

ELS BACTERIS DE LA FERMENTACIÓ MALOLÀCTICA DEL VI

Escrit per:

Albert Bordons

Dept. de Bioquímica i Biotecnologia
Universitat Rovira i Virgili

Els bacteris làctics dels aliments fermentats

Els bacteris làctics o bacteris de l'àcid làctic són un conjunt de bacteris grampositius de baix contingut en G+C, i per tant, de la mateixa branca evolutiva que *Bacillus* i *Clostridium*. Es classifiquen dins l'ordre *Lactobacillales* i els gèneres més coneguts són *Lactobacillus* (unes 100 espècies), *Leuconostoc* (15 espècies), *Lactococcus* (7 espècies), *Pediococcus* (8 espècies) i *Streptococcus* (68 espècies). Tenen en comú el fet de produir àcid làctic a partir de sucres a causa del seu metabolisme, exclusivament fermentatiu: la fermentació làctica. Per això són anaerobis, si bé toleren l'oxigen, ja que contenen superòxid-dismutasa i peroxidasa. Són per tant anaerobis aerotolerants. En canvi, no tenen catalasa, present en altres organismes aerobis i anaerobis facultatius. Com veiem pels noms dels gèneres, alguns presenten formes de bacil i altres de coc. D'altra banda no són mòbils i tampoc són esporulats.

Des del punt de vista metabòlic, tenen uns requeriments nutritius complexos (aminoàcids, vitamines, etc.), i això va lligat al fet que viuen en hàbitats rics en nutrients, com la llet,



Figura 1. Els vins de qualitat són el resultat de la fermentació alcohòlica dels llevats seguida en la majoria dels casos per la fermentació malolàctica dels bacteris làctics.

els vegetals, o l'aparell digestiu dels animals. Encara que alguns pocs d'aquests darrers són patògens (uns quants *Streptococcus*), la gran majoria dels bacteris làctics són més coneguts per les aplicacions i beneficis que se'n treuen, sobretot en el camp alimentari.

Molts aliments fermentats ho són per l'acció dels bacteris làctics. Els més coneguts són els derivats de la llet (iogurts, altres llets fermentades i els formatges), però també hi ha productes càrnics com diversos embotits, alguns productes de peix fermentat, i sobretot molts productes vegetals fermentats per bacteris làctics, com per exemple la col àcida. Tots aquests aliments s'anomenen globalment productes làctics.

L'acció beneficiosa dels bacteris làctics sobre aquests aliments es pot resumir en:

- una millor conservació dels aliments, ja que l'àcid làctic produït fa baixar el pH de l'aliment i això hi dificulta molt el creixement d'altres microorganismes perjudicials, patògens inclosos;
- la modificació dels aliments, amb l'aparició de nous gustos, aromes o textures, i sovint amb una major digestibilitat. Aquestes modificacions són interessants per al seu consum.

El vi i els bacteris làctics

El vi també és un aliment fermentat (Figura 1), la fermentació principal del qual és l'alcohòlica que duen a terme els llevats (*Saccharomyces cerevisiae*) tot transformant els sucres del most del raïm en etanol. Ara bé, com que el most i els recipients on té lloc la vinificació no són estèrils, a part dels llevats (autòctons o inoculats) també hi ha altres microorganismes, com els bacteris acètics i els bacteris làctics.

El nombre de bacteris làctics durant la fermentació alcohòlica normalment és molt baix, a tot estirar 10^2 per ml (Figura 2), ja que molts d'ells són inhibits per l'etanol i altres compostos produïts pels llevats, i pel SO_2 afegit al most per tal de controlar la població bacteriana, especialment els bacteris acètics. Quan la fermentació alcohòlica s'acaba i els llevats moren, alguns bacteris làctics poden prosperar i aconseguir un cert creixement, fins a 10^7 bacteris per

ml en alguns casos, en part gràcies als compostos alliberats pels llevats. Aleshores aquests bacteris làctics poden produir diverses transformacions en el vi, la més interessant de les quals és l'anomenada fermentació malolàctica (FML).

Els bacteris làctics que es poden aïllar en mostres de mostos i vins són dels gèneres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* i sobretot d'*Oenococcus*.

