# DEGRADACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL ÁCIDO ACÉTICO EN VINOS

Mª Angeles Novella Herrero

# DEGRADACION MICROBIOLOGICA DEL ACIDO ACETICO EN VINOS

## 1. INTRODUCCION

La acidez volátil está constituída por la parte de ácidos grasos pertenecientes a la serie acética, que se encuentran en los vinos en estado libre o de sal. El componente esencial es el ácido acético y uno de sus derivados: el acetato de etilo, también pequeñas cantidades de ácido propiónico, butírico y sus ésteres ( Delanoe D. et al., 1987).

El ácido acético con umbral de percepción bajo, confiere el carácter de acritud; el acetato de etilo es el responsable del olor característico del vino "picado" o acetificado (Soufleros I, y Bertrand A., 1979), se percibe organolépticamente a 18 ppm (Sefridge T. B., y Amerine M. A., 1980).

El ácido acético, componente habitual en los vinos, puede originarse de dos formas muy distintas:

*a) Vía normal:* Durante el curso de la fermentación alcohólica, y sobretodo durante la fermentación gliceropirúvica, ruta metabólica, ruta metabólica caracterizada por la producción de glicerina y ácido pirúvico que se acumula, siendo el origen de numerosos productos secundarios, entre ellos el ácido acético. Los valores de acidez volátil, (g/l en acético), oscilan de 0'20 para vinos, a 0'70 aproximadamente en vinos de más de un año o con crianza.

*b) Vía anormal:* Cuando la acidez volátil es superior a 1 g/l, es el indicador de diversas alteraciones provocadas por levaduras, bacterias lácticas o bacterias acéticas.

La enfermedad de la acescencia, acetificación o picadura acética, ocasionada por bacterias acéticas, constituye todavía un peligro en las bodegas, es la alteración más común que pueden sufrir los vinos, donde el etanol de los mismos es transformado en ácido acético. Cuando la acidez volátil sobrepasa la concentración permitida por la legislación, el vino se destina a las vinagrerías o alcoholeras.

No existe en la actualidad ningún medio con capacidad para eliminar del vino los ácidos volátiles en los vinos, mediante la utilización de microorganismos diferentes, Saccharomyces cerevisiae y Penicillium nigricans, con la posibilidad de que este método pueda considerarse como remedio curativo a la enfermedad de la acescencia o picadura acética.

## 2. METODOLOGIA

2.1.- Parte experimental.

2.1.1. Vino: La experiencia se ha llevado a cabo en matraces erlenmeyer de 500 cm3 sobre vino de la variedad bobal, filtrado amicróbicamente, cuyas características iniciales son:

Acidez volátil ..... 2'1 g/l en ác. acético
Azúcares reductores ..... 2'1 g/l
Grado alcohólico ..... 2'1 g/l

Las condiciones del ensayo se establecieron seleccionando aquellos parámetros admitidos por la legislación vigente, y que pueden afectar de forma negativa al crecimiento de las bacterias acéticas, permitiendo el desa-

rrollo de Saccharomyces cerevisiae y de Penicllium nigricans.

Se realizaron 8 ensayos diferentes según la composición del medio:

1.- vino base más 0'1 g/l de $SO_2$ y 0'1 g/l de tanino enológico.

2.- vino base más 0'1 g/l de tanino enológico.

3.- vino base más 0'1 g/l. de $SO_2$.

4.- vino base.

El pH se modificó con ácido tartárico hasta alcanzar el valor de 3'2.

5.- vino base más 0'12 g/l de $SO_2$ y o'1 g/l de tanino enológico.

6.- vino base más 0'1 g/l de tanino enológico.

7.- vino base más 0'1 g/l de $SO_2$.

8.- vino base.

El pH se modificó con NaOH hasta alcanzar el valor de 3'8 diferentes: 28° C, 19° C y 6° C.

