



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**
Grado en Enología

**Determinación de las necesidades nutricionales de
Oenococcus oeni para su cultivo en el laboratorio**

Alumna: Lucía García Sáez

Tutoras: Josefina Vila Crespo

Violeta Ruipérez Prádanos

Julio 2018

ÍNDICE

| | |
|---------------------------------------------------------|-------------|
| Abstract | Pág.: 1 |
| 1 Resumen | Pág.: 1 |
| 2 Introducción | Pág.: 2-5 |
| 2.1 Necesidades nutricionales de <i>O. oeni</i> | Pág.: 4-5 |
| 2.1.1 Composición del medio MLO modificado | Pág.: 5 |
| 3 Justificación | Pág.: 6 |
| 4 Objetivos | Pág.: 7 |
| 5 Materiales y métodos | Pág.: 8-10 |
| 5.1 Microorganismos | Pág.: 8 |
| 5.2 Medios de cultivo | Pág.: 8 |
| 5.2.1 MLO modificado | Pág.: 8 |
| 5.2.2 Medios de cultivo estudiados | Pág.: 8 |
| 5.3 Ensayos de crecimiento bacteriano | Pág.: 8-9 |
| 5.3.1 Medio sólido | Pág.: 9 |
| 5.3.2 Medio líquido: curva de crecimiento | Pág.: 9 |
| 5.4 Confirmación de los microorganismos | Pág.: 8 |
| 5.4.1 Tinción de Gram | Pág.: 9 |
| 5.4.2 Prueba de catalasa | Pág.: 9 |
| 5.4.3 Observación al microscopio | Pág.: 9 |
| 5.5 Protocolo de FML | Pág.: 10 |
| 5.6 Análisis bioquímicos | Pág.: 10-11 |
| 5.6.1 Analíticas del vino inicial | Pág.: 10 |
| 5.6.2 Determinación de la cantidad de ácido málico | Pág.: 10-11 |
| 5.6.2.1 Cromatografía de papel | Pág.: 10-11 |
| 5.6.2.2 Kit de ácido málico | Pág.: 10-11 |
| 5.7 Análisis estadísticos | Pág.: 11 |
| 6 Resultados y discusión | Pág.: 12-24 |
| 6.1 Elección de las modificaciones | Pág.: 12 |
| 6.2 Identificación y seguimiento de los microorganismos | Pág.: 12-13 |
| 6.2.1 Tinción de Gram | Pág.: 12-13 |
| 6.2.2 Prueba de la Catalasa | Pág.: 13 |
| 6.3 Crecimiento bacteriano | Pág.: 13-17 |
| 6.3.1 Crecimiento medio sólido | Pág.: 13-14 |
| 6.3.2 Crecimiento en medio líquido | Pág.: 15-17 |
| 6.4 Desarrollo de la FML | Pág.: 18-23 |
| 6.4.1 Vino inicial | Pág.: 18 |
| 6.4.2 Cromatografías de papel | Pág.: 19-22 |
| 6.4.3 Kit de ácido málico | Pág.: 23-24 |
| 7 Conclusiones | Pág.: 25 |
| 8 Bibliografía | Pág.: 26-27 |

Abstract

This work is focused on lactic acid bacteria (LAB) that carry out the malolactic fermentation (MLF) in wines. Taking into account previous studies (Zúñiga *et al.*, 1993) which demonstrate that the culture environment described gives an adequate growing of bacteria, the purpose of this study is to determine feeding requirements for these microorganisms. It will be described the effect of modifications in the composition of culture medium on the development and growth of the *Oenococcus oeni* in the lab. As a first step, it has been fulfilled a bibliographic review with the aim of knowing the function and effect of each nutrient in the bacteria. Then, different growing tests have been carried out eliminating several nutrients, and evaluating these results over the bacteria's kinetic growth. After evaluating results, it MLF was developed in wine using these acclimatized bacteria to evaluate their capacity to fulfil the fermentation above mentioned.

1- Resumen

El trabajo se enfoca en las bacterias lácticas (BAL) que llevan a cabo la fermentación maloláctica (FML) en vinos. Partiendo de anteriores estudios que demuestran que el medio de cultivo descrito por Zúñiga *et al.* proporciona un crecimiento adecuado de la bacteria, el estudio se centra en la determinación de las necesidades nutricionales de estos microorganismos mediante variaciones en la composición de los medios de cultivo y el estudio de su efecto en el crecimiento y desarrollo de *Oenococcus oeni* en el laboratorio. En primer lugar, se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica cuyo objetivo era saber la función y el efecto de cada nutriente en las bacterias. Posteriormente, se llevaron a cabo distintas pruebas de crecimiento eliminando distintos nutrientes y evaluando su repercusión en la cinética de crecimiento bacteriana. Tras evaluar los resultados se procedió a realizar la FML en un vino utilizando las bacterias aclimatadas en los diferentes medios de cultivo para evaluar su capacidad para realizar dicha fermentación.

2- Introducción

La fermentación maloláctica (FML) es un proceso que se realiza durante la vinificación, normalmente de tintos, y que es llevada a cabo por las bacterias lácticas (BAL). Tradicionalmente, la FML se desarrolla después de la fermentación alcohólica (FA). Consiste en la transformación del ácido málico, vigente en el vino, en ácido láctico, lo que causa una desacidificación biológica, un aumento del pH de entre 0,1 a 0,5 unidades (aproximadamente) y cambia el perfil organoléptico del vino (Bordons *et al.*, 2013). Esto produce una sensación más agradable en la boca, una desaparición de aromas primarios, afrutados y vegetales. Además, provoca una estabilidad biológica al impedir el crecimiento de otras bacterias o microorganismos en el vino (Swiegers *et al.*, 2005; García-Ruiz *et al.*, 2012).

La FML depende de distintos factores como el pH, concentración de etanol, SO₂, temperatura, ácidos grasos o compuestos fenólicos y suele afectar positivamente a la calidad del vino, siempre que este proceso se realice correctamente. Se puede realizar de forma espontánea (con bacterias indígenas presentes en el vino) o de forma controlada, inoculando cultivos iniciadores de la FML. Una FML espontánea puede durar semanas o incluso meses, y suele ser difícil de controlar, lo que conlleva un riesgo en las características organolépticas como subida de acidez volátil, alta producción de acetoína y diacetilo, caída del color, desaparición de aromas varietales de la uva y alteraciones aromáticas o producción de aminas biógenas (Romero *et al.*, 2003). Esto se evita utilizando la inoculación de BAL seleccionadas, principalmente de la especie *Oenococcus oeni*. La inoculación de cultivos iniciadores de BAL agiliza el inicio y desarrollo de la FML y se reduce el riesgo de deterioro por la actuación de otras BAL permitiendo el control de la cepa inoculada (Berbegal *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2006).

En la primera definición técnica, las BAL se reconocieron como un extenso grupo de bacterias Gram-positivas, con forma de cocos o bacilos, que no producen esporas y no tienen motilidad, y tienen la habilidad de catabolizar azúcares, principalmente en ácidos lácticos. Estos criterios de clasificación condujeron hacia una definición más amplia de BAL que comprende diversos tipos de bacterias. Durante los años 90, los avances en técnicas moleculares permitieron una descripción más elaborada de BAL: bacterias Gram-positivas, que no forman esporas, microaerófilas o anaerobias que producen ácido láctico como el mayor producto final de la fermentación de los azúcares. Las BAL son típicamente catalasas negativas ya que carecen de la enzima citocromo, aerotolerantes y ácido-tolerantes. Los géneros más comunes de BAL relacionados con los alimentos son: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium* y *Weissella*. Aunque incluso se haya sugerido que las BAL son un grupo de bacterias heterogéneas y puede que no exista una definición técnica universal, todos los géneros arriba mencionados han demostrado haberse bifurcado de un ancestro común (Papadimitriou *et al.*, 2016).

En la actualidad, *Oenococcus oeni*, es la BAL más utilizada como cultivo iniciador de la FML, ya que asegura una rápida y completa fermentación, resistiendo, además a las condiciones de un vino (Berbegal *et al.*, 2015; Gutiérrez, 2015). Debido a la interacción entre las levaduras y las bacterias y entre las mismas bacterias, durante toda la FA, ocurre una selección natural y, finalmente, la especie dominante es *O. oeni*. (Lonvaud-Funel, 1999). Se ha comprobado, por tanto, que soporta las condiciones de estrés del vino y llega a tolerar niveles de pH bajos, altas concentraciones de SO₂ y alto grado alcohólico (Mesas *et al.*, 2004; Alegría *et al.*, 2004).

Las BAL se dividen fisiológicamente en dos grupos, dependiendo de la ruta de fermentación de la hexosa: homofermentativas y heterofermentativas. *O. oeni* usa la vía de las pentosas fosfato, produciendo, además de ácido láctico, CO₂, ácido acético y/o etanol, convirtiéndola en una bacteria heterofermentativa (Zúñiga *et al.*, 1993). Se ha demostrado que, su actuación en el perfil organoléptico de los vinos es mayoritariamente beneficiosa. (Lonvaud-Funel, 1999; Liu, 2002).

El uso de *O. oeni* como cultivo iniciador de la FML, debido a la escasez de nutrientes en esta etapa y las condiciones adversas del vino para el desarrollo y actividad bacteriana, implica la búsqueda de estrategias que optimicen la aplicación de estos cultivos. Entre las estrategias que no implican la aplicación de ingeniería genética, el método más simple y clásico consiste en la identificación de cepas en la naturaleza con las características adecuadas (Betteridge *et al.*, 2015).

Por lo tanto, la búsqueda de cultivos iniciadores para la realización de una FML adecuada implica superar dos retos: i) la selección de cepas óptimas y ii) la adaptación de estas bacterias a las condiciones adversas que se presentan en el vino para su desarrollo.

La selección de cepas de *O. oeni* óptimas para el desarrollo de la FML en las condiciones deseadas requiere un medio de cultivo general en laboratorio que pueda proporcionar un buen crecimiento bacteriano. Las BAL poseen unos requerimientos nutricionales complejos (Zúñiga *et al.*, 1993). Actualmente, los diferentes medios descritos en la bibliografía incluyen numerosos componentes (Álvarez, 2017). Esto supone un inconveniente dificultando su elaboración y elevando su coste.

En estudios previos se realizó una revisión bibliográfica (Álvarez, 2017), concluyendo que los medios más utilizados para el estudio y crecimiento de *O. oeni* son MRS y MLO. Según los datos publicados, el medio MLO permite un crecimiento rápido y fácil de *O. oeni* (Claus *et al.*, 1983). Por otro lado, el medio MRS aparece en la bibliografía como un medio idóneo para bacterias lácticas, especialmente para *Lactobacillus plantarum* (Navarro *et al.*, 2000). Por lo tanto, para este estudio se partió del medio MLO descrito por Zúñiga *et al.*, (1993) modificado sin zumo de tomate, ya que estudios previos en nuestro grupo de investigación demuestran que su ausencia no influye negativamente en el crecimiento de *O. oeni* (Álvarez, 2017).

