

INFLUENCIA DE LA MICROOXIGENACIÓN EN LA COINOCULACIÓN DE BACTERIAS

Nart, Enric *¹; Álamo, Antonio ²; Brull, Anna ¹; Lerm, Elda ²; Pellerin, Patrice ²; Roselló, Jordi ¹

¹ Fundació Parc Tecnològic del Vi – VITEC. Crtra de Porrera, Km1, 43730, Falset. 977 83 19 12. Enric.nart@vitec.cat

² Oenobrand. Parc Scientifique Agropolis II, bat 5. 2196 Blvd de La Lironde. CS34603. 34397 Montpellier Cedex 5. France

Resumen / Abstract

La coinoculación de *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum* junto con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en el mosto de uva es una alternativa sencilla y eficaz que presenta ventajas económicas y de proceso. Las técnicas de microoxigenación permiten aportar el oxígeno necesario para estabilizar el color del vino, disminuir su astringencia, eliminar verdor y conseguir mayor carácter frutal. En este estudio se evalúa la influencia de la coinoculación de bacterias lácticas y levaduras en el mosto, combinada con técnicas de microoxigenación, para la elaboración de vinos tintos de la variedad tempranillo. Se han realizado microvinificaciones combinando estas dos técnicas, a partir de uva tempranillo de la denominación de origen Ribera del Duero, evaluando tanto las variables de proceso como la calidad del vino acabado. La combinación de coinoculación y microoxigenación ha permitido acortar el proceso de elaboración y mejorar las propiedades organolépticas de los vinos elaborados.

Co-inoculation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* with yeast *Saccharomyces cerevisiae* in grape must is a simple and effective alternative that offers economic and process advantages. Microoxygenation techniques allow provide the oxygen needed to stabilize wine color, decrease astringency, eliminate vegetal aroma and increase fruity character of the wine. In this study the influence of co-inoculation of lactic acid bacteria and yeasts in the must, combined with micro-oxygenation techniques for making red wines from Tempranillo is evaluated. There have been made microvinifications with combining these two techniques, using Tempranillo grapes from the appellation of origin Ribera del Duero, evaluating the results in terms of process, analytical, and sensory analysis. The combination of these techniques has allowed to shorten the winemaking process and to improve the organoleptic properties of wines produced.

Palabras clave: Coinoculación, Microoxigenación, Tempranillo, Bacterias Lácticas, Co-inoculation, Micro-oxigenation, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus plantarum*

1. Introducción

La coinoculación (inoculación de bacterias lácticas 24 horas después de la inoculación de levadura en el mosto) es un procedimiento sencillo y eficaz con ventajas económicas y de calidad de producto final. La inoculación de *O. oeni* después de la fermentación alcohólica (FAL) implica en muchas ocasiones un elevado tiempo de latencia y lentitud en la fermentación maloláctica (FML). La inoculación al inicio de la FAL permite a las bacterias adaptarse gradualmente al etanol mejorando de este modo la cinética de la FML. Esta reducción en el tiempo de vinificación implica una reducción de costes pero también ayuda a evitar el deterioro del vino reduciendo el riesgo de contaminación por microorganismos indeseados durante los prolongados periodos de latencia [1, 4, 8, 9].

El oxígeno desarrolla un papel fundamental en la definición cualitativa del vino. En exceso produce la oxidación irreversible de los antocianos libres provocando una disminución del color, así como una oxidación de los aromas. Las técnicas de microoxigenación controlada permiten aportar el oxígeno necesario al vino para favorecer la combinación de antocianos con taninos y su polimerización. De este modo se consigue

estabilizar el color del vino, disminuir su astringencia, eliminar verdor y obtener vinos con mayor carácter frutal [2, 3, 10, 11, 12].

El objetivo del presente estudio es la evaluación de la influencia de la coinoculación de *O. oeni* y *L. plantarum* con *S. cerevisiae* en el mosto, combinada con técnicas de microoxigenación, en la elaboración de vinos tintos de la variedad tempranillo. Se evaluaron la cinética y el desarrollo satisfactorio de la FAL y FML, el comportamiento de los compuestos polifenólicos del vino, la estabilidad del color y se analizó sensorialmente el vino obtenido (evaluando astringencia, verdor y fruta).