2.1.2.- Microorganismos utilizados:

- Saacharomyces cerevisiae cepa A1, aislada en vinos de la Denominación de Origen Utiel-Requena. Es una levadura filmógena, término conocido en el lenguaje enológico como levaduras de "Flor", por lo tanto con capacidad para degradar el ácido acético (Marcilla J. et al., 1939, Martínez de La Ossa et al., 1987).

Responde al test Killer como K-R+.

- Penicillium nigricans cepa MRL, aislado en vinos de la Denominación de Origen Utiel-Requena, con capacidad para degradar el ácido acético y el acetato y el acetato etilo.

2.2.-Métodos analíticos.

2.2.1.- Azúcares reductores, anhídrido sulfuroso y acidez volátil: analizador de flujo fraccionado.

2.2.2.- Alcoholes superiores y grado alcohólico: Cromatografía de gases con detector de llama.

2.2.3.- Acidos orgánicos: Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de UV.

2.2.4.- pH: pHmetro.

2.3.- Técnicas para la identificación de levaduras (Kreger-Van Rij 1984; Barnett J. A. 1985).

2.3.1.- Observación de las características de la reproducción vegetativa.

- Características de las células vegetativas, forma y tamaño; formación de pseudomicelio y micelio verdadero.

- Características sexuales, observación de presencia de ascosporas.

2.3.2.- Caracteres fisiológicos y bioquímicos.

- Utilización de compuestos de carbono.

- Asimilación de compuestos nitrogenados.

- Crecimiento a diversas temperaturas.

- Producción de ácido acético a partir de la glucosa.

- Resistencia a la cicloheximida.

- Factor Killer.

2.3.3.- Técnicas para la identificación de hongos filamentosos (métodos clásicos).

Observación del crecimiento de las colonias en agar Czapec y extracto de malta al 2%, 28° C, durante 10-14

días. Después de estos resultados se han seguido los criterios morfológicos de Raper K. B. y Thom C. (1949).

## 3. RESULTADOS

3.1.- Degradación del ácido acético (evolución de la acidez volátil) por Saccharomyces cerevisiae cepa A1.

| ENSAYOS | | 1 SEMANA | 2 SEMANAS | 3 SEMANAS | 4 SEMANAS |
|---|---|---|---|---|---|
| 28° C | 1 | 2,05 | 1,75 | 0,98 | 0,45 |
| | 2 | 2,05 | 1,75 | 0,98 | 0,45 |
| | 3 | 2,05 | 1,75 | 0,96 | 0,46 |
| | 4 | 2,00 | 1,70 | 0,90 | 0,42 |
| | 5 | 2,00 | 1,70 | 0,94 | 0,42 |
| | 6 | 2,00 | 1,70 | 0,92 | 0,43 |
| | 7 | 2,00 | 1,70 | 0,90 | 0,41 |
| | 8 | 2,00 | 1,65 | 0,87 | 0,40 |
| 19 ° C | 1 | 2,05 | 1,75 | 1,00 | 0,54 |
| | 2 | 2,06 | 1,75 | 1,00 | 0,54 |
| | 3 | 2,05 | 1,75 | 1,04 | 0,54 |
| | 4 | 2,05 | 1,70 | 1,00 | 0,50 |
| | 5 | 2,00 | 1,70 | 0,98 | 0,52 |
| | 6 | 2,05 | 1,68 | 0,98 | 0,52 |
| | 7 | 2,05 | 1,68 | 0,98 | 0,51 |
| | 8 | 2,00 | 1,65 | 0,95 | 0,48 |
| 6°C | 1 | 2,10 | 1,80 | 1,20 | 0,72 |
| | 2 | 2,10 | 1,80 | 1,20 | 0,72 |
| | 3 | 2,10 | 1,80 | 1,25 | 0,75 |
| | 4 | 2,10 | 1,80 | 1,20 | 0,70 |
| | 5 | 2,10 | 1,80 | 1,18 | 0,70 |
| | 6 | 2,10 | 1,80 | 1,20 | 0,70 |
| | 7 | 2,10 | 1,80 | 1,20 | 0,71 |
| | 8 | 2,10 | 1,80 | 1,20 | 0,70 |

Los valores de acidez volátil están expresados en g/l. en ácido acético.