Las bacterias requieren adaptación para su crecimiento bajo condiciones desfavorables como las que se dan en el vino, en concreto, altas concentraciones de alcohol y bajo pH. La adaptación metabólica es crucial para la supervivencia porque estimula la producción de energía adicional y disminuye el nivel de estrés, por ejemplo, a través de una alcalinización del citosol, bajo condiciones ácidas. pH bajos dañan tanto la pared celular como la membrana celular, influenciando así al pH y al potencial de la membrana. La acidificación del citosol es gen-tóxica y da como resultado la desnaturalización de las proteínas. Sobre todo, afecta al metabolismo lo que lleva hacia un agotamiento de la energía y a la muerte celular. El estrés provocado por el etanol es particularmente importante para la mayoría de *O. oeni*, que llevan a cabo la FML durante el proceso de vinificación. (Papadimitriou *et al.*, 2016).

Bajo condiciones de estrés, las células tratan de adaptarse mediante respuestas moleculares apropiadas en un intento de mejorar los efectos negativos y restaurar el crecimiento y el potencial de supervivencia. Las especies que pertenecen a los géneros *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, y *Leuconostoc* y a las especies de *Streptococcus* utilizan la ruta de la FML para mejorar la supervivencia bajo condiciones de estrés medioambiental, tales como un bajo pH, una alta concentración de carbohidratos o la inanición. Esta ruta implica la decarboxilación del ácido L-málico al ácido L-láctico y CO₂ (Papadimitriou *et al.*, 2016).

La aclimatación bacteriana a las condiciones del vino se ha realizado mediante diferentes estrategias entre las que destacan el uso de medios de cultivo con composición similar al vino y medios de cultivo a los que se adiciona etanol (Cecconi *et al.*, 2009; Lerm *et al.*, 2011; Brizuela *et al.*, 2017). Los resultados indican que la adaptación al contenido alcohólico del medio de cultivo acidificado es un factor importante para su supervivencia en las duras condiciones del vino (Brizuela *et al.*, 2017).

Bajo condiciones de estrés medioambiental, las BAL cambian los flujos de energía y metabólicos, modifican la tasa de crecimiento y adaptan el metabolismo de las fuentes de carbono al nuevo medio al modificar la síntesis de las enzimas y de los metabolitos para transportar y metabolizar de manera eficiente los carbohidratos y otras fuentes de carbono, tales como el malato y el citrato (Papadimitriou *et al.*, 2016).

2.1.- Necesidades nutricionales de *O. oeni*

Muchas cepas de BAL tienen requerimientos característicos del número de aminoácidos, vitaminas, purinas, pirimidinas, así como otros nutrientes para su crecimiento en un medio sintético (Deguchi *et al.*, 1991). Se encontró que los requerimientos nutricionales de las bacterias son específicos de las cepas, y que sólo diez componentes son esenciales para todas las bacterias lácticas estudiadas: fuentes de carbono y fosfatos, manganeso, como numerosos ácidos amínicos (prolina, arginina y los ácidos amínicos ramificados como la valina, leucina e isoleucina) junto con vitaminas (ácido nicotínico y ácidos pantoténicos). Los nucleótidos no fueron esenciales para ninguna de las bacterias estudiadas (Terrade, 2009).

2.1.1. Composición del medio MLO modificado

El medio MLO modificado contiene triptona, extracto de levadura, glucosa, fructosa, MgSO₄, MnSO₄, citrato diamónico, tween 80 y cisteína. La función que estos componentes realizan en el crecimiento bacteriano se describe a continuación:

Las BAL emplean la triptona como fuente de carbono. El extracto de levadura, obtenido por autólisis o plasmólisis de las células de levadura, aporta mezclas de aminoácidos y péptidos, vitaminas y carbohidratos, es un factor de crecimiento al igual que fuente de nitrógeno, fósforo, azufre y carbono.

La glucosa y fructosa, son fuente de carbono y energía. Se estudió que el crecimiento de *O. oeni* mejoraba con mezclas de azúcares (glucosa / fructosa), dependiendo de las condiciones de la mezcla en el sustrato y que se relacionaba con un aumento de rendimiento de biomasa y una productividad celular volumétrica más alta. También se investigó la influencia de glucosa y fructuosa por separado. La glucosa tiene el mayor rendimiento de producción de biomasa, siendo un factor necesario en el crecimiento celular, pero con un ratio de crecimiento menor que en fructosa. Aunque con esta última se experimentan retrasos de crecimiento, comportamiento que se podría explicar con que la fructosa se usa en parte como un aceptor de electrones y no como un generador de energía (Zhang *et al.*, 2005; Todar, 2008).

El citrato de amonio se puede utilizar como fuente de carbono y/o energía, en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas. La fermentación del citrato en el caso de las BAL, se produce cuando las bacterias carecen del ciclo de Krebs o no es completamente funcional. La fermentación del citrato por BAL en vino, produce fermentaciones secundarias y la concentración de estos productos debe de estar

comprendido dentro de ciertos valores para que no influyan negativamente (Magni *et al.*, 2008). El citrato es un precursor de aromas, su catabolismo se asocia con un aumento en la producción de los componentes diacetílicos aromáticos dando los aromas mantequillosos. Los azúcares aseguran la degradación del citrato produciendo estos componentes aromáticos ya que *O. oeni* usa el citrato como un aceptor en el co-metabolismo con los azúcares (Zee, 2002; Todar, 2008; König, 2017). La cofermentación de los citratos y de la glucosa en unas BAL heterofermentativas sigue, de manera obligada, la ruta del fosfato pentosa, produciendo fundamentalmente ácido láctico, ácido acético/etanol, y ATP de la glucosa consumida. Un mol adicional tanto de ácido acético como de ATP se sintetiza para cada mol de citrato metabolizado. (Papadimitriou *et al.*, 2016).

L-cisteína interviene en la producción de aminoácidos que inciden en los aromas. El uso de la L-cisteína ha sido considerado junto con otros aminoácidos como la L-valina o la d-ribosa, como aminoácido esencial para el crecimiento de *O. oeni* (Terrade *et al.*, 2008). Muchas cepas de BAL tienen requerimientos característicos del número de aminoácidos, y ha quedado claro que pueden sintetizar la mayoría de ellos, encontrándose la L-cisteína entre estos aminoácidos utilizados (Deguchi *et al.*, 1991)

Por otro lado, en baja concentración, se requiere la adición de sales inorgánicas como $MgSO_4$ y $MnSO_4$. El metabolismo requiere magnesio que se adiciona como sal inorgánica. Son cationes que estabilizan macromoléculas aniónicas; el azufre es indispensable para producir cisteína y metionina (aminoácidos); el manganeso es clasificado como un oligoelemento en la nutrición bacteriana (Kenneth T. 2008); El Tween 80, aumenta la supervivencia celular con poca capacidad para asimilar ácidos oleicos, al disolver grasas, mejorando así su asimilación.

3- Justificación

En la actualidad, *Oenococcus oeni* es la bacteria láctica más usada para realizar la FML en vinos de forma efectiva. Su inoculación permite controlar este proceso, efectuar una FML más rápida y conferir al vino unas características deseadas.

El interés actual en la búsqueda de microorganismos que confieran características únicas al vino ha llevado a la selección de bacterias autóctonas para la elaboración de vinos. La búsqueda de un medio de cultivo general que facilite y abarate el aislamiento y desarrollo de estos microorganismos en el laboratorio es un proceso clave para esta selección.

Por otro lado, la adaptación de las bacterias a las condiciones de estrés presentes en el vino (pH, escasez de nutrientes y presencia de etanol) para su uso como cultivos iniciadores supone un reto en enología. La adaptación metabólica de las bacterias al medio es un paso crucial para su supervivencia, ya que durante esta fase su respuesta celular al estrés supone la reprogramación de sus rutas metabólicas (Papadimitriou *et al.*, 2016).

Las BAL se encuentran con situaciones de estrés durante la FML ya que los componentes del vino (SO₂, grado alcohólico, niveles bajos de pH, escasez de nutrientes...) son limitantes a la hora del desarrollo y crecimiento de las células. Por ello es interesante realizar ensayos donde se adapten las BAL a estas situaciones de estrés antes de la siembra en vino. Se han analizado ya las adaptaciones a condiciones de estrés mediante modificaciones en el pH mediante acidificaciones y adiciones de etanol (Brizuela *et al.*, 2017). En este estudio la estrategia utilizada se basa en la modificación del medio de cultivo para adaptar a *O. oeni* a situaciones de estrés con escasez de nutrientes.

4- Objetivos

El objetivo principal de este estudio es la evaluación del crecimiento de *O. oeni* eliminando ciertos nutrientes para la obtención de un medio de cultivo reducido y estudiar su influencia en la adaptación de las bacterias en las condiciones de estrés en las que se lleva a cabo la FML.

Para ello se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Revisión bibliográfica de las funciones de los distintos componentes del medio de cultivo. Propuesta de cambios en la composición para ensayos en laboratorio.
- Estudio del crecimiento de dos cepas de *O. oeni* en cultivos de laboratorio modificados.
- Estudio de la evolución de la FML efectuada por estas cepas después de la adaptación a medios más restrictivos.

5- Materiales y métodos

5.1- Microorganismos

Se utilizaron dos cepas de *Oenococcus oeni*, CECT217 y CECT4759, ambas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). La cepa CECT217 fue aislada en vino por Garvie en 1967 y clasificada inicialmente como *Leuconostoc oenos* (Garvie, 1967). Posteriormente, Dicks la reclasificó como *Oenococcus oeni* (Dicks, 1995). La cepa CECT4759, se obtuvo de la colección de Martínez-Murcia (A12) de la Universidad de Alicante, y fue aislada por A. Zavaleta de vinos de Cigales (Valladolid).

El mantenimiento de *O. oeni* se realizó en medio MLO modificado (ver apartado 5.2). Las bacterias se mantuvieron en el medio sólido realizando pases frecuentes. El crecimiento se realizó en anaerobiosis a 26°C. Dicha anaerobiosis se consiguió aislando el medio con el uso de papel de film. El crecimiento en medio líquido se realizó en las mismas condiciones que en los ensayos en medio sólido. En este caso, para evitar el contacto del matraz con el oxígeno, se tapó el matraz con algodón y papel de film (cada vez que se efectuó una toma de muestras había una ruptura de dicha anaerobiosis que duraba hasta que finalizaba el muestreo. Inmediatamente se volvía a usar el método de aislamiento ya citado).

5.2- Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo fueron autoclavados a 121 °C durante 15 minutos antes de su uso en los diferentes ensayos.

