

## FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA – UNA HERRAMIENTA PARA REDUCIR LA ACIDEZ Y MEJORAR EL AROMA EN VINOS DE CLIMA FRÍO

Maret DU TOIT<sup>1\*</sup>, Lynn ENGELBRECHT<sup>1</sup>, Eida LERM<sup>2</sup>, Doris RAUHUT<sup>3</sup>, Caroline KNOLL<sup>3</sup> and Sibylle KRIEGER-WEBER<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Institute for Wine Biotechnology & Department of Viticulture and Oenology, Stellenbosch University, Private Bag X1, 7602 Matieland South Africa; <sup>2</sup>Anchor Wine Yeast, PO Box 14, 7475 Epping Industria, South Africa; <sup>3</sup>Department of Microbiology and Biochemistry, Geisenheim University, Von-Lade-Str.1, 65366 Geisenheim, Germany; <sup>4</sup>Lallemand, In den Seiten 53, 70825 Korntal-Münchingen, Germany

\*Corresponding author: M. du Toit, Telephone +27 21 808 3772, Fax +27 21 808 3771, Email: mdt@sun.ac.za

### Introducción

Tanto la fermentación alcohólica como maloláctica se deben llevar a cabo teniendo en cuenta las diferentes condiciones climáticas, ya que los principales parámetros del mosto que afectan a las levaduras pueden sufrir variaciones muy importantes en función del clima. La finalidad de la fermentación maloláctica (FML) varía en función de las condiciones climáticas. En las regiones de clima frío el efecto más significativo de la maloláctica consiste en la reducción de la acidez con el fin de mejorar la sensación en boca del vino. La acidez total en los vinos de clima frío puede alcanzar los 12 g/L, con concentraciones de ácido málico que pueden alcanzar los 6-8 g/L, mientras que en las regiones más cálidas el ácido málico puede ser de alrededor de 2-3 g/L. La alta acidez total da lugar a un pH bajo comprendido entre 2,9 y 3,3 que tendrá un efecto importante sobre el tipo de bacterias lácticas (BL) que sobrevivirán en estas condiciones (Lerm et al., 2010; Du Toit et al., 2011). Por otro lado, la eliminación del ácido málico como fuente de carbono preferida en las condiciones de vinificación hace que el vino sea microbiológicamente estable frente al crecimiento de otras bacterias lácticas, y esto es determinante en los climas cálidos donde el pH es mayor de 3.6 lo que permite el crecimiento de *Lactobacillus* y *Pediococcus*, bacterias típicas de alteraciones en los vinos. La tercera razón a favor de la maloláctica es la mejora del aroma, sabor y sensación en boca del vino (Lerm et al., 2010; Du Toit et al., 2011; Knoll et al., 2011, 2012). Los vinos que realizan la fermentación maloláctica se perciben con una mayor complejidad, mejor estructura y mayor redondez en boca. En general, los vinos pueden ser más afrutados y más cremosos/mantecosos. El efecto sobre el aroma depende del tipo de bacterias utilizadas, así como del tipo de cultivo iniciador de la fermentación alcohólica.

Las bacterias lácticas más comúnmente asociadas a la vinificación pertenecen a los géneros *Oenococcus*, *Lactobacillus* e *Pediococcus*. Las especies pertenecientes a estos géneros degradan el ácido málico a través de mecanismos diferentes, pero las dos especies que se utilizan comercialmente para inducir la FML son *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum*.

*Oenococcus oeni* es la especie más estudiada y más adecuada en condiciones enológicas normales y *L. plantarum* es siempre la preferida para la co-inoculación en el caso de pH alto. Las cepas de *Oenococcus oeni* se adaptan a condiciones más desfavorables como pH bajo (2,9-4,0), concentraciones de etanol de hasta el 16% y anhídrido sulfuroso total (SO<sub>2</sub>) de hasta 50 mg/L y además sobreviven a temperaturas bajas. No obstante, *O. oeni* aumenta ligeramente la acidez volátil al ser heterofermentador obligatorio. Por el contrario, *L. plantarum* prefiere pH mayores de 3,4; por consiguiente, en las regiones de clima frío se encontrará en condiciones difíciles y además

presenta una menor tolerancia a etanol, SO<sub>2</sub> y temperatura. *O. oeni* en las condiciones de vinificación no produce ácido acético y por tanto no tendrá un efecto negativo sobre la acidez volátil. Las dos especies tienen genomas diferentes que dan lugar a perfiles enzimáticos diversos y que por tanto tendrán un efecto diferente sobre el perfil aromático del vino, dando lugar a estilos diferentes (Lerm et al., 2010; Du Toit et al., 2011).

