

INFLUENCIA DEL ACIDO L-MALICO EN EL PROCESO DE ACETIFICACION

M.^a Angeles Novella Herrero

INFLUENCIA DEL ACIDO L-MALICO EN EL PROCESO DE ACETIFICACION

1.- INTRODUCCION

La naturaleza microbiológica del vinagre se supo, cuando Kützing (1873) dio a conocer que la conversión del etanol a ácido acético era llevada a cabo por microorganismos vivos.

Quince años antes Peerson había designado con el nombre de *Mycoderma* a la película que se forma sobre los líquidos en los cuales tiene lugar una fermentación acética.

Pasteur (1868) confirmó la opinión de Kützing y demostró la naturaleza fisiológica de la misma, pero Paster creía que ésta fermentación era ocasionada por una sola especie de bacterias: *Mycoderma aceti*.

En 1878 Hansen demostró que eran más de una las especies capaces de producir ácido acético en la cerveza, aisló y dio nombre al *Bacterium aceti* y *Bacterium Pasteuranum*, más tarde aisló el *Bacterium Kützingianum*.

Hacia 1879 Henberg estudió el grupo, describió otras especies y lo clasificó de nuevo.

Actualmente las bacterias acéticas se agrupan en dos géneros: *Acetobacter* y *Gluconobacter*, son frecuentes sobre las uvas, a veces en proporción más importante que las bacterias lácticas o levaduras (6), como es el caso del fruto parasitado por *Botrytis cinerea* (podredumbre), que conlleva a una población de estos microorganismos igual o superior a la flora blastomicética, debido a la ruptura

de la piel del grano (3), la densidad de bacterias acéticas es proporcional al grado de infección de las uvas (12).

Forman parte de la flora microbiana en los mostos y vinos, pero su número se ve reducido hacia el final de la fermentación alcohólica debido a las características de la misma, y predomina entonces el género *Acetobacter* sobre *Gluconobacter*.

Son microorganismos aerobios estrictos (crecen en la superficie de contacto vino-aire, formando películas o velos), precisan del oxígeno para poder desarrollarse (el anhídrido carbónico inhibe la oxidación del etanol), Gram negativos, polimorfos, se presentan en forma elipsoidal o en bastones de 0'6-3 micras de tamaño, se encuentran aisladas, en parejas o en cadenas. Las fuentes de carbono principales son la glucosa, etanol, glicerol y lactato; las fuentes de nitrógeno son minerales y orgánicas (1).

El peculiar metabolismo de las bacterias acéticas, es su capacidad para producir ácido acético a expensas del grado alcohólico del vino (etanol), este proceso se conoce como acetificación, picadura acética o acescencia. Es una enfermedad importante que puede alterar las características organolépticas del vino, llegando a no ser apto para el consumo, y cuyo destino serían las vinagrerías o alcoholeras.

El análisis de la acidez volátil (ácido acético), permite apreciar el estado de alteración de los vinos, no solo por estas bacterias, sino por los otros microorganismos, también capaces de deteriorarlos (8). El producto que con-

forma libre, además de no afectar a la acetificación, puede incluso estimularla.

2.- OBJETIVO

Los ácidos mayoritarios en los mostos y vinos son tartárico y L-málico, el ácido L-málico en la Denominación de Origen Utiel-Requena se encuentra en los mostos en porcentajes aproximados (según variedades) del 40% respecto a la acidez total titulable (9) (10), es el ácido fisiológicamente más vulnerable y susceptible de ser degradado por bacterias acéticas (5). Más del 50% del ácido tartárico precipita después de la fermentación alcohólica en forma de sales, por el contrario del ácido L-málico solo desaparece generalmente (precipitación o degradación) de 0'5 a 1 g/l.

