

Bioquímica de las bacterias lácticas del vino y la fermentación maloláctica

Albert Bordons y Cristina Reguant

La principal fermentación del vino es la alcohólica, producida por las levaduras. Ahora bien, como el mosto y los recipientes donde tiene lugar la vinificación no son estériles, aparte de las levaduras (autóctonas o inoculadas) también hay otros microorganismos como las bacterias acéticas y las bacterias lácticas. El papel beneficioso más conocido de las bacterias lácticas en los vinos es la fermentación maloláctica, que da lugar a una desacidificación del vino.

Las bacterias lácticas o bacterias del ácido láctico son bacterias grampositivas de bajo contenido en G+C. Tienen en común el hecho de producir ácido láctico a partir de azúcares, debido a su metabolismo exclusivamente fermentativo, sobre todo la fermentación láctica. Por eso son anaerobias, si bien toleran el oxígeno. Son, por tanto, *anaerobias aerotolerantes*. Desde el punto de vista metabólico, tienen unos requerimientos nutritivos complejos (aminoácidos, vitaminas, etc.).

El *vino* es un alimento fermentado cuya fermentación principal es la alcohólica que llevan a cabo las levaduras. Ahora bien, como el mosto y los recipientes donde tiene lugar la vinificación no son estériles, aparte de las levaduras (autóctonas o inoculadas) también hay otros microorganismos, como las bacterias acéticas y las bacterias lácticas.

El número de bacterias lácticas durante la fermentación alcohólica normalmente es muy bajo, como mucho 10^2 por mL, ya que la mayoría son inhibidas por el etanol y por el SO_2 añadido al mosto para

controlar la población bacteriana, especialmente las acéticas. Cuando la alcohólica termina y las levaduras mueren, algunas bacterias lácticas pueden prosperar y conseguir un cierto crecimiento, en ocasiones, hasta 10^7 por mL. Estas bacterias lácticas producen algunas transfor-

maciones en el vino, de las cuales la más interesante es la llamada *fermentación maloláctica* (FML). Las bacterias lácticas que se pueden aislar en muestras de mostos y vinos son de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* y, sobre todo, de *Oenococcus*.

Oenococcus oeni

Oenococcus oeni es la principal especie de este género, nombre que fue propuesto¹ para la especie conocida hasta entonces como *Leuconostoc oenos*.² Antes se consideraban *Leuconostoc* porque son cocos y realizan la fermentación heteroláctica, o sea, que fermentan los azúcares produciendo otros compuestos además de ácido láctico, sobre todo CO_2 y también acético y etanol en pequeñas cantidades. Sin embargo, *Oenococcus* tiene unas características exclusivas, que lo hacen diferente de *Leuconostoc*: su hábitat es exclusivamente el mosto y el vino, pueden

crecer al pH del vino (entre 3 y 4), y toleran el etanol, un 10% (v/v) y más. *O. oeni* es la especie predominante en la FML de vinos, si bien en algunos casos se ha comprobado que esta fermentación la realizan otras especies, como *Lactobacillus plantarum*.

El dato más relevante para proponer que *Oenococcus* era otro género distinto fue la comprobación, por comparación de las secuencias del RNA ribosomal, de que filogenéticamente está bien separado de *Leuconostoc* y otras especies de bacterias lácticas.

► Bioquímica de la fermentación maloláctica

El papel más beneficioso conocido de las bacterias lácticas en los vinos es la FML, que da lugar a una desacidificación del vino. El mosto de la mayoría de las uvas, excepto los de climas muy cálidos, contiene una cierta cantidad de ácido L-málico (1-5 g/L), que tiene un sabor fuerte y áspero. Normalmente, después de la fermentación alcohólica, si bien muy ocasionalmente de forma simultánea a esta, las bacterias lácticas como *O. oeni* pueden realizar esta FML, que es la descarboxilación del L-málico en L-láctico, con desprendimiento de CO₂ que aparece como pequeñas burbujas en el vino. Esta reacción es llevada a cabo porque dichas bacterias tienen el enzima maloláctico (fig. 1), que requiere Mn²⁺ y NAD⁺. Como el málico es dicarboxílico y el láctico es monocarboxílico, esto conlleva una reducción de la acidez, de 0,1 a 0,5 unidades de pH.

