

BIOTECNOLOGÍA Y VIDA COTIDIANA

Manual de trabajos prácticos
de biotecnología

VINOS Y VINAGRES

Dra. María Antonia Muñoz de Malajovich



ArgenBio 

Consejo Argentino para la Información
y el Desarrollo de la Biotecnología



por qué Biotecnología

BIOTECNOLOGÍA Y VIDA COTIDIANA

VINOS Y VINAGRES

Autora:

Dra. María Antonia Muñoz de Malajovich

Coordinadora de Biotecnología

Instituto de Tecnología ORT de Río de Janeiro, Brasil

"Biotecnología y vida y cotidiana" es el título de una serie de Manuales de Trabajos Prácticos de Biotecnología editados por el Programa Educativo Por Qué Biotecnología de ArgenBio. "Vinos y Vinagres" es el segundo ejemplar de esta serie, elaborada y diseñada por la Dra. María Antonia Muñoz de Malajovich. El primer ejemplar fue "Limpiando la ropa con enzimas", editado en octubre de 2007.

María Antonia Muñoz de Malajovich es argentina, estudió Ciencias Biológicas en la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires.

Radicada en Brasil, cursó la maestría y el doctorado en genética en la Universidad Federal de Río de Janeiro. Actualmente es docente y coordinadora de Biotecnología en el Instituto de Tecnología ORT de Río de Janeiro, donde organizó e implantó el Curso Técnico de Biotecnología y el Núcleo Experimental de Estudios Ambientales - NEDEA. En 2008 recibió el Premio Beatrice Wand-Polak, otorgado por World ORT, por su labor destacada en el desarrollo de nuevos programas, materiales y tecnologías educativas.

A lo largo de veinte años dedicados a la enseñanza de la Biotecnología, la Dra. Malajovich ha dado numerosas conferencias y cursos de formación de Profesores en Brasil, Perú, Uruguay y Venezuela, además de publicar diversos artículos. Es autora del libro Biotecnología publicado en portugués (Axcel Books, Brasil, 2004) y en español (Universidad Nacional de Quilmes, Argentina, 2007).

El equipo de Por Qué Biotecnología de ArgenBio agradece a María Antonia Muñoz de Malajovich por su generosidad al compartir sus conocimientos y los recursos didácticos que genera, frutos de su creatividad, experiencia y trabajo con sus alumnos.

Las versiones impresas de los manuales "Limpiando la ropa con enzimas" y "Vinos y Vinagres" son de distribución gratuita y limitada. Las versiones digitales son de total libre acceso y están disponibles en el sitio www.porquebiotecnologia.com.ar

Para consultas e información: educacion@porquebiotecnologia.com.ar

Noviembre - 2008

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

Primera parte - VINOS

1. VINOS	Pág. 13
1.1. EL VINO	Pág. 13
1.2. LA VINIFICACIÓN	Pág. 13
1.2.1. LA VID	Pág. 13
1.2.2. LA PREPARACIÓN DEL MOSTO	Pág. 14
1.2.3. EL ROL DE LA LEVADURA	Pág. 14
1.2.4. LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	Pág. 15
1.2.5. LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA	Pág. 15
1.2.6. EL TRATAMIENTO FINAL	Pág. 15
1.3. ¿VINO TINTO O VINO BLANCO?	Pág. 16
1.4. LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA	Pág. 17
1.4.1. EL MERCADO MUNDIAL	Pág. 17
1.4.2. IDENTIDAD TECNOLÓGICA	Pág. 17

2. ACTIVIDADES PRÁCTICAS - GUÍA DEL DOCENTE	Pág. 18
2.1. LAS BEBIDAS FERMENTADAS	Pág. 18
2.1.1. PREPARACIÓN DE UNA BEBIDA GASEOSA	Pág. 18
2.1.2. PREPARACIÓN DE VINOS DE FRUTAS	Pág. 19
2.1.2.1. LAS FRUTAS	Pág. 19
2.1.2.2. RELACIÓN ENTRE LA CANTIDAD DE AZÚCAR Y EL TENOR ALCOHÓLICO	Pág. 20
2.1.2.3. CORRECCIÓN DEL pH	Pág. 21
2.1.2.4. LA LEVADURA	Pág. 21
2.1.2.5. LAS ETAPAS DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	Pág. 21
2.1.2.6. EL TRATAMIENTO FINAL DEL VINO	Pág. 22
2.1.2.7. ALGUNAS RECETAS	Pág. 23
2.2. DEL MOSTO AL VINO: ASPECTOS TÉCNICOS Y METODOLÓGICOS	Pág. 23
2.2.1. MONTAJE DEL FERMENTADOR	Pág. 23
2.2.2. EL MONITOREO DE LA FERMENTACIÓN	Pág. 24
2.2.3. MASA Y BALANZAS	Pág. 26
2.2.4. SELECCIONANDO VARIABLES	Pág. 27
2.2.5. TRATAMIENTO DE LOS DATOS	Pág. 28
2.3. LA INMOVILIZACIÓN, UNA TECNOLOGÍA NOVEDOSA	Pág. 29

3. AGRADECIMIENTOS	Pág. 31
---------------------------	---------

4. BIBLIOGRAFÍA	Pág. 31
------------------------	---------

5. ACTIVIDADES PRÁCTICAS - GUÍAS DEL ALUMNO	Pág. 33
A1. UNA BEBIDA DIFERENTE	Pág. 37
A2. DEL MOSTO AL VINO: las etapas fundamentales	Pág. 39
A3. DEL MOSTO AL VINO: monitoreando la fermentación	Pág. 41
A4. UNA TECNOLOGÍA NUEVA: la inmovilización de levaduras	Pág. 43