5.2.1- MLO modificado

La composición del medio de cultivo se detalla a continuación: triptona, 10,0 g/L (Bacto™ Tryptone, Ref. 210705); extracto de levadura, 5,0 g/L (Labkem Ref. 18128.20150417B9B); glucosa, 10,0 g/L (Labkem, Ref. 21534.170126FF); fructosa, 5,0 g/L (Panreac PRS, Ref. 142728.1210); MgSO₄ · 7H₂O, 0,20g/L (Panreac PA, Ref. 131404); MnSO₄ · H₂O 0,05g/L (Panreac, PA Ref. 131413.1210); citrato diamónico, 3,5g/L (Applichem Panreac, Ref. 141120.1210); Tween 80 (Tween^R Panreac Pr, Ref. 212050).

El pH se ajustó a 4,8. La cisteína (Sigma, Ref. 1001670432), esterilizada por filtración, se añadió asepticamente tras el proceso de la esterilización en autoclave.

5.2.2- Medios de cultivo estudiados

Los medios de cultivo estudiados se realizaron como se describe en el apartado anterior suprimiendo los siguientes componentes: i) citrato de amonio; ii) fructosa; iii) cisteína y iv) azúcares (glucosa y fructosa).

5.3- Ensayos de crecimiento bacteriano

Los ensayos de crecimiento bacteriano se realizaron en los diferentes medios sólidos y líquidos en los medios descritos en el apartado 5.2 de materiales y métodos.

5.3.1. Medio sólido

Se realizó una siembra en estría de cada una de las cepas en placas Petri (5 placas por condición y cepa, y un control a mayores por cada condición sin dicha siembra, 10 placas con siembra y 5 sin ella en total) y se determinó la evolución del crecimiento de las dos cepas a través de un seguimiento diario de las placas en las diferentes condiciones. El crecimiento se realizó a 26°C en anaerobiosis aislando las placas Petri con el uso de papel de film durante 7 días.

5.3.2. Medio líquido: curva de crecimiento

Previamente, se realizó un cultivo en medio MLO modificado líquido de las dos cepas de *O. oeni* hasta alcanzar la fase estacionaria tras incubación en anaerobiosis (con el uso de algodón y papel de film) a 26°C. El ensayo de crecimiento se llevó a cabo en 30 matraces Erlenmeyer de 100 ml (5 condiciones por cada cepa y sus triplicados correspondientes, y un control por cada condición, sin inocular, a mayores) con 50 ml de los diferentes medios de cultivo, inoculando 1 ml de los microorganismos procedentes del medio líquido.

Se estudió la evolución de las dos cepas de *O.oeni* en las distintas condiciones durante varios días mediante la determinación de la densidad óptica del cultivo a 600nm usando un espectrofotómetro (Spectronic® 20 GENESYS™). Los ensayos se realizaron por triplicado tomando como referencia los medios sin inocular.

El análisis de datos de la evolución del crecimiento de las diferentes cepas se representó como la media de los triplicados indicando la desviación estándar de las medidas realizadas.

5.4. Confirmación de los microorganismos

5.4.1 Tinción de Gram

Tanto al principio como al final de los ensayos se realizó una tinción de Gram para comprobar la presencia de bacterias lácticas. Brevemente, la muestra se fijó en un portaobjetos, se añadió secuencialmente violeta de genciana, lugol, alcohol-acetona y safranina como colorante de contraste (OIV/OENO 206/2010). La muestra se observó con el objetivo 100x aplicando aceite de inmersión en un microscopio Leica DM750.

5.4.2 Prueba de la catalasa

Esta prueba, al igual que la tinción Gram, se realizó para comprobar la presencia de bacterias catalasa negativas, característico de *O. oeni*, y descartar por tanto la presencia de bacterias acéticas, que son catalasa positivas.

La prueba se realizó siguiendo el protocolo descrito por la OIV (OIV/OENO 206/2010). Se puso en un portaobjetos una pequeña muestra de bacterias y se depositó sobre la muestra una gota de peróxido de hidrógeno al 30%. La liberación de gas se observó claramente a simple vista.

5.4.3 Observación al microscopio

Diariamente se toman muestras y se observan al microscopio con el objetivo de 40x para asegurarnos la ausencia de contaminaciones por levaduras u otros organismos.

5.5. Protocolo de FML

Después de confirmar el crecimiento bacteriano en las distintas condiciones de cultivo, se inoculó a un vino experimental elaborado en la ETSIIA con las variedades Garnacha, Cabernet Sauvignon y Mencía que había finalizado la FA y que fue conservado en congelación. El vino sin ningún tratamiento adicional (sin esterilizar antes de la inoculación) se dispuso en matraces de 100ml (30 matraces en total) poniendo 50ml de vino en cada uno, inoculando la cepa correspondiente y dejando que transcurriera la FML 14 días.

Se realizaron análisis mediante cromatografía de papel de la evolución de la FML como método cualitativo y mediante un análisis enzimático usando el kit de ácido málico (Tecnología Difusión ibérica S.L.) como método cuantitativo.

5.6. Análisis bioquímicos

5.6.1. Analíticas del vino inicial

Como se explica a continuación, se realizaron hasta un total de 5 analíticas al vino inicial:

- **Determinación de azúcares residuales mediante el Método Rebeleim:** basada en la oxidación de los azúcares reductores mediante una disolución de cobre divalente, en medio alcalino y en ebullición.
- **Determinación del pH mediante un pHmetro.** Se basa en la diferencia de potencial de una solución a partir de un potencial de referencia.
- **Determinación de la acidez total en vinos mediante el Método potenciométrico:** La acidez total es la suma de todas las acideces valorables, cuando se lleva al vino a pH 7 por adición de una solución alcalina valorada.

El ácido carbónico y el anhídrido sulfuroso libre y combinado, no están comprendidos en la acidez total.

- **Determinación del anhídrido sulfuroso libre, realizado con un medidor de SO₂ (SO₂-matic 23, Crison):** su determinación se basa en la liberación de SO₂ libre y total que tiene un vino.
- **Determinación del grado alcohólico mediante una ebulloimetría:** se basa en la diferencia existente entre los puntos de ebullición del agua y el alcohol.

5.6.2. Determinación de la cantidad de ácido málico

5.6.2.1 Cromatografía de papel

Se realizó primero una cromatografía de papel del vino inicial antes de ser inoculado y cromatografías de papel de los 30 matraces los días 0, 4, 6, 12 y 14. Este método consiste en colocar una pequeña cantidad de vino en el extremo de un papel de cromatografía de papel; éste se introduce en una solución de desarrollo, habitualmente algún disolvente orgánico saturado con una solución acuosa. La porción acuosa del sistema disolvente forma una fase inmóvil a medida que es absorbida por el papel; la parte orgánica sirve para extraer el ácido de la fase acuosa. Para evitar que los

disolventes se evaporen (mal desarrollo del cromatograma) las tiras de papel deben estar en un recipiente cerrado saturado con el vapor del disolvente.

5.6.2.2 Kit de ácido málico

Método enzimático cuyo principio es que la enzima L-malato deshidrogenasa (L-MDH) cataliza la oxidación del ácido L-málico a oxalacetato con la reducción concomitante del nicotinamida adenina dinucleótido. El incremento en la absorbancia a 340 nm debido a la formación de NADH es directamente proporcional a la concentración del ácido L-málico en la muestra. Se usó el kit para la determinación enzimática de ácido málico (Tecnología Difusión Ibérica, S.L), siguiendo las instrucciones del fabricante con pequeñas modificaciones adaptadas a nuestro ensayo.

La concentración de ácido málico se calcula mediante la realización de una recta patrón con un estándar de ácido málico (Tecnología Difusión Ibérica, S.L).

5.7 Análisis estadísticos

Después del seguimiento del crecimiento bacteriano en medio líquido y realizar la curva de crecimiento, se realizó la prueba t de Student con los datos obtenidos a las 72h (momento en el que el crecimiento era máximo para las bacterias) para evaluar la diferencia de crecimiento entre el medio MLO modificado y los medios MLO modificados con la ausencia de algún nutriente. Esta prueba consiste en valorar la diferencia significativa de las matrices de dos grupos, confrontando el MLO modificado con los medios MLO modificados con ausencia de algún nutriente.

6- Resultados y discusión

6.1 Elección de las modificaciones

Tras la revisión bibliográfica, se concluyó que las modificaciones en el medio de cultivo a estudiar son la eliminación de estos componentes: i) cisteína; ii) citrato; iii) fructosa y iv) azúcares.

Se eliminaron estos componentes para acondicionar a *O. oeni* a situaciones de estrés debido a la falta de estos nutrientes y ver su comportamiento. Como se ha descrito en la bibliografía, el comportamiento de *O. oeni* ante distintas concentraciones de glucosa y fructosa influye en su crecimiento, siendo óptimo con la mezcla de estos dos componentes. *O. oeni* realiza una cofermentación del citrato con los azúcares para formar ácido málico y es usado en fermentaciones secundarias; además en estudios anteriores, se indicó que la omisión del citrato de diamonio resultaba inadecuado para el crecimiento de *O. oeni* ya que necesitaban más de 10 días para crecer (Álvarez, 2017).

La L-cisteína interviene en la producción de aminoácidos que inciden en los aromas y es considerado como un aminoácido esencial para el crecimiento de *O. oen*.

Una vez descritos y seleccionados las modificaciones del medio de cultivo, se procedió a evaluar mediante diferentes ensayos el crecimiento de *O. oeni* en laboratorio con los cambios elegidos. Tras esto, en función de los resultados obtenidos, se realizará una mejora o modificación en el medio de cultivo que resulte más efectivo para la bacteria.

6.2. Identificación y seguimiento de microorganismos

Durante todo el proceso se realizó un seguimiento diario al microscopio para comprobar que las muestras no estuvieran contaminadas ya que no se había usado antibióticos en los medios de cultivo, descartándolos debido, entre otras razones, a su elevado coste. Un problema muy importante en todo el proceso fue la convivencia en el laboratorio con estudios con levaduras, lo que hizo más fácil la contaminación en repetidas ocasiones de las muestras, obligando a reiniciar el proceso de la primera prueba una y otra vez, así como a probar distintas formas de cultivo hasta que finalmente se logró un desarrollo de las bacterias en ausencia de levaduras.

6.2.1 Tinción de Gram

En la figura 1 se muestran dos imágenes de la visualización al microscopio con el objetivo de 40x, dónde se pueden observar microorganismos de pequeño tamaño indicando que se tratan de bacterias y se descarta la presencia de levaduras. Están teñidas con azul de metileno para facilitar su observación al microscopio.