Desde el punto de vista metabólico, la FML no es una fermentación clásica como la misma láctica donde se utilizan azúcares como sustratos y obtienen ATP por fosforilación a nivel de sustrato en las reacciones de la glucólisis. La FML solamente es una descarboxilación que no parece que conlleve, en principio, ningún beneficio energético a las células que la realizan, y donde el único beneficio aparente sería la subida del pH externo. Sin embargo, se ha descubierto que la FML es una de las fermentaciones peculiares con ATP sintasa, ya que la salida del

L-láctico de las células (fig. 1) se efectúa mediante un simport con protones,³ y que paralelamente hay una entrada de protones a favor de gradiente (el pH externo es 3-4 y el interior es superior a 6), mediante una ATP sintasa, que lo acopla a la síntesis del ATP.

Así pues, *O. oeni* puede obtener algunos ATP por la descarboxilación del málico en un medio como el vino donde prácticamente no hay azúcares. Estos ATP, junto con algunos nutrientes remanentes de los restos de las levaduras, pueden permitir un ligero crecimiento de estas bacterias en el vino.

Desde el punto de vista enológico, esta desacidificación del vino conlleva al mismo tiempo una mejora en su calidad, al reducir la sensación de aspereza del málico. Además, el ácido L-láctico que aparece es más agradable y suave a la cata.

► Otros aspectos beneficiosos del metabolismo de las bacterias lácticas en el vino

Un aspecto interesante desde el punto de vista enológico consecuencia de la pequeña subida de pH de la FML es que el color del vino tinto, debido sobre todo a los antocianos como la malvidina, evoluciona hacia tonalidades menos intensas y no tan rojas, lo que los hace más interesantes visualmente.

Desde el punto de vista organoléptico, la FML conlleva una mejora del vino porque

además de la desacidificación, el desarrollo de las bacterias provoca cambios en los contenidos de los diversos compuestos orgánicos del vino.

Aparte del L-málico, el cítrico es otro importante ácido orgánico metabolizado por las bacterias lácticas del vino. Se ha comprobado que *O. oeni*,⁴ al igual que muchas otras bacterias, capta el citrato y lo metaboliza dando lugar a diversos compuestos (fig. 2). De todos estos, el diacetilo se considera el más importante por su aroma a mantequilla o nata (aromas lácteos) que caracteriza a muchos vinos que han realizado la FML. Aparece en pequeñas concentraciones (hasta 2 mg/L) aunque tiene un umbral de detección sensorial muy bajo.⁵ El diacetilo se forma químicamente por descarboxilación oxidativa del alfa-acetolactato, un intermediario inestable. Por otro lado, en función de las condiciones, el diacetilo puede ser utilizado por las mismas bacterias convirtiéndolo en acetoina y 2,3-butanodiol, mucho menos aromáticos.

Las bacterias lácticas del vino también pueden producir pequeñas cantidades de exopolisacáridos, que se unen con los taninos, responsables de la astringencia de los vinos jóvenes, con lo cual baja la astringencia y el vino se vuelve más agradable.

Otro beneficio muy importante es la estabilidad microbiológica que se consigue con la FML. Los vinos donde esta ha tenido lugar pueden ser embotellados sin el riesgo de un posible desarrollo bacteriano posterior, que podría dar lugar a la formación de CO₂. Las bacterias lácticas agotan el málico y otros nutrientes como los azúcares, con lo cual es mucho más difícil el crecimiento posterior de otras bacterias.

► Posibles perjuicios de las bacterias lácticas en los vinos

En algunas ocasiones, el desarrollo de las bacterias lácticas puede tener consecuencias negativas para la calidad de los vinos. Afortunadamente, la mayoría de estos casos se producen de forma muy esporádica, sobre todo cuando ha habido otros problemas previos a la fermentación o de poco control de la vinificación.

De estos posibles perjuicios, el más frecuente es el *picado láctico*, debido a la producción bacteriana de una cierta can-

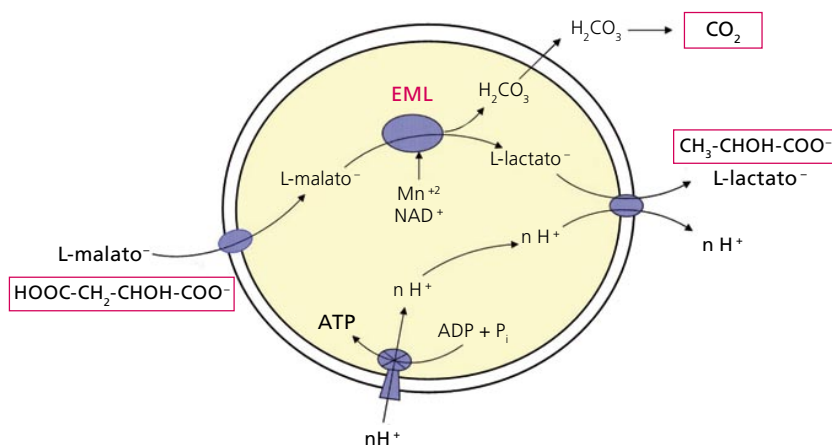


Figura 1. La fermentación maloláctica: conversión de L-málico a L-láctico y CO₂ por el enzima maloláctico (EML) de células de bacterias lácticas como *Oenococcus oeni*