Segunda parte - VINAGRES

1. VINAGRES	Pág. 47
1.1. EL VINAGRE	Pág. 47
1.2. LA ACETIFICACIÓN	Pág. 47
1.3. TRADICIÓN Y MODERNIDAD	Pág. 48
1.3.1. PROCESO DE FABRICACIÓN LENTO, FRANCÉS O DE ORLÉANS	Pág. 48
1.3.2. PROCESO DE FABRICACIÓN RÁPIDO, SCHUETZENBACH O ALEMÁN	Pág. 49
1.3.3. PROCESOS DE FABRICACIÓN CON CULTIVOS SUMERGIDOS	Pág. 49
1.4. USOS DEL VINAGRE	Pág. 49
 2. ACTIVIDADES PRÁCTICAS - GUÍA DEL DOCENTE	 Pág. 50
2.1. LOS PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS EN LA ENSEÑANZA	Pág. 50
2.2. INICIANDO LA PRODUCCIÓN DE VINAGRES	Pág. 50
2.2.1. EL MONITOREO DE LA ACETIFICACIÓN COMO PRE-REQUISITO	Pág. 50
2.2.1.1. PROCEDIMIENTO	Pág. 50
2.2.1.2. ¿POR QUÉ $C_{NaOH} = 0,66\%$?	Pág. 51
2.2.1.3. LA ELABORACIÓN DE LOS DATOS	Pág. 51
2.2.1.4. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES	Pág. 52
2.2.2. OBTENCIÓN DEL INÓCULO	Pág. 52
2.3. EL PROCESO LENTO DE PRODUCCIÓN DE VINAGRES	Pág. 53
2.3.1. MONTAJE DEL FERMENTADOR	Pág. 53
2.3.2. EL FERMENTADOR EN FUNCIONAMIENTO	Pág. 53
2.3.2.1. COMPOSICIÓN INICIAL DEL CALDO	Pág. 53
2.3.2.2. LA MADRE DEL VINAGRE	Pág. 54
2.3.2.3. REALIZANDO LA FERMENTACIÓN	Pág. 55
2.3.2.4. PROBLEMAS POSIBLES	Pág. 56
2.3.3. PRODUCCIÓN, RENDIMIENTO Y PRODUCTIVIDAD	Pág. 57
2.4. EL PROCESO RÁPIDO DE PRODUCCIÓN DE VINAGRES	Pág. 58
2.4.1. MONTAJE DEL FERMENTADOR	Pág. 58
2.4.2. EL FERMENTADOR EN FUNCIONAMIENTO	Pág. 59
2.4.3. PASAJE A UN SISTEMA CONTINUO DE PRODUCCIÓN	Pág. 59
2.5. ACONDICIONAMIENTO DEL VINAGRE COMO PRODUCTO FINAL	Pág. 60
2.6. ALTERACIONES DEL VINAGRE	Pág. 60
2.7. ¿CÓMO UTILIZAR LOS PROTOCOLOS?	Pág. 60
 3. AGRADECIMIENTOS	 Pág. 61
 4. BIBLIOGRAFÍA	 Pág. 61
 5. ACTIVIDADES PRÁCTICAS - GUÍAS DEL ALUMNO	 Pág. 63
A1. ¿CÓMO PREPARAR VINAGRE ARTESANALMENTE?	Pág. 67
A2. ¿CÓMO MEDIR LA ACIDEZ DEL VINAGRE?	Pág. 69
A3. ¿CÓMO INICIAR LA PRODUCCIÓN DE VINAGRE?	Pág. 71
A4. PRODUCCIÓN DE VINAGRE - PROCESO LENTO	Pág. 73
A5. ¿CÓMO CONSTRUIR UN FERMENTADOR? - PROCESO RÁPIDO	Pág. 75
A6. PRODUCCIÓN DE VINAGRE - PROCESO RÁPIDO	Pág. 77

INTRODUCCIÓN

La elección de “Vinos y Vinagres” como tema central de este fascículo nos remite a la estrecha relación existente entre Ciencia, Tecnología y Sociedad. Es imposible desarrollar este tema sin referirnos a los trabajos de Louis Pasteur y el nacimiento de la Microbiología Aplicada, parte de lo que hoy llamamos Biotecnología.

En sus primeros estudios químicos sobre la estructura cristalina del ácido tartárico y la formación de soluciones ópticamente activas, Pasteur observó que los compuestos que desvían la luz polarizada en un único sentido provienen de organismos vivos. Esta certeza le permitió abordar de manera diferente las fermentaciones, sobre las cuales trabajó a partir de 1854.

Para Pasteur, las fermentaciones resultan de la acción de microorganismos o “fermentos”. A cada tipo corresponde un fermento específico. Para que el proceso fermentativo se desarrolle con éxito, el fermento debe encontrar todos los nutrientes necesarios, entre los cuales se incluye la presencia o ausencia de aire.

Los trabajos sobre las fermentaciones marcan un gran progreso conceptual, puesto que inician el derrumbe de la Teoría de la Generación Espontánea. Su importancia práctica no pasó desapercibida para los productores de bebidas fermentadas que enfrentaban dificultades no sólo para mantener una calidad constante en sus productos sino también para conservarlos. Al encontrar aplicación inmediata en la fabricación de vinos, vinagres, cervezas y productos lácteos, estos descubrimientos fueron fundamentales en la economía francesa de la segunda mitad del siglo XIX.

En la enseñanza de Biotecnología, la preparación de vinos y vinagres es un tema interdisciplinario de gran riqueza. No sólo permite comprender los procesos metabólicos que se realizan en diferentes condiciones (anaerobiosis, aerobiosis), sino que además demanda conocimientos químicos y biológicos. Y también una buena dosis de ingenio.