2. Materiales y Métodos

2.1 Elaboración de los vinos

El estudio se llevó a cabo en la bodega experimental de VITEC, en el municipio de Falset (Tarragona). La uva utilizada fue de la variedad tempranillo de la Denominación de Origen Ribera del Duero. Se realizaron 4 ensayos por triplicado:

1. Inoculación secuencial de *S. cerevisiae* y *O. oeni* sin aporte de oxígeno (**C-SQ**)
2. Inoculación secuencial de *S. cerevisiae* y *O. oeni* con aporte de oxígeno (**O-SQ**)
3. Coinoculación de *S. cerevisiae* y cultivo mixto de *O. oeni* y *L. plantarum*, sin aporte de oxígeno (**C-CO**)
4. Coinoculación de *S. cerevisiae* y una cultivo mixto de *O. oeni* y *L. plantarum*, con aporte de oxígeno (**O-CO**).

Las microvinificaciones fueron realizadas en depósitos de acero inoxidable de 50 litros. Las etapas en las que interviene la microoxigenación se realizaron en depósitos de 66 l fabricados específicamente para ese fin y utilizando un microoxigenador Saen4000 (Parsec S.R.L., Osmannoro, Italia). En la Figura 1 se presentan de forma esquemática las condiciones de vinificación bajo las que se realizó cada uno de los ensayos.

