EDICIÓN INTERNACIONAL

ISSN: 1668-3889

INFORMACIÓN TÉCNICA PARA LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA

ENOLOGIA®

REVISTA Nº 5 AÑO III
Viticultura, Enología y Marketing Profesional
NOVIEMBRE -DICIEMBRE 2006
Mendoza - Argentina

- Aplicación del Sistema Cie-Lab a los vinos tintos. Correlación con algunos parámetros tradicionales
- Influencia del crecimiento de cepas de levaduras *no-Saccharomyces* sobre el metabolismo de compuestos nitrogenados en bacterias lácticas del vino
- Siembra simultánea de bacterias y levaduras para inducir la fermentación - 2da parte
- La variedad de uva como factor de diferenciación de los vinos
- Consideraciones sobre los "golpes de calor"
- Sistemas de conducción: Influencia de la arquitectura y de la tela antigranizo sobre El microclima lumínico
- Vid y Agua: Revisión de conceptos
- Enfermedades de la vid provocadas por virus
- Reflectores sobre los proveedores y la sustentabilidad
- Éxito a largo plazo
- Exportaciones vitivinícolas de Chile

En la INTERVITIS INTERFRUCTA unos 600 expositores de todo el mundo presentan innovaciones para sectores como por ejemplo :

- Técnicas de cultivo para la viticultura y la fruticultura
- Cultivo y procesamiento de las cosechas
- Vinicultura
- Envasado, cierre y embalaje
- Distribución y organización

INTERVITIS INTERFRUCTA

INTERVITIS INTERFRUCTA

Feria Internacional Tecnológica para Vino, Frutas y Zumos de Frutas

Del 22 al 26 abril de 2007 Messe Stuttgart

www.intervitis-interfructa.de

www.revistaenologia.com

INFLUENCIA DEL CRECIMIENTO DE CEPAS DE LEVADURAS NO-SACCHAROMYCES SOBRE EL METABOLISMO DE COMPUESTOS NITROGENADOS EN BACTERIAS LÁCTICAS DEL VINO

M. E. Farias[1,2], P. A. Aredes Fernandez[2], O. A. Sosa[1] y M.C. Manca de Nadra[1,2*]

[1] Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), y Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, 4000 Tucumán, Argentina.

[2] Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

mcmanca@unt.edu.ar

La ocurrencia de la fermentación maloláctica en algunos vinos puede ser deseable. Pero su manejo presenta una compleja gama de factores que influyen en el cumplimiento de los resultados buscados. Entre ellos, no hay que descuidar a los microorganismos que se desarrollaron previamente en el medio, pudiendo empobrecerlo en elementos nutricionales y/o enriquecerlo de otros que pueden limitar el crecimiento y desarrollo de las bacterias lácticas. El presente artículo evalúa el desarrollo de dos especies de bacterias lácticas en medios donde previamente tuvo la oportunidad de desarrollarse durante tiempos variables una cepa de levadura de tipo no-Saccharomyces.

Malolactic fermentation could be desirable in several wines. But there is a wide range of factors that influences the expectable results and makes difficult its management. Among them, it is important to consider also the microorganisms that previously developed in the medium. These microorganisms could spoil the medium, either by the consumption of nutritional elements or production of inhibitor substances that may interfere on lactic acid bacteria growth. This article shows the results of an experiment that includes the growth of two lactic acid bacteria in media with different times of a previous non-Saccharomyces yeast growth.

Palabras claves: Bacterias lácticas, levaduras no-Saccharomyces, vino.

Keywords: Lactic acid bacteria, Non-Saccharomyces yeast, Wine.