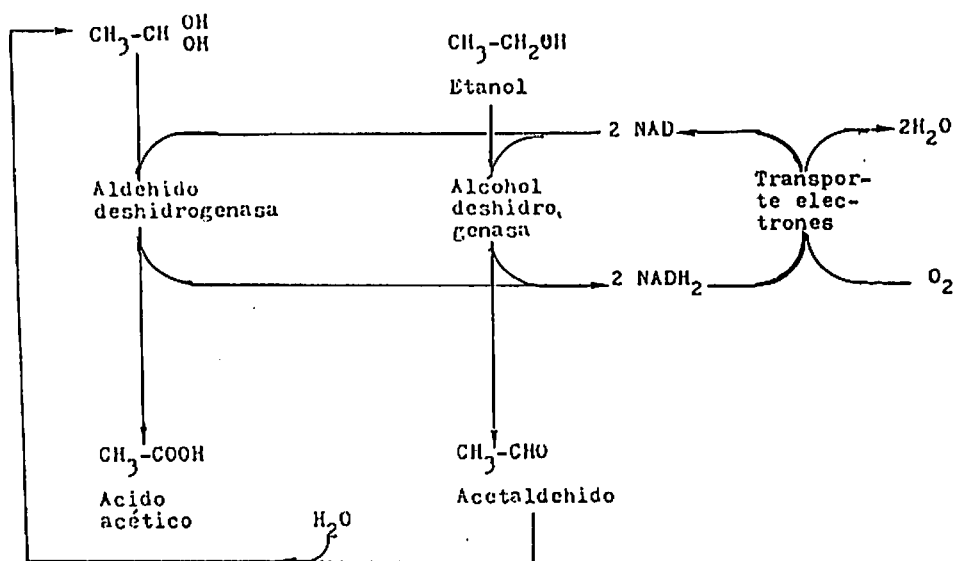


Figura 1.- Oxidación del etanol en acético, a expensas del óxido del aire, por las bacterias acéticas (Divies 1973).

Se pretende con esta experiencia observar la influencia del ácido L-málico en el proceso de acetificación por bacterias acéticas.

3.- MATERIAL Y METODOS

La experiencia se realizó en un medio nutritivo sintético que contenía:

A.- 2 g/l de ácido tartárico+2 g/l de glucosa.

B.- 2 g/l de ácido tartárico.

C.- 2 g/l de ácido L-málico+2 g/l de glucosa.

D.- 2 g/l de ácido L-málico.

Se utilizaron éstas cantidades por ser similares a la de los vinos de la Denominación de Origen Utiel-Requena.

Todos contenían:

- 12% (v/v) de etanol.
- 3 g/l de extracto de levadura.
- 3 g/l de extracto de malta.
- 1 g/l de sulfato de amonio.

Se utilizó una cepa de bacterias acéticas aislada de vino acetificado y la experiencia se llevó a cabo durante 30 días, a 26° C.

Análisis realizados:

- Recuento de microorganismos: método por dilución en serie incubado a 26° C. de temperatura sobre agar YM modificado:

Extrato de levadura 3 g/l

Extracto de malta 3 g/l

Glucosa 10 g/l

- Sulfato de amonio 1g/l.

- Glucosa: método químico.

- Acidez volátil expresada en ácido acético: método García-Tena.

- Etanol, acetaldehído acetato de etilo por cromatografía de gases: cromatógrafo Varian 3700, columna Supelcowax-10 de 30 cm² de longitud y 0'5 micras de diámetro interno.

- Ácidos tartárico y L-málico por cromatografía de líquidos (HPLC), cromatógrafo Varian 5000, columna C-8 de 5 micras de diámetro de partícula spherisorb, se analizó con dos columnas en serie de 25 cm².

- Ph: phmetro Radiometer Copenhagen 82.

4.- RESULTADOS Y DISCUSION

Los datos analíticos vienen expresados en:

- acidez volátil en g/l en ácido acético.

- etanol en porcentaje v/v.

- acetaldehído en ppm.

- acetato de etilo en ppm.

- málico en g/l.

- tartárico en g/l.

- glucosa en g/l.

- bacterias acéticas en microorganismos/cm³.

ENSAYO A

Días	pH	Acidez volátil	Etanol	Acetaldehído	Acetato de Etilo	Tartárico	Glucosa	Bacterias acéticas
0	3.5	-	12.00	-	-	2	2	652
1	3.42	0.14	12.00	14.47	18.08	2	2	-
3	3.42	0.18	11.45	14.41	4.64	2	1.5	540
9	3.42	0.18	11.40	7.61	1.98	2	1.5	500
13	3.41	0.20	10.83	15.10	3.25	1.97	1.5	800
15	3.41	0.22	10.49	6.60	2.88	1.97	1.4	1250
18	3.41	0.51	9.85	17.00	2.53	1.95	1.3	1800
21	3.38	0.52	9.63	31.70	4.43	1.90	1.3	2650
30	3.20	3.28	7.97	40.47	10.69	1.85	0.3	8000