La elección del momento para realizar la inoculación es una herramienta muy útil tanto para superar las condiciones difíciles a las que se enfrenta la FML como para cambiar el estilo de vino que interesa obtener. Actualmente las prácticas más frecuentemente utilizadas son la inoculación secuencial y la co-inoculación (Azzolini et al. 2010; Lerm et al. 2010). La inoculación secuencial permite controlar la FML de forma que las condiciones sean óptimas para el cultivo iniciador. Los puntos más críticos para el éxito de la FML secuencial son los altos contenidos de alcohol y el agotamiento de los nutrientes. La co-inoculación evita los riesgos asociados a la inoculación secuencial, ya que el etanol todavía no está presente o presenta concentraciones bajas y los nutrientes son suficientes tanto para las levaduras como para las bacterias. Otra ventaja de la co-inoculación es que el vino se puede estabilizar antes con la adición de SO<sub>2</sub>. El riesgo de la co-inoculación es que si la fermentación alcohólica ralentiza o se para, el cultivo iniciador de la FML, en particular *O. oeni*, en condiciones de pH alto metaboliza los azúcares produciendo cantidades elevadas de ácido acético que inhibe la fermentación alcohólica.

### **Factores que influyen sobre la fermentación maloláctica**

Los factores que afectan al crecimiento de las BL y/o a la FML son pH, etanol, temperatura, concentración de ácido málico, cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada para la fermentación alcohólica, nutrientes del mosto, residuos de fungicidas, características de las variedades en relación a los ácidos fenólicos y uso de lisozima (Lerm et al., 2010; Du Toit et al., 2011). Los factores más importantes en las regiones de clima frío son pH, etanol, cepa de levadura y concentración de ácido málico.

#### *pH y etanol*

El pH es crucial para el crecimiento y la cinética de la FML en el vino. El pH de 3,5 es crítico para el tipo de BL que estará presente y para el buen resultado de la FML. Un pH inferior a 3,5 favorece la supervivencia de *O. Oeni* ya que esta especie se adapta mejor a los pH bajos y la dominancia de esta especie asegura una FML segura ya que la competición con las otras BL es limitada. Mientras que el pH por encima de 3.5 es favorable para todas las BL utilizadas en vinificación y además la flora natural está presente con un mayor número de células permitiendo una competición natural. Como se mencionó anteriormente, *L. plantarum* está recomendado como cultivo iniciador cuando tenemos un pH mayor de 3,4, ya que el número de células disminuye rápidamente si se inocula a un pH por debajo de 3,4 causando la parada de la fermentación o una FML incompleta. El pH bajo es una realidad que debe ser considerada y manejada en el caso de vides cultivadas en climas fríos, y esto requiere una cuidadosa selección de cepas capaces de soportar condiciones difíciles. Además, el pH bajo intensifica el efecto de SO<sub>2</sub> y etanol como se describe a continuación.

La bibliografía muestra que etanol y pH actúan sinérgicamente y que un pH bajo y unas altas concentraciones de etanol representan las condiciones más inhibitorias para la FML. El trabajo de

Knoll et al. (2011) mostró que un pH de 3,2 y una concentración de etanol del 15% eran condiciones prohibitivas que sólo permitían un FML parcial y que esto estaba relacionado con la disminución del número de células. Un pH de 3,6 asociado a un alto contenido de etanol seguía teniendo una influencia negativa en el desarrollo de la FML, sin embargo un pH de 3,8 no causaba problemas incluso con un contenido de alcohol del 15%. Por el contrario, con concentraciones de etanol del 12,5%, típicas de las regiones frías, el pH no representaba ningún problema para la FML (Figura 1). Por lo tanto, en las regiones climáticas frías, la elección de una fecha de vendimia que corresponda a una maduración óptima de las uvas es crucial para poder asegurar que la relación pH y concentración de etanol sea adecuada y permita asegurar el éxito de la FML.