Resumen

Se llevó a cabo un estudio comparativo de la influencia del metabolismo de Hanseniaspora uvarum sobre el desarrollo y la fisiología de dos bacterias lácticas implicadas en la vinificación: Lactobacillus hilgardii 5w y Oenococcus oeni X_2L. A distintos tiempos del desarrollo de la levadura en el medio de jugo de uva, el caldo fermentado fue inoculado con L. hilgardii u O. oeni y se incubó por 48hs a 30°C. Cuando O. oeni creció en el sobrenadante del cultivo luego de 0, 3 y 8 horas del desarrollo de la levadura (M1, M2 y M3 respectivamente), la tasa de crecimiento y la biomasa final no se vieron modificadas. Con L. hilgardii se observó una disminución de ambos parámetros. Luego de 12, 24 y 34 horas de desarrollo levaduriano (M4, M5 y M6, respectivamente), los resultados para ambos microorganismos fueron similares: la tasa de crecimiento aumentó y la masa celular final disminuyó. Cuando O. oeni fue inoculado en los medios M1, M2 y M3, se observó una disminución inicial de las proteínas directamente relacionada a la producción de aminoácidos. Con L. hilgardii las concentraciones de aminoácidos y de proteínas disminuyeron. En los medios M4, M5 y M6, O. oeni mostró que las concentraciones de proteína permanecieron constantes y las concentraciones de aminoácidos disminuyeron. Los resultados obtenidos con L. hilgardii fueron distintos con una mayor tasa de consumo de proteínas sin modificación significativa de los aminoácidos. El incremento de aminoácidos en las primeras horas del crecimiento de O. oeni podría regular la producción de proteasas alcanzando el equilibrio entre la producción y utilización de aminoácidos. La elevada actividad proteolítica en L. hilgardii podría ser responsable del incremento de aminoácidos a pesar de su consumo.

Introducción

Las fermentaciones alcohólica y maloláctica son los principales procesos que tienen lugar en la vinificación. Las levaduras transforman los azúcares a etanol, pero al mismo tiempo juegan un rol importante en la producción de ácidos orgánicos y productos volátiles finales en las bebidas alcohólicas. La fermentación maloláctica sigue siendo un proceso controlado imperfectamente, puesto que muchos factores nutricionales y físico-químicos afectan el crecimiento y metabolismo de las bacterias lácticas. Algunos de ellos dependen de la cepa de levadura utilizada, proveyendo distintas cantidades de aminoácidos, péptidos y vitaminas dis-

ponibles que actúan como factores de crecimiento para el desarrollo de las bacterias lácticas, o sobre la presencia de productos metabólicos que actúan como inhibidores. Algunos estudios han revisado la importancia del nitrógeno de la fuente, del transporte, del destino metabólico y de la influencia sobre la fermentación llevada a cabo por la levadura Saccharomyces cerevisiae.

Desafortunadamente, existe muy poca información sobre el metabolismo del nitrógeno de especies de levaduras vínicas no-Saccharomyces. Estudios cuantitativos recientes sobre la ecología de la vinificación mostraron que especies No-Saccharomyces (especialmente Hanseniaspora uvarum (Kloeckera apiculata) y Candida stellata) sobreviven durante la fermentación alcohólica en niveles significativos por períodos más prolongados de lo que se pensaba anteriormente y crece a poblaciones máximas de 10^6 -10^7 ufc. ml^{-1} (Fleet et al., 1984; Heard y Fleet, 1985; Pardo et al., 1989). Tal crecimiento fue considerado de ser cuantitativamente significativo y de influenciar probablemente la composición química del vino.

Llevamos a cabo un estudio comparativo de la influencia del metabolismo de Hanseniaspora uvarum sobre el crecimiento y fisiología del nitrógeno de dos bacterias lácticas involucradas en la vinificación. Lactobacillus hilgardii 5w, un microorganismo perjudicial, con efecto ecológico negativo como el peróxido de hidrógeno (Rodríguez y Manca de Nadra. 1995a, b) y la producción de histamina (Farias et al., 1995; Farias et al., 1996), y Oenococcus oeni X_2L, un microorganismo beneficial con óptimas propiedades tecnológicas.

Materiales y Métodos

a- Microorganismos y Condiciones culturales

Lactobacillus hilgardii 5w, Oenococcus oeni X_2L y Hanseniaspora uvarum ca12 (Kloeckera apiculata) fueron aislados de vinos Argentinos. Las levaduras y bacteria lácticas fueron cultivadas en un medio basal que contiene por litro: extracto de levadura, 10g; glucosa, 5g; tween 80, 1ml y jugo de uva, 57 ml. Cuando se indicó, se agregó 1% KNO_3 al medio de cultivo. El pH fue ajustado a pH de 4.8 con HCl 0.1 M previo esterilización por autoclave durante 15 min. a 121°C.

b- Cultivos Secuenciales en Medio Líquido

Un balón tapado de 250 ml, conteniendo 200 ml de medio basal, fue inoculado con una cepa de levadura e incubado a 30°C. En distintos tiempos (0, 3, 8, 12, 24 y 34h), 20 ml del caldo fermentado fue colectado y se realizó el conteo del número de células viables. Los sobrenadantes del cultivo de levadura y bacterias fueron usados para mediciones analíticas.