Algunos de los puntos más importantes relacionados con el tema son: crecimiento de poblaciones microbianas, factores limitantes, sucesión ecológica, metabolismo microbiano, fermentación alcohólica, fermentación acética, titulación ácido-base (volumetría), separación de mezclas heterogéneas, construcción de fermentadores, puesta en marcha de procesos fermentativos por carga y semicontinuos.

En el desarrollo de este fascículo sobre Vinos y Vinagres evitamos utilizar algunos tratamientos matemáticos avanzados, indispensables en el nivel universitario pero no en el secundario. Aún cuando las actividades prácticas se realicen con materiales simples y de bajo costo, los resultados permiten un tratamiento sofisticado que incluye la elaboración de tablas y gráficos. El tema facilita el desarrollo de proyectos muy variados.

Por razones prácticas dividimos este fascículo en dos partes obvias, la primera dedicada a Vinos, la segunda a Vinagres. Esperamos que este Manual les sea útil y que se diviertan con los vinos y vinagres tanto como nosotros.

¡Buena Suerte!



Primera Parte

VINOS

1. EL VINO

1.1. ASPECTOS HISTÓRICOS

La palabra vino designa la bebida resultante de la fermentación alcohólica de la uva. Su composición química es compleja e incluye: agua, azúcares, alcoholes, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, sustancias nitrogenadas, pectinas, gomas y mucílagos, compuestos volátiles y aromáticos (ésteres, aldehídos y cetonas), vitaminas y dióxido de azufre.

Desde su origen, en aproximadamente 6000 AC, el vino se relaciona con los dioses (Osiris, Dionisio, Baco). Tiene un lugar destacado en el Antiguo y el Nuevo Testamento (Noé, Jesús) y está asociado a numerosos ritos judíos y cristianos; sólo el Islam lo prohíbe.

Numerosos documentos muestran la existencia del vino en las sociedades egipcia, griega y romana de la Antigüedad. Jarras de vino acompañaron a Tutankamón en las tinieblas de su tumba. Adormecido después de beber vino, el gigante Polifemo fue cegado por Ulises. En 92 DC, el emperador Domiciano mandó arrancar las vides de buena parte de Galia para que se plantaran granos y abastecer a Roma.

En Europa, la producción de vino se desarrolla en forma artesanal y en pequeña escala, características que se mantienen al expandirse la viticultura siguiendo los movimientos colonizadores y migratorios. La vid y el vino llegan a Chile y Argentina en el siglo XVI, un poco más tarde a Estados Unidos, Sudáfrica y Australia.

Con la Revolución Industrial comienza la producción de bebidas fermentadas en gran escala. En Francia las primeras tentativas enfrentan dificultades y las “enfermedades de los vinos” comprometen buena parte de la producción. En ese contexto, Louis Pasteur es nombrado profesor de Química y Decano de la Facultad de Ciencias de Lille, un establecimiento fundado para resolver problemas de los industriales locales.

Pasteur abre la posibilidad de mejorar la producción al demostrar que la levadura es el agente de la fermentación y no lo contrario, como se creía en la época. También distingue a los microorganismos responsables por una fermentación normal de los que la alteran, aconsejando a los productores el uso de cepas microbianas puras. Más tarde descubre que un tratamiento de poca duración con calor permite eliminar la mayor parte de los patógenos sin alterar las características de las bebidas.

Entre 1854 y 1882, con la innovación tecnológica representada por la pasteurización y sus trabajos sobre las fermentaciones y la microbiología del vino, Pasteur establece los fundamentos de la industria vinícola moderna.

1.2. LA VINIFICACIÓN

La variada flora microbiana de la uva incluye levaduras, responsables por la transformación del azúcar en etanol, y bacterias acéticas que oxidan el etanol formando ácido acético. Considerando que desde un punto de vista ecológico el destino final de la uva es el vinagre, el arte de la vinificación representa un éxito tecnológico.

1.2.1. LA VID

Hay diferentes especies de vides; la *Vitis vinifera* brinda los vinos más finos, mientras que la *Vitis labrusca*, *Vitis ripari*, y otras variedades más rústicas de la propia *Vitis vinifera* se utilizan para la elaboración de vinos comunes. Existe un suelo y clima ideal (“terroir”) para cada cultivar fuera del cual difícilmente se obtendrán resultados tan buenos.

Muchos vinos resultan de la mezcla de uvas de cultivares diferentes (vinos genéricos o de corte). Otros se obtienen a partir de una única variedad: Pinot noir, Chardonnay o Pinot blanc en los Borgoñas, Cabernet-Sauvignon en los Burdeos, Sangiovese en los Chianti y Zinfandel en los vinos californianos. Una variedad como Pinot Noir dará bebidas tan diferentes como un Borgoña o un Champagne según el proceso utilizado para la elaboración del vino.

En 2007, y después de seis años de trabajo, un grupo franco-italiano logró completar el mapa del genoma de la *Vitis vinifera*, variedad Pinot Noir. Esta información abre numerosas perspectivas para los viticultores. Entre los 30.434 genes de la uva hay centenas responsables por los aromas y el sabor de los vinos. Otros regulan la cantidad de resveratrol, una molécula que disminuye los niveles de colesterol reduciendo el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Al identificar marcadores moleculares relacionados con la maduración de la fruta, se podrá acompañar con arreglos o matrices ("arrays") el proceso y elegir el momento adecuado para la vendimia.

El cultivo de la vid es una tarea compleja que exige tratamientos, injertos y podas. Para asegurar que la calidad permanezca constante se recurre a la multiplicación vegetativa, una práctica que torna a las vides susceptibles a muchos patógenos. Se espera que los estudios genómicos permitan seleccionar genes de resistencia a algunas enfermedades.