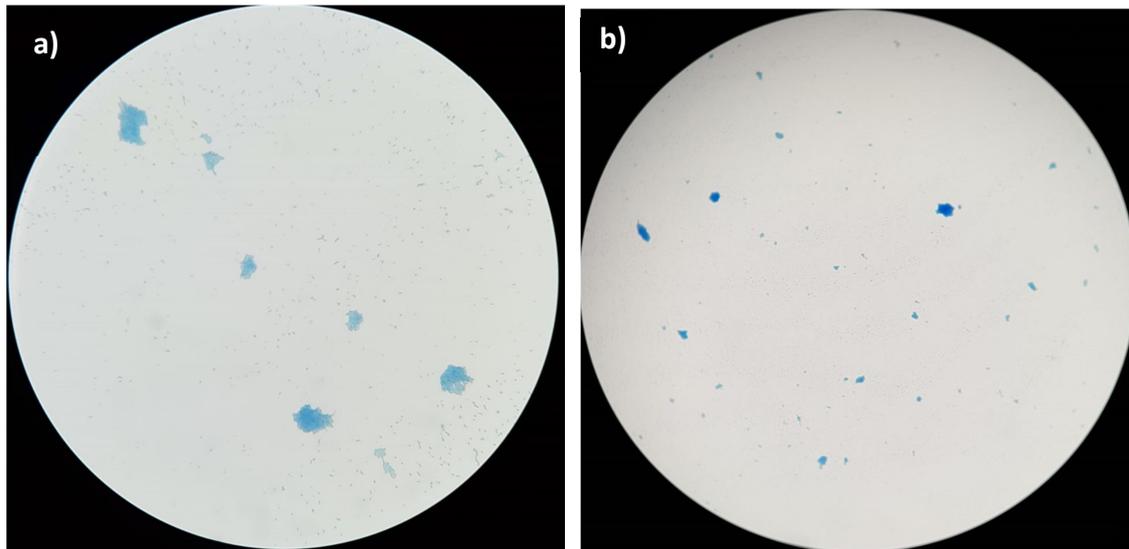


Figura 1: Visualización al microscopio de las cepas de *Oenococcus oeni* con tinción de las cepas a) CECT 217 y b) CECT 4759. Como se puede observar, los únicos organismos que hay en las figuras son bacterias.

6.2.2 Prueba de la catalasa

Los resultados obtenidos al realizar esta prueba ratificaron que las dos cepas tenían actividad catalasa negativa, descartando que se hubiera producido una contaminación por bacterias acéticas (catalasas positivas), confirmando, por tanto, que eran bacterias lácticas.

6.3 Crecimiento bacteriano

6.3.1 Crecimiento en medio sólido

Los experimentos se llevaron a cabo primero en medio sólido y posteriormente en medio líquido.

En medio sólido se pudo comprobar que había diferencias de crecimiento entre cepas, empezando a ser visibles el 4º día de crecimiento, cuando empezaron a aparecer colonias blanquecinas aisladas en las placas, así como que en ambas cepas dichas colonias tardaron en aparecer en el medio sin azúcares y sin citrato. Al 8ª día, prácticamente en todas las placas las colonias habían constituido estrías, mientras que en las placas con el medio sin citrato y sin azúcares casi no habían aparecido.

En la figura 2 se puede observar el crecimiento al 9º día de la cepa CECT 217, el cual ya ha finalizado, y se aprecian diferencias de crecimiento entre la placa con el medio MLO modificado (todo) y el resto de placas con ausencia de algún nutriente, siendo menor, en estos últimos casos, el crecimiento. La ausencia de cisteína parece haber presentado más dificultades para que *O. oeni* se desarrolle correctamente.

En la figura 3, observamos que la cepa CECT 4759 muestra también diferencias entre las placas del medio con todos los nutrientes y las placas en las que existe ausencia de algún nutriente. En comparación con la cepa CECT 217 con falta de fructosa o con ausencia de azúcares, la cepa CECT 4759 parece haber desarrollado un menor crecimiento que la CECT 217.

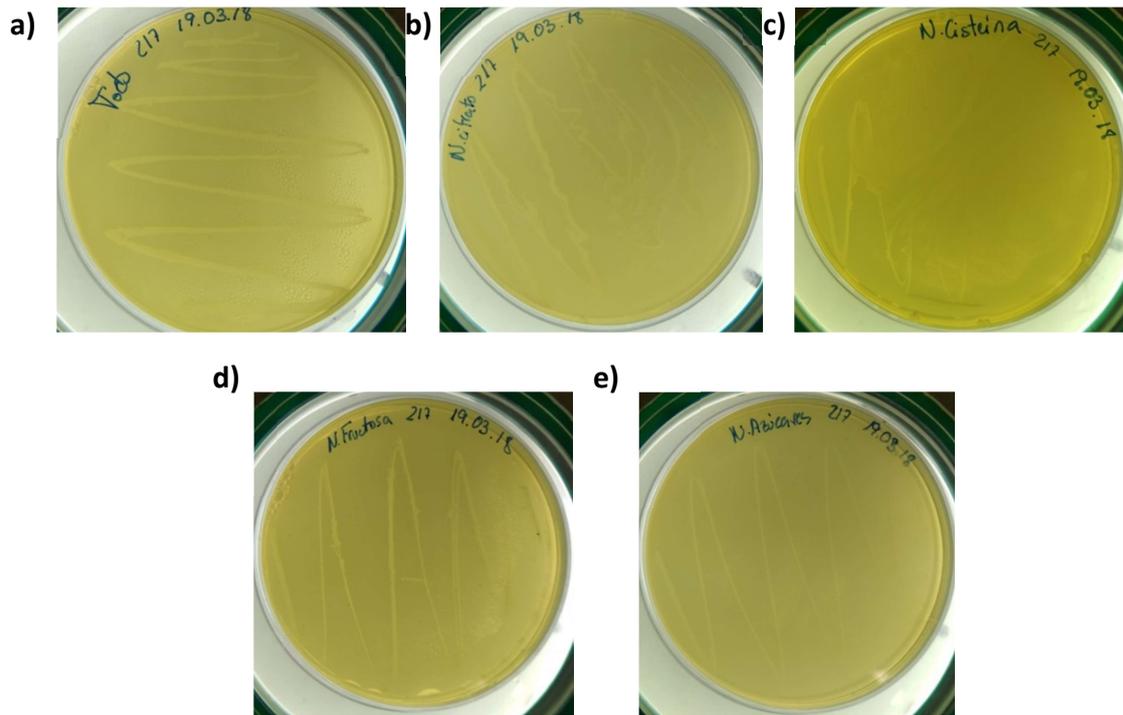


Figura 2: comparación del máximo crecimiento de *Oenococcus oeni* de la cepa de la CECT 217 en los medios a) MLO sólido modificado, b) MLO sólido modificado sin citrato, c) MLO sólido modificado sin cisteína, d) MLO sólido modificado sin fructosa y e) MLO sólido modificado sin azúcares.

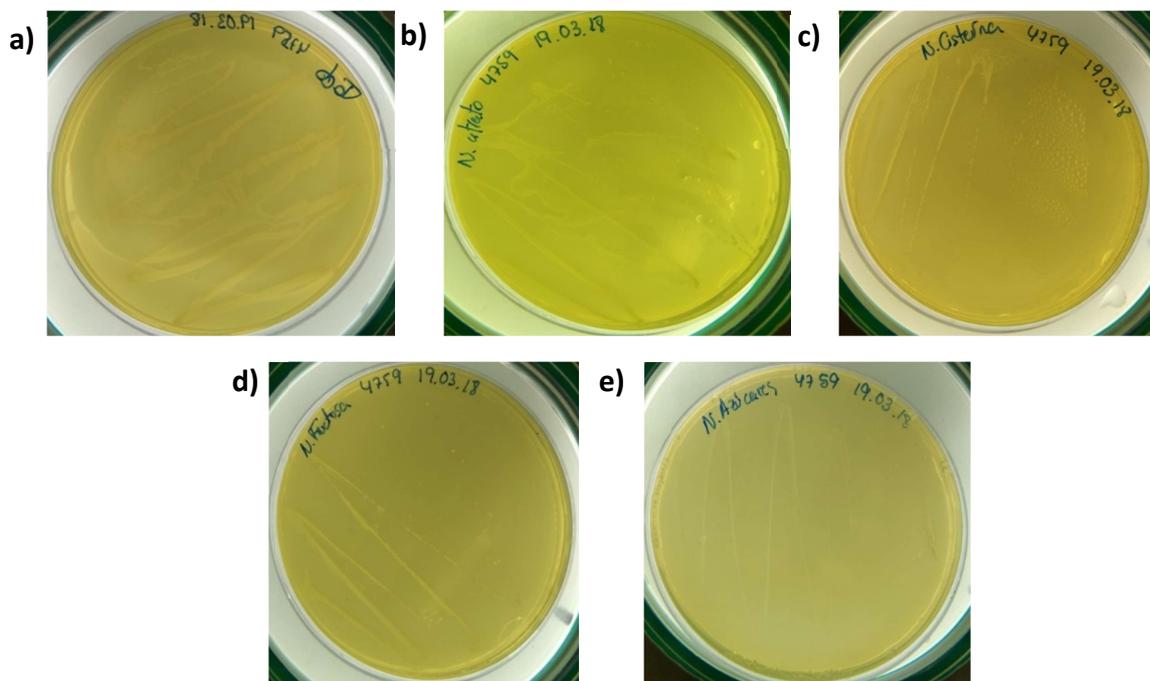


Figura 3: comparación del máximo crecimiento de *Oenococcus oeni* de la cepa de la CECT 4759 en los medios a) MLO sólido modificado, b) MLO sólido modificado sin citrato, c) MLO sólido modificado sin cisteína, d) MLO sólido modificado sin fructosa y e) MLO sólido modificado sin azúcares.

Posteriormente se realizó el ensayo en medio líquido donde se monitorizó diariamente mediante la determinación de la absorbancia a 600nm.

6.3.2 Crecimiento en medio líquido

Remarcar que dicho ensayo se tuvo que repetir varias veces debido a problemas de contaminaciones con levaduras, ya que partíamos de un medio sin antibióticos y se convivía en un ambiente donde se estaban estudiando levaduras simultáneamente.