c- Mediciones analíticas

En distintos tiempos del desarrollo, las células fueron centrifugadas y el sobrenadante fue usado para las determinaciones de las actividades proteolíticas. Usando jugo de uva autoclavado como sustrato, los aminoácidos fueron determinados por el método de Cd-ninhidrina modificado (Doi et al., 1981). Luego de 1 hora de incubación a 30°C, la reacción fue detenida mediante el agregado de 0.65ml de ácido tricloroacético 24% (TCA). A una muestra del sobrenadante con TCA (20-100 µl, dependiendo de la concentración de aminoácidos) se le agregó 1.7 ml del reactivo Cd-ninhidrina (se disolvió 0.8 g de ninhidrina en una mezcla de 80ml de etanol 99.5% y 10 ml de ácido acético, seguido de la adición de 1 g de $CdCl_2$ disuelto en 1 ml de agua destilada). La mezcla fue calentada a 84°C por 5 minutos, luego enfriada y se le realizó la determinación de absorbancia a 507 nm. La absorbancia para cada muestra fue ajustada al valor producido por 1 $mmol.l^{-1}$ de una solución de leucina. El coeficiente de absorción molar de leucina $\&_M$ (M^{-1} cm^{-1}) fue obtenido a partir de: $\&_M$ = absorbancia (1 mol l^{-1} de muestra) x (volumen total/volumen de muestra) x 10^3.

La concentración de aminoácidos fue determinado como sigue:

$$(mmol^{-1}) = \frac{\text{Absorbancia x dilución}}{\varepsilon M \text{ leucina}}$$

Determinación de proteínas: Las proteínas de las muestras se determinaron por la reacción con Azul brillante de Coomassie G-250 (Bradford, 1976). La calibración se realizó usando albúmina de serum bovino (BSA) (Compañía Química Sigma).

Resultados y discusión

La Figura 1 muestra a Hanseniaspora uvarum ca12, creciendo en un medio basal. El final de la fase de crecimiento exponencial fue alcanzado en 12 horas de incubación a 30°C. Tras 34 horas de desarrollo, se observó una disminución en el número de células (de 3.1 x 10^7 ufc ml^{-1} en 24 horas a 5.0 x 10^6 ufc ml^{-1} en 34 horas de incubación).

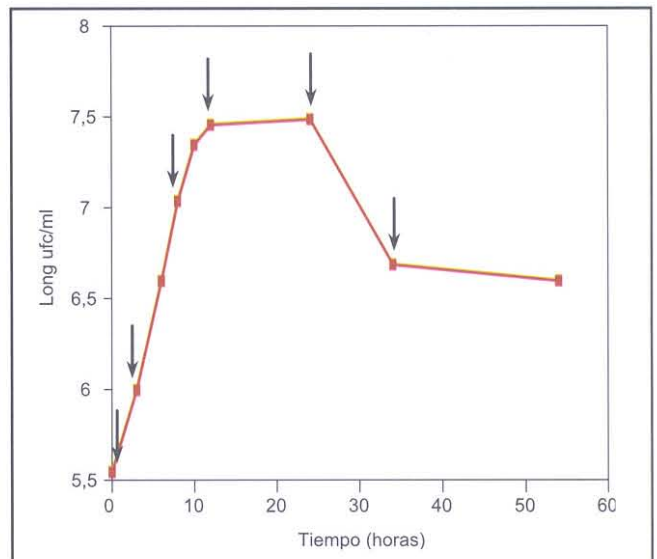

Figura 1. Crecimiento de Hanseniaspora uvarum en un medio basal. Las flechas indican el tiempo al cual se tomó el sobrenadante para la inoculación secuencial de bacterias (0horas: M1; 3hs: M2; 8 hs: M3; 12hs: M4; 24h: M5; y 34 hs: M6).