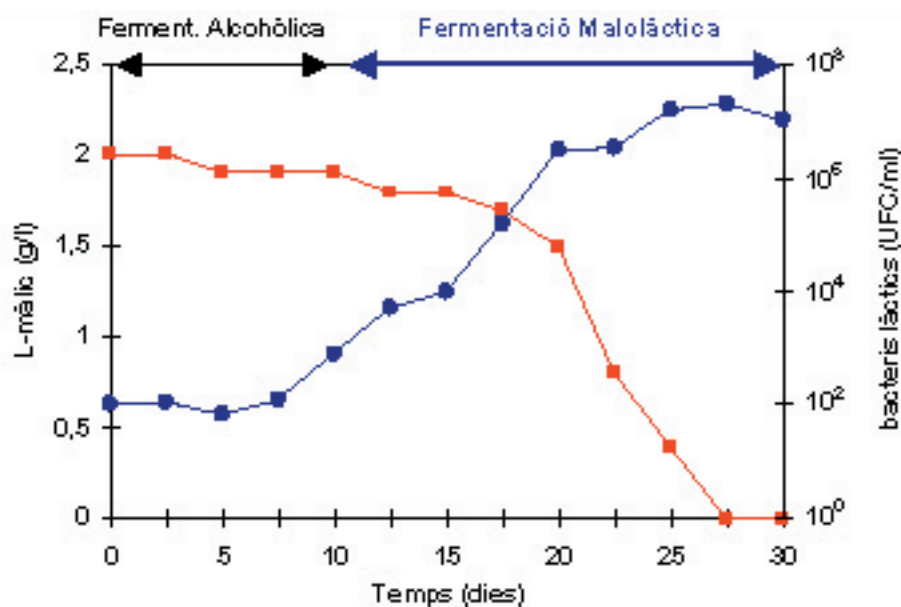


Figura 2. Evolució del contingut en àcid L-màlic (quadrats en roig) i del nombre de bacteris làctics (cercles en blau) al llarg d'una fermentació alcohòlica (fins al dia 10) seguida de la fermentació malolàctica.

Oenococcus oeni

Oenococcus oeni és l'única espècie del gènere *Oenococcus*, nom que fou proposat (Dicks et al., 1995) per a l'espècie coneguda fins aleshores com a *Leuconostoc oenos* (Garvie et al., 1967). Abans es consideraven *Leuconostoc* perquè són cocs i realitzen la fermentació heterolàctica, és a dir, que quan fermenten els sucres produeixen altres compostos a més d'àcid làctic (l'isòmer D-): sobretot CO_2 i també àcid acètic i etanol en petites quantitats. Tanmateix tenen unes característiques exclusives, que els fan diferents dels *Leuconostoc*:

- el seu hàbitat és exclusivament el most i el vi;
- poden créixer al pH del vi, que oscil·la entre 3 i 4;
- poden créixer en presència d'etanol, fins al 10% (v/v) i més.

Però sobretot, la dada més rellevant per proposar que *Oenococcus* és un altre gènere diferent de *Leuconostoc* fou la comprovació, per comparació de les seqüències de l'RNA ribosomal, que filogenèticament *Oenococcus* està ben separat de *Leuconostoc*, així com d'altres

bacteris làctics relacionats com alguns *Lactobacillus*. Així doncs, la majoria d'aïllats en el procés de vinificació, i sobretot després de la fermentació alcohòlica, tenen les característiques d'*O. oeni* (Figura 3). És l'espècie predominant en la fermentació malolàctica de vins de molt diversos llocs, si bé en alguns casos s'ha comprovat que aquesta fermentació és duta a terme per altres espècies, com *Lactobacillus plantarum*.

La fermentació malolàctica

El paper beneficiós més conegut dels bacteris làctics en els vins és la fermentació malolàctica (FML), que

produceix una desacidificació del vi. El most de la majoria de raïms, excepte els de climes molt càlids, conté una certa quantitat d'àcid L-màlic (de 2 a 5 g/l), que té un gust fort i aspre, no gaire agradable. Durant la fermentació alcohòlica els llevats pràcticament no el degraden i per tant aquest àcid màlic hi és, als vins. Normalment després la fermentació alcohòlica (Figura 2), si bé molt ocasionalment poden fer-ho de forma simultània a aquesta, els bacteris làctics com *O. oeni* poden realitzar la FML, que és la descarboxilació de l'àcid L-màlic a L-làctic, amb despreniment de CO_2 , que apareix en forma de petites bombolles en el vi. Aquesta reacció es produeix perquè aquests bacteris tenen l'enzim malolàctic (Figura 4), que requereix Mn^{++} i NAD^+ . Com que l'àcid màlic és dicarboxílic i el làctic és monocarboxílic, això comporta una reducció de l'acidesa, de 0,1 a 0,5 unitats de pH.

Des del punt de vista metabòlic la FML no és una fermentació de les clàssiques com la mateixa fermentació làctica, on s'utilitzen sucres com a substrats i s'obtenen ATP per fosforilació en el substrat en les reaccions de la glucòlisi. Només és una descarboxilació que no sembla que comporti en principi cap benefici energètic a les cèl·lules que la realitzen, i on l'únic avantatge aparent seria la pujada del pH extern. Tanmateix, s'ha descobert que la FML és una de les fermentacions peculiars amb ATP-sintasa, ja que la sortida del L-làctic de les cèl·lules (Figura 4) s'efectua mitjançant un simport amb protons (Salema *et al.*, 1996), i que paral·lelament hi ha una entrada de protons a favor del gradient (el pH extern és de 3-4 i l'interior és superior a 6), mitjançant una ATP-sintasa, que ho acobla a una síntesi d'ATP. Altres fermentacions peculiars amb ATP-sintasa com aquesta són per exemple les descarboxilacions de succinat a propionat per *Propionigenium* o d'oxalat a format per *Oxalobacter*. Així doncs, *O. oeni* pot obtenir uns quants ATP per la descarboxilació de l'àcid màlic, és a dir la FML, en un medi com el vi on pràcticament no



Figura 3. *Oenococcus oeni*, l'espècie més habitual a la fermentació malolàctica dels vins. (Universitat de Bordeus, www.u-bordeaux2.fr/oenologie)

hi ha sucres, i on per tant els bacteris no poden obtenir ATP per la fermentació làctica. Aquests ATP, juntament amb alguns nutrients romanents de les restes dels llevats, poden permetre un lleuger creixement d'aquests bacteris en el vi.