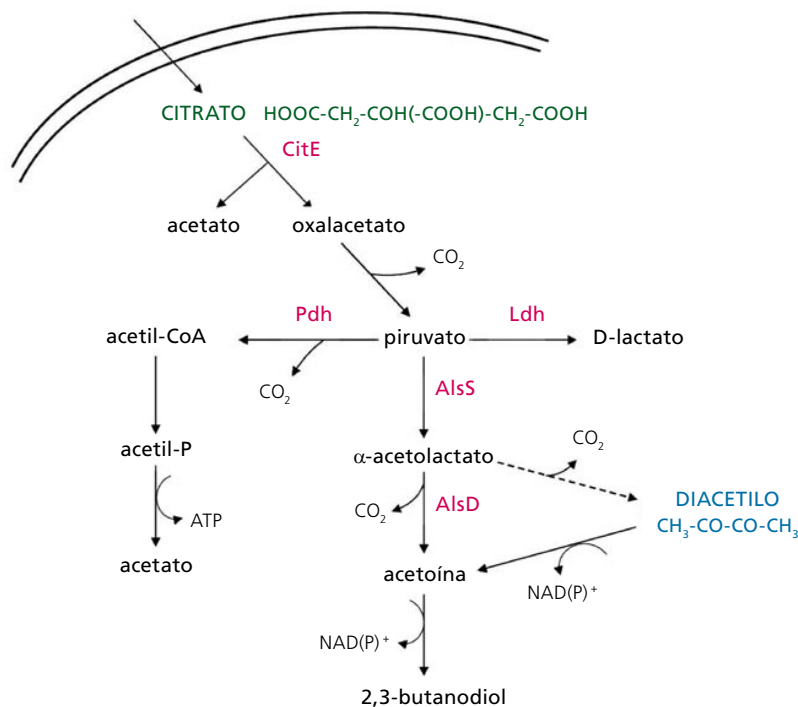


Figura 2. Utilización de citrato por las bacterias lácticas del vino como *O. oeni*

Los principales enzimas implicados son: CitE: citrato liasa; Pdh: piruvato deshidrogenasa; Ldh: lactato deshidrogenasa; AlsS: acetolactato sintasa; AlsD: acetolactato descarboxilasa. La línea discontinua hacia diacetilo indica una reacción no enzimática.

especies de bacterias lácticas como productoras de aminas biógenas, que incluyen *L. hilgardii*, *L. brevis*, *L. buchneri* y *Pediococcus parvulus*.^{6,7} Dichas especies son consideradas como contaminantes durante el proceso de vinificación, por lo que generalmente la aparición de aminas biógenas se asocia a falta de higiene en las prácticas enológicas. Algunas cepas de *O. oeni* también pueden producir ciertas cantidades de aminas biógenas como histamina y, en menor grado, putrescina, aunque las especies mayoritariamente responsables de elevados contenidos de estas aminas biógenas en vino son *L. hilgardii* y *P. parvulus*.⁸ La detección de los genes que codifican los enzimas responsables de la producción de aminas biógenas, como el de la histidina descarboxilasa (*hdc*) en el caso de la histamina, puede ser una herramienta para la selección de cepas de *O. oeni* que carezcan de estos genes.⁹

Carbamato de etilo

Otro compuesto tóxico, el carbamato de etilo, cancerígeno de carácter genotóxico, es detectado en algunos vinos en concentraciones muy bajas (unos 20 µg/L). Aunque el principal precursor del carbamato de etilo en vino por reacción con el etanol es la urea excretada por levaduras, otros precursores del carbamato de etilo que también reaccionan con el mismo son los productos de degradación de la arginina (como la citrulina) por parte de diversas especies de bacterias lácticas mediante la vía de la arginina deiminasa (ADI) (fig. 4). *O. oeni* presenta una capacidad variable de degradación de arginina y los genes de la ruta ADI se encuentran en gran cantidad de sus cepas. Sin embargo, algunas cepas de especies consideradas contaminantes, como *L. brevis* y *L. buchneri*, acumulan mayores cantidades de citrulina que *O. oeni*.¹⁰