La Tabla 1 muestra los parámetros de la dinámica de crecimiento obtenidos con el crecimiento de Lactobacillus hilgardii 5w y Oenococcus oeni en el medio basal de cultivo filtrado (por membrana de 0.2 µm de tamaño de poro) luego del desarrollo de Hanseniaspora uvarum a 30°C. Cuando Oenococcus oeni desarrolló en el sobrenadante del cultivo luego de 0, 3 y 8 horas de desarrollo levaduriano (M1, M2 y M3), la tasa de crecimiento y biomasa final fueron similares

(aproximadamente 0.035 h^{-1} y 3 x 10^8 ufc ml^{-1}, respectivamente). La tasa de crecimiento de Lactobacillus hilgardii en el medio basal sin desarrollo levaduriano fue 0.11 h^{-1}, mientras que la tasa de crecimiento luego de 8 horas de desarrollo levaduriano fue de 0.055 h^{-1}. Mientras aumentó el tiempo de desarrollo levaduriano desde 0 a 8 horas, hubo una disminución correspondiente en el crecimiento bacteriano de 2.5 x 10^7 a 1.25 x 10^7 ufc ml^{-1}. Luego de 12, 24 y 34 horas de desarrollo levaduriano (M4, M5 y M6), se observó un incremento de la tasa de crecimiento con disminución de la masa celular final de ambos organismos.

Cuando Oenococcus oeni fue inoculado en los medios M1, M2 y M3, se observó una disminución inicial de proteínas relacionada directamente a la producción de aminoácidos (Figura 2A). Farías et al., (1996); Manca de Nadra et al. (1999) y Farías y Manca de Nadra (2000) caracterizaron y purificaron las proteasas extracelulares producidas por Oenococcus oeni aislado del vino. El consumo de proteína durante las primeras 12 horas del crecimiento podría estar relacionado al tiempo de producción de proteasa por Oenococcus oeni. Su actividad es observada hasta las 24 horas de crecimiento mostrada por un aumento de los aminoácidos. Aproximadamente 14 mmol l^{-1} de aminoácidos fueron producidos por O. oeni tras 48 horas de crecimiento en los distintos medios. Las tasas de consumo de proteína fueron 0.07, 0.05 y 0.09 µg l^{-1} h^{-1} en los medios M1, M2 y M3 respectivamente.

Medios de Cultivo[a]	µmáx (h^{-1}) x 10^{-2}		Biomasa final (log ufc ml^{-1})	
	O. oeni	*L. hilgardii*	*O. oeni*	*L. hilgardii*
M1	3.5 ± 0.1	11.1 ± 0.4	8.45 ± 0.10	7.40 ± 0.07
M2	3.2 ± 0.1	10.0 ± 0.6	8.50 ± 0.09	7.25 ± 0.05
M3	3.7 ± 0.2	5.5 ± 0.5	8.60 ± 0.08	7.10 ± 0.04
M4	4.5 ± 0.2	6.0 ± 0.2	7.61 ± 0.10	6.80 ± 0.10
M5	5.0 ± 0.3	6.5 ± 0.3	7.71 ± 0.12	6.60 ± 0.05
M6	5.2 ± 0.2	10.5 ± 0.3	7.56 ± 0.09	7.00 ± 0.12

[a]Medios de cultivo luego de 0 horas (M1), 3hs (M2), 8hs (M3), 12hs (M4), 24hs (M5) y 34 hs (M6) de crecimiento de Hanseniaspora uvarum a 30ºC.
Los valores son medias de tres experimentos independientes ± la desviación estándar.

Tabla 1. Dinámica del desarrollo de Lactobacillus hilgardii en medios obtenidos luego del crecimiento de Hanseniaspora uvarum

Con Lactobacillus hilgardii las concentraciones de aminoácido y proteína disminuyeron (Figura 2B). Aproximadamente 5 mmol l-1 de aminoácidos fueron consumidos tras las 48 hs de crecimiento, independientemente de los medios. Las