3.2.- Degradación del ácido acético (evolución de la acidez volátil) por Penicillium nigricans cepa MRL.

| ENSAYOS | | 1 SEMANA | 2 SEMANAS | 3 SEMANAS | 4 SEMANAS | 5 SEMANAS |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 28° C | 1 | 2,10 | 2,00 | 1,70 | 1,14 | 0,80 |
| | 2 | 2,10 | 2,00 | 1,72 | 1,14 | 0,82 |
| | 3 | 2,10 | 2,00 | 1,72 | 1,14 | 0,80 |
| | 4 | 2,10 | 1,98 | 1,65 | 1,06 | 0,78 |
| | 5 | 2,10 | 2,00 | 1,70 | 1,14 | 0,83 |
| | 6 | 2,10 | 2,00 | 1,71 | 1,14 | 0,82 |
| | 7 | 2,10 | 2,00 | 1,70 | 1,14 | 0,82 |
| | 8 | 2,10 | 1,98 | 1,65 | 1,06 | 0,78 |
| 19 ° C | 1 | 2,10 | 1,95 | 1,58 | 1,05 | 0,69 |
| | 2 | 2,10 | 1,94 | 1,57 | 1,05 | 0,70 |
| | 3 | 2,10 | 1,95 | 1,57 | 1,06 | 0,70 |
| | 4 | 2,10 | 1,93 | 1,54 | 1,00 | 0,66 |
| | 5 | 2,10 | 1,93 | 1,56 | 1,05 | 0,70 |
| | 6 | 2,10 | 1,93 | 1,57 | 1,05 | 0,68 |
| | 7 | 2,10 | 1,92 | 1,57 | 1,04 | 0,68 |
| | 8 | 2,10 | 1,90 | 1,55 | 1,02 | 0,65 |
| 6°C | 1 | 2,10 | 2,10 | 1,90 | 1,40 | 0,98 |
| | 2 | 2,10 | 2,10 | 1,92 | 1,41 | 0,98 |
| | 3 | 2,10 | 2,10 | 1,92 | 1,41 | 0,96 |
| | 4 | 2,10 | 2,10 | 1,85 | 1,35 | 0,94 |
| | 5 | 2,10 | 2,10 | 1,90 | 1,40 | 0,96 |
| | 6 | 2,10 | 2,10 | 1,90 | 1,40 | 0,95 |
| | 7 | 2,10 | 2,10 | 1,89 | 1,39 | 0,95 |
| | 8 | 2,10 | 2,10 | 1,87 | 1,38 | 0,93 |

Los valores de la acidez volátil están expresados en g/l en ácido acético.

3.3.- Resultados analíticos de los distintos ensayos. Sólo se expresan los datos correspondientes a la prueba número uno a 28° C, por ser todos los valores prácticamente iguales.

| | SACCHAROMYCES | CEREVISIAE | PENICILLIUM | NIGRICANS |
|---|---|---|---|---|
| AZUCARES REDUCTORES | 0,85 | 0,85 | 0,85 | 0,85 |
| GRADO AL_ COHOLICO | 12,50 | 12,00 | 12,50 | 12,00 |
| TARTARICO | 2,00 | 2,00 | 2,00 | 2,00 |
| L-MALICO | 0,65 | 0,50 | 0,65 | 0,65 |
| CITRICO | 0,70 | 0,70 | 0,70 | 0,70 |
| SUCCINICO | 0,80 | 0,65 | 0,80 | 0,85 |
| FUMARICO | 20,30 | 5,60 | 20,30 | 3,90 |
| GLICERINA | 9,60 | 8,70 | 9,60 | 9,20 |
| ACETALDE_ HIDO | 50,10 | 248,00 | 50,10 | 41,00 |
| ACETATO DE ETILO | 542,80 | 540,30 | 542,80 | 228,00 |
| METANOL | 90,00 | 89,00 | 90,00 | 81,00 |
| 1-PROPANOL | 26,00 | 25,20 | 26,00 | 23,60 |
| ISOBUTANOL | 29,00 | 29,00 | 29,00 | 28,00 |
| ISOAMILICOS | 134,00 | 214,80 | 134,00 | 119,70 |
| LACTATO DE ETILO | 143,50 | 121,70 | 143,50 | 122,30 |
| 2, 3-BUTA_ NODIOL | 789,60 | 1032,00 | 798,60 | 517,60 |
| 2-FENIL- ETANOL | 38,10 | 40,00 | 38,10 | 34,00 |

