo a los protocolos de trabajo previamente establecidos en la bodega. Después de realizar la fermentación alcohólica (FA), los vinos se inocularon con una bacteria seleccionada, cepa *Oenococcus oeni* (nombre comercial "Uvaferm Alpha"), en tres series, siguiendo el esquema que aparece en la figura 1 (Fig. 1).

Siembra directa: según el protocolo recomendado por el fabricante: 1g/HI para conseguir aprox. 1×10^6 UFC/ml, (Serie I y Serie S).

Siembra por pie de cuba: El depósito T13 (50 HI) se sembró con UA por siembra directa y se utilizó como pie de cuba: cuando la concentración de ácido málico descendió 1/3, se tomaron 25 HI y se repartieron como inóculo para los depósitos T17, T19 y T20. Posteriormente, los 4 depósitos se rellenaron con vino (Serie T).

SERIE I:

Se parte de un lote de vino que realizó FA en un único depósito. De este vino se llenaron 6 barricas de 225 litros que realizaron FML a 18°C, 5 de ellas (I1 a I5) inoculadas con Uvaferm Alpha (UA), y una, IB, que se dejó de testigo y realizó FML espontánea. Toma de muestras a 2/3 de FML.

SERIE S:

Igual que la SERIE I. Toma de muestras a 2/3 de FML.

SERIE T:

Se parte de 5 lotes de vino de 50 HI que realizaron FA en depósitos de acero inoxidable. Los depósitos T13, T17, T19 y T20 se sembraron con UA mediante sistema de pie de cuba para realizar la FML. El depósito T21 realizó FML espontánea.

Análisis Microbiológicos: Implantación de la bacteria inoculada UA:

Se tomaron muestras homogéneas de los depósitos y barricas cuando se habían consumido 2/3 del ácido málico y se conservaron con 30% de glicerol estéril a -20°C hasta el momento de su análisis.

Las muestras fueron sembradas por diseminación en placa en medio sintético MLO agar con cicloheximida 0,003%. Las placas fueron incubadas en atmósfera microaerófila a 28 °C durante 48-72 horas.

Se analizaron aproximadamente 28 colonias por placa. Se obtuvieron los perfiles de las cepas aisladas mediante amplificación por RAPD-PCR con cebador M13 y posterior separación de los fragmentos amplificados mediante electroforesis horizontal con gel de agarosa. Los perfiles de las cepas aisladas en cada muestra se compararon con el perfil de Uvaferm Alpha (Fig. 2) obtenido mediante la misma técnica. De esta forma, se observó si las bacterias aisladas correspondían a la cepa inoculada. Los resultados se han expresado en porcentajes de imposición.

Fig. 1: ESQUEMA DE LAS VINIFICACIONES REALIZADAS

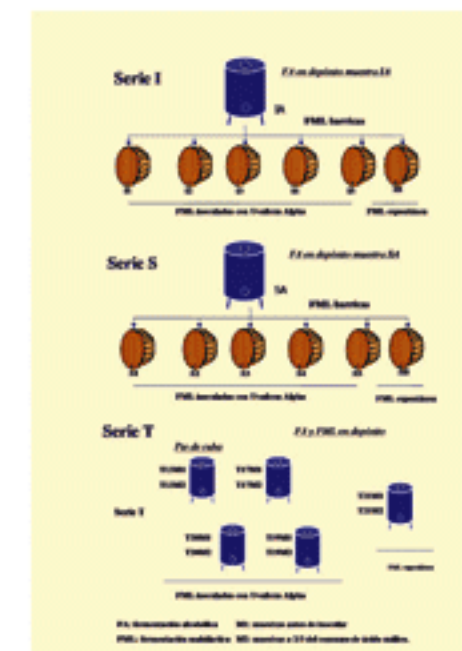
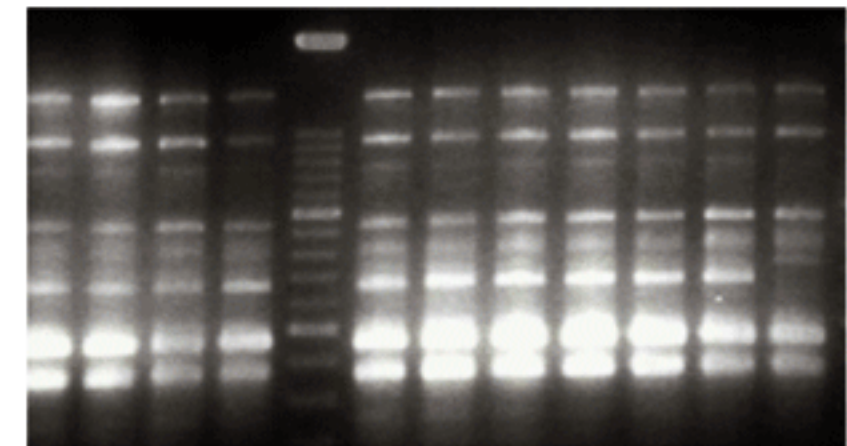


Fig. 2: CEPA Uvaferm Alpha. ANÁLISIS



MPM

MPM: marcador de pesos moleculares XIV (100bp ladder) Boehringer Mannheim

3.- RESULTADOS:

Gráfico 1. Imposición de UA inoculada por siembra directa. Serie S.