Des del punt de vista enològic, aquesta desacidificació del vi comporta al mateix temps una millora en la seva qualitat, en reduir la sensació d'aspror i forta acidesa de l'àcid màlic. A més a més, l'àcid L-làctic que apareix és més agradable i suau al tast. La FML té lloc sobretot en els vins negres però també en alguns de blancs.

Altres avantatges de la fermentació malolàctica

A part de la desacidificació que suposa la FML, la intervenció d'*Oenococcus oeni* als vins té altres aspectes beneficiosos. Un benefici enològic, conseqüència de la petita pujada

de pH, és que el color del vi negre, a causa sobretot dels antocians com la malvidina, evoluciona cap a tonalitats menys intenses i no tan roges, cosa que el fa més atractiu visualment.

Des del punt de vista organolèptic, la FML comporta una millora del vi perquè a més de la desacidificació i canvi de l'àcid màlic pel làctic, el desenvolupament dels bacteris provoca canvis en els continguts de carbohidrats, aminoàcids, àcids orgànics i altres components del vi. Els principals compostos que apareixen són el diacetil, l'acetoina, el lactat d'etil i una mica d'acètic. El diacetil es considera el més important d'aquests compostos pel seu aroma de mantega o nata (aromes lactis) que caracteritza molts vins que han realitzat la FML. Apareix en petites concentracions (fins a 2 mg/l) però té un llindar de detecció sensorial molt baix, i es produeix per degradació de l'àcid cítric.

D'altra banda, els bacteris làctics del vi també poden produir petites quantitats d'exopolisacàrids, que s'uneixen amb els tanins, responsables de l'astringència dels vins joves, amb la qual cosa baixa l'astringència i el vi es torna més agradable al tast.

Finalment, l'estabilitat microbiològica que s'aconsegueix amb la FML suposa un altre benefici molt important. Els vins on ha tingut lloc la FML poden ser embotellats sense el risc d'un possible desenvolupament bacterià posterior, que podria donar lloc a la formació de gas (CO_2) un cop el vi és a les ampolles. A més durant la FML els bacteris exhaureixen l'àcid màlic i altres nutrients com els sucres,

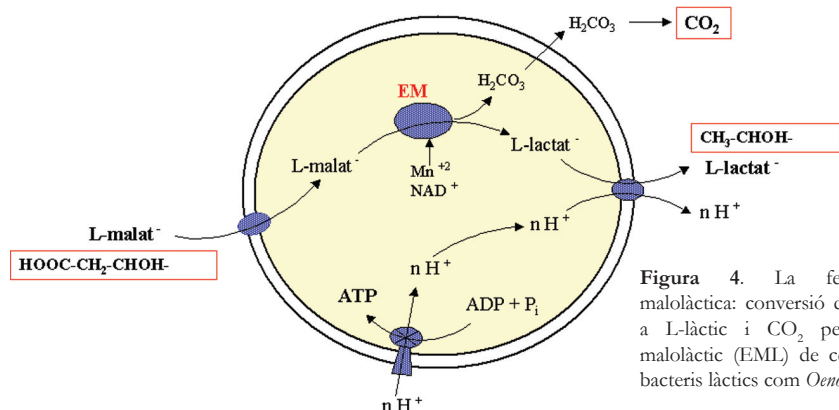


Figura 4. La fermentació malolàctica: conversió de L-màlic a L-làctic i CO_2 per l'enzim malolàctic (EML) de cèl·lules de bacteris làctics com *Oenococcus oeni*.

amb la qual cosa és molt més difícil el creixement posterior de qualsevol tipus de bacteri. De fet, en alguns cellers es promou la FML encara que no es desitgi una disminució de l'acidesa, perquè un cop l'àcid màlic s'ha convertit en làctic, aquest és molt estable biològicament en les condicions del vi.

Possibles perjudicis dels bacteris làctics en els vins

En algunes ocasions el desenvolupament dels bacteris làctics i la mateixa FML

poden tenir conseqüències negatives per a la qualitat dels vins. Afortunadament la majoria d'aquests casos es produeixen molt esporàdicament, sobretot quan hi ha hagut altres problemes previs a la fermentació o de poc control de la vinificació.