Todos los datos están expresados en mg/l, a excepción de azúcares reductores, tartárico, L-málico, succínico y glicerina (g/l). El grado alcohólico se expresa en % (V/V).

3.4.- Discusión de los parámetros analíticos.

Los dos microorganismos disminuyen la acidez volátil hasta concentraciones menores a las permitidas. En una experiencia similar sobre medio sintético la disminución fue total.

La degradación de ácido acético es más rápida a temperaturas más altas, pero resulta de gran interés que tanto Saaharomyces cerevisiae como penicillium nigricans metabolicen el ácido acético a 6° C porque las bacterias acéticas apenas presentan desarrollo,

es el factor más importante que puede utilizarse en la desacetificación de los vinos; tanto el tanino enológico como el anhídrido sulfuroso de escasa incidencia sobre Saccharomyces cerevisiae y Penicillium nigricans, también lo eran sobre bacterias acéticas.

Respecto al pH, el crecimiento es ligeramente mayor a pH igual a 3,8 que a 3,2; asimismo ocurre con las bacterias. Es aconsejable no modificar este parámetro que supone un gasto económico adicional, de repercusión mínima en la desacetificación, teniendo en cuenta además que los valores normales de un vino oscilan entre 3,3 y 3,7.

En la crianza biológica de los vinos de Jerez, se habla de pérdida de riqueza alcohólica, en este caso es mínima, ello es debido a que los vinos andaluces permanecen bajo velo de levaduras de flor durante meses, en la desacetificación el proceso debe ser interrumpido cuando el contenido de ácido acético sea el deseado.

Acerca del tiempo empleado en la experiencia, cabría decir que puede disminuirse de 20 a 25 días, si el inóculo se realiza con "velo" ya formado de levaduras y el micelio crecido del hongo filamentoso en lugar de esporas .

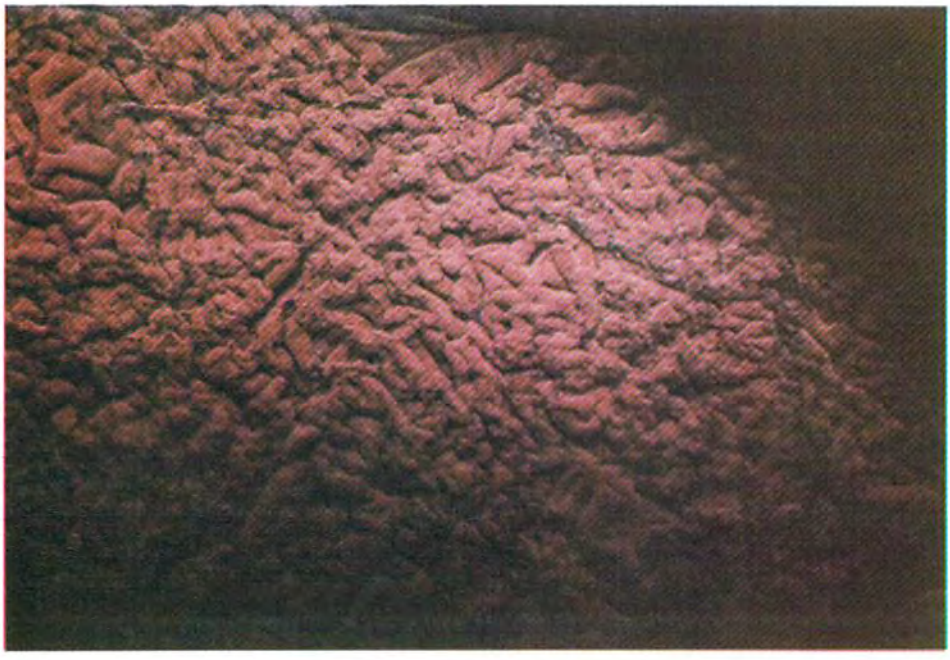
Haciendo referencia a los resultados analíticos, no se observan diferencias significativas en los ácidos orgánicos, la glicerina disminuye aproximadamente 1 g/l en el caso de Saccharomyces cerevisiae aumentando la concentración de acetaldehído y alcoholes isoamílicos, productos considerados como factor de calidad en los vinos de crianza biológica. En los ensayos realizados con Penicillium nigricans, hay que destacar el consumo de acetato de etilo, componente característico de la acescencia.