Finalmente se pudieron obtener los siguientes resultados:

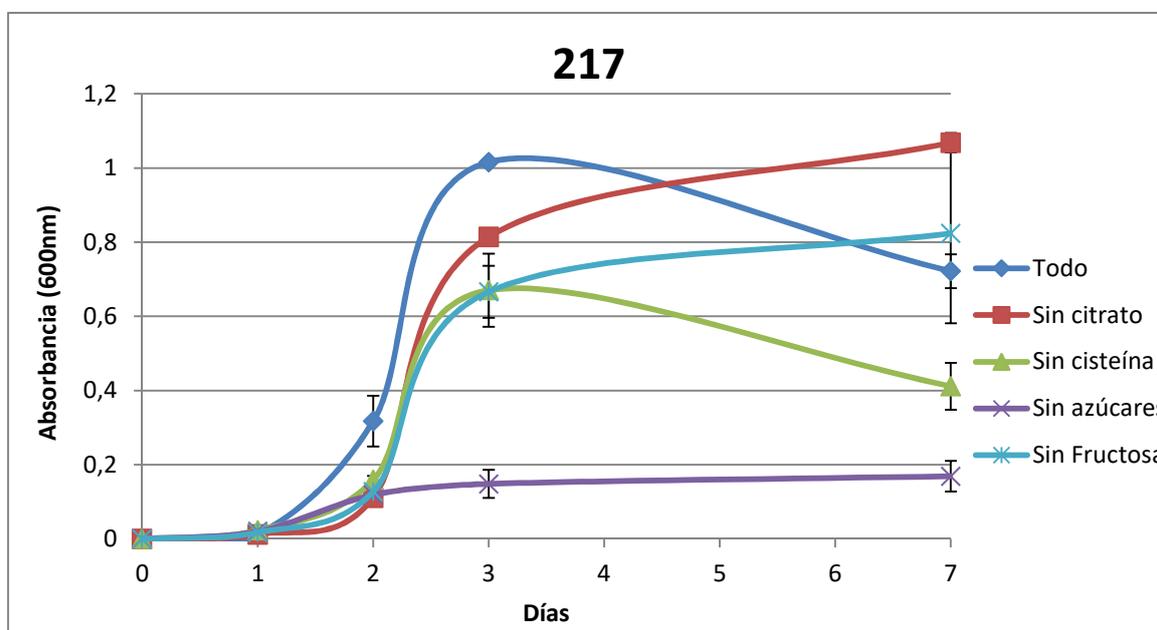


Figura 4: Curvas de crecimiento de *Oenococcus oeni* de la cepa de la CECT 217 y su desviación estándar medidas a una D.O de 600nm, siendo cada punto la media de los triplicados.

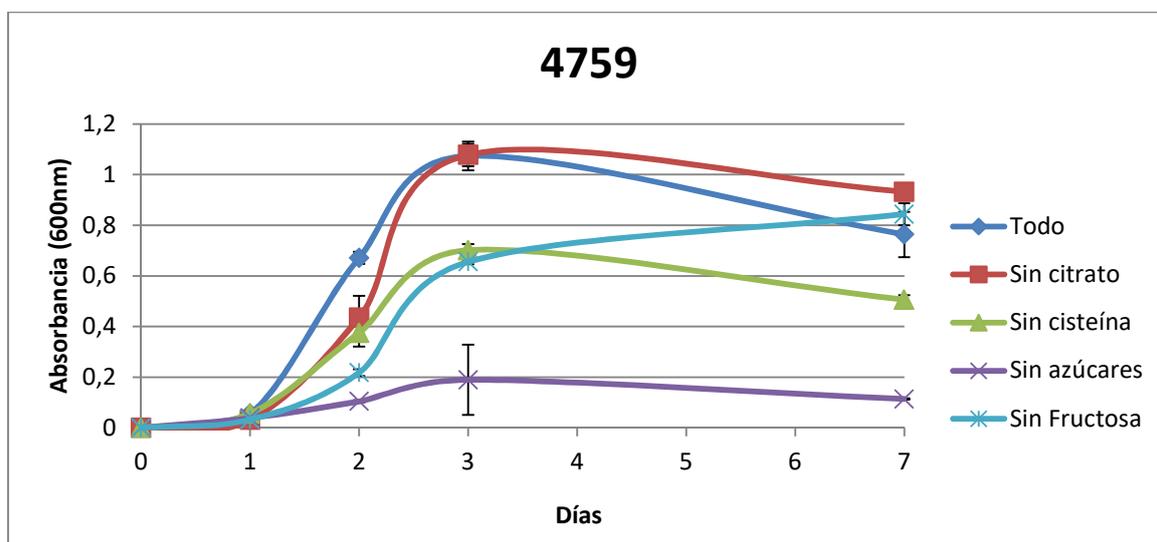


Figura 5: Curva de crecimiento de *Oenococcus oeni* de la cepa de la CECT 4759 y su desviación estándar medidas a una D.O de 600nm, siendo cada punto la media de los triplicados.

Como podemos ver tanto en la figura 4 como en la 5, las bacterias experimentan cambios de crecimiento dependiendo del medio de cultivo. Es significativo, sobre todo, el poco crecimiento que desarrolla *O. oeni* en ausencia de azúcares, razón por la cual se decide eliminar durante el ensayo de la FML.

También se observa que en los medios con ausencia de fructosa tienen un crecimiento más lento. Ambas cepas demuestran tener un escaso crecimiento en el medio con ausencia de cisteína. Sin embargo, en el medio con ausencia de citrato hay claras diferencias entre cepas: en la cepa 4759, como vemos en la figura 5, no parece influir la ausencia de este nutriente mientras que en la cepa 217, figura 4, el crecimiento es más lento, como señalaban estudios anteriores (Álvarez, 2017).

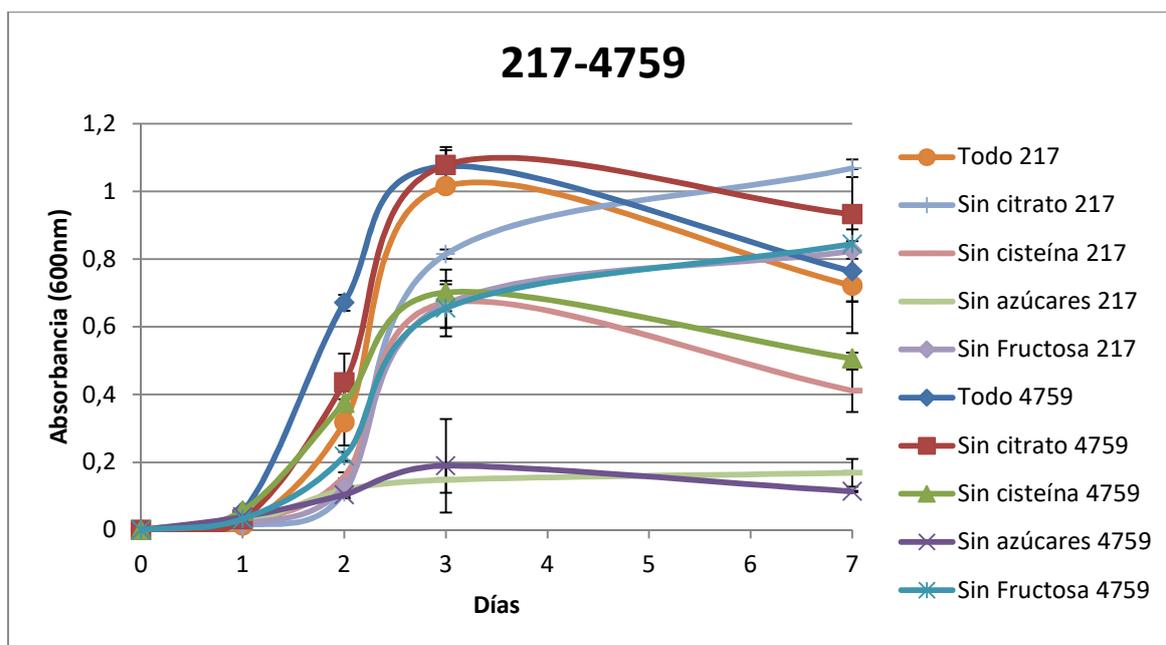


Figura 6: Curva comparativa del crecimiento de *Oenococcus oeni* de la cepa de la CECT 217 y de la CECT 4759 y su desviación estándar medidas a una D.O de 600nm.

En la figura 6, observamos más fácilmente las diferencias existentes entre cepas y nutrientes eliminados. Ambas cepas demuestran su máximo de crecimiento en el medio con todos los nutrientes, sin embargo, la cepa 4759 presenta un buen crecimiento en el medio con ausencia de citrato superando a la cepa 217 en el medio con todos los nutrientes. La ausencia de citrato en la cepa 217 retrasa su crecimiento, demostrando lo comentado en ensayos anteriores (Álvarez, 2017). El mínimo lo presentan ambas cepas en ausencia de azúcares con valores similares de crecimiento, demostrando ser un complejo de nutrientes necesario para su desarrollo. La falta de cisteína afecta al crecimiento de ambas cepas negativamente. En ausencia de fructosa ambas cepas desarrollan un crecimiento más lento, presentando ambas la misma evolución.

Los resultados obtenidos parecen concordar con la diferencia en las necesidades nutricionales entre cepas bacterianas descritas por otros autores (Terrade, 2009).

Como se puede observar en las figuras 4-6, el máximo de crecimiento en la mayoría de los casos se alcanza a las 72h, a partir de este punto la concentración de bacterias comienza a descender.

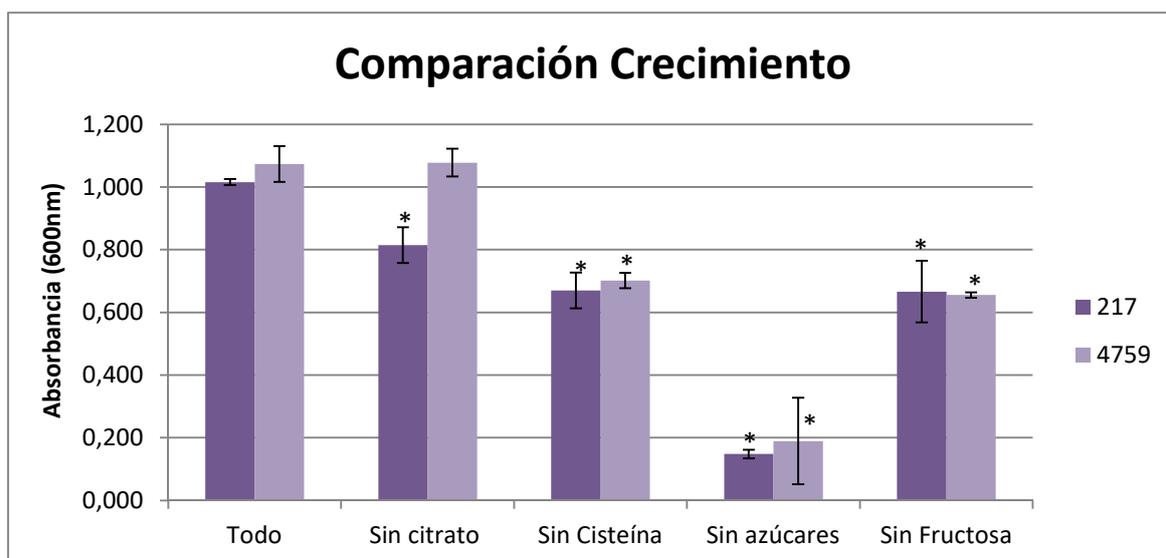


Figura 7: Medidas comparativas del crecimiento de *Oenococcus oeni* de las cepas de la CECT 217 y de la CECT 4759 a las 72h, momento en el que alcanzan su máximo crecimiento en los medios de MLO modificado, MLO modificado sin citrato, MLO modificado sin cisteína, MLO modificado sin azúcares y MLO modificado sin fructosa, medidas a una D.O. de 600nm. Las diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento con respecto al MLO modificado (todo) de cada cepa se analizaron mediante la prueba t de Student (* $p < 0,05$)

En la figura 7 podemos observar una representación de la comparación a las 72 h (cuando la mayoría de las muestras han alcanzado el máximo de crecimiento), entre cepas, del crecimiento en las distintas condiciones. Al realizar la prueba t de Student (T-test) las diferencias de crecimiento a las 72h si eliminamos ciertos nutrientes se hace evidente. También se puede ver con más claridad lo dicho para las figuras 4-6: no hay crecimiento relevante en el medio sin azúcares.