Los resultados de Knoll et al. (2011) demostraron que estos factores influían en el perfil aromático del vino. Las condiciones de pH bajo se caracterizaban por los ésteres etílicos mientras que con pH alto destacaba la presencia de ésteres de acetato. El control de estos factores y la elección de la cepa son herramientas que el enólogo puede utilizar para elegir un estilo particular de vino y un determinado perfil aromático.

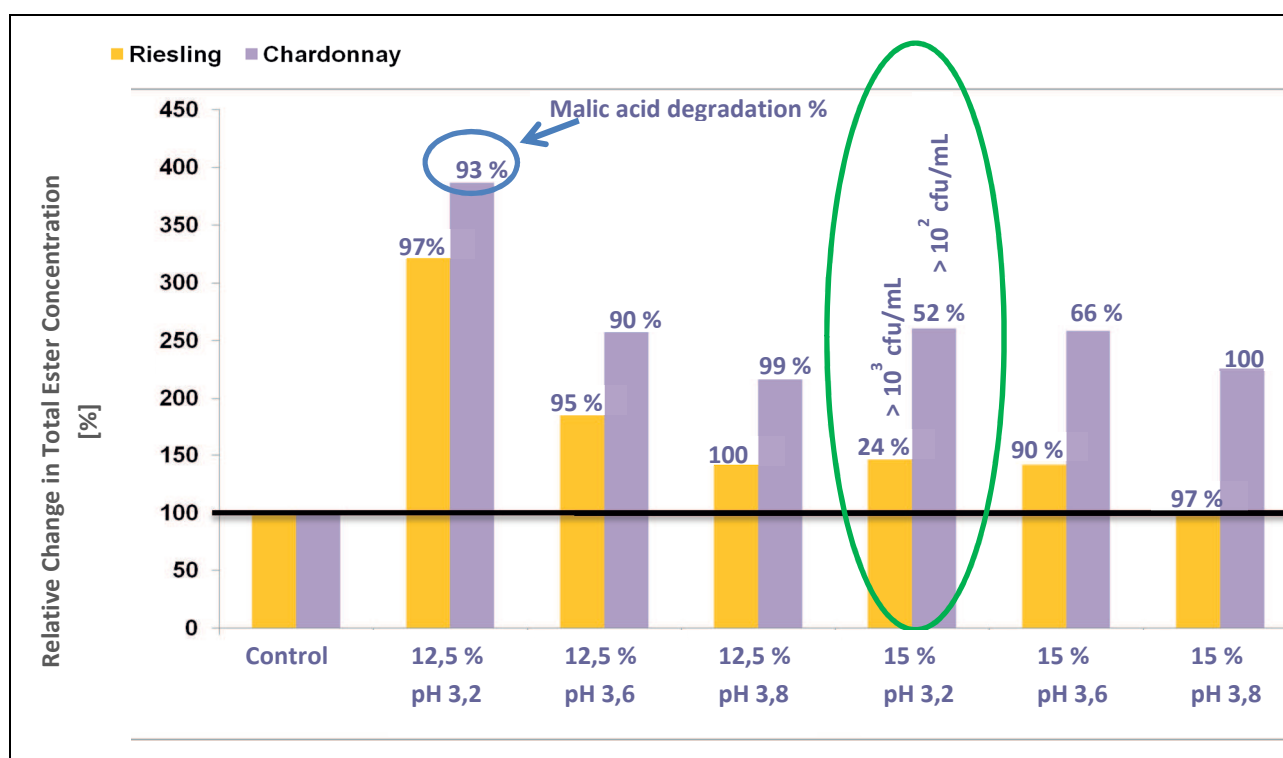


Figura 1: Sinergia entre pH y etanol en la fermentación secuencial de vinos Riesling y Chardonnay inoculados con la cepa de *O. oeni* R1105 (Knoll et al., 2011)