## 4. CONCLUSIONES

Podemos concluir que la degradación biológica del ácido acético de los vinos es posible tanto con Saccharomyces cerevisiae cepa A1, como con Penicillium nigricans cepa MRL, discrepando con Ribéreau-Gayon (1961) cuando afirma que la utilización de las levaduras micodérmicas para el "despicado de los vinos" sigue siendo una teoría.

Hay que tener en cuenta que la legislación no permite que en los vinos "picados" se realice ningún proceso, siendo su único destino la fabricación de vinagre o las destilerías (a veces para estos usos también se rechazan), pero sí contempla la posibilidad de utilizar levaduras de "flor" como práctica enológica, si ésta se hace cuando el vino contiene una acidez volátil menor a 1 g/l, llevaríamos a cabo un tratamiento enológico permitido.

Penicillium Nigricans. Cepa Mrl



Levadura de Flor. Saccharomyces Cerevisiae Cepa Ai

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Barnett J. A., Payne R. W., Yarrow D., 1985. "Yeasts: characteristics and identificaction". Cambridge University Press.

- Delanoe D., Maillard C., Maisondieu D., 1987. Le vin de l'analyse à l'elaboration. Technique el documentation, Paris

- Kreger-Van Rij N. J. W., 1984. The yeasts a taxnomic study. Elsevier Science publishers B. V. Amsterdam.

- Marcilla J., Alas G., Feduchy E., 1939. Contribución al estudio de las levaduras que forman velo sobre ciertos vinos de elevado grado alcohólico. Anales Centro de Insvestigación.

- Martínez de la Ossa E., Caro I., Bonat M., Pérez L., Domecq B., 1987. Variations o the major volatiles trough aging of sherry. Am. J. Enol. Vitic. 38, 4.

- Pérez L., 1991. La crianza del vino de Jerez. Vitivinicultura 9, 18-22.

- Polo, M. C., 1973. Evolución de los aminoácidos libres en mosto y en vinos por la acción de las levaduras de flor. Tesis doctoral, Madrid.

- Raper K. B., Thom C., 1949. A manual the Penicillium of the Penicilia. Williams & Wilkins Company Baltimore.

- Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., 1961. Traite d'oenologie II. Libraire polytechnique C. H. Béranger.

- Sefridge T. B., Amerine M. A., 1980. Odor Thresolds and interactions of ethyl acetate and diacetyl in artificial wine medium. Am. J. Enol. Vitic., 29, 1.

- Soufleros I., Bertrand A., 1979. Role de la souche de leuvre dans la production des substances voletiles au cours de la fermentation du jus de raisin. Conn. Vigne Vin, 13, 181.

- Verona O., Florenzano G., 1956. Microbiología applicata all'industria enologica. Ediziones agricole Bologne.