

# **Trabajo Práctico**

## **Visita a la Bodega INTA EEA Mendoza**

### **B101**

## **Biología General**

La microbiología industrial es la disciplina que utiliza los microorganismos para obtener productos comerciales de valor. Los microorganismos industriales son organismos que se han seleccionado para que produzcan uno o más compuestos específicos. En gran parte, los microorganismos industriales son “especialistas” metabólicos capaces de producir determinados metabolitos con gran rendimiento. Todos estos procesos industriales se basan en la potenciación de reacciones metabólicas microbianas, con el fin de aumentar la producción de algún compuesto de interés tales como por ejemplo etanol, antibióticos, enzimas, hormonas, pan, cerveza o vino.

El origen de esta disciplina fueron procesos de **fermentación** alcohólica mediante los cuales tuvieron lugar la producción de vino y la cerveza. La **fermentación** es un proceso metabólico de óxido-reducción que se da en ausencia de oxígeno y donde los aceptores finales de electrones son compuestos orgánicos.

### **Proceso de vinificación.**

La producción de vinos es un proceso muy antiguo y de gran importancia económica en nuestra región. La base científica de este proceso comenzó con los estudios de Pasteur, quien demostró que los vinos son el producto de la fermentación alcohólica llevada a cabo por levaduras en el jugo de uva (Amerine, 1985). La fermentación del mosto (jugo de uva) es un proceso microbiológico complejo, que implica interacciones entre levaduras, bacterias y hongos filamentosos. Entre estos organismos las levaduras (hongos unicelulares) desempeñan un papel central.

Las uvas son cosechadas en un estado de madurez apropiado, el cual determina las propiedades químicas y físicas del jugo extraído de ellas. La concentración de los azúcares y de los ácidos, principales componentes del jugo, tienen un elevado impacto en las propiedades de la fermentación. Otras condiciones pre-cosecha que afectan la composición química de la uva y su jugo incluyen el clima, la exposición solar, el suelo, la utilización de fertilizantes, la disponibilidad de agua, la edad del viñedo y la utilización de funguicidas e insecticidas.

Por otro lado, se reconocen otras propiedades relevantes que deben ser tenidas en cuenta en el jugo además de las concentraciones de azúcares, como el contenido de sustancias nitrogenadas, concentración de vitaminas, contenido de O<sub>2</sub> disuelto, cantidades de sólidos solubles, residuos de plaguicidas, pH y presencia de cualquier sustancia inhibidora o estimuladora de las levaduras producidas por el crecimiento de los hongos o bacterias en la superficie de las uvas.

La mayoría de los jugos contienen cantidades suficientes de sustancias nitrogenadas (>150 mg/L de nitrógeno asimilable) para permitir una fermentación rápida y completa. Sin embargo algunos jugos, sobre todo aquéllos que han sido clarificados, pueden no tener suficientes nutrientes nitrogenados (Henschke y Jiranek, 1993). La demanda de nitrógeno de las levaduras incrementa significativamente con el incremento del contenido de azúcar en el jugo y también varía de acuerdo a la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada. Actualmente, una práctica muy común es suplementar los jugos con fosfato diamónico u otros complementos nitrogenados para asegurar que la disponibilidad de nitrógeno no sea un factor limitante para el crecimiento de las levaduras.

El pH del jugo de uva varía entre 2,8 y 4,0 dependiendo de las concentraciones de los ácidos tartárico y málico presentes. El pH del jugo afecta el crecimiento de las levaduras y tiene influencia en la fermentación alcohólica.

El tratamiento de las uvas con plaguicidas pre-cosecha puede tener como consecuencia la presencia de residuos de dichas sustancias en los jugos. Dependiendo de su concentración y la naturaleza química, estos residuos pueden disminuir o alterar el crecimiento de las levaduras al cambiar su fisiología causando una fermentación lenta o inhibiéndola por completo (Cabras y col; 1999; Fleet and Heard, 1993; Milkota y col, 1996).