### Concentración de ácido málico

La concentración de ácido málico es uno de los factores menos considerado en la realización de la FML y a menudo es un parámetro que no viene evaluado. La concentración de ácido málico es primordial, en primer lugar para la regulación del gen maloláctico y, en segundo lugar, porque la cantidad de ácido láctico producida se vuelve tóxica para la célula cuando supera ciertos niveles, causando una disminución del número de células hasta unos niveles en los que la cantidad de

enzima disponible no es suficiente para convertir el ácido málico. Estos aspectos dependen de la cepa; seleccionar la cepa correcta teniendo en cuenta la concentración de ácido málico es fundamental para asegurar el éxito de la FML. Esto es importante en regiones de climas fríos donde los niveles de ácido málico son más altos y donde la FML debe realizarse prestando gran atención también a otros parámetros como pH, etanol, SO<sub>2</sub> y nutrientes. Cuanto más alta sea la concentración de ácido málico, más tiempo se necesitará para completar la FML, que en muchos casos tardará hasta tres o cuatro veces más. La Tabla 1 muestra los niveles de ácido málico y su efecto relativo sobre el éxito de la FML.

Tabla 1. Efecto de la concentración de ácido málico sobre la FML

	<b>Fácil</b>	<b>Moderado</b>	<b>Difícil</b>	<b>Extremadamente difícil</b>
Valores iniciales de ácido málico (g/L)	2-4	4-5 ó 1-2	5-7 ó 0,5-1	>7 ó <0,5

Una concentración de ácido láctico de 1,5 g/L es tolerada por la mayoría de las cepas malolácticas, pero hay algunas cepas que a esa concentración ya se ven afectadas. La mayoría de las cepas son sensibles a una concentración de 3 g/L y es la excepción la que puede funcionar y degradar parcialmente los niveles de ácido málico. Lallemand e IFV (Fig. 2) han demostrado que este efecto está relacionado con la disminución del número de células. Se puede ver en la figura el comportamiento de una cepa sensible a 1,5 g / L: inicialmente hay una reducción de la vitalidad celular seguida por una reanudación de la población que permite que la FML no se bloquee. Sin embargo, con 3 g/L, la población continúa disminuyendo sin poder recuperarse, con una parada inevitable de la FML. Por lo tanto, si el mosto presenta altas concentraciones de ácido málico, es necesario seleccionar una cepa más resistente a la cantidad esperada de ácido láctico.

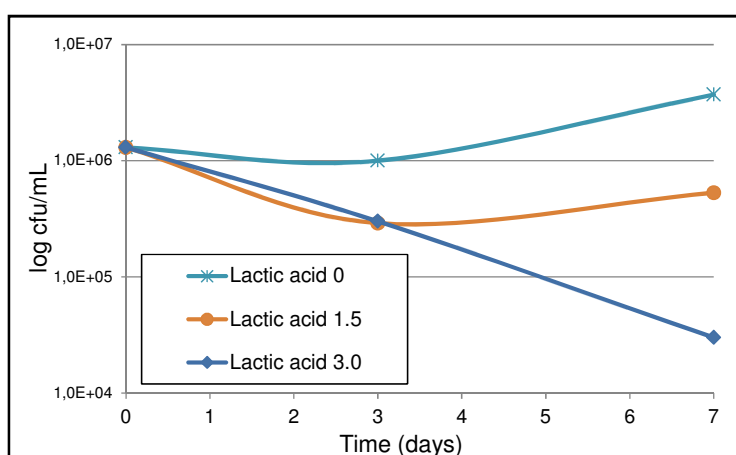


Figura 2: Efecto del ácido málico sobre la vitalidad de una cepa comercial de bacterias lácticas (Vincent Gerbaux International ML School Lallemand 2015).