1.2.2. LA PREPARACIÓN DEL MOSTO

La uva está compuesta por 86% de agua, 12% de azúcares fermentables y 2% de moléculas diversas. Para retirar el jugo o mosto se la estruja o prensa. El rendimiento de la extracción mejora con el agregado de enzimas de maceración (pectinasas, celulasas y hemicelulasas).

Si se quiere obtener vino blanco, se utilizan uvas blancas o tintas sin el hollejo. Las uvas tintas con hollejo originan vinos tintos debido a que este libera compuestos fenólicos (antocianinas, flavonas, taninos).

1.2.3. EL ROL DE LA LEVADURA

El agente biológico de la fermentación alcohólica es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que se encuentra en el hollejo de la uva.

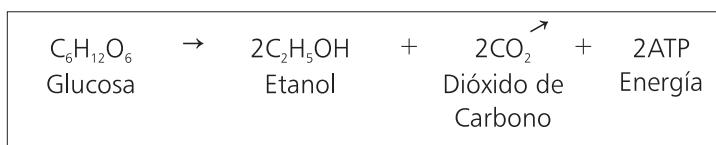
La industria moderna tiende a sustituir las levaduras "salvajes" por levaduras enológicas seleccionadas. Estas fermentan a bajas temperaturas, produciendo poca espuma pero bastante alcohol y sustancias aromáticas agradables (ésteres y terpenos). Además, toleran cantidades mayores de alcohol y de dióxido de azufre (SO₂) en el medio y son portadoras de factores "killer" que contribuyen a la eliminación de otras levaduras. El crecimiento de estas levaduras durante la fermentación es acompañado por métodos moleculares de identificación (DNA mitocondrial o ribosomal).

En la vinificación, se agrega dióxido de azufre al mosto para inhibir el desarrollo de microorganismos indeseables, que permanecen en estado latente. La inoculación se realiza con levaduras enológicas seleccionadas ya en plena actividad, de modo que se reproduzcan con mucha más velocidad que las salvajes.

Algunos productores argumentan que las levaduras enológicas masifican la calidad del vino. Ya han sido creados bancos de levaduras autóctonas buscando mantener una calidad diferente y preservar la biodiversidad. Por otro lado, las levaduras salvajes producen enzimas (β -glucosidasas) que degradan redes moleculares complejas liberando compuestos aromáticos aprisionados. Esa es la razón que esgrimen algunos de los productores para promover el uso conjunto de levaduras salvajes y enológicas. Otros prefieren agregar enzimas.

1.2.4. LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

Al iniciarse la vinificación las levaduras respiran y se multiplican hasta agotar el oxígeno; luego comienzan a fermentar, según la ecuación:

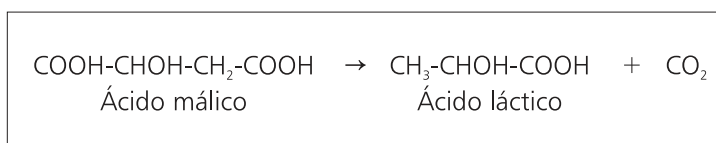


La intensidad de la fermentación aumenta lentamente hasta entrar en una fase tumultuosa, después de la cual comienza a disminuir. Al acabar el azúcar, termina la fermentación alcohólica.

En la vinificación, el proceso se realiza en cubas de madera, de cemento o de acero, y se lo acompaña midiendo variaciones de la densidad del mosto, del tenor de azúcar o de la temperatura. Terminada la fermentación, se procede al primer trasiego para eliminar la borra. Después de un tiempo se hace un segundo trasiego.

1.2.5. LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA

Entre el primero y el segundo trasiego comienza una segunda fermentación, en la que bacterias lácticas como *Oenococcus oeni* transforman el ácido málico (diácido) en ácido láctico (monoácido) y CO_2 , según la ecuación:



Es una de las etapas más complejas de la vinificación. La acidez del vino disminuye y se producen las primeras modificaciones aromáticas que constituyen la base del "bouquet".