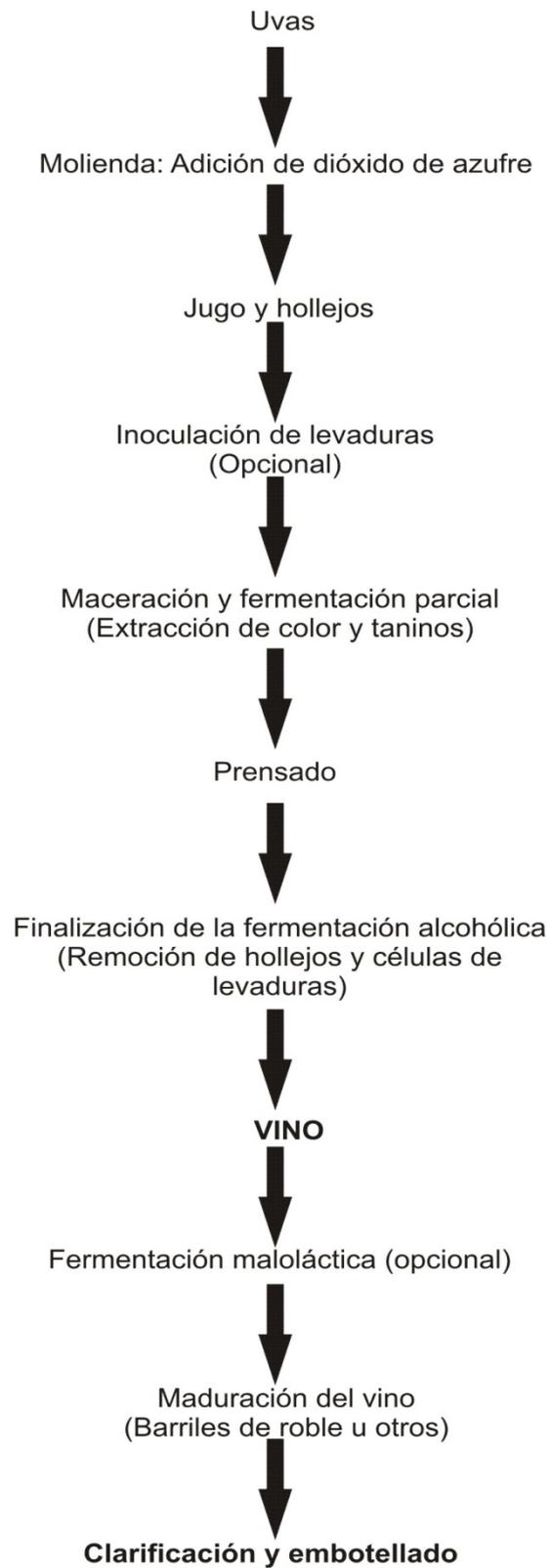
La aireación del jugo (remontado) antes y durante los estadios tempranos de la fermentación y la presencia de materiales particulados y sólidos de la uva pueden estimular el crecimiento y la fermentación de las levaduras (Bisson, 1999; Delfini y Costa, 1993).

### **Molienda y tratamientos pre-fermentación.**

Las uvas tintas son molidas mecánicamente y el jugo más el hollejo (mosto) son transferidos directamente a los tanques de fermentación. La fermentación comienza naturalmente (es decir, gracias a la presencia de los microorganismos propios de la uva) o luego de la inoculación con cepas de levaduras seleccionadas. Cuando se desea llevar a cabo fermentaciones inoculadas, es una práctica común el agregado de dióxido de azufre al mosto recién obtenido. La finalidad es restringir el

crecimiento de las cepas naturales de levaduras y prevenir las reacciones oxidativas (Ough y Crowell, 1987, Romano y Suzzi, 1993) producidas por ellas.

Durante los primeros días los hollejos se ubican en la parte superior del tanque de fermentación formando el “sombbrero”. En dicho estadio temprano, conocido como maceración, el jugo es remontado regularmente por sobre el sombrero con la finalidad de extraer los pigmentos púrpuras y rojos de las antocianinas, como así también otros sustratos fenólicos de las cubiertas de las uvas, para dar color y caracteres tánico y astringente al vino. El proceso de extracción es favorecido por la producción de etanol durante la fermentación preliminar. Cuando se ha logrado suficiente extracción, el vino parcialmente fermentado se descuba, es decir, se retira del tanque de fermentación y se separa el hollejo del jugo; este último se trasvasa a otro tanque donde se completa el proceso de fermentación (Fleet, 2001) (Figura 1).