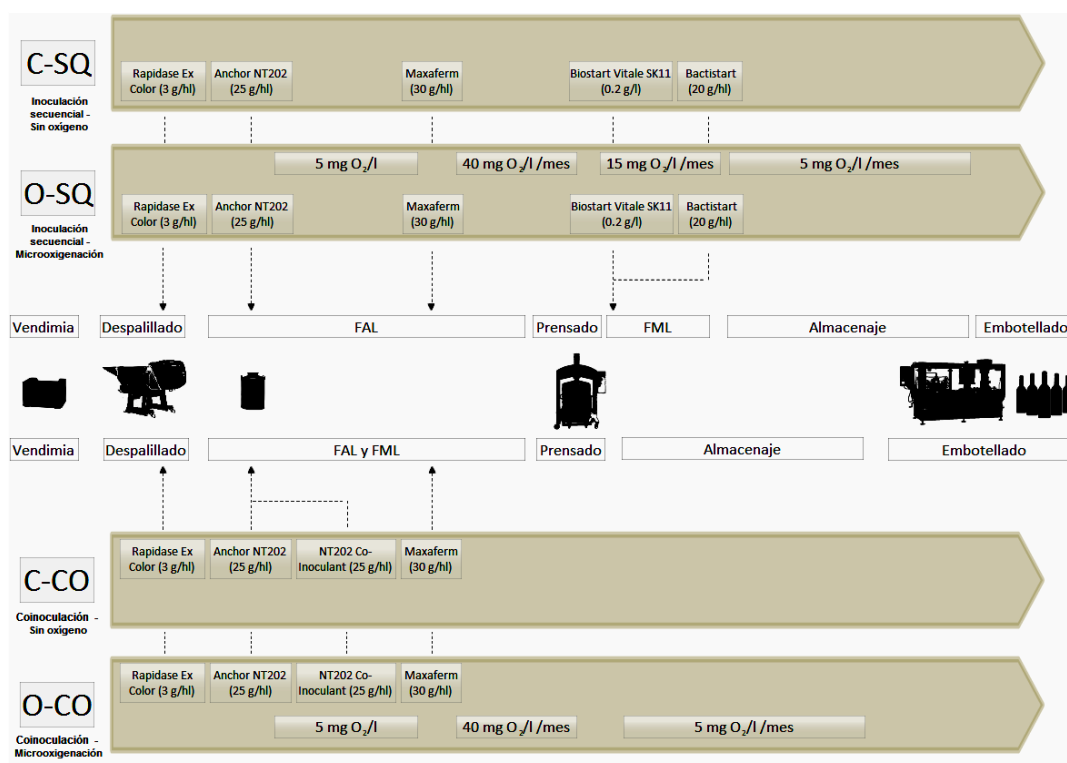


Figura 1. Esquema del proceso de vinificación para cada uno de los ensayos

2.2 Análisis químicos

Los análisis químicos básicos (pH, acidez total tartárica (ATT), SO₂ libre, grado alcohólico) se realizaron según la metodología descrita por la OIV [5]. Los análisis del ácido acético, glucosa+fructosa, ácido L-láctico y ácido L-málico se realizaron mediante la técnica enzimática de BioSystems (Barcelona, España). Los porcentajes de color (amarillo, rojo y azul), la intensidad colorante, el índice dA (%) y la tonalidad se analizaron según el método descrito por Glories, Y. (1984) [6]. Los antocianos y los taninos totales se determinaron según el método descrito por Ribéreau-Gayon, P. y Stonestreet, E. (1966) [7]. La determinación del índice de PVPP y el índice de polifenoles totales (IPT) se realizó según la metodología descrita por Glories, Y. (1984)[6].

2.3 Análisis sensoriales

El análisis sensorial de los vinos fue realizado por el panel de cata entrenado de VITEC, formado por diez degustadores. La cata tuvo lugar en la sala para análisis sensorial normalizada ISO 8589:2007 en las instalaciones de VITEC.

Se llevó a cabo una degustación descriptiva de los doce vinos sin identificar y en orden aleatorio y distinto para cada juez, para evitar el efecto fatiga y la influencia de la muestra precedente. Los resultados obtenidos se muestran en el apartado de análisis sensorial, y son las medias aritméticas de las puntuaciones otorgadas por todos los degustadores [13].

3. Resultados y Conclusiones

3.1 Desarrollo de las fermentaciones alcohólica (FAL) y maloláctica (FML)

La fermentación alcohólica se desarrolló durante 12 días de manera satisfactoria. El uso de técnicas de microoxigenación y la coinoculación de bacterias no tuvieron efecto alguno sobre la cinética de la FAL.

En las vinificaciones con coinoculación, la FML se desarrolló de manera satisfactoria, finalizando al mismo tiempo que la fermentación alcohólica (Figura 2).

En las vinificaciones con inoculación secuencial, la FML se desarrolló de manera satisfactoria y tuvo una duración de 20 días. La fase de latencia fue más prolongada en la inoculación secuencial que en la coinoculación. No se apreciaron diferencias en la cinética de fermentación debidas a la aplicación de la microoxigenación en ninguno de los casos estudiados. (Figura 2)