### Efecto de la cepa de levadura

La cepa de *S. cerevisiae* seleccionada para la fermentación alcohólica puede tener un impacto significativo sobre el éxito de la FML y por tanto se debe elegir con atención, sobre todo en condiciones de clima frío, donde la FML en la mayoría de los casos tiene lugar en un entorno difícil, e incluso extremadamente difícil. Las levaduras enológicas se dividen en tres categorías: estimulantes, neutras e inhibitorias. La levadura tiene la capacidad de inhibir las BL a través de la producción de compuestos como etanol, SO<sub>2</sub>, ácidos grasos de cadena media y proteínas antibacterianas o del agotamiento de los nutrientes requeridos por las BL (Alexandre et al., 2004). Algunas cepas de levaduras enológicas pueden desempeñar un papel positivo en la estimulación de la FML mediante la desintoxicación del sustrato de fermentación o con la liberación de nutrientes por medio de la autólisis. Por lo tanto, para conseguir realizar una buena FML es crucial poder elegir la combinación correcta de cepas de levadura y BL. Por ejemplo, un Chardonnay con una concentración de ácido málico de 4 g/L pudo realizar la FML sólo con una de las cuatro combinaciones de levadura/bacterias estudiadas (Fig. 3).

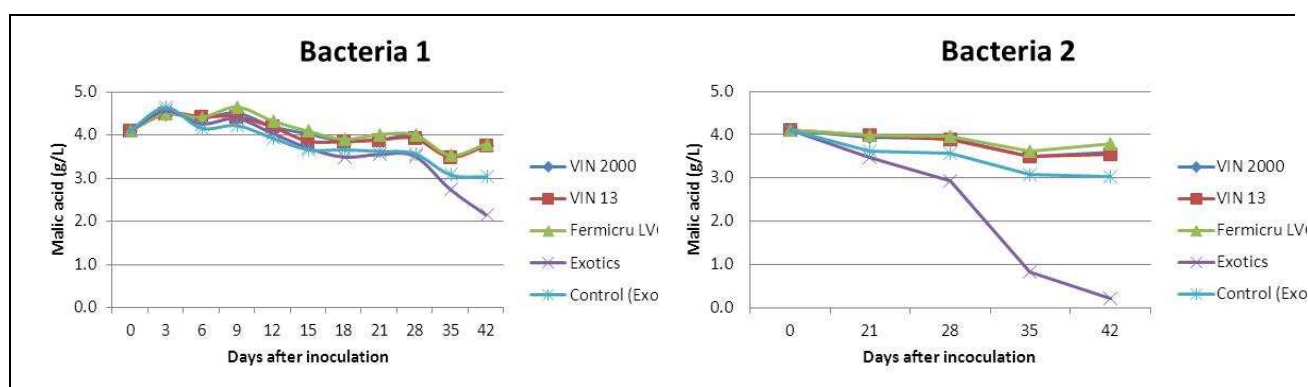


Figura 3: Dos bacterias diferentes combinadas con cuatro levaduras diferentes en un co-inoculación de Chardonnay con un pH de 3,3 y una acidez total de 9.3 g / L (Scholtz, 2013).

### Momento para la inoculación de la FML

Actualmente existen tres posibilidades para inducir la FML:

- co-inoculación, donde las levaduras y bacterias se adicionan juntas durante las primeras 48 horas de la fermentación;
- durante la fermentación alcohólica pero antes de los últimos 50 g/l de azúcares residuales
- inoculación secuencial, después del final de la fermentación alcohólica.

Las tres opciones mencionadas tienen sus ventajas pero también presentan riesgos potenciales y por lo tanto, en función de las condiciones del vino, la cepa de levadura utilizada determinará cuándo realizar la inoculación. La co-inoculación se ha difundido mucho en la última década, puesto que se ha visto que puede representar una solución para las FML difíciles, ya que muchos de los compuestos de las levaduras que hacen que el medio no sea adecuado para la FML se producen en la última fase de la fermentación alcohólica. La co-inoculación también implica diferentes estilos de vino, ya que los precursores y las actividades enzimáticas del mosto y del vino son diferentes. La co-inoculación también ayuda a estabilizar el vino más rápidamente al reducir el riesgo de