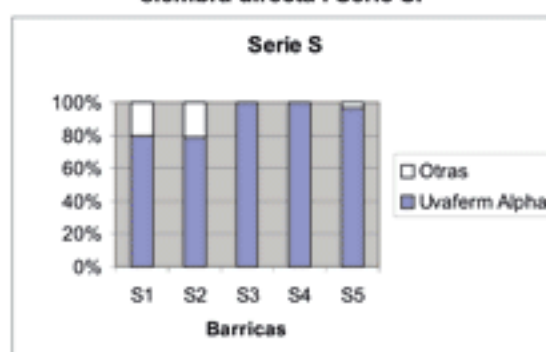


Gráfico 3. Imposición de UA inoculada con sistema de Pie de Cuba. Serie T.

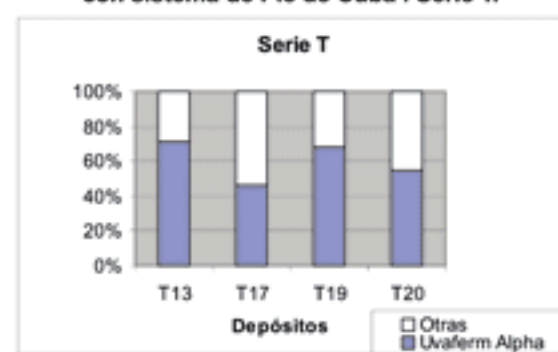


Gráfico 2. Imposición de UA inoculada por siembra directa. Serie I.

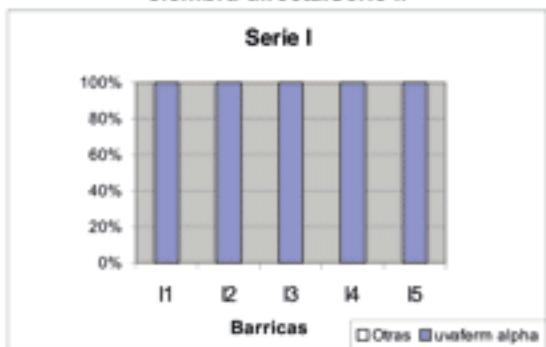
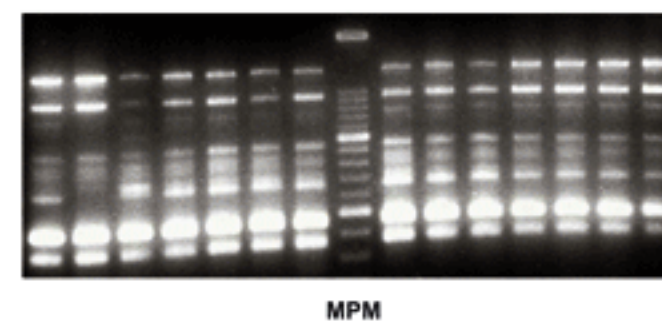


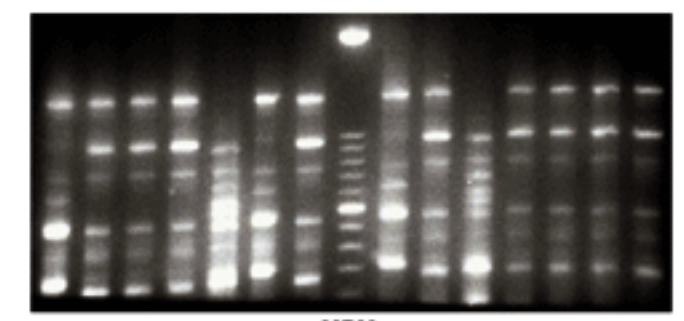
Fig. 3. Perfiles obtenidos de una FML inoculada por siembra directa.



MPM

100 % imposición de UA

Fig. 4. Perfiles obtenidos de una FML inoculada por pie de cuba.



MPM

70 % imposición de UA

- Se observó que las FML que fueron conducidas con el sistema de siembra con pie de cuba (serie T, gráfico 3), mostraron menor imposición de la cepa estéril en contraposición con las FML que fueron inoculadas por siembra directa (gráficos 1 y 2). Dentro de la serie T, mostró mayor porcentaje de implantación el depósito T13, que sirvió de tanque madre para el pie de cuba.
- En las figuras 3 a y b se observan los perfiles obtenidos en un caso de siembra directa (serie S) con total imposición de la cepa UA.
- En las figuras 4 a y b se muestran los perfiles obtenidos en un caso de siembra por pie de cuba (serie T) donde la imposición de UA fue de 70 %.

4.- CONCLUSIONES:

- El sistema de análisis de RAPD-PCR fue eficaz para realizar los controles de pureza del inóculo y determinación del nivel de imposición en las distintas fermentaciones, siendo de fácil realización y con obtención de resultados en corto tiempo.
- Las fermentaciones malolácticas inoculadas mostraron diferentes niveles de imposición de la cepa Uvaferm Alpha. Estos valores oscilaron entre 46% y 100 % de imposición.
- El sistema de inoculación afectó a los niveles de imposición de la cepa. El sistema de siembra directa mostró mayor implantación de la cepa inoculada que el sistema de inoculación con pie de cuba.
- Determinar el porcentaje de imposición del estéril podría ser de utilidad para el sector elaborador como herramienta de control para asegurar la calidad del proceso y correlacionar su repercusión en las características organolépticas del vino.