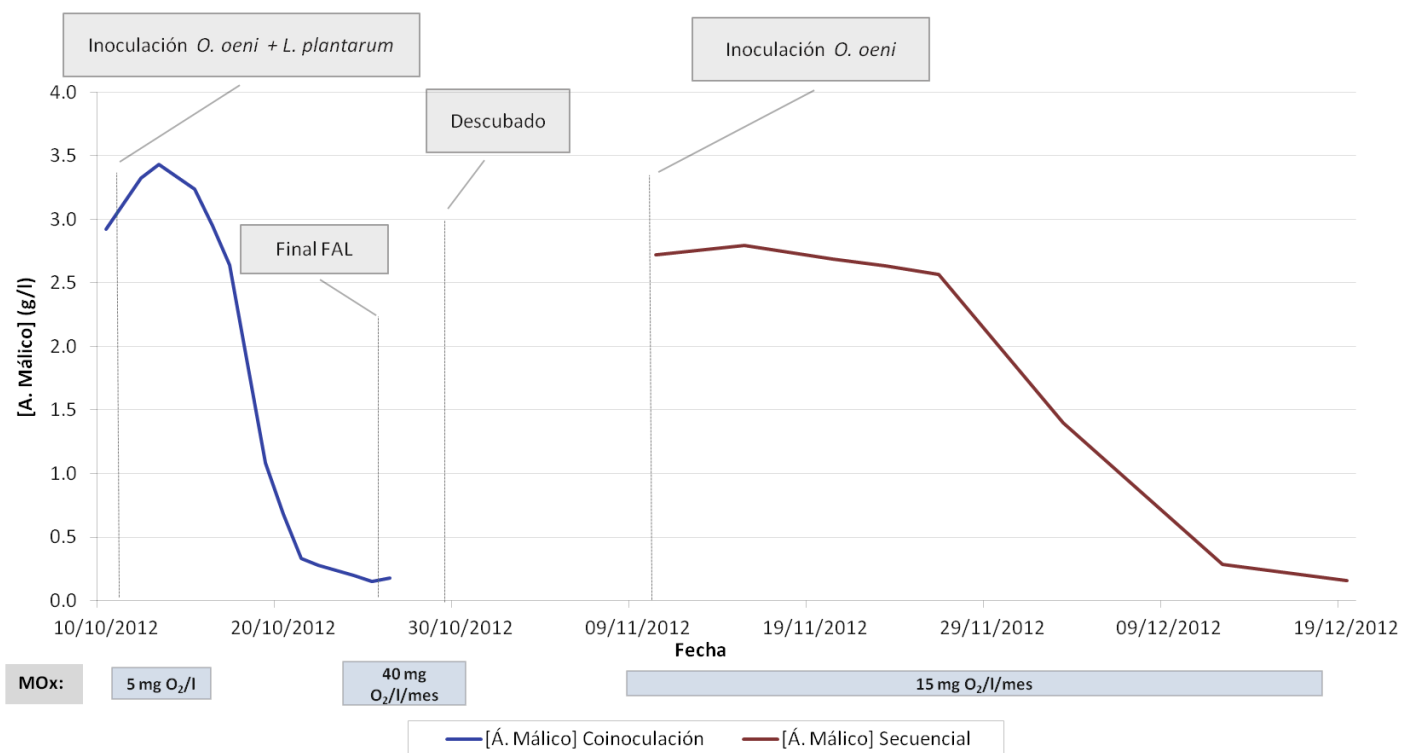


Figura 2. Comparación del desarrollo de la fermentación maloláctica entre ensayos con coinoculación e inoculación secuencial. Media aritmética de los resultados obtenidos de los distintos triplicados, agrupados por tipo de FML.

3.2 Resultados analíticos

Entre los vinos acabados de los distintos ensayos no se detectaron diferencias significativas en el grado alcohólico, la acidez total tartárica ni el pH (Tabla 1). Los experimentos con coinoculación (**C-CO** y **O-CO**) presentaron una concentración superior de ácido acético (0.5 g/l frente a 0.4 g/l de los ensayos con inoculación secuencial, $p=0.001$), diferencia no detectable sensorialmente.

En la Tabla 2 se presentan los resultados analíticos de los compuestos fenólicos del vino obtenido. Se apreciaron diferencias significativas en la concentración de taninos totales, resultando ésta inferior en los ensayos con microoxigenación (**O-CO** y **O-SQ**).

Tabla 1. Efecto de la microoxigenación en la co-inoculación de bacterias lácticas en la elaboración de vino tinto de Tempranillo (Ribera del Duero)
Resultados analítica básica. (Medias de los resultados analíticos correspondientes a los ensayos 2012)

Tratamiento	Grado Alcohólico (% vol)	Acidez Total Tartárica (g/l)	pH	Ácido Acético (g/l)
Contr. Co-Inoc. (C-CO)	14.6 a	5.3 a	4.14 a	0.5 a
Microox. Co-Inoc (O-CO)	14.5 a	5.2 a	4.13 a	0.5 a
Contr. Secuenc. (C-SQ)	14.5 a	5.2 a	4.22 a	0.4 b
Microox. Secuenc. (O-SQ)	14.4 a	5.4 a	4.17 a	0.4 b
Significancia ¹	ns	ns	ns	***

¹ *, **, ***, y ns indican la significancia a $p=0.05$, 0.01 , 0.001 y no significativa, respectivamente. Se ha utilizado el test de Tukey HSD ($p=0.05$) para establecer las separaciones entre las medias de los distintos tratamientos, considerando a y b grupos estadísticamente distintos.