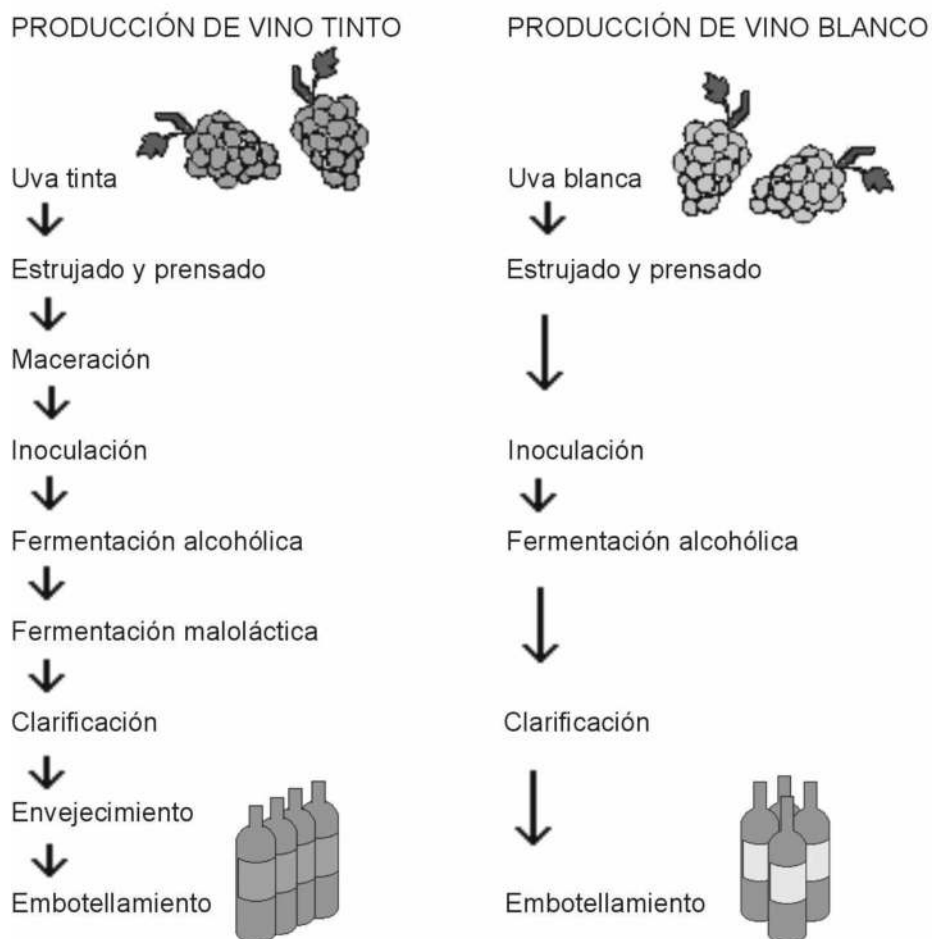
1.2.6. EL TRATAMIENTO FINAL

Después de la fermentación, se clarifica el vino por medio de procesos físicos (filtración, precipitación y decantación). Luego se pone el vino a envejecer en toneles o botellas, para que se desarrolle el "bouquet". Siendo este el resultado de una serie de reacciones químicas de reducción, el envejecimiento debe hacerse sin contacto con el oxígeno.

1.3. ¿VINO TINTO O VINO BLANCO?

La obtención de un vino tinto o blanco depende básicamente del tipo de uva y del procedimiento seguido, representado en la Figura 1.

Figura 1: La vinificación.



Vinificación en tinto

La uva tinta se estruja y macera para obtener el mosto; una vez corregidas la acidez y la cantidad de azúcar, se lo pasa a la cuba donde se desarrolla la fermentación alcohólica. Se separa el mosto de la borra por trasiego pasando por una segunda fermentación (fermentación maloláctica). Después del clarificado, se deja estabilizar el vino durante dos años antes de embotellarlo. Los vinos rosados o “rosés” pasan por un proceso similar al de la vinificación en tinto, pero el mosto se macera con los hollejos por menos tiempo. También se obtienen mezclando vinos blancos y tintos.

Vinificación en blanco

El mosto se obtiene a partir de uva blanca o de uva tinta sin hollejo sin que haya maceración. En los vinos blancos se evita la fermentación maloláctica, siendo algunos vinos blancos de Borgoña una excepción a la regla. Los vinos espumantes (Champagne, Cava, Prosecco) pasan por una segunda fermentación alcohólica en la botella.

1.4. LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA

1.4.1. EL MERCADO MUNDIAL

La comercialización de vinos finos y caros es una actividad económicamente importante en la que el consumidor busca calidad y tradición. El consumo mundial de vino llega a unos 235 millones de hectolitros por año. Disminuyó ligeramente en los países productores tradicionales (Francia, Italia, España, Portugal) pero aumentó en otros lugares donde no era habitual beber vino (China, India y Tailandia). Actualmente hay una cierta disociación entre consumidores y productores siendo que de cada tres botellas de vino, sólo dos serían consumidas en el país de origen.

A partir de 2005, la producción mundial de vino se estabilizó en unos 277 millones de hectolitros por año. En los últimos años nuevos productores ingresaron en el mercado internacional; es el caso de Argentina, Chile, Sudáfrica, Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos. Es posible que a medio plazo India y China se integren a este grupo.

1.4.2. IDENTIDAD TECNOLÓGICA

La calidad de un vino depende del suelo, del clima y del tipo de uva, pero también obedece a la tecnología de fabricación. Sin embargo, en la historia del vino fueron pocos los cambios tecnológicos significativos:

- El reemplazo de las ánforas romanas por barricas de roble, por los galos.
- La adición de azúcar para aumentar el tenor alcohólico (chaptalización); el empleo de botellas; el descubrimiento del método de transformación de los vinos en champagne por Don Pérignon (siglo XVII).
- El uso de tapones de corcho, que permiten un mejor envejecimiento del vino (inicio del siglo XVIII).
- La introducción en Europa de plantas americanas resistentes a la filoxera (insecto parásito de la vid); el desarrollo de los medios de transporte, permitiendo la conservación de los mejores viñedos (siglo XIX).

¿Cuál será el papel de la biotecnología en una industria tan conservadora? La genómica abre perspectivas insospechadas. Además de permitir acompañar la maduración del fruto con precisión, también abre el camino para el mejoramiento de las cepas y la producción de plantas resistentes a las enfermedades y plagas (insecto *Phylloxera vitifolia*, bacteria *Xylella fastidiosa*, Grapevine Fanleaf Virus o GFLV).

Aunque es posible transferir genes de resistencia de una variedad a otra, los productores tradicionales ven esto con mucha desconfianza, porque el rótulo de varietal es parte de las estrategias de venta de los vinos de buena calidad. El rechazo a los transgénicos también se extiende a las plantas porta-injertos resistentes al GFLV.

Sin embargo, algunos de los nuevos productores aceptarían la transferencia de genes de vides rústicas a plantas de elite, con el objetivo de mejorar la producción. Recientemente en Australia, se introdujo un gen que modifica el color y reduce el contenido de taninos de la *Vitis vinifera* Syrah.

La genómica no solo se ocupó de la vid, también han sido secuenciados los genomas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Oenococcus oeni*. Ya existen varias levaduras transgénicas; algunas producen enzimas de maceración, otras inciden en la fermentación maloláctica.