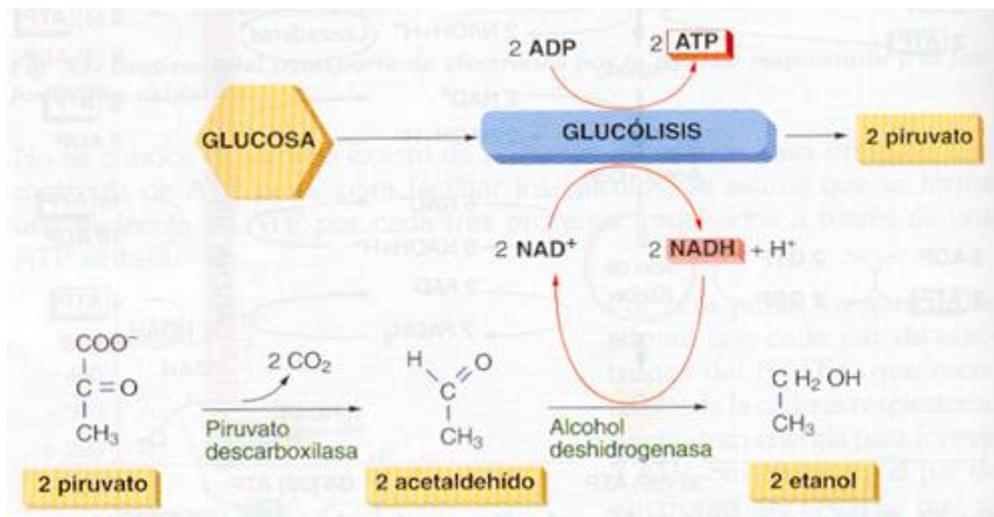
**Figura 1.** Proceso de producción de vinos tintos

## Fermentación alcohólica.

Las **fermentaciones**, ya sean alcohólicas o lácticas, son **procesos catabólicos** que se llevan a cabo en ausencia de  $O_2$ . En la **fermentación alcohólica**, a partir de **HEXOSAS** presentes en el mosto se produce **ETANOL** y  $CO_2$ . (Figura 2).

La fermentación alcohólica es llevada a cabo por **levaduras**, organismos eucariotas unicelulares pertenecientes al reino **FUNGI**, que se dividen en su mayoría por gemación (reproducción asexual).

Los vinos tintos son fermentados de 7 a 20 días aproximadamente a una temperatura aproximada de  $30^\circ C$ . Cuando se utilizan cepas comerciales de **levaduras** para llevar a cabo la fermentación, éstas son generalmente cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y son inoculadas en niveles entre  $10^6$  y  $10^7$  cel/mL. La ventaja de llevar a cabo fermentaciones inoculadas con cepas comerciales es que las mismas son más rápidas y predecibles, mientras que las poblaciones de levaduras naturales producen fermentaciones variables, difíciles de controlar, y con interferencias de un rango amplio de otras especies de levaduras. Se considera que la fermentación alcohólica se ha completado cuando los azúcares fermentables del jugo, glucosa y sacarosa, son utilizados totalmente. En esta etapa se retiran del vino los hollejos y las células decantadas de las levaduras. Luego se transfiere el mismo a tanques de fermentación o barriles donde se lleva a cabo la fermentación malo-láctica y la maduración del vino (opcional).



**Figura 2.** Fermentación alcohólica

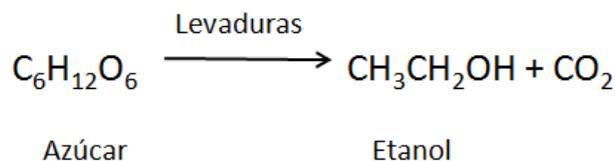
## Fermentación malo-láctica.

La fermentación malo-láctica (FML) comienza naturalmente luego de finalizada la fermentación alcohólica y dura de 2 a 4 semanas. Las **bacterias** ácido lácticas (BAL) residentes en el vino son las encargadas de llevar a cabo dicha etapa (Boulton y col, 1995; Davis y col, 1985; Henick-Kling, 1993; Lonvaud-Funel, 1999; Wiwobo y col, 1985). Las BAL son organismos procariontes, unicelulares, Gram (+) y se dividen por fisión binaria.

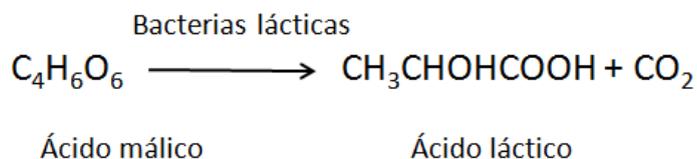
La reacción principal de la FML es la decarboxilación del ácido L-málico a L-láctico, causando una disminución en la acidez del vino (**desacidificación**). Dicha desacidificación produce un vino más suave y de sabor maduro. Además, el crecimiento de las BAL en el vino contribuye con metabolitos adicionales que pueden conferir características de “*flavor*” complejas, a menudo descriptos como sabores a manteca, a nueces o frutado. Además de las consideraciones de “*flavor*”, los vinos que completan la fermentación malo-láctica poseen gran estabilidad microbiológica y son menos propensos al deterioro por otras especies de BAL o incluso a la contaminación por bacterias acéticas. La mencionada estabilidad microbiológica se debe a que las BAL consumen nutrientes que de otra manera estarían disponibles para otros microorganismos indeseables y producen toxinas (bacteriocinas) que inhiben el crecimiento de otras bacterias como por ejemplo las bacterias acéticas.