Tabla 2. Efecto de la microoxigenación en la co-inoculación de bacterias lácticas en la elaboración de vino tinto de Tempranillo (Ribera del Duero)
Resultados compuestos fenólicos. (Medias de los resultados analíticos correspondientes a los ensayos 2012)

Tratamiento	IPT (Abs 280 nm)	Antocianos Totales (mg/l)	Antocianos Libres (mg/l)	Índice PVPP (%)	Taninos Totales (g/l)
Contr. Co-Inoc. (C-CO)	68.7 a	698.0 a	388.5 a	44.4 a	2.8 a
Microox. Co-Inoc (O-CO)	67.3 a	694.2 a	386.2 a	44.4 a	2.4 b
Contr. Secuenc. (C-SQ)	61.7 a	688.6 a	418.0 a	40.1 a	2.6 ab
Microox. Secuenc. (O-SQ)	59.9 a	746.1 a	517.7 a	30.6 a	2.4 b
Significancia ¹	ns	ns	ns	ns	*

¹ *, **, ***, y ns indican la significancia a $p=0.05$, 0.01 , 0.001 y no significativa, respectivamente. Se ha utilizado el test de Tukey HSD ($p=0.05$) para establecer las separaciones entre las medias de los distintos tratamientos, considerando a y b grupos estadísticamente distintos.

No se observaron diferencias de color entre las muestras microoxigenadas y las elaboradas sin adición de oxígeno. En cambio, la coinoculación sí presentó diferencias respecto a la inoculación secuencial. Los ensayos con coinoculación (**C-CO** y **O-CO**) presentaron valores significativamente más altos de intensidad colorante que los inoculados secuencialmente (**C-SQ** y **O-SQ**), así como un color menos evolucionado, con mayor porcentaje de azul (Tabla 3 y Figura 3).

Tabla 3. Efecto de la microoxigenación en la co-inoculación de bacterias lácticas en la elaboración de vino tinto de Tempranillo (Ribera del Duero) Resultados color. (Medias de los resultados analíticos correspondientes a los ensayos 2012)

Tratamiento	Intensidad Colorante	dA (%)	Amarillo (%)	Rojo (%)	Azul (%)	Tonalidad
Contr. Co-Inoc. (C-CO)	9.9 a	52.8 a	36.4 a	51.4 a	12.2 ab	0.7 a
Microox. Co-Inoc (O-CO)	10.7 a	48.7 a	36.3 a	49.4 a	14.3 a	0.7 a
Contr. Secuenc. (C-SQ)	7.4 b	53.1 a	36.7 a	51.6 a	11.7 b	0.7 a
Microox. Secuenc. (O-SQ)	6.8 b	52.5 a	37.6 a	51.3 a	11.1 b	0.7 a
Significancia ¹	***	ns	ns	ns	**	ns

¹ *, **, ***, y ns indican la significancia a $p=0.05$, 0.01 , 0.001 y no significativa, respectivamente. Se ha utilizado el test de Tukey HSD ($p=0.05$) para establecer las separaciones entre las medias de los distintos tratamientos, considerando a y b grupos estadísticamente distintos.