Por otra parte, con respecto a las diferencias entre cepas, el T-test confirma que hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las cepas en el medio con ausencia de citrato. Por lo tanto, la única diferencia en las necesidades nutricionales entre cepas en las condiciones ensayadas se encuentra al eliminar citrato del medio de cultivo.

Al comprobarse que *O. oeni* no se desarrolla correctamente en el medio sin azúcares, se decidió eliminar esta condición en la prueba siguiente, la FML.

6.4 Desarrollo de la FML

6.4.1 Vino inicial

Al vino inicial se le hicieron las siguientes analíticas:

- Ácido málico determinado con la cromatografía de papel y con el método enzimático del kit de ácido málico: 3,6g/L de ácido málico.
- Azúcares residuales determinados con Rebeleim para comprobar que el vino había terminado la FA: 0,55 g/L de azúcares residuales.
- pH medido con el pHmetro: 3,97.
- Acidez total determinado mediante una reacción ácido-base: 7,4 g/L de ácido tartárico.
- Sulfuroso libre determinado gracias al SO₂-matic: 16,5 mg/L.
- Grado alcohólico determinado mediante una ebullometría: 13'15%vol.

A continuación, en la figura 8, se puede ver la imagen correspondiente a la cromatografía de papel del vino inicial. Como se puede observar, las tres manchas del vino muestran que este tiene entre 2 y 4 g/L de ácido málico. Lo que nos indica que nuestras bacterias pueden realizar la FML.

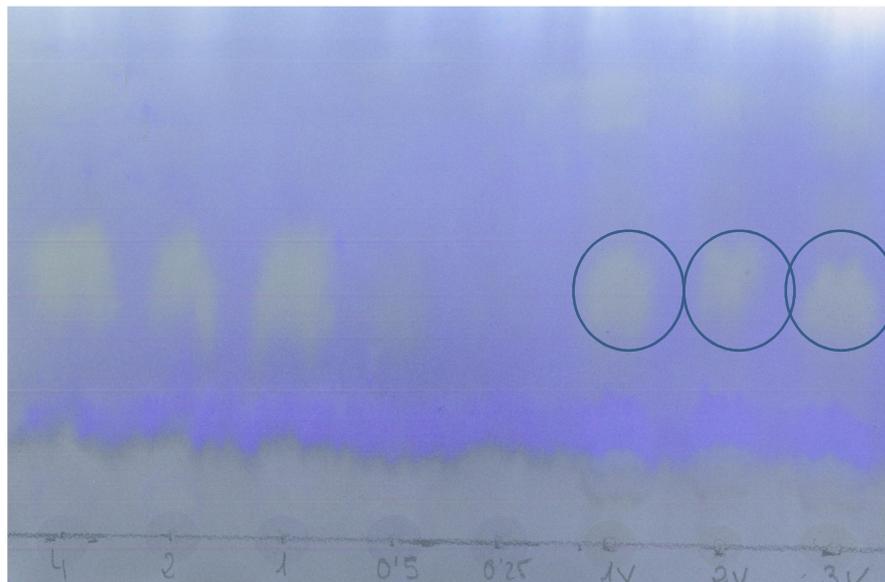


Figura 8: Resultado de la cromatografía de papel del vino inicial antes de inocular, con las muestras patrón (concentraciones de 0,5 a 4 g/L de ácido málico y tres muestras del vino inicial).

6.4.2 Determinación del ácido málico por cromatografía de papel

Se inoculó a ese vino inicial con las bacterias previamente acondicionadas y se hizo un seguimiento por cromatografía de papel de la evolución de la FML.

Tabla 1: Clave utilizada en las cromatografías de papel para identificar las muestras.

| | |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 1. Control + 1 | 16. 217 ₃ Sin Citrato |
| 2. Control + 2 | 17. 217 ₃ Sin Cisteína |
| 3. Control + 3 | 18. 217 ₃ Sin Fructosa |
| 4. Control – 1 | 19. 4759 ₁ Todos los nutrientes |
| 5. Control – 2 | 20. 4759 ₁ Sin Citrato |
| 6. Control – 3 | 21. 4759 ₁ Sin Cisteína |
| 7. 217 ₁ Todos los nutrientes | 22. 4759 ₁ Sin Fructosa |
| 8. 217 ₁ Sin Citrato | 23. 4759 ₂ Todos los nutrientes |
| 9. 217 ₁ Sin Cisteína | 24. 4759 ₂ Sin Citrato |
| 10. 217 ₁ Sin Fructosa | 25. 4759 ₂ Sin Cisteína |
| 11. 217 ₂ Todos los nutrientes | 26. 4759 ₂ Sin Fructosa |
| 12. 217 ₂ Sin Citrato | 27. 4759 ₃ Todos los nutrientes |
| 13. 217 ₂ Sin Cisteína | 28. 4759 ₃ Sin Citrato |
| 14. 217 ₂ Sin Fructosa | 29. 4759 ₃ Sin Cisteína |
| 15. 217 ₃ Todos los nutrientes | 30. 4759 ₃ Sin Fructosa |

Los ensayos se realizaron con cuatro condiciones y tres repeticiones por cada cepa, a lo que añadimos tres controles positivos (vino inicial inoculado con la cepa VP41 de *O. oeni*, los cuales finalmente se descartaron debido a un crecimiento inexistente ya que vemos que no hay un descenso en las concentraciones de ácido málico) y tres controles negativos (el vino inicial sin inocular). Con estos datos se realizó la clave para identificar las muestras en las cromatografías de papel (tabla 1).

En la figura 9 se muestran los resultados de las cromatografías de papel realizadas a las muestras de vino el 4º día de FML. Como se puede observar hay muestras donde queda poco contenido en ácido málico, indicando que se encuentran cercanas a finalizar la FML. Sin embargo, se han señalado aquellas que todavía tenían altas concentraciones de ácido málico. Estas marcas coinciden con aquellas muestras cuyo medio de cultivo estaba modificado para no tener citrato, para acondicionarlas a su falta. Señalar que, durante el acondicionamiento previo a la inoculación, las muestras que habían crecido menos habían sido los medios sin citrato.

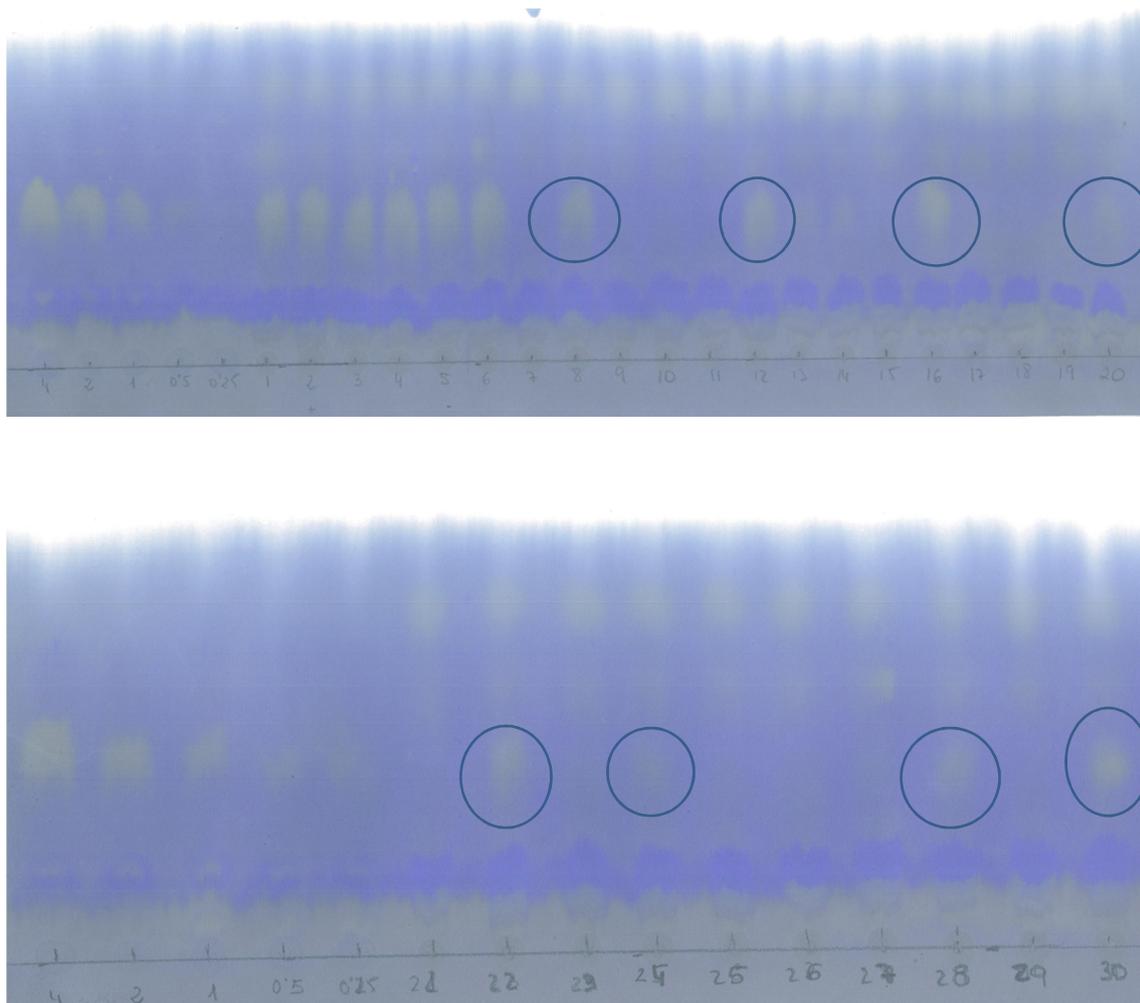


Figura 9: Resultado de la cromatografía de papel de las muestras del día 4, con las muestras patrón (concentraciones de 0,5 a 4 g/L de ácido málico).