La entrada de la levadura ML01 en la industria de vinos de Estados Unidos y Canadá estaba prevista para 2007. Se trata de una levadura modificada genéticamente para realizar ambas fermentaciones (alcohólica y maloláctica). Aunque reconocida como segura (GRAS, del inglés Generally Recognized As Safe) por la FDA, resta saber cuál será su aceptación por parte de los productores tradicionales y los consumidores.

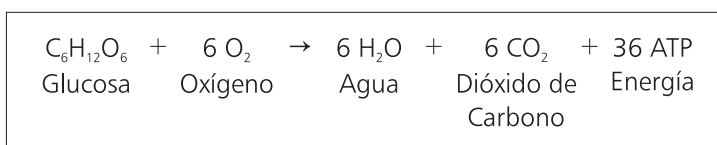
2. ACTIVIDADES PRÁCTICAS – GUÍA DEL DOCENTE

2.1. LAS BEBIDAS FERMENTADAS

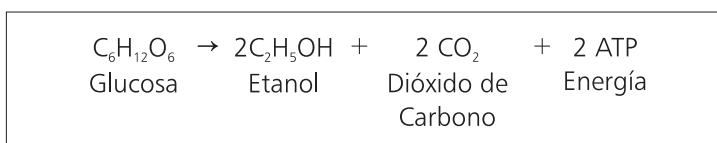
Las bebidas fermentadas son el resultado de la actividad metabólica de las levaduras sobre una materia prima azucarada.

En presencia de oxígeno (aerobiosis) las levaduras respiran, degradando la glucosa en agua y dióxido de carbono. En ausencia de oxígeno (anaerobiosis) las levaduras fermentan, degradando parcialmente la glucosa en etanol y dióxido de carbono. Aunque ambos procesos liberan energía, la respiración es mucho más eficiente que la fermentación. Se los representa por las siguientes ecuaciones:

RESPIRACIÓN



FERMENTACIÓN



Las levaduras pueden utilizar otros azúcares (sacarosa, fructosa), pero no almidón ni lactosa. Con materias primas amiláceas debe degradarse enzimáticamente el almidón hasta obtener un azúcar fermentable. Es el caso de la cerveza, por ejemplo.

2.1.1. PREPARACIÓN DE UNA BEBIDA GASEOSA

La Actividad 1 (Una bebida diferente) está basada en un material del Nacional Center for Biotechnological Education (NCBE) y propone la preparación de una bebida gaseosa con bajo o nulo contenido alcohólico.

Los componentes fundamentales son agua, un hidrato de carbono (azúcar, miel) y levaduras secas instantáneas comerciales. El agregado de jugo de limón mejora notablemente el sabor, y las pasas de uva le dan un atractivo especial a la bebida porque se desplazan verticalmente durante la fermentación. Las pasas cargadas de dióxido de carbono suben a la superficie, donde liberan el gas e inician nuevamente el descenso.

Hay otras opciones adicionales, tales como el jugo de naranja u otros cítricos, jengibre fresco (1 rodajita), cremor tártaro (1 cucharadita de café), canela o extracto de vainilla, colorante de alimentos, etc.

Dentro de las posibilidades locales, sugerimos que cada grupo de alumnos invente una bebida. Se indican algunos valores (agua, levadura, cantidad de hidrato de carbono) que aseguran un resultado al menos aceptable. Después de lavarse las manos, los alumnos mezclan los ingredientes en una botella plástica y la cierran con un globo ajustado por una gomita elástica. Se observan las transformaciones durante 24 a 48 horas.

Las levaduras se multiplican consumiendo rápidamente el oxígeno e inician la fermentación. Esta es detectada fácilmente porque se libera gas, formando espuma e inflando el globo. Es el momento de frenar el proceso

fermentativo guardando las bebidas en la heladera. El resultado será una bebida gaseosa y dulce, con mucho menos etanol que una cerveza.

Una semana después, provistos con vasitos plásticos de café y cuenta-gotas, los chicos podrán comparar las diferentes gaseosas. La evaluación, que se realiza sobre muestras numeradas, comprende cuatro variables: aspecto, olor, color y sabor. En relación a este último, se trata de degustar y no de beber. La mejor manera de probar las bebidas es lamer una gota colocada en la palma de la mano.

Los mejores resultados se obtienen en pruebas a ciegas donde el grupo que evalúa no ha participado de su preparación y no sabe de quién es cada producto.

2.1.2. PREPARACIÓN DE VINOS DE FRUTAS

La palabra “vino” se refiere exclusivamente a la bebida obtenida por fermentación alcohólica de la uva madura y fresca o del jugo de uva fresca. Si en vez de uva se utiliza otra fruta hay que utilizar la expresión “vino de frutas” indicando si es manzana, pera, etc. Sin embargo, y por motivos prácticos, en este texto usaremos la palabra “vino” en forma amplia, refiriéndonos tanto a los vinos de uva como a los de otras frutas.

El objetivo de la Actividad 2 (Del mosto al vino: las etapas fundamentales) es preparar un mosto, fermentarlo y acondicionar el vino, que es el producto final.

2.1.2.1. LAS FRUTAS

La materia prima para producir vinos es la fruta, porque contiene azúcares simples (fructosa, sacarosa y glucosa) que pueden ser fermentados por las levaduras. Dependiendo del grado de maduración y del tipo de fruta, la cantidad de azúcar varía del 10 al 20% en masa (m/m). Uvas, manzanas y bananas tienen mayor cantidad de azúcar que melones, sandías, frutillas o frutas rojas (Tabla 1).

Conviene seleccionar frutas de estación bastante maduras. Cualquier tipo sirve: uva, manzana, ciruela, durazno, tomate, banana, ananá, maracuyá, naranja, caqui, kiwi, mango, melón, sandía, etc. También vale la pena experimentar con mezclas.