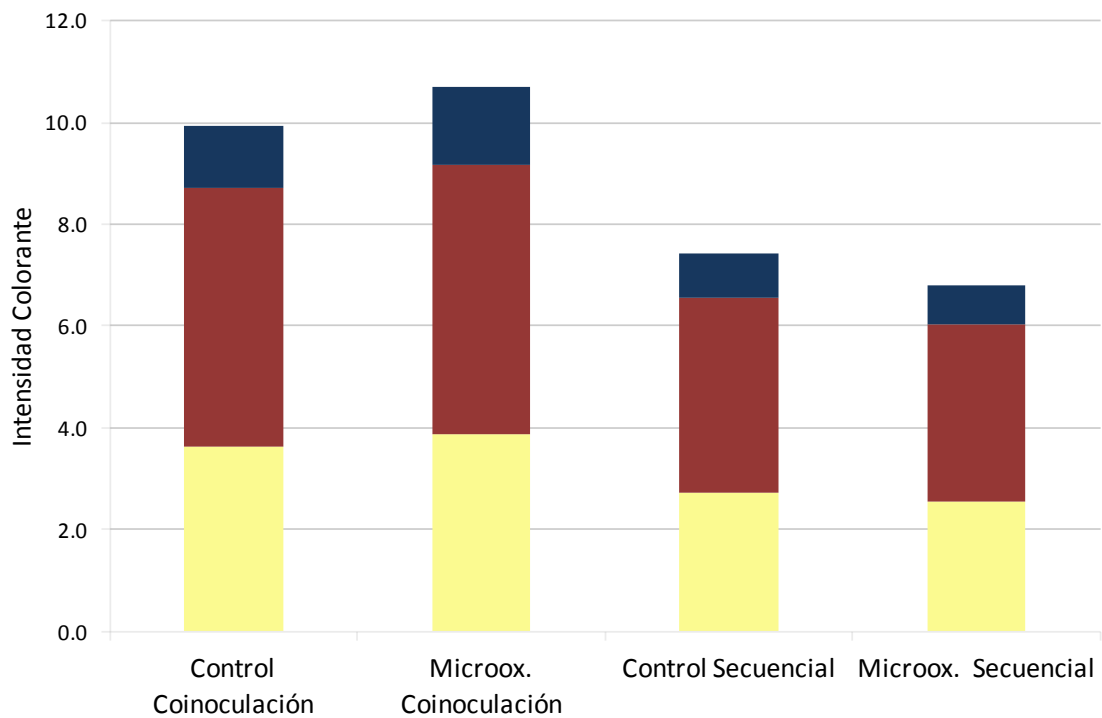


Figura 3. Comparativa del color. Azul, rojo y amarillo sobre la intensidad colorante.

3.3 Resultados del análisis sensorial

3.3.1 Aspecto olfativo y gustativo

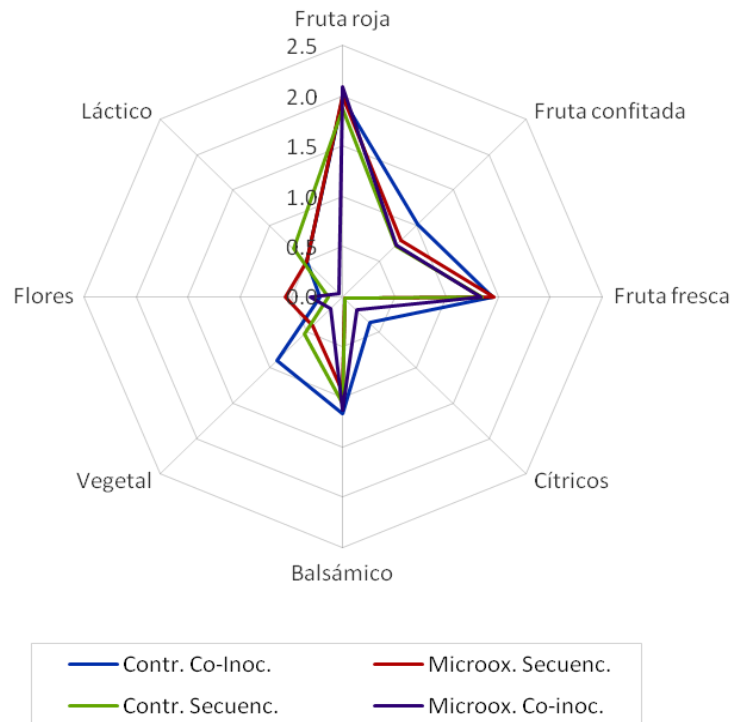


Figura 4. Diagrama de araña de los resultados obtenidos en la cata en el apartado olfativo

Se observa como los ensayos no presentan diferencias para los atributos de *Fruta roja*, *Fruta fresca* y *Balsámico*. El atributo en el que los ensayos presentan más diferencias es el de *Vegetal*, habitualmente descrito como uno de los más influenciados por la microoxigenación [2]. Considerando el aroma *Vegetal* como un atributo negativo, las puntuaciones otorgadas por el panel están en concordancia con el ranking hedónico presentado en el siguiente apartado (Figura 6).