Comprobamos que, aparentemente, prácticamente todas las muestras han acabado la FML a día 6 menos las muestras 8, 12 y 16, que se corresponden con los medios que no tenían citrato de la cepa 217, sin embargo, en la cepa 4759 todas las muestras han finalizado FML (fig. 10).

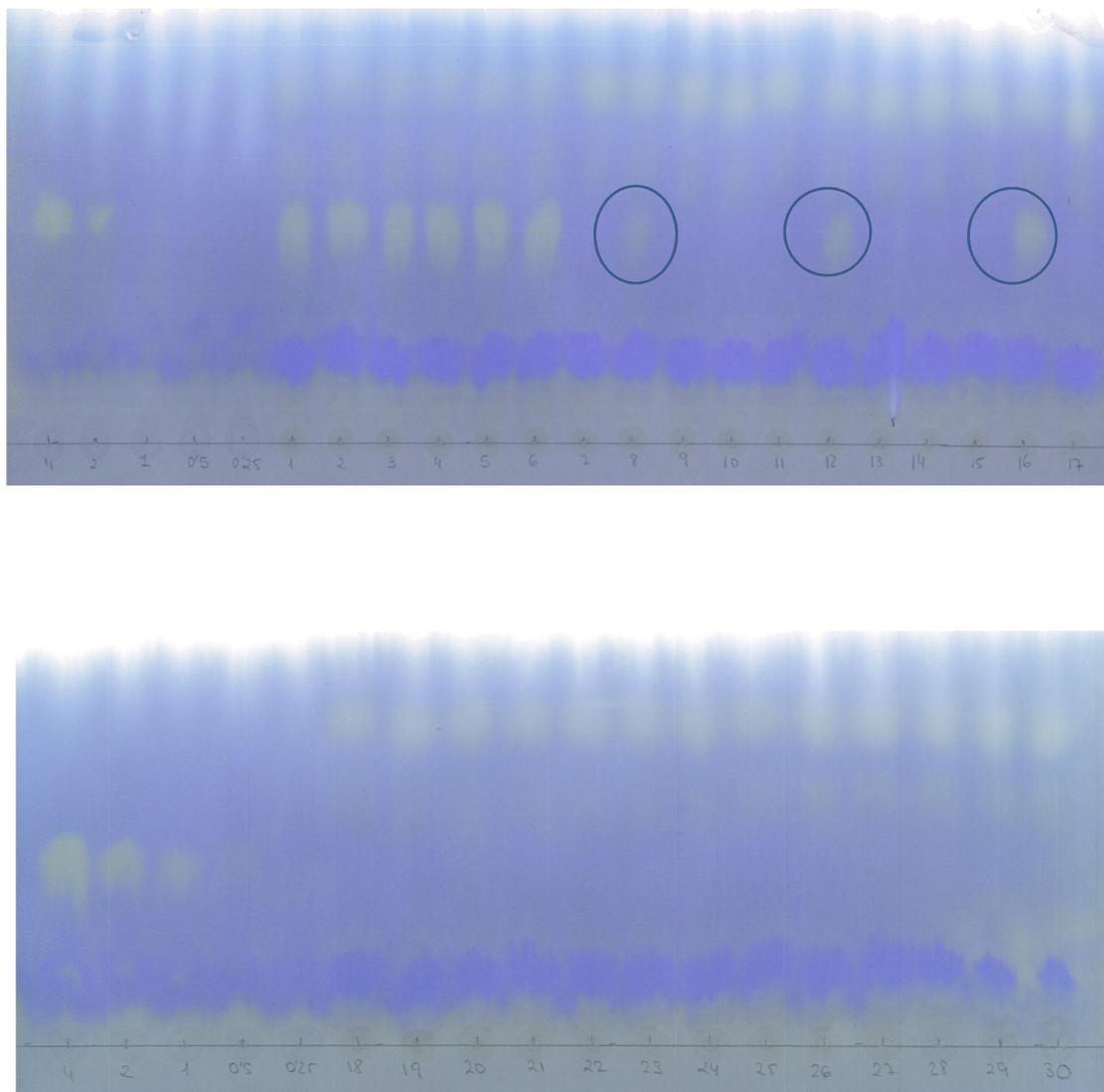


Figura 10: Resultado de la cromatografía de papel de la muestras del día 6, con las muestras patrón (concentraciones de 0,5 a 4 g/L de ácido málico).

Finalmente, en las cromatografías de papel realizadas el día 12, todas las muestras han finalizado la FML (fig. 11).

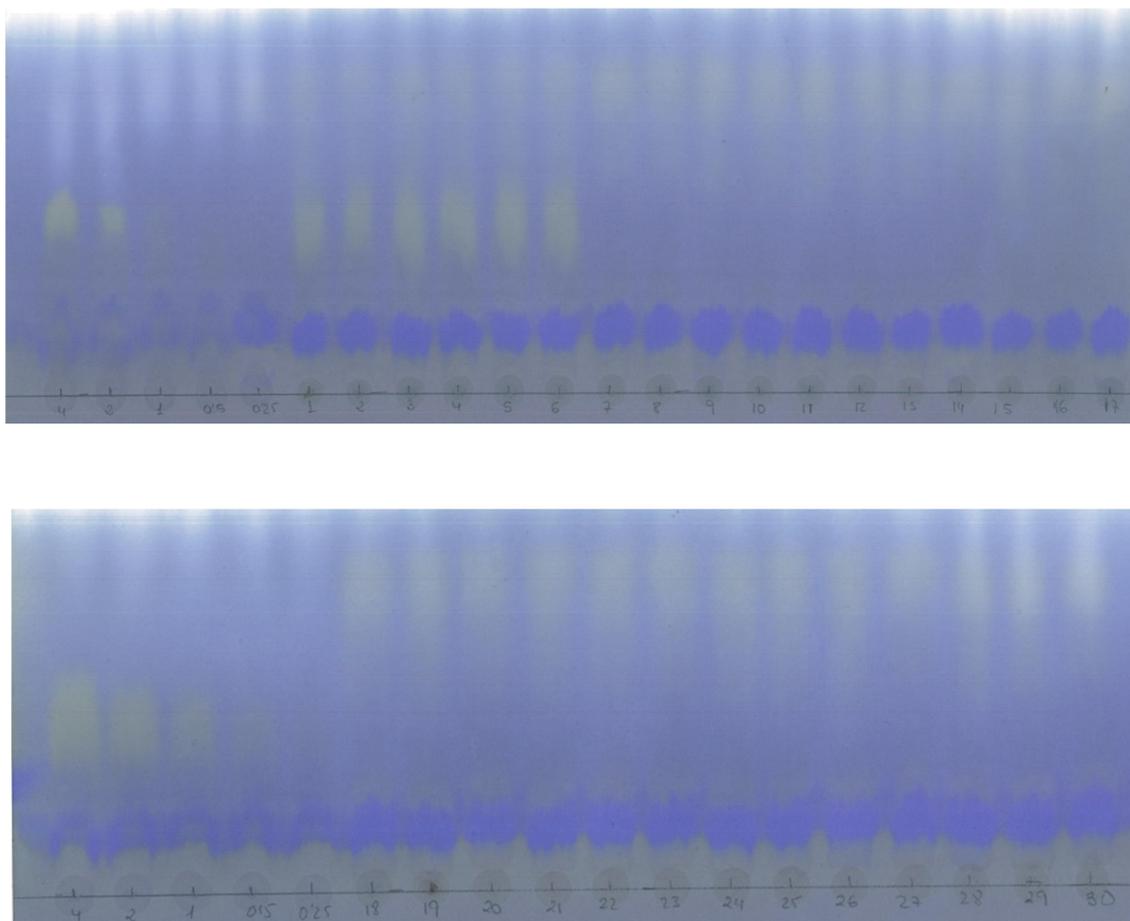


Figura 11: Resultado de la cromatografía de papel de la muestras del día 12, con las muestras patrón (concentraciones de 0,5 a 4 g/L de ácido málico).

6.4.3 Determinación enzimática del ácido málico

Debido a que las cromatografías de papel sólo eran un método cualitativo de la FML, se decidió hacer una determinación enzimática como método cuantitativo de la evolución de las concentraciones del ácido málico en el vino con el paso de los días y apreciar mejor las diferencias en la evolución de las concentraciones de ácido málico dependiendo de la condición estudiada.

Las gráficas que hay a continuación son una representación de la evolución de dicho ácido málico determinado con el método enzimático.

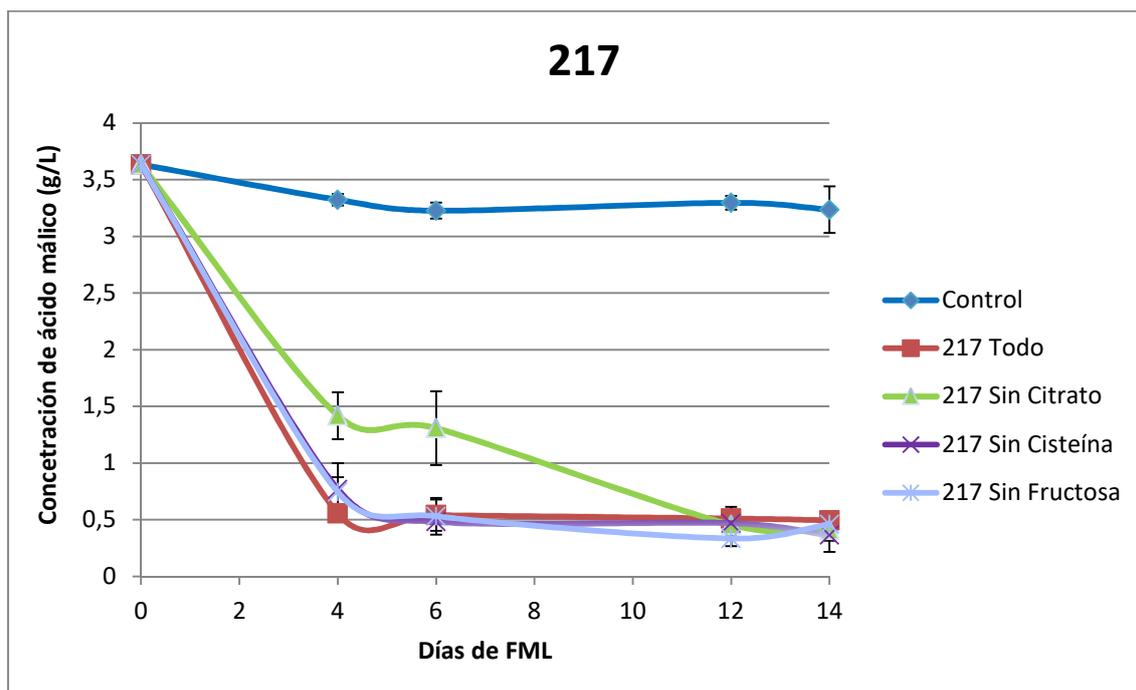


Figura 12: Medidas comparativas del desarrollo de la FML por *Oenococcus oeni* de la cepas de la CECT 217 acondicionadas en los medios de MLO modificado (todo), MLO modificado sin citrato, MLO modificado sin cisteína y MLO modificado sin fructosa cotejados con el control negativo (vino sin inocular), medidas a 340nm.