ENSAYO B

Días	pH	Acidez volátil	Etanol	Acetaldehído	Acetato de Etilo	Tartárico	Bacterias acéticas
0	3.50	-	12.00	-	-	2	652
1	3.40	0.14	12.00	9.42	12.79	2	-
3	3.42	0.18	11.95	6.77	4.52	2	530
9	3.42	0.18	11.95	3.81	1.78	1.98	500
13	3.42	0.20	11.73	5.35	1.31	1.97	440
15	3.39	0.22	11.26	2.64	1.24	1.97	400
18	3.39	0.25	10.40	21.91	2.89	1.95	355
21	3.38	0.25	9.90	35.10	1.57	1.92	360
30	3.38	0.33	9.26	45.73	2.54	1.86	450

ENSAYO C

Días	pH	Acidez volátil	Etanol	Acetaldehído	Acetato de Etilo	Málico	Glucosa	Bacterias acéticas
0	3.5	-	12.00	-	-	2	2	652
1	3.39	0.22	11.32	13.03	10.89	2	1.8	-
3	3.38	0.25	11.03	14.31	3.78	2	1.8	670
9	3.38	0.25	10.61	14.88	2.55	2	1.8	710
13	3.37	0.73	10.02	40.85	2.44	1.82	1.6	48x10 ²
15	3.21	2.47	9.27	105.78	16.47	1.64	1.5	73x10 ²
18	2.57	45.09	4.02	76.88	1358.00	1.10	1.5	22x10 ³
21	2.54	46.12	3.50	9266.80	766.40	1.09	1.5	80x10 ³
30	2.51	47.97	2.85	901.61	66.21	1.09	1.5	55x10 ³

ENSAYO D

Días	pH	Acidez volátil	Etanol	Acetaldehído	Acetato de Etilo	Málico	Bacterias acéticas
0	3.50	-	12.00	-	-	2	652
1	3.40	0.16	11.65	12.00	15.21	2	-
3	3.40	0.18	11.33	11.28	3.92	2	580
9	3.39	0.18	10.81	4.72	1.08	2	560
13	3.39	0.25	10.22	5.81	1.27	1.97	22x10 ²
15	3.36	0.25	9.49	28.30	1.76	1.95	4x10 ³
18	2.96	12.28	7.83	326.76	854.00	1.95	9x10 ³
21	2.61	35.08	3.78	61.60	5.42	1.45	20x10 ³
30	2.60	38.74	3.01	582.00	3.26	1.25	26x10 ³

Los resultados obtenidos nos permiten deducir:

- En los medios nutritivos donde hay ácido L-málico, la producción de ácido acético es considerablemente superior a los ensayos A y B que no lo contienen al igual que la tasa de crecimiento, la participación de éste ácido en el metabolismo de las bacterias acéticas es por la vida del ciclo de Krebs o por la del ciclo de glicolato.

- El ácido tartárico no es degradado y la pequeña proporción que desaparece debe ser en forma de precipitado.

- Sin glucosa o L-málico, el etanol no parece ser una fuente de carbono fácilmente degradable, y en la misma concentración favorece más la producción de ácido acético el ácido L-málico que la glucosa.