La ecuación global de la fermentación alcohólica se muestra en la Figura 3.

### Fermentación alcohólica



### Fermentación maloláctica



**Figura 3.** Ecuaciones globales de los procesos fermentativos que ocurren durante la vinificación.

## Bibliografia

- Amerine M.A. (1985). In H. Koprowski and S.A. Plotin (ed.), *World's Debt to Pasteur*. Alan R. Liss, Ins., New York, N.Y. pp 67-81.
- Bisson L.F. (1999). Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*. **50**:107-119.
- Boulton R., Singleton V., Bisson L., Kunkee R. (ed) (1996). Yeast an biochemistry of ethanol fermentation. In: *Principles and practices of Winemaking*. pp 102-192. New York, NY, USA: Chapman and Hall
- Cabras P., Angiorni A., Garau V.L., Prisi F.M., Farris G.A., Adu G., Emonti G. (1999). Pesticides in fermentative processes of wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **47**:3854-3857.
- Davis C., Wibowo R., Eschenbruch R., Lee T.H., Fleet G.H. (1985). Practical implications of malolactic fermentation-a review. *American Journal of Enology and Viticulture*. **36**:209-301.
- Delfini G., Costa A. (1993). Effects of grape must lees and insoluble materials on the alcoholic fermentation rate and the production of acetic acid, pyruvic acid and acetaldehyde. *American Journal of Enology and Viticulture*. **44**:86-92.
- Fleet G.H. (2001). Wine. p 748. In *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* 2nd Ed. Ed M.P. Doyle et al. ASM Press, Washington D.C.
- Fleet G.H., Heard G.M. (1993). Yeasts-growth during fermentation p.27-54. In G.H. Fleet (ed.), *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland
- Henick-Kling T. (1993). Malolactic fermentation, p. 289-326. In G.H. Fleet (ed.), *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- Henschke P.A., Jiranek V. (1993). Yeasts-metabolism of nitrogen compounds, p.77-164. In G.H. Fleet (ed.), *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- Lonvaud-Funel, A. (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leewenhoek*. **76**:317-331.
- Milikota F., Males P., Cvjetkovik B. (1996). Effectiveness of five fungicides on grape vine grey mould and their effects on must fermentation. *Journal of Wine Research*. **7**:103-110.
- Ough C.S., Crowell E.A. (1987). Use of sulfur dioxide in winemaking. *Journal of Food Science*. **52**: 386-388,393.
- Romano P., Suzzi G. (1993). Sulfur dioxide and wine microorganisms. P. 373-394. In G.H. Fleet (ed.), *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland
- Wiwobo D., Eschenbruch R., Davis C., Fleet G.H., Lee T.H. (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine-a review. *American Journal of Enology and Viticulture*. **36**:302-313.

### Actividades a desarrollar luego de haber realizado la visita a la Bodega

1. ¿Qué tipo de organismos son las levaduras? ¿Dentro de que reino se encuentran?
2. ¿Qué comportamiento tienen las levaduras frente al oxígeno?
3. Diga V o F y Justifique: Las levaduras pueden respirar o fermentar según la disponibilidad de  $O_2$  del medio en el que se encuentren.
4. ¿Qué le ocurrirá a la velocidad de crecimiento de las levaduras si suplementamos el medio con  $O_2$ ? Justifique
5. ¿Cuál es el rendimiento energético de la fermentación alcohólica? ¿Es mayor, menor o igual a la respiración aeróbica? Justifique
6. ¿Cuándo se considera que la fermentación alcohólica ha concluido? ¿Qué parámetro se mide en bodega para estimar dicho final?
7. ¿Qué tipo de organismos son las bacterias lácticas? ¿Dentro de qué reino se encuentran?
8. ¿Qué tipo de metabolismo tienen las bacterias lácticas?
9. ¿Cuál es la utilidad en bodega de permitir que los vinos completen la fermentación malo-láctica?