D'aquests possibles perjudicis, el més freqüent és el picat làctic, que és la producció d'una certa quantitat de l'àcid làctic i també d'acètic per part dels bacteris làctics. Quan en el vi hi

hagi sucres residuals que els llevats no hagin consumit, la situació normal per als bacteris és consumir-los, fent la fermentació làctica i per tant produint àcid làctic. En aquest cas s'hi produeix el D-làctic, mentre que a la FML a partir de L-màlic apareix L-làctic. Per tant, l'anàlisi enzimàtica dels dos isòmers d'àcid làctic permet distingir si hi ha un inici de picat làctic. Atès que *Oenococcus*, *Leuconostoc* i alguns *Lactobacillus* (com *L. brevis* i *L. hilgardii*) fan la fermentació heterolàctica, a més d'àcid làctic produeixen àcid

Velázquez, *Els borratxos o El triomf de Bacus* (1629)



acètic a partir de sucres. Tanmateix, les espècies homofermentatives com *Pediococcus* i altres *Lactobacillus* també poden produir àcid acètic a partir de pentoses. El picat làctic pot aparèixer quan hi ha una proliferació de bacteris làctics perquè els llevats encara no han acabat la fermentació alcohòlica, per problemes diversos d'aturades de la susdita fermentació.

En alguns vins poc àcids la FML duta a terme pels bacteris làctics pot donar lloc a una desacidificació excessiva, cosa que no és convenient perquè part del caràcter del vi es perd si és poc àcid i a més, el pH més alt pot afavorir el creixement d'altres bacteris perjudicials. Per evitar aquesta desacidificació no volguda se sol afegir més sulfurós en acabar la fermentació alcohòlica (per tenir més de 25 mg/l de SO₂ lliure), o bé es pot recórrer a l'addició de lisozim per inhibir els bacteris làctics.



Un altre dels problemes ocasionals relacionats amb la qualitat del vi que poden ser causats pels bacteris làctics és l'anomenada malaltia del greix. Consisteix en la producció excessiva d'exopolisacàrids (dextrans), sobretot per soques de *Pediococcus*, que dona un característic aspecte filant i oliós al vi.

D'altra banda, només hi ha dos compostos que poden ser tòxics per als humans que puguin ser atribuïts als bacteris làctics del vi: el carbamat d'etil i les amines. El primer és un carcinogèn detectat en alguns vins en concentracions molt baixes (com a molt uns 20 µg/l) i que pot aparèixer per reacció amb l'etanol dels productes de degradació de l'arginina com la citrul·lina o el carbamil·fosfat per part dels bacteris làctics. També es pot formar per reacció amb l'etanol de l'urea excretada pels llevats. En el cas dels làctics, per evitar aquest problema s'estudia la utilització d'estàrters que no degradin l'arginina o si més no que no acumulin aquests precursors del carbamat d'etil.

Les amines com la histamina poden arribar ocasionalment en alguns vins a més de 10 mg/l i el seu consum pot comportar diverses patologies, incloent-hi trastorns cardíacs. Poden ser produïdes per algunes soques de bacteris làctics per descarboxilació dels aminoàcids corresponents (com la histidina en el cas de la histamina). L'aparició està lligada a una manca d'higiene durant la vinificació.

Causes de no-realització o retards de la fermentació malolàctica

En primer lloc cal tenir en compte que el vi és un medi hostil per als microorganismes en general i en particular per als bacteris làctics. Amb l'excepció dels bacteris acètics que poden oxidar l'etanol del vi a àcid acètic, hi ha molt pocs microorganismes capaços de mantenir-se o créixer als vins. A diferència del most, que és un medi ric en components nutritius (fonamentalment sucres), el vi és quasi un medi mínim, i amb els problemes agreujants de contenir etanol, que és un bon antimicrobià, tenir un pH relativament àcid, i tenir una certa concentració de sulfurós afegit al llarg de la vinificació.

Des del punt de vista de creixement bacterià, cal recordar també que una de les característiques dels bacteris làctics en general són els seus requeriments nutritius complexos. Així doncs, en principi no ens hauria d'estranyar que els bacteris làctics no poguessin prosperar amb facilitat als vins. D'altra banda, si el vi fos un medi més ric, amb concentracions de sucres residuals més importants, com hem vist aleshores sí que hi hauria un bon creixement bacterià, sobretot dels bacteris làctics heterofermentatius que farien la fermentació làctica (a part de la FML), que els és molt més rendible energèticament però que donaria lloc a la producció de compostos no desitjables, sobretot l'àcid acètic.

El pH del vi és un dels principals factors que afecten el comportament dels bacteris làctics. Si bé llur pH òptim és al voltant de 4,5, poden efectuar la FML als pH normals dels vins, al voltant de 3,5, però tenen força dificultats a pH inferiors a 3,2. Quant a l'etanol, per sobre del 10% la reducció de l'activitat de la FML ja comença a ser manifesta, i acaba més tard com més etanol té el vi, per bé que aquesta influència depèn molt de les soques. D'aquesta manera, en general *O. oeni* es caracteritza per ser més resistent, mentre que diversos *Lactobacillus* en resulten més afectats. En qualsevol cas, la concentració màxima d'etanol que permet la realització de la FML, si bé certament retardada, és del 15% (v/v).