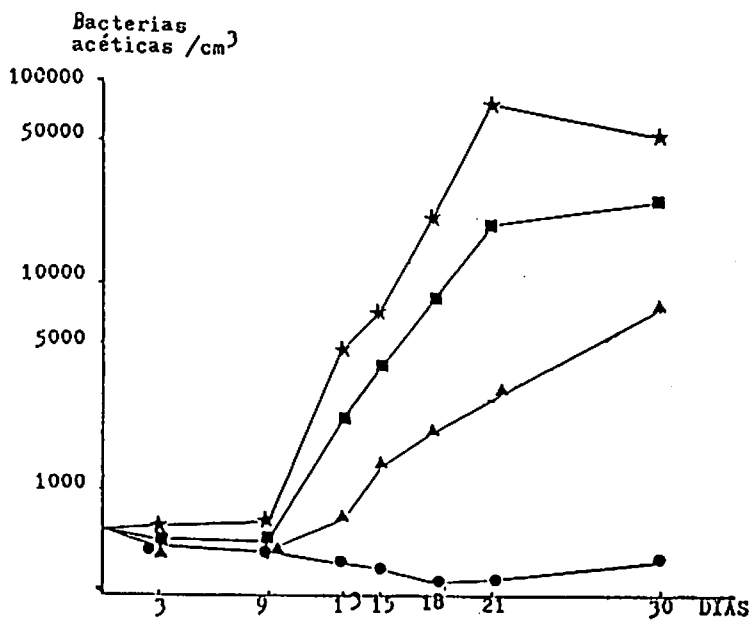
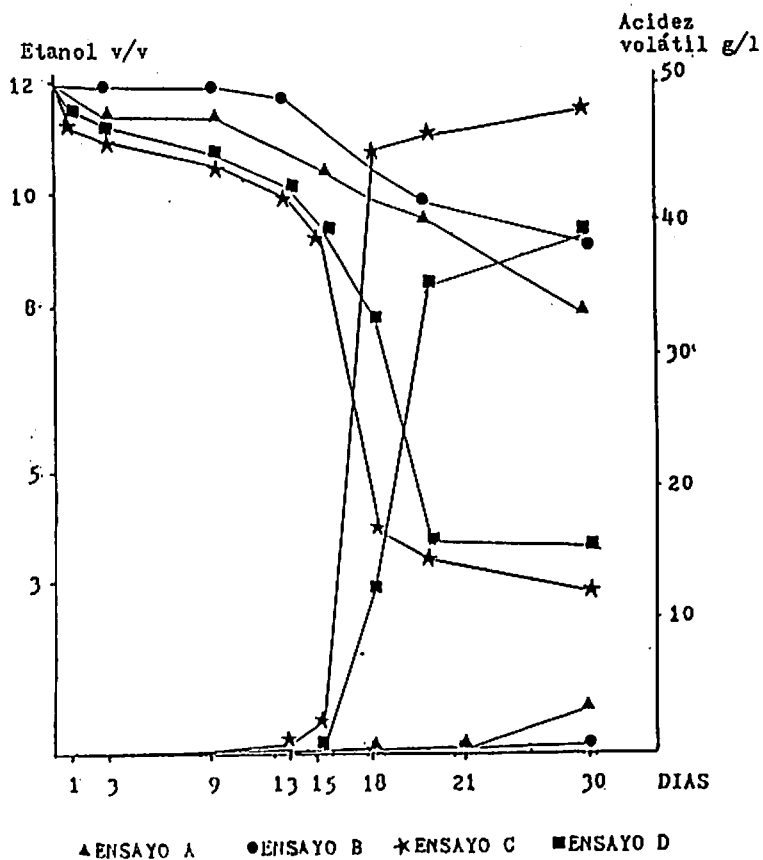
- El ácido L-málico podría ser la causa de que determinadas variedades de *Vitis Vinífera* como la tempranillo, cuyo porcentaje en este ácido, respecto del tartárico, es mayor, sean más susceptibles de acetificarse que otros, como ha ocurrido en varias ocasiones. Estas alteraciones no serían provocadas por bacterias lácticas, ya que determinadas

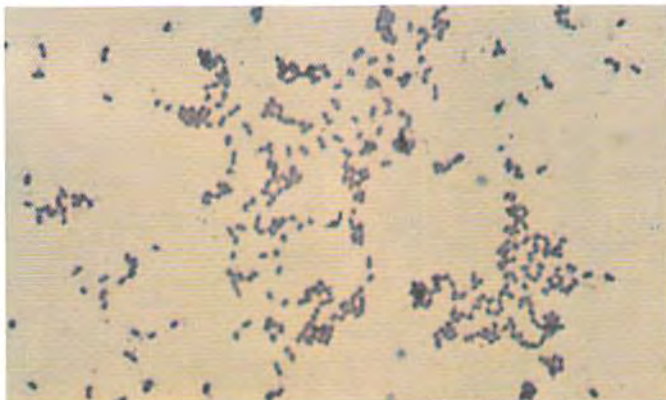
cepas, en la fermentación maloláctica son capaces de producir ácido acético, pero en proporciones de 1 g/l de acidez volátil (7), al no ser capaces de utilizar el etanol como fuente de carbono.

5.- CONCLUSIONES

Los vinos conservados en barricas o en depósitos, no suelen ser, estables microbiológicamente, los microorganismos (poblaciones pequeñas) se encuentran en estado latente, se desarrollarán cuando las condiciones sean favorables. Las operaciones de trasiego son suficientes para iniciar el desarrollo (5), (1). Además pueden vivir en condiciones de anaerobiosis (ausencia de oxígeno), esto explicaría el lento crecimiento de las bacterias acéticas, en el vino almacenado, es decir al abrigo del aire (2).