El jugo puede extraerse con algún aparato doméstico (exprimidor, licuadora, centrífuga, procesadora) o, simplemente, colocando la fruta dentro de una bolsa plástica y amasándola con las manos (Figura 2). Para filtrar el jugo basta un colador de paño.



Figura 2: Otra forma simple de preparar vinos de fruta

El licuado de fruta es distribuido en bolsas plásticas, de las que se extrae el aire antes de cerrarlas con una gomita. A medida que la fermentación avanza y se desprende CO_2 , la bolsa comienza a inflarse. Sacando el gas de tanto en tanto se evita que estalle.

Este último paso no es necesario con algunos jugos de fruta industrializados, que pueden resultar más económicos. Obtuvimos buenos resultados con jugos de uva y manzana pasteurizados. A pesar de ser bastante ácidos debido a la presencia de antioxidantes (ácido cítrico y ácido ascórbico), el crecimiento de las levaduras no fue inhibido. Hay que evitar los jugos que tengan conservantes como el meta bisulfito de sodio.

Aunque los productores de vino recomiendan enriquecer el mosto agregando fosfato de amonio al jugo, las frutas tienen bastantes nutrientes minerales y en el ámbito escolar no es necesario agregar algún complemento.

2.1.2.2. RELACIÓN ENTRE LA CANTIDAD DE AZÚCAR Y EL TENOR ALCOHÓLICO

El tenor alcohólico de un vino se expresa en grados Gay-Lussac ($^{\circ}$ GL), un valor que indica el porcentaje de alcohol en volumen (v/v). Se dice que la bebida tiene 12° GL si hay 12 ml de etanol en 100 ml de vino. Generalmente, la graduación alcohólica de los vinos comercializados se encuentra en un rango comprendido entre 10 y 14° GL.

Cuando la cantidad de azúcar de la fruta no es suficiente para conseguir un vino con el grado alcohólico deseado, puede corregirse el mosto agregándole azúcar (sacarosa). Esta es la llamada “chaptalización”, una práctica muy discutida que está permitida en algunos países (Francia, Alemania, Brasil) y prohibida en otros (Argentina, Chile).

La uva tiene naturalmente entre 15 y 22% (m/m) de azúcar, una cantidad que es suficiente para originar vinos con graduación alcohólica elevada. Sólo la banana madura alcanza una cantidad de azúcares (18% m/m) comparable a la de la uva. En las otras frutas la cantidad suele ser menor, generando vinos con poco tenor alcohólico que se deterioran fácilmente. Por eso se les agrega azúcar.

Al planear la actividad práctica hay que evitar las exageraciones, porque las concentraciones altas de azúcar inhiben el crecimiento de las levaduras. Algunos autores señalan “a ojo de buen cubero” que para obtener un vino con una buena graduación alcohólica basta añadir al mosto 20 g de azúcar por cada 100 g de fruta.

Pero hay otras formas de abordar la cuestión. Una de ellas es investigar en alguna tabla de composición de alimentos cuál es la cantidad de azúcar de la fruta elegida (Tabla 1). Conociendo el valor correspondiente se calcula cuánto azúcar hay que agregar para alcanzar la proporción de 20% m/m.

Tabla 1: Cantidad de carbohidratos en diversas frutas.

Los valores, expresados en g% (m/v) son aproximados, ya que la cantidad de carbohidratos varía con el grado de maduración de la fruta y la variedad considerada.

Ananá 12	Durazno 8,7	Mamón 12	Pelón 8,5
Arándano 7,3	Frambuesa 9,	Mandarina 10	Palta 0,9
Banana 15,6	Frutilla 7	Mango 13	Papaya 5,9
Cajú 10	Granada 8,9	Manzana 15	Pera 10-14
Carambola 7,1	Guayaba 13	Maracuyá 12	Pomelo 6,2
Cereza 14,6	Higo 10	Melón 8	Ruibarbo 0,9
Ciruela 14	Kiwi 11	Mora 7,9	Sandía 8-9
Damasco 9,3	Limón 2,5-7	Naranja 8-11	Uva 14-20

La otra forma de abordar la cuestión es aplicar como regla general que por cada 20 g de azúcar agregados a un litro de jugo o mosto, la graduación alcohólica del vino aumentará 1°GL (temperatura = 25°C). O sea que si se quiere obtener un litro de vino con 5°GL más de los que tendría naturalmente, habría que agregarle al mosto $5 \times 20\text{g} = 100\text{g}$ de azúcar.

Los pequeños productores artesanales utilizan hidrómetros (densímetros) con corrección de temperatura y escalas adaptadas a la producción de vino: densidad, % de sacarosa o Brix, % de alcohol. Con las medidas correspondientes se consultan tablas especialmente elaboradas que indican con precisión cuáles son las correcciones necesarias para alcanzar determinado tenor alcohólico a cierta temperatura.

Esos instrumentos de medición son muy frágiles y difícilmente se encuentran en un establecimiento escolar. Aunque en Internet hay numerosos protocolos referentes a la construcción de densímetros, estos no tienen la sensibilidad adecuada.

2.1.2.3. CORRECCIÓN DEL pH

El valor ideal del pH para la fermentación alcohólica está entre 3 y 4. Los valores más altos pueden ser modificados mediante la adición de jugo de limón, ácido tartárico o ácido cítrico. También puede llegarse a un pH correcto mezclando frutas ácidas con frutas menos ácidas.

2.1.2.4. LA LEVADURA

Algunos productores de vino seleccionan y cultivan sus propias levaduras (pie de cuba); otros compran las cepas de levaduras comerciales, especiales para la producción de vinos.