Respecte l'aeració, si bé aquests bacteris són aerotolerants i per tant poden créixer i realitzar la FML en presència d'oxigen, s'ha observat que moltes soques es desenvolupen millor sense oxigen, excepte en alguns casos que serien afavorits per petites concentracions d'oxigen. De totes maneres, el creixement amb aire comporta molt sovint la producció d'acetat, i per tant és preferible l'anaerobiosi.

La sensibilitat dels bacteris làctics al sulfurós és variable, però en general concentracions superiors a 50 mg/l de SO₂ combinat o 10 mg/l de lliure ja poden inhibir la FML. Els àcids grassos de cadena curta procedents de les cèl·lules de llevats també poden tenir un efecte negatiu, depenent de quins es tracti i de la quantitat que n'hi hagi. Així per exemple, en assaigs de laboratori en vins simulats, col·laboradors de l'autor han apreciat retards notables de la FML en presència de 20 mg/l de decanoic o de 5 mg/l de dodecanoic. La possible acció tòxica dels àcids grassos es pot eliminar mitjançant l'addició d'escorces de llevats o altres adjuvants com extracte de llevat o polisacàrids.

En ocasions on no es respecten els terminis de seguretat, els pesticides afegits per al control fitosanitari de les vinyes poden passar al most i per tant als vins. Si bé les concentracions que en poden resultar al final de la fermentació alcohòlica són molt baixes, atesa la seva toxicitat poden afectar els bacteris ja presents als mostos, i en conseqüència afectar la FML posterior. En algunes ocasions també s'han detectat als mateixos vins. D'altra banda, els tanins procedents dels raïms, com a compostos polifenòlics, poden tenir una activitat antibacteriana, i s'ha comprovat que la FML presenta més dificultats en bótes de roure novell per la presència d'aquests compostos.

La relació dels llevats amb els bacteris làctics que han d'efectuar la FML pot ser contradictòria. El vi és un medi on han crescut els llevats i que ha estat alterat per ells. D'una banda, les restes de cèl·lules de llevats aporten components nutritius per als bacteris, però d'altra banda els llevats han eliminat o metabolitzat compostos que ja eren al most i que podien ser necessaris per als bacteris làctics, com algunes vitamines o sals minerals, i poden haver produït alguns compostos tòxics com el mateix etanol o algunes proteïnes. Aquesta dependència és variable segons la soca de llevat, i els procediments tecnològics seguits en acabar la FML,

com trasbalsos o clarificacions.

Finalment, un altre factor biològic que pot afectar els bacteris làctics i la FML són els bacteriòfags, els virus bacterians, en aquest cas dels bacteris làctics. La presència de bacteriòfags al vi sovint ha estat associada a dificultats en la FML, però s'ha vist realment que la presència d'aquests virus pot ser un fenomen corrent però no perjudicial perquè un percentatge important dels bacteris làctics autòctons són lisogènics, és a dir, tenen incorporat el virus dins del seu DNA, sense que els afecti en la seva viabilitat. Els bacteris lisogènics indueixen espontàniament els virus, però aquests no es poden multiplicar en el vi, a causa del mateix caràcter hostil que aquest representa per als bacteriòfags.

Possibles solucions als problemes de la fermentació malolàctica

Com s'ha pogut comprovar, molts d'aquests factors inhibidors afecten principalment el creixement dels bacteris làctics, però com ja s'ha dit aquest augment del nombre de cèl·lules bacterianes que es dona als vins després de la fermentació alcohòlica sovint és molt poc rellevant pel mateix caràcter hostil i pobre del vi, quant a components nutritius.

Malgrat això, la FML pot ser duta a terme si hi ha un nombre mínim de cèl·lules de bacteris que puguin realitzar-la, al voltant de 10⁷ per ml. Per això, si la població autòctona del vi no ha arribat a aquests nivells perquè no ha pogut créixer per algun dels factors comentats, la primera solució i més usual i convenient, és inocular una població de cèl·lules de bacteris làctics apropiats per aquest vi. Això es fa habitualment posant-hi bacteris estàrters (d'*O. oeni*) reactivats d'algun preparat comercialitzat o d'una soca seleccionada als mateixos cellers, per bé que també es pot recórrer a afegir una certa quantitat d'un vi del mateix celler que estigui fent la FML eficaçment. Pel que fa a la inoculació amb estàrters, fins fa uns anys a la majoria de soques comercialitzades els calia un període de reactivació de les cèl·lules liofilitzades

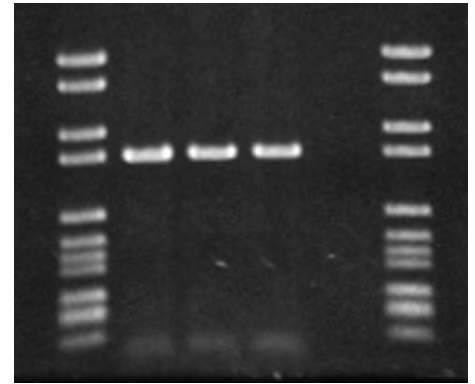


Figura 5. PCR específica d'*Oenococcus oeni* (carrers 1,2,3: soques d'*O. oeni*; carrer 4: una soca d'una altra espècie: *Lactobacillus plantarum*, M: marcadors de pesos moleculars). En els carrers amb *O. oeni* s'hi observa la banda de 1025 pb, corresponent al producte amplificat del fragment específic d'*O. oeni*.

en vi diluït, però ara hi ha diverses soques comercials que es poden inocular directament al vi sense reactivar-les prèviament.