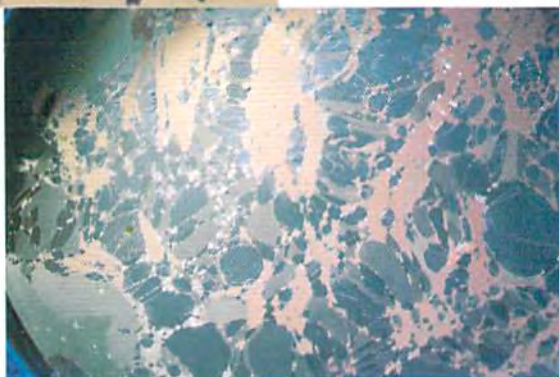
Podemos concluir que el ácido L-málico influye positivamente en el proceso de acetificación y como fuente de carbono, es suficiente para que las bacterias acéticas desarrollen la enfermedad de la acescencia (acetificación), cuando las condiciones de aireación y temperatura sean idóneas.





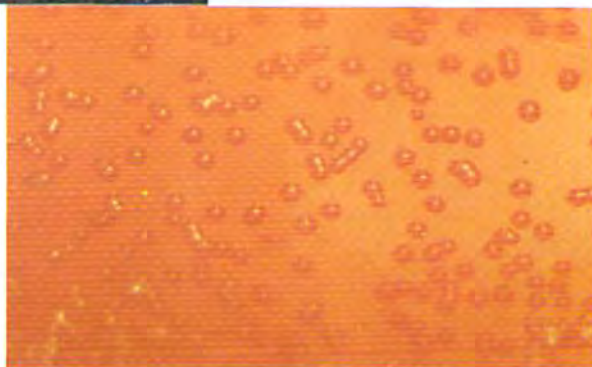
Observación de bacterias acéticas al microscopio.

Velo formado sobre la superficie del vino por bacterias acéticas.



Velo formado sobre la superficie del vino por bacterias acéticas.

Colonias de bacterias acéticas.



BIBLIOGRAFIA

- (1) Buchanan R. E. and Gibbons N. E., 1974
Bergey's manual of determinative bacteriology,
8 th ed The Williams & Wilkins Co. Baltimore.
- (2) Drysdale G. S., Fleet G. H., 1985
Acetic acid bacteria in same Australian wines.
Food Technol. Aust. 37, pp 17-20.
- (3) Joyeux A., 1983
Analyse microbiologico des raisins, des mouts et des
vins. Application a l'etude des bacteries acetiques.
Thèse d'Université Bordeaux II.
- (4) Joyeux A., Lafon-Lafourcade S., Ribéreau-Gayon P., 1984
Evolution of acetic acid bacteria during fermentation
and storage of wine.
Applied an Environmental Microbiology 48, pp 153-156.
- (5) Joyeux A., Lafon-Lafourcade S., Ribéreau-Gayon P., 1984
Métabolisme des bactéries acétiques dans le moût de raisin.
Sciences des Aliments 4, pp 247-255.
- (6) Lafon-Lafourcade S., Joyeux A., 1981
Les bactéries acétiques du vin.
Bulletin de l'O. I. V., 54, 608, pp 803-829.
- (7) Lafon-Lafourcade S., Lucmaret V. Joyeux A., 1980
Quelques observations sur la formation d'acide acetique
par les bactéries lactiques.
Connaissance Vigne Vin 14, 3, pp 183-194.
- (8) Lafon-Lafourcade S., Ribéreau-Gayon M. P. 1977
Origines des l'acidite volatile des grans vins liquoreux.
Académie d'Agriculture de France. Extrait du procès-
verbal de la séance du 18 du mai. pp 551-558.
- (9) Novella M. A., 1987
Influencia fermentación maloláctica en la calidad
de los vinos tintos, de la variedad bobal, en la
Denominación de Origen Utiel-Requena.
La Semana Vitivinícola 2149-2150, pp 4625-4640.
- (10) Novella M. A., 1987
Fermentación maloalcohólica por Schizosaccharomyces,
en la Denominación de Origen Utiel-Requena.
La Semana Vitivinícola 2153, pp 4933-4938.