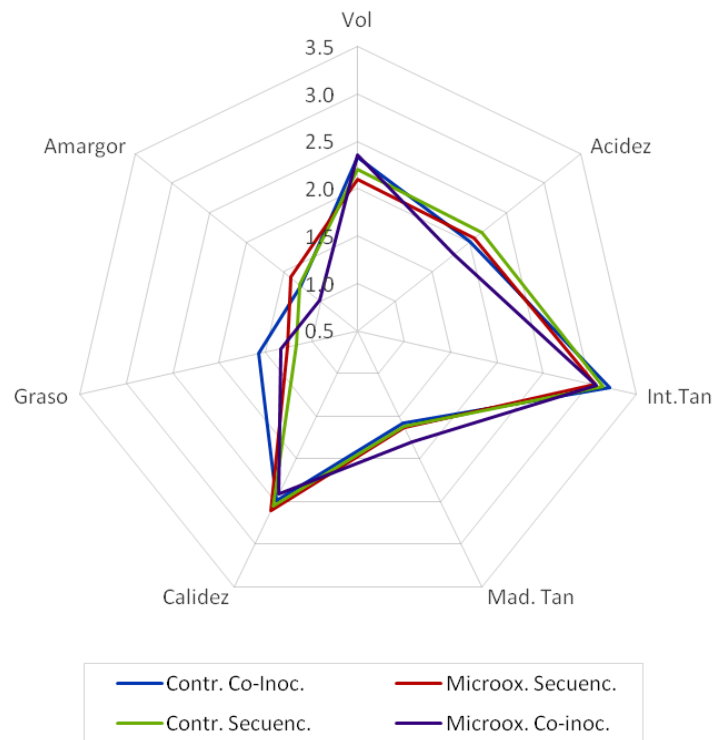


Figura 5. Diagrama de araña de los resultados obtenidos en la cata en el apartado gustativo

El panel ha considerado el vino con coinoculación y con aporte de oxígeno como el que presenta más *Madurez tánica*, menor *Acidez* y menor *Amargor*. Los experimentos con coinoculación presentan mayor *Volumen en boca* y el ensayo con coinoculación pero sin aporte de oxígeno se valoró como el más *Graso*.

3.3.2 Ranking hedónico

El panel de cata consideró que el orden cualitativo de los vinos catados fue (desde el mejor valorado):

1. Coinoculación + O₂ 2. Inoculación secuencial + O₂ 3. Inoculación secuencial sin O₂ 4. Coinoculación sin O₂

El panel presentó un alto grado de consenso, puesto que cada posición de preferencia contó con el respaldo de por lo menos siete de los diez catadores. A diferencia de los resultados analíticos presentados en el apartado 3.2, el panel de cata sí valoró el efecto de la microoxigenación durante la vinificación, colocando los vinos micro-oxigenados en las dos primeras posiciones del ranking (Figura 6):