tividad de láctico y también de acético. Cuando en el vino hay azúcares residuales que las levaduras no hayan consumido por diversos problemas de paradas de la fermentación alcohólica, las bacterias pueden consumirlos y proliferar, haciendo la fermentación láctica y, por tanto, produciendo D-láctico, mientras que en la FML a partir de L-málico aparece L-láctico. Dado que *Oenococcus*, *Leuconostoc* y algunos *Lactobacillus* (como *L. brevis* y *L. hilgardii*) hacen la fermentación heteroláctica, además de láctico producen ácido acético a partir de azúcares. Sin embargo, las especies homofermentativas como *Pediococcus* y otros *Lactobacillus* también pueden producir ácido acético a partir de pentosas.

En algunos vinos poco ácidos, la FML llevada a cabo por las bacterias lácticas puede dar lugar a una desacidificación excesiva, lo que no es conveniente porque parte del carácter del vino se pierde si es poco ácido y, además, el pH más alto puede favorecer el crecimiento de otras bacterias perjudiciales.

Solo hay dos compuestos en el vino que pueden ser tóxicos para los humanos y

sean debidos a las bacterias lácticas: las aminas biógenas y el carbamato de etilo.

Aminas biógenas

Las aminas biógenas pueden llegar ocasionalmente en algunos vinos a más de 10 mg/L y su consumo puede comportar varias patologías, desde migrañas hasta trastornos cardíacos. Las principales aminas biógenas asociadas al vino son la putrescina, histamina, tiramina y cadaverina. Son el producto de la descarboxilación de diferentes aminoácidos presentes en el vino (fig. 3). Se han caracterizado diversas

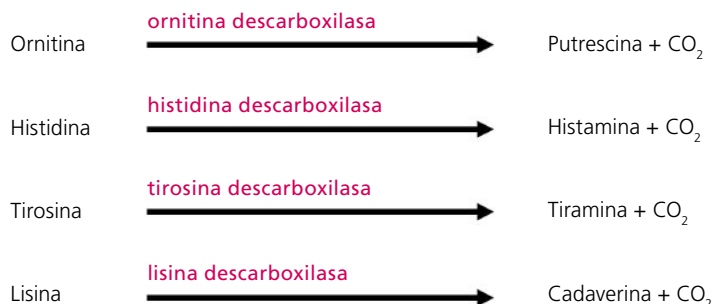


Figura 3. Producción de las principales aminas biógenas asociadas al vino a partir de la descarboxilación de aminoácidos mediante los enzimas indicados

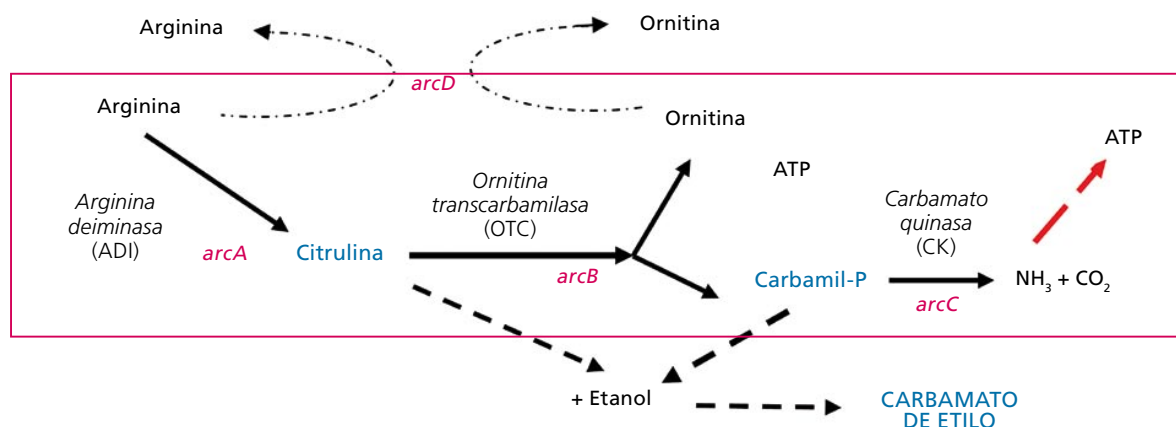


Figura 4. Ruta de la arginina deiminasa de las bacterias lácticas, con la posible acumulación de citrulina y carbamil-fosfato, precursores de la producción de carbamato de etilo mediante reacción con el etanol

Los nombres de los genes de la ruta ADI se indican en rojo.