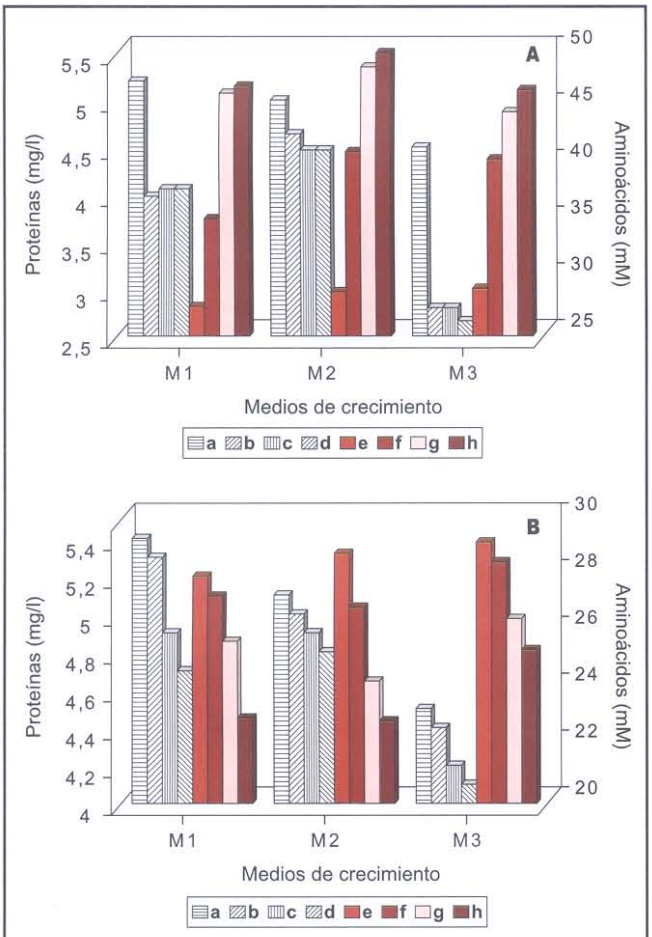

Figura 2. El crecimiento de Oenococcus oeni (A) y Lactobacillus hilgardii (B) en los medios obtenidos luego de 0, 3 y 8 horas (M1, M2 y M3 respectivamente) de desarrollo de la levadura. Concentraciones de proteína (fondo en blanco) y de aminoácidos (fondo sombreado) durante 0 h (a, e), 12 hs (b, f), 24 h (c, g) y 48 hs (d, h) del desarrollo de la bacteria.

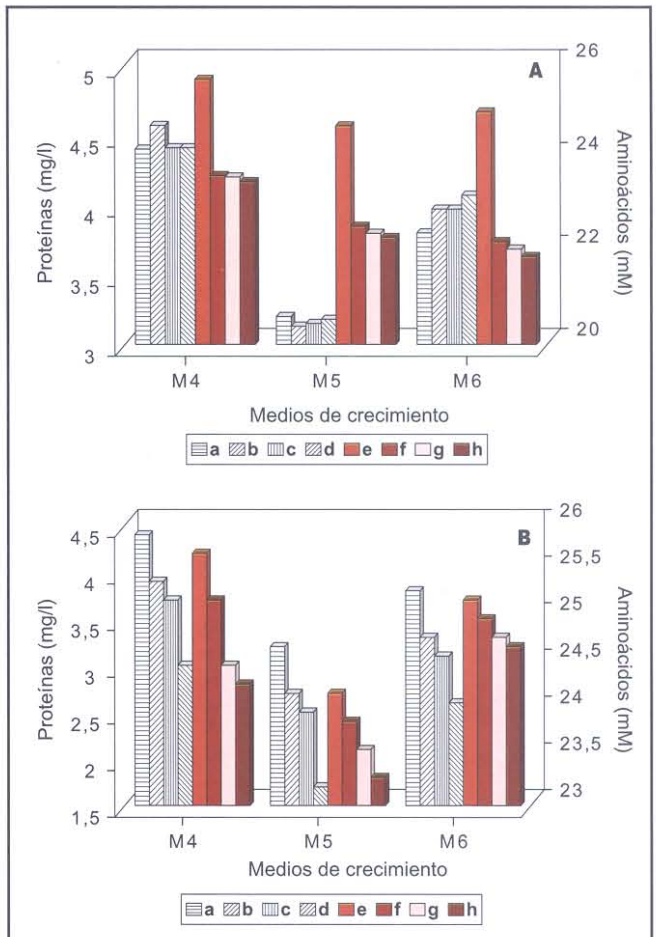

Figura 3. El crecimiento de Oenococcus oeni (A) y Lactobacillus hilgardii (B) en los medios obtenidos luego de 12, 24 y 34 horas (M4, M5 y M6 respectivamente) de desarrollo de la levadura. Concentraciones de proteína (fondo en blanco) y de aminoácidos (fondo sombreado) durante 0 h (a, e), 12 hs (b, f), 24 h (c, g) y 48 hs (d, h) del desarrollo de la bacteria.

tasas de consumo de proteína fueron 0.009, 0.005 y 0.01 μg l^{-1} h^{-1} en M1, M2 y M3 respectivamente. L. hilgardii mostró actividad proteolítica desde las 24 horas.