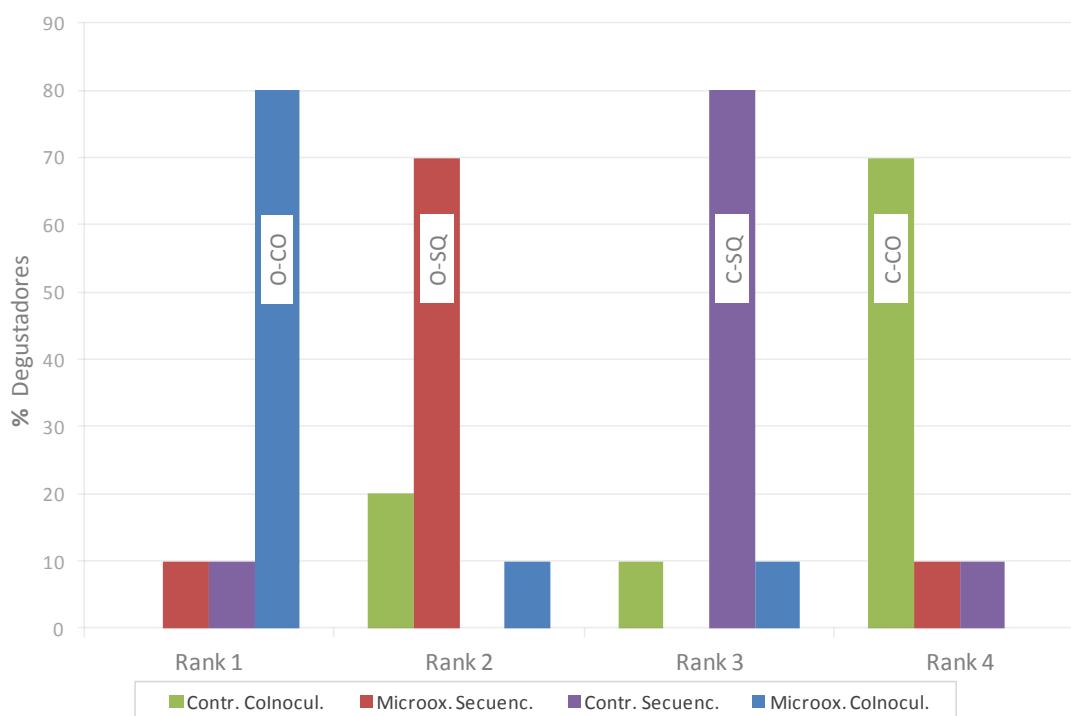


Figura 6. Ranking Hedónico. Porcentaje de jueces del panel que consideraron cada vino en la posición del ranking indicada.

3.4 Conclusiones

Se concluye que, para un mosto de tempranillo con las características iniciales presentadas:

- 1) La coinoculación de bacterias lácticas *O. oeni* y *L. plantarum* y levaduras *S. cerevisiae*, representa una muy buena opción para disminuir el tiempo de vinificación y minimizar así el riesgo de contaminación por microorganismos indeseados.
- 2) Se ha observado un aumento de la acidez volátil, a pesar de que el ácido acético se mantiene a niveles bajos, no perceptibles a nivel sensorial, y perfectamente aceptables para un vino tinto de estas características.
- 3) El uso de la microoxigenación proporciona vinos con menor intensidad de aromas vegetales y gracias a la combinación de dicha técnica con la coinoculación se obtienen vinos más frescos y redondos, aportando sensación de *Volumen* y de *Madurez Tánica*.

4. Bibliografía

- [1] Fugelsang, KC ; Edwards, CG. Fermentation and post-fermentation processing. Wine microbiology, practical applications and procedures. Springer, New York, USA. 115-138. 2007.
- [2] Pino, C ; Bartolomé, B ; Suberviola, J ; Gómez-Cordobés, C. La microoxigenación en la evolución de los polifenoles, el color y las características sensoriales de un vino tinto cv Tempranillo durante su elaboración. *Enólogos*, 52, 42 – 45. 2008.
- [3] Nevares, I ; del Álamo, M. Measurement of dissolved oxygen during red wines tank aging with chips and micro-oxygenation. *Analytica Chimica Acta*, 621, 68 – 78. 2008.
- [4] Lerm, E. ; Engelbrecht, L. ; du Toit, M. Selection and characterisation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* South African wine isolates for use as malolactic fermentation starter cultures. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 32, 280-295. 2011.
- [5] OIV. Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. Office International de la Vigne et du Vi, Paris. 2007.
- [6] Glories, Y. La couleur des vins rouges II. *Conn. Vigne Vin*, 18, 253. 1984.
- [7] Ribéreau-Gayon, P. ; Stonestreet, E. Le dosage des tanins dans le vin rouge et détermination de leur structure. *Chimie Anal*, 48, 188-197. 1966.
- [8] Pintado, J. ; Rimbault, M ; Guyot, JP. Influence of polysaccharides on oxygen dependent lactate utilization by an amylolytic *Lactobacillus plantarum* strain. *Int J. Food Microbiol*, 98, 81-88. 2004.
- [9] Hidalgo, J. Tratado de enología. Vol 2. 2ª ed. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 2003.
- [10] Álvarez, J.M.; Tanino: la revolución enológica. Mito o realidad. *Revista Enología*, nº2, año IV, Mayo-Junio, 1-15. 2007
- [11] Zamora, F. Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos. AMV ediciones Mundi Prensa, Madrid, 2003.
- [12] Biondi, A. ; Cavini, F. ; Basquiat, M ; Oxygène et vin. Du rôle de l'oxygène à la technique de micro-oxygénation. Parsec Edition, Firenze, 2008.
- [13] UNE-ISO. Análisis Sensorial. 2ª ed. AENOR, Madrid, 2010.