En addicionar una quantitat important de bacteris adequats, fins i tot quan no estan en fase de creixement, s'està aportant una biomassa portadora d'enzim malolàctic que pot efectuar la FML desitjada. En aquestes condicions, semblants a les que es troben els bacteris en condicions naturals al vi, encara que no hi hagi un creixement rellevant, la mateixa transformació de màlic a làctic pot ser prou per obtenir-ne energia suficient per mantenir les cèl·lules en un metabolisme mínim i poder realitzar altres reaccions a part de la FML, com les relacionades amb la millora organolèptica comentada.

Les altres possibles solucions per als casos on no es realitza la FML o es retarda excessivament passen substancialment per controlar les condicions del vi per tal d'evitar els problemes esmentats, com controlar el SO₂ perquè no n'hi hagi en excés, o evitar la presència de pesticides. D'altra banda, en inocular els bacteris làctics és important assegurar-se que la fermentació alcohòlica estigui acabada, i que les cèl·lules mortes de llevats hagin estat un temps en contacte amb el vi i que aquest no estigui clarificat en excés,

per tal que els bacteris disposin de petites concentracions dels nutrients (minerals i vitamines) necessaris per a la FML.

Identificació d'*Oenococcus oeni* per mètodes moleculars

Per tal de controlar l'FML en el celler i veure si la població bacteriana evoluciona correctament és evident que cal disposar de tècniques eficients d'identificació que permetin distingir les diferents espècies de bacteris làctics i aquestes dels altres microorganismes. Aquestes tècniques també són necessàries per fer qualsevol estudi experimental per millorar el procés o per fer recerca sobre l'FML, per exemple per veure com influeixen les diverses condicions dels vins sobre l'esmentada FML. Els mètodes fenotípics clàssics d'identificació basats en proves bioquímiques presenten molts inconvenients, com la variabilitat o el nombre elevat de proves que cal efectuar per comprovar que un aïllat bacterià és d'una espècie determinada, i sovint hi ha incertituds, atès que les descripcions

dels manuals d'identificació es basen en les dades d'un nombre limitat de soques, mentre que la variabilitat dels aïllats de les mostres (en aquest cas de vi) és més gran. A més a més, la identificació de *O. oeni*, l'espècie més habitual en vins, és especialment difícil ja que presenta un creixement lent, una gran variabilitat en algunes proves i una pobresa fermentativa remarcable. Per tant, és convenient recórrer a mètodes moleculars fiables, precisos i ràpids.

Tot i que hi ha força tècniques moleculars a l'abast per identificar si un aïllat és de l'espècie *O. oeni*, un dels mètodes més utilitzats consisteix en fer una PCR específica d'espècie que amplifica un fragment del gen de l'enzim malolàctic d'*O. oeni* mitjançant encebadors específics (Zapparoli *et al.* 1998). D'aquesta manera s'obté un producte d'amplificació de DNA de 1025 pb, fàcilment detectable per electroforesi (Figura 5). Al nostre laboratori utilitzem aquesta tècnica per saber de forma ràpida i precisa si els diversos aïllats són *O. oeni*. Una altra possibilitat és la detecció directa dels bacteris d'aquesta espècie i d'altres presents en mostres de vi mitjançant la hibridació *in situ* del 16S rRNA amb sondes específiques que estan marcades amb fluorocroms (Blasco *et al.*, 2003), amb la qual cosa els bacteris poden ser vistos i comptats al microscopi de fluorescència (Figura 6).

Sovint no n'hi ha prou amb saber que uns aïllats són de l'espècie *O. oeni* o d'una altra espècie, ja que el que cal és reconèixer la soca, és a dir, tipificar-la. Per exemple, per controlar si una soca determinada usada com a estarter és realment la soca predominant al final de la FML, per saber si ella és la responsable de la fermentació o potser ha estat alguna de les soques autòctones presents ja al vi la que s'ha imposat. D'altra banda, molts estudis han demostrat que la resistència a les diverses condicions del vi i la influència en la qualitat organolèptica d'aquest són soca-

dependents. Per tant, calen mètodes que permetin diferenciar soques, sobretot d'*O. oeni*, per tal d'estudiar llur dinàmica de poblacions en diferents condicions i per controlar les soques inoculades i les autòctones. En aquest cas, per força cal recórrer a mètodes moleculars per tipificar-les.