Tras 12, 24 y 34 horas de crecimiento levaduriano (en los medios M4, M5 y M6), Oenococcus oeni mostró que las concentraciones de proteína se mantuvieron constantes y la concentraciones de aminoácidos disminuyeron (Figura 3A). El incremento de los aminoácidos en las primeras horas del desarrollo de Oenococcus oeni podría regular la producción de proteasas alcanzando el equilibrio entre la producción y utilización de aminoácidos.

Los resultados obtenidos con Lactobacillus hilgardii fueron distintos mostrando una alta tasa de consumo de proteínas (0.03, 0.04 y 0.03 μg $l^{-1}h^{-1}$ en los medios M4, M5 y M6 respectivamente) sin modificación significativa de la concentración de aminoácidos (1 mmol l^{-1}) (Figura 3B). En las mismas condiciones, se observó un incremento en la concentración de amonio de los aminoácidos (información sin publicar). A partir de estos resultados es posible inferir que la cantidad de aminoácidos liberados por acción de las proteasas es más alta que su utilización.

Conclusiones

Podemos concluir que las modificaciones producidas por el desarrollo de Hanseniaspora uvarum en los medios afectan tanto al crecimiento como al metabolismo del nitrógeno de Oenococcus oeni y Lactobacillus hilgardii. Las distintas respuestas de las bacterias lácticas podrían estar relacionadas a los distintos requerimientos nutricionales y mecanismos de regulación enzimática de cada microorganismo.

Reconocimientos

Este trabajo fue realizado con el aporte económico de la Fundación Antorchas, Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) Argentina.

Recibido: Mayo de 2006
Aceptado: Noviembre de 2006

NDLR: Si desea contactarse con alguno de sus autores comuníquese con enologia@revistaenologia.com

Referencias Bibliográficas

Bradford, M.M., "A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye-binding," Anal. Biochem. 72, 248-255 (1976).

Doi, E., D. Shibata and T. Matoba, "Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay," Anal. Biochem. 118, 173-184 (1981).

Farias, M.E, M.C. Manca de Nadra, G.C. Rollan, and A.M. Strasser de Saad, "Histidine decarboxylase production by Lactobacillus hilgardii: Effect of Organic Acids," Curr. Microbiol. 31, 15-18 (1995).

Farias, M.E., A.M. Strasser de Saad and M.C. Manca de Nadra, "Viability and histamine decarboxylase activity of Lactobacillus hilgardii 5w during storage," Microbiol. Alim. Nutr. 14, 351-355 (1996).

Farías, M.E., G.C. Rollán and M.C. Manca de Nadra, "Influence of nutritional factors on the protease production by Leuconostoc oenos from wine". J. Appl. Bacteriol 81, 398-402 (1996).

Farías, M.E. and M.C. Manca de Nadra, "Purification and partial characterization of Oenococcus oeni exoprotease, " FEMS Microbiol. Lett. 185, 263-266 (2000).

Fleet, G.H., S. Lafon-Lafourcade and P. Ribereau-Gayon, "Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines," Appl. Environm. Microbiol. 48, 1034-1038 (1984).

Heard, G.M. and G.H. Fleet, "Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines," Appl. Environm. Microbiol. 50, 727-728 (1985).

Manca de Nadra, M.C., M.E. Farías, M.V. Moreno-Arribas, E. Pueyo and M.C. Polo, "A proteolytic effect of Oenococcus oeni on nitrogenous macromolecular fraction of red wine," FEMS Microbiol. Lett. 174, 41-47 (1999)..

Pardo, I. García, M.I., M. Zúñiga and F. Uruburu, "Dynamics of microbial populations during fermentation of wines from Utiel-Requena region of Spain," Appl. Environm. Microbiol. 55, 539-541 (1989).

Rodriguez, A.V. and M.C. Manca de Nadra, "Effect of pH and hydrogen peroxide produced by Lactobacillus hilgardii on Pediococcus pentosaceus growth," FEMS Microbiol. Lett. 128, 59-62 (1995 a).

Rodriguez, A.V. and M.C. Manca de Nadra, "Production of hydrogen peroxide by Lactobacillus hilgardii and its effect on Leuconostoc oenos growth." Curr. Microbiol. 30, 23-25 (1995 b).