alteración microbiana. Knoll et al. (2012) demostraron que la co-inoculación era más rápida que la inoculación secuencial y esto demostraba que se puede encontrar una adecuada combinación levadura/bacteria para los vinos con pH bajo producidos en regiones frías. No hubo ningún efecto sobre la fermentación alcohólica cuando se efectuó controlándola de forma adecuada. Además se observó que los vinos presentaban la misma concentración de ácido acético que el control donde se usó *O. oeni*; Por lo tanto, no hay que tener miedo de la co-inoculación. El efecto de la co-inoculación sobre los compuestos aromáticos volátiles es diferente al efecto de la inoculación secuencial, presentando la primera unos niveles más altos de ésteres de etilo y acetato. Otra evidencia importante fue que las diferencias entre las cepas eran mucho más evidentes en la co-inoculación, debido a la disponibilidad de sustratos y precursores, que en la inoculación secuencial donde los perfiles aromáticos de las cepas eran mucho más parecidos (Fig. 4).

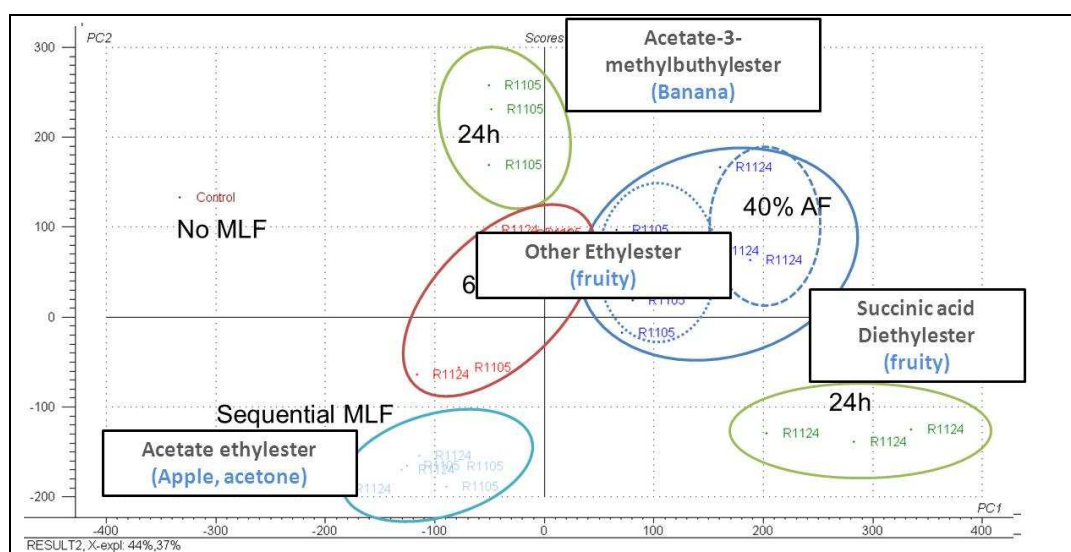


Figura 4: Score plot del PCA de los compuestos aromáticos en vinos Riesling con pH bajo fermentados con cuatro tipos de inoculación diferentes y dos cepas diversas (Knoll et al., 2012).

## Conclusiones

En conclusión, el buen resultado de la FML en las regiones de clima frío depende de algunos factores cruciales que deben tenerse en cuenta a la hora de decidir qué tipo de cepa utilizar para la inoculación de la FML. En las regiones de clima frío, los dos factores que tienen un impacto más significativo en el crecimiento de las cepas seleccionadas son el pH bajo y los altos niveles de etanol. Por tanto, es necesario elegir la cepa que mejor se adapte a estas condiciones.

Numerosos estudios muestran además la importancia de la combinación levadura/bacteria para el éxito de la FML en zonas de clima frío; por lo tanto es necesario elegir atentamente el tipo de levadura para garantizar la mejor compatibilidad entre las levaduras y las bacterias. El momento elegido para realizar la inoculación de la FML puede ser útil para limitar la duración de la FML ya que en muchos casos la FML, en condiciones de pH bajo, temperaturas bajas y niveles de etanol altos, puede durar meses si se usa la inoculación secuencial, mientras que la co-inoculación puede reducir a la mitad el tiempo, disminuyendo así mismo el riesgo de alteración del vino. Para diversificar el estilo del vino y su perfil aromático, los enólogos disponen de varias herramientas:

momento en el que realizar la inoculación, elección de una determinada cepa o incluso especie, *O. oeni* o *L. plantarum*, o también el uso de una combinación de las dos.