S'han desenvolupat diversos mètodes moleculars per tipificar soques d'*O. oeni*, entre els quals cal destacar-ne dos. Un és la macrorestricció de DNA total i separació dels fragments grans obtinguts per electroforesi de gels en camp pulsant (PFGE) (Zapparoli *et al.*, 2000), que per a les diferents soques dóna uns perfils de bandes molt reproduïbles i fàcils d'analitzar, però que és una tècnica força laboriosa. D'altra banda, la tècnica de polimorfismes de DNA amplificats per PCR a l'atzar (RAPD: *random amplified polymorphic DNA*) incorpora com a encebador de la PCR un sol oligonucleòtid curt (10-15 pb) arbitrari i és una tècnica senzilla, ràpida i molt discriminatòria entre soques. Només té l'inconvenient que és poc reproduïble.

Precisament per millorar això, al nostre laboratori na Cristina Reguant va estar treballant en diferents variants fins arribar a dissenyar i optimitzar un mètode per a tipificar soques d'*O. oeni* que és reproduïble i manté la simplicitat i la discriminació entre soques del RAPD. Es tracta d'un RAPD multiplex (Reguant *et al.*, 2003), anomenat així perquè s'hi utilitzen dos encebadors alhora: un dels arbitraris que més discriminació donava (anomenat Coc: 5'-AGCAGCGTGG-3') juntament amb un dels dos encebadors de la PCR específica d'espècie esmentats abans (és l'encebador anomenat On2: 5'-ATCATCGTCAAACAAGAGGCCTT-3'). Amb això s'obté un perfil de bandes discriminant per a cada soca (Figura 7) que és reproduïble en diferents assajos. Aquest mètode incrementa la reproductibilitat i rapidesa dels mètodes convencionals de RAPD-PCR i ha estat validat al nostre laboratori controlant la dinàmica de poblacions de soques d'*O. oeni* al llarg de la FML de 4 vinificacions dutes a terme al celler del Mas dels Frares

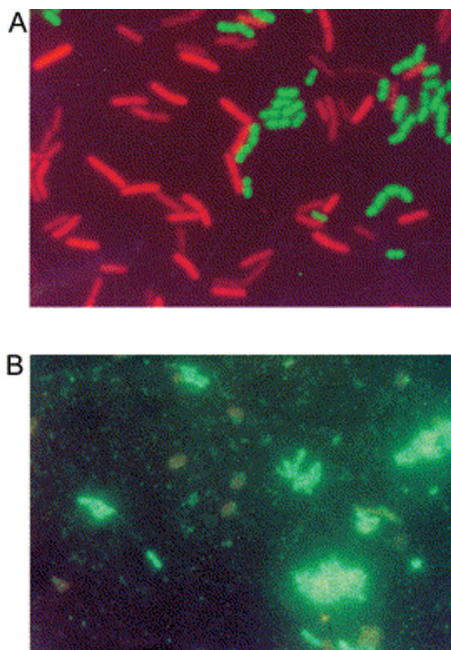


Figura 6. A: *Lactobacillus plantarum* i *Leuconostoc mesenteroides* poden ser diferenciats per hibridació simultània amb una sonda marcada amb fluoresceïna i una altra amb rodamina. **B:** Mostra de vi al final de la FML on s'hi pot veure *O. oeni* hibridat amb la sonda específica marcada amb fluoresceïna (Blasco *et al.*, 2003).

de la Facultat d'Enologia de la URV. S'ha vist que unes 900 colònies aïllades al llarg d'aquestes FML corresponien a 30 soques diferents, de les quals en predominaven una o dues al final de la majoria de vinificacions. Amb això també s'estudia la influència de les diferents condicions (pH, temperatura, presència de SO₂, etc.) sobre les diverses soques. Altrament, amb aquesta tècnica també s'ha pogut avaluar la implantació de soques estànter de la FML i comprovar la seva possible dominància o no sobre les soques autòctones.

Agraïments

Als doctors i doctorands de la URV que han realitzat o realitzen les tesis sobre aquests temes des de 1992 fins ara: Dra. M. Carme Masqué, Dra. Montse Poblet, Dra. M. Teresa Vidal, Dra. Cristina Reguant, Dr. Ramon Carreté, Gerrie Garcia, Joana Gil, Isabel Araque, Silvana Romero. Als projectes finançats ALI95-0887-C04-01, ALI97-1077-C02-02 i AGL2000-0827-C02-02. A la Unitat d'Enologia del Centre de Referència de Tecnologia d'Aliments (Generalitat de Catalunya) i al Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la URV, dels quals sóc membre.

Referències

Les més generals sobre el tema són aquelles on està subratllat el primer autor.