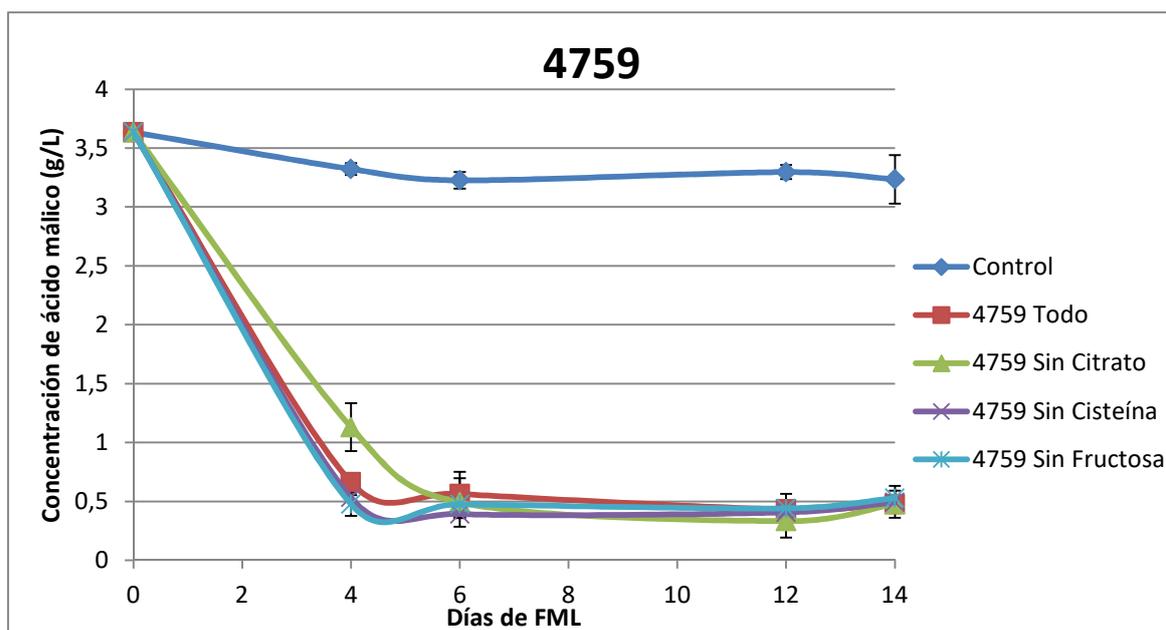


Figura 13: Medidas comparativas del desarrollo de la FML por *Oenococcus oeni* de la cepas de la CECT 4759 acondicionadas en los medios de MLO modificado (todo), MLO modificado sin citrato, MLO modificado sin cisteína y MLO modificado sin fructosa cotejados con el control negativo (vino sin inocular), medidas a 340nm.

Se puede observar que los resultados obtenidos en las figuras 9 y 10 se corresponden con los obtenidos en las figuras 12 y 13: hay un desarrollo más lento en aquellas muestras a las que se les había acondicionado a un medio sin citrato. También se confirma que hay pequeñas diferencias entre cepas como se había demostrado en las pruebas de crecimiento en medio líquido. Sin embargo, no se ven diferencias significativas a la hora de realizar la FML, la mayoría termina FML a los 4-6 días.

El control negativo, a pesar de no haber sido inoculado, presenta un ligero descenso de su contenido de ácido málico debido a la posible presencia de bacterias en el vino inicial ya que este no se esterilizó como se ha indicado anteriormente.

7- Conclusiones

Las conclusiones de este estudio, tras la revisión bibliográfica y los ensayos realizados en el laboratorio, se resumen a continuación:

1. Hay variaciones en el crecimiento de *O. oeni* cuando se eliminan nutrientes en el medio MLO que dependen del nutriente eliminado y la cepa utilizada.
2. El medio MLO sin los azúcares no resulta adecuado para el desarrollo y crecimiento de *O. oeni*.
3. En los casos estudiados de *O. oeni*, no parece haber mejora en la FML si acondicionamos las bacterias eliminando componentes.
4. Para las cepas estudiadas, el crecimiento previo de las bacterias en los medios ensayados apenas afecta al desarrollo de la FML, excepto en ausencia de citrato. Posibilidad de futuros ensayos que estudien y reafirmen estas conclusiones.
5. En relación con las necesidades nutricionales, se confirma que hay diferencias entre cepas. Necesidad de futuros estudios que profundicen en las necesidades nutricionales.

Una vez expuestas estas conclusiones, mi reflexión personal es señalar, primero, la complejidad de este ensayo por la dificultad que tienen las bacterias en sí, para desarrollarse, y más, compitiendo en un ambiente con levaduras. Por ello, la prueba del crecimiento bacteriano en medio líquido hubo de repetirse hasta en tres ocasiones al aparecer contaminaciones tanto en los controles como en las muestras al tercer día de los ensayos.

Con relación al estudio en sí, el ensayo ha demostrado que, tan sólo ante la falta de citrato, la cepa 4759 se desarrolla sin problemas, demostrando así que los azúcares son determinantes para *O. oeni*, y que tanto la presencia de cisteína como de fructosa mejoran su crecimiento. También se ha demostrado las diferencias nutricionales entre cepas. Ante esto, las perspectivas de futuro son:

- una profundización en estas diferencias nutricionales, como por ejemplo, variando la concentración de citrato, cisteína y fructosa,
- una investigación del desarrollo de *O. oeni* en ausencia de otros nutrientes, con la posibilidad de abaratar los costes de la preparación de los medios de cultivo sin influir negativamente en el crecimiento de las bacterias,
- su influencia a la hora de realizar la FML y,
- la posibilidad de analizar los vinos finales con el fin de estudiar su efecto sobre las aminas biógenas.

8- Bibliografía

- Alegría E. G., López I., Ruiz J.I., Sáenz J., Fernández E., Zaragoza M., Dizo M., Torres C., Ruiz-Larrea F. (2004). High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol.
- Álvarez Muñoz, I. (2017). Estudio y optimización de medios de cultivo para el crecimiento de *Oenococcus oeni*. Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias, Campus de Palencia, Universidad de Valladolid.
- Betteridge A., Grbin P., Jiranek V., (2015). Improving *Oenococcus oeni* to overcome challenges of wine malolactic fermentation. School of Agriculture, Food and Wine. University of Adelaide. Australia.
- Berbegal C., Benavent-Gil Y., Pardo I. & Ferrer S. (2015). A novel culture medium for *Oenococcus oeni* malolactic starter production. Enolab, Universidad de Valencia. Elsevier.
- Bordons A., Reguant C. (2013) Bioquímica de las bacterias lácticas del vino y la fermentación maloláctica. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBB). Revista: Bioquímica del vino.
- Brizuela N. S., Bravo – Ferrada B.M., Valdés La Hens D., Hollman A., Delfederico L., Caballero A., Tymczyszyn E. E., Semorile L. (2017). Comparative vinification assays with selected Patagonian strains of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum*.
- Cecconi D., Milli A., Rinalducci S., Zolla L., Zapparoli G. (2009). Proteomic analysis of *Oenococcus oeni* freeze-dried culture to assess the importance of cell acclimation to conduct malolactic fermentation in wine.
- Deguchi Y., Morishita T. (1991) Nutritional requirements in multiple auxotrophic lactic acid bacteria: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways in *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Pediococcus acidilactici*. Yakult central institute for microbiological research, Tokyo, Japan.
- Gutiérrez Hernández G.D, (2015). Tesis doctoral, Diseño y optimización de un medio de crecimiento definido para *Oenococcus oeni* en condiciones enológicas. Universidad Pontificia Católica de Santiago de Chile.
- König H., Uden G., Frölich J., (2017). Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine.
- Lerm E., Engelbrecht L., Toit M. du (2011) Selection and characterisation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* South African wine isolates for use as Malolactic Fermentation Starter Cultures. Institute for wine biotechnology, Department of Viticulture and Oenology, University. South Africa.
- Liu S-Q. (2002). Malolactic fermentation in wine - beyond deacidification. Journal of Applied Microbiology 92:589-601.

- Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *International Journal of General and Molecular Biology*.
- Magni C., García – Quintans N., Martín M. Mendoza D. de, López P. (2008). Fundamentos biológicos, procesos y biotecnología de las bacterias lácticas (Vol. I), cap. 3, pp. 1-38. Ed. Pérez-Martín G. CSIC
- Mesas J. M, Rodríguez, M.C., Alegre M.T. (2004). Tolerancia de *Oenococcus oeni* RS1 a las condiciones de estrés del vino.
- Papadimitriou K., Alegría A., Bron P. A., Angelis M. de, Gobbetti M., Kleerebezem M., Lemos J. A., Linares D. M., Ross P., Stanton C., Turróni F., Sinderen D.van, Varmanen P., Ventura M., Zúñiga M., Tsakalidou E., Kokb J., (2016). *Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria*.
- Romero EG; Feliú, JAT; Gascueña JM; Vozmediano LC; Martínez AG; Cañas PMI. (2003). Identificación y selección de bacterias lácticas de interés enológico y comercial para su aplicación a la mejora de la calidad de los vinos tintos de Castilla la Mancha. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias.
- Swiegers J.H., Bartowsky E.J., Henschke P.A. & Pretorius I.S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*.
- Terrade N, Mira de Orduña R. (2009) Determination of the essential nutrient requirements of wine-related bacteria from the genera *Oenococcus* and *Lactobacillus*
- Todar K. (2008), Nutrition and growth of Bacteria (page 1) Web Review of Todar's Online Textbook of Bacteriology. "The Good, the Bad, and the Deadly". (*SCIENCE Magazine*- June 4, 2004 - Vol 304: p. 1421).
- Zee E. ann, (2002). Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and applications: Proceedings of the seventh Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications.
- Zhang, D. – S., Lovitt, R. W. (2005). Studies on growth and metabolism of *Oenococcus oeni* on sugars and sugar mixtures.
- Zhang, D. & Lovitt, R.W. (2006). Review strategies for enhanced malolactic fermentation in wine and cider maturation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81:1130- 1140.
- Zúñiga, M., Pardo, I., Ferrer, S. (1993). An improved medium for distinguishing between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. Departament de Microbiologia, Facultat de Ciències Biològiques, Universitat de València, Spain.