## Bibliografía

Alexandre H., Costello P.J., Remize F., Guzzo J., Guilloux-Benatier M. (2004). *Saccharomyces cerevisiae-Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *International Journal of Food Microbiology* 93, 141-154.

Azzolini, M., Tosi E., Vagnoli P., Krieger S., Zapparoli G. (2010). Evaluation of technological effects of yeast-bacterial co-inoculation in red table wine production. *Italian Journal of Food Science* 3, 257-263.

Du Toit M., Engelbrecht L., Lerm E., Krieger-Weber S. (2011). *Lactobacillus*: The Next Generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures – An Overview. *Food Bioprocess Technology* 4, 876-906.

Knoll C., Fritsch S., Schnell S., Grossmann M., Rauhut D., du Toit M. (2011). Influence of simulated stress on malolactic fermentation and volatile aroma compound composition in white wines. *LWT-Food Science and Technology* 44, 2077-2086.

Knoll C., Fritsch S., Schnell S., Grossmann M., Krieger-Weber S., du Toit M., Rauhut D. (2012). Impact of different malolactic fermentation inoculation scenarios on Riesling wine aroma. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 1143-1153.

Lerm E., Engelbrecht L., du Toit M. (2010). Malolactic fermentation: The ABC's of MLF. *South African Journal of Enology and Viticulture* 31, 186-212.

Scholtz, M. (2013). Assessing the compatibility of mixed MLF starter cultures with different wine yeasts. Master thesis, Stellenbosch University.

## RESUMEN

*Los vinos con acidez alta a menudo encuentran grandes dificultades para llevar a cabo la fermentación maloláctica (FML). Por lo tanto, es importante desarrollar estrategias para realizar esta desacidificación biológica y mejorar el aroma en vinos con pH bajo. En base a nuestro cribado de cepas de pH bajo, es evidente que el éxito de FML depende de la cepa y está relacionado con el número de células presentes. Los resultados de un estudio realizado con mosto Chardonnay que presentaba un pH 3,2 y una concentración de ácido málico de 4,3 mostraron en primer lugar que utilizar una combinación levadura/bacteria adecuada es esencial para garantizar el éxito de la FML y en segundo lugar que esta combinación influye sobre el potencial aromático de las cepas malolácticas, especialmente a nivel de ésteres incluso en el caso de FML parciales. Los resultados obtenidos mostraron que *Oenococcus oeni* era mejor que *Lactobacillus plantarum*, ya que el número de células durante la fermentación fue mayor. Se estudió el efecto de diferentes estrategias de inoculación de la FML con dos cepas diferentes de *O. oeni* en vinos Riesling proveniente de zonas de clima frío (pH 2,9-3,1) y se evaluó también el perfil de los aromas volátiles del vino.*

*La duración de la fermentación fue menor en el caso de la co-inoculación que con la inoculación secuencial. Los resultados mostraron que los vinos con co-inoculación tendían a presentar una mayor concentración de ésteres etílicos y ésteres de acetato, tales como acetato de feniletilo, acetato de 3-metilbutilo, butanoato de etilo, lactato de etilo y succinato de etilo. En otro estudio que utilizó Riesling y Chardonnay y simuló las condiciones climáticas de zonas templadas y frías se demostró que un pH bajo (3,2) y concentraciones de alcohol altas (15% v / v) representaban las condiciones más difíciles para la FML, pero que incluso la FML parcial en estas condiciones tenía un efecto sobre el perfil aromático del vino final, especialmente sobre los ésteres. Los resultados también mostraron que se producían concentraciones más altas de algunos terpenos a un pH de 3,2 que a un pH de 3,8.*

**Palabras clave:** Fermentación maloláctica, Clima frío, Aroma del vino