Por otra parte, se ha comprobado que el ácido L-málico inhibe el consumo de arginina.¹¹ Así pues, un buen control del momento de finalización de la FML e inmediata estabilización del vino es clave para evitar el consumo de arginina y la posible acumulación de precursores de carbamato de etilo.

► Causas de no realización o retrasos de la fermentación maloláctica

El vino es un medio hostil para los microorganismos, en general, y para las bacterias lácticas, en particular. A diferencia del mosto que es un medio rico en componentes nutritivos (fundamentalmente azúcares), el vino es un medio mínimo, y con los problemas agravantes de contener etanol, que es un buen antimicrobiano, tener un pH relativamente ácido, y con una cierta concentración de sulfuroso añadido durante la vinificación.

El pH del vino es uno de los principales factores que afectan al comportamiento de las bacterias lácticas. Si bien su pH óptimo es alrededor de 4,5, pueden efectuar la FML a pH normales de los vinos (alrededor de 3,5), pero tienen muchas dificultades a pH inferiores a 3,2. En cuanto al etanol, por encima del 10%, la reducción de la actividad de la FML ya empieza a ser manifiesta, dando lugar a retrasos en su finalización cuanto más etanol tiene el vino, si bien esta influencia depende mucho de las cepas. Así pues, *O. oeni* se caracteriza por ser más resistente, a diferencia de varios *Lactobacillus* que resultan más afectados. En cualquier

caso, la concentración máxima de etanol que permite la realización de la FML es del 15% (v/v).

En los últimos años, se han realizado numerosos estudios sobre la respuesta de *O. oeni* a los factores de estrés asociados al vino, como el elevado contenido en etanol o el bajo pH. En este sentido, han sido caracterizadas diversas proteínas de estrés, como Hsp18, y reguladoras, como CtsR.^{12,13} Han sido también descritos otros mecanismos que ayudan a *O. oeni* a sobrevivir en condiciones desfavorables en función de las condiciones del medio y del estado de crecimiento. Respecto a la respuesta al pH ácido, los genes involucrados serían los relacionados con la degradación de ácidos presentes en el vino, como el málico y el cítrico, asociados a bombas de protones que ayudan a mantener la homeostasis del pH interno.¹⁴ El sistema ATPasa de membrana responde a la demanda de transporte de protones acoplada al catabolismo de sustratos, con la consiguiente producción de energía para la célula. Así pues, la actividad ATPasa y los mecanismos asociados a esta, como la propia FML, contribuirían a evitar la acidificación del medio interno favoreciendo el crecimiento celular.

Respecto a la toxicidad del etanol, esta se asocia al aumento de permeabilidad de la membrana celular debido a modificaciones en la composición lipídica.¹⁵ El aumento de la permeabilidad supone un incremento del transporte pasivo hacia el interior de la célula, provocando una acidificación del medio interno. Así pues, los mecanismos que contribuyen a la respuesta al pH ácido estarían también

relacionados con la tolerancia al etanol. Por otra parte, los cambios físicos y de composición en la membrana celular son cruciales para la defensa contra agentes de estrés externos.

La respuesta asociada al estrés es variable dependiendo de la cepa de *O. oeni* y se ha observado que los niveles de transcripción de determinados genes puede ser un indicador del comportamiento metabólico durante la FML de dichas cepas.¹⁶ #

Albert Bordons y Cristina Reguant
GRUPO DE BIOTECNOLOGÍA ENOLÓGICA,
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
Y BIOTECNOLOGÍA
FACULTAD DE ENOLOGÍA DE TARRAGONA,
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI (URV)

► Bibliografía

Puede consultar la bibliografía de este artículo en www.sebbm.com/revista



► Bibliografía general recomendada

- García M.J., Zúñiga M., Uruburu F.: Revisión: El metabolismo y el control de las bacterias lácticas en el vino. *Rev Esp Ciencia Tecnol Aliment* 1992; 32: 233-68.
- Henick-Kling T.: Malolactic fermentation. En: G.H. Fleet (ed.). *Wine microbiology and biotechnology*. Amsterdam: Harwood Academic, 1993: 289-326.
- Liu S.Q.: Malolactic fermentation in wine - beyond acidification (A review). *J Appl Microbiol* 2002; 92: 589-601.
- Lonvaud-Funel A.: Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Ant van Leeuwenhoek* 1999; 76: 317-31.