- Blasco, L., S. Ferrer, I. Pardo (2003) Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 225: 115-123
- Dicks, L.M.T., F. Dellaglio, M.D. Collins (1995) Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45 (2):395-397
- García, M.J., M. Zúñiga, F. Uruburu (1992) Revisión: El metabolismo y el control de las bacterias lácticas en el vino. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 32 (3): 233-268
- Garvie, E.I. (1967) *Leuconostoc oenos* sp. nov. *Journal of General Microbiology*, 48:431-438
- Henick-Kling, T. (1993) Malolactic fermentation. G.H. Fleet (Ed.). *Wine microbiology and*

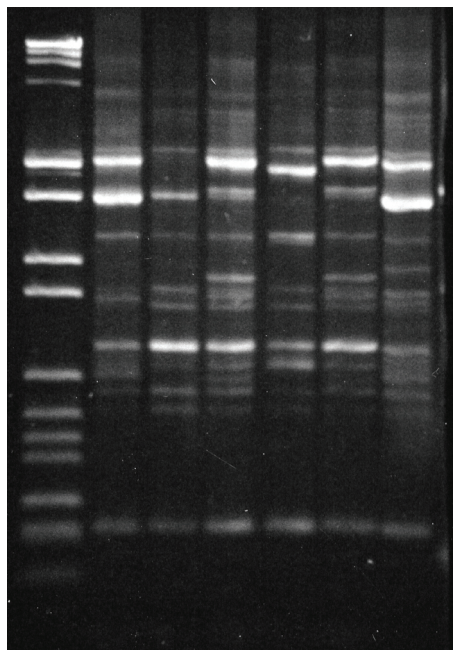


Figura 7. Perfils RAPD-PCR obtinguts amb Multiplex Coc+On2 corresponents a 6 soques d'*Oenococcus oeni* predominants en tres vinificacions (carrers 1 a 6). M: marcador de pesos moleculars (Reguant *et al.*, 2003).

biotechnology (pp. 289-326). Amsterdam: Harwood Academic

Liu, S.Q. (2002) Malolactic fermentation in wine - beyond acidification (A review). *Journal of Applied Microbiology*, 92:589-601

Reguant, C., A. Bordons (2003) Typification of *Oenococcus oeni* strains by multiplex RAPD-PCR and study of population dynamics during malolactic fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 95:344-353

Ribéreau-Gayon, P., D. Dubourdieu, B. Donèche, A. Lonvaud (1998) *Traité d'Enologie I. Microbiologie du vin et vinifications*. Paris: Dunod

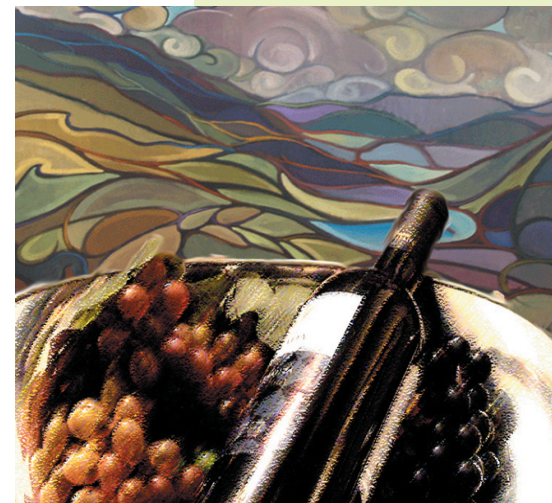
Salema, M., J.S. Lolkema, M.V. San Romão, M.C.L. Dias (1996). The proton motive force generated in *Leuconostoc oenos* by L-malate fermentation. *Journal of Bacteriology*, 178 (11):3127-3132

Wibowo, D., R. Eschenbruch, C.R. Davis, G.H. Fleet, T.H. Lee (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36 (4):302-313

Zapparoli, G., S. Torriani, P. Pesente, F. Dellaglio (1998) Design and evaluation of malolactic enzyme gene targeted primers for rapid identification and detection of *Oenococcus oeni* in wine. *Letters in Applied Microbiology*, 27:243-246

Zapparoli, G., C. Reguant, A. Bordons, S. Torriani, F. Dellaglio (2000) Genomic DNA fingerprinting of *Oenococcus oeni* strains by pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *Current Microbiology*, 40:351-355

© Ausiàs Acarín



Albert Bordons de Porrata-Doria és llicenciat i doctor en Ciències Biològiques per la UB. Va treballar durant 9 a una empresa de recerca

i desenvolupament, en el camp de la producció bacteriana d'aminoàcids.

Va exercir de professor de Bioquímica Industrial a l'actual Universitat Rovira i Virgili de Tarragona i actualment és professor titular de Bioquímica i Biologia Molecular al Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la mateixa universitat i ha estat director d'aquest departament del 1995 al 2001.

Les seves principals publicacions científiques aborden temes sobre biotecnologia ambiental, com la captació bacteriana de metalls pesants, la biodessulfuració, i sobretot, des del 1990, sobre bacteris làctics del vi. A més a més, els seus principals interessos intel·lectuals són l'origen de la vida i la diversitat metabòlica dels microorganismes. D'altra banda, és un amant de la natura, i bon aficionat a les llengües, especialment al català.