En el ámbito escolar pueden utilizarse tanto las levaduras comerciales como las levaduras que normalmente forman una capa blanquecina en la superficie de la uva. En el primer caso, se usa levadura fresca prensada (2 g por litro) o levadura seca instantánea. En el segundo, el mosto se inocula con las levaduras de 6 a 12 uvas seleccionadas, bien picadas y sin pepitas. Hay que elegir las sanas porque en el hollejo de la uva hay otros microorganismos (bacterias lácticas y acéticas, hongos) que pueden deteriorar el vino. El procedimiento es interesante, pero la fermentación se desarrolla más lentamente y a veces crecen contaminantes.

2.1.2.5. LAS ETAPAS DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

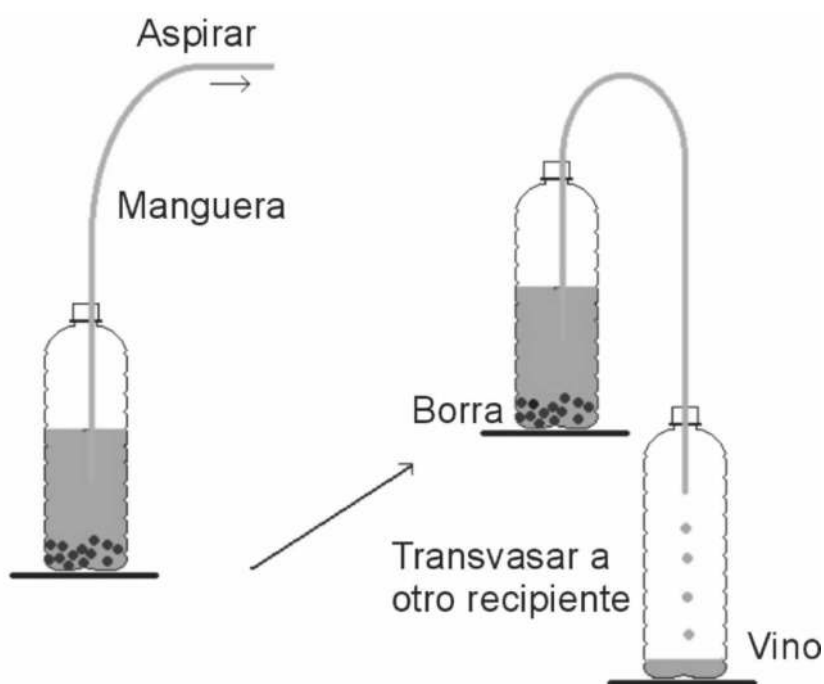
Inicialmente, las levaduras se multiplican consumiendo el oxígeno dentro del fermentador. Al encontrarse en condiciones anaerobias, las levaduras comienzan a fermentar. Las uvas que colocamos como inóculo se cargan de CO_2 y suben a la superficie formando un "sombbrero". El proceso es lento durante 12 a 24 horas, entra en una fase tumultuosa que dura de 2 a 3 días, y disminuye nuevamente su intensidad hasta detenerse lentamente. Los tiempos varían fundamentalmente en función de la temperatura, la cantidad de azúcar del mosto, la cantidad de levadura y el volumen de mosto.

Si se quiere obtener un vino con mayor tenor alcohólico, al disminuir la intensidad de la fermentación se puede abrir el fermentador, agregar más azúcar y cerrarlo nuevamente.

2.1.2.6. EL TRATAMIENTO FINAL DEL VINO

Al finalizar la fermentación habremos conseguido un líquido turbio con olor a alcohol, levaduras y fruta. La presencia de residuos sólidos suele darle a la bebida un aspecto poco agradable, y a la larga la deteriora. Por eso es necesario filtrar el vino obtenido a través de un paño o filtro de papel (los de café sirven) y dejarlo decantar en la heladera antes del trasiego, cuando se transvasa el sobrenadante con un sifón. (Figura 3).

Figura 3: Separación del vino y de la borra mediante un sifón



Las partículas en suspensión que aún permanecen en el vino pueden ser eliminadas por precipitación. Una forma de hacerlo es agregando al vino una cucharada de gelatina disuelta en agua o de clara de huevo batida a punto de nieve. En seguida, se coloca el vino en la heladera o a 0° C. El alcohol precipita las partículas de ovalbúmina que, al depositarse, arrastran las impurezas del vino. Otra opción eficaz, aunque bastante más burda, es congelar y descongelar el vino. En ambos casos es necesario un segundo trasiego.

La pasteurización elimina los microorganismos. El procedimiento es calentar el vino a una temperatura entre 60 y 70°C durante 1 a 2 minutos y enfriarlo rápidamente.

Los vinos de frutas mejoran al envejecer algún tiempo en la heladera.

2.1.2.7. ALGUNAS RECETAS

Vino de uva y manzana: Mezclar 400 ml de jugo de manzana, 200 ml de jugo de uva y el jugo de medio limón. Agregar 150 g de azúcar. Completar con agua hasta llegar a 1 l. Inocular con 2 g de levadura seca instantánea.

Vino de naranja: Mezclar 500 ml de jugo de naranja y 500 ml de agua. Agregar 500 g de azúcar. Inocular con 1 g de levadura seca instantánea.

Vino de frutas: Triturar 500 g de cualquier fruta junto con 2 vasos de agua, el jugo de 6 naranjas y 2 cucharadas de azúcar o miel. Filtrar con un paño. Inocular con 1 g de levadura seca instantánea.

Es preferible disolver el azúcar en agua caliente y obtener un jarabe que, una vez frío, se juntará al mosto.

2.2. DEL MOSTO AL VINO: ASPECTOS TÉCNICOS Y METODOLÓGICOS

2.2.1. MONTAJE DEL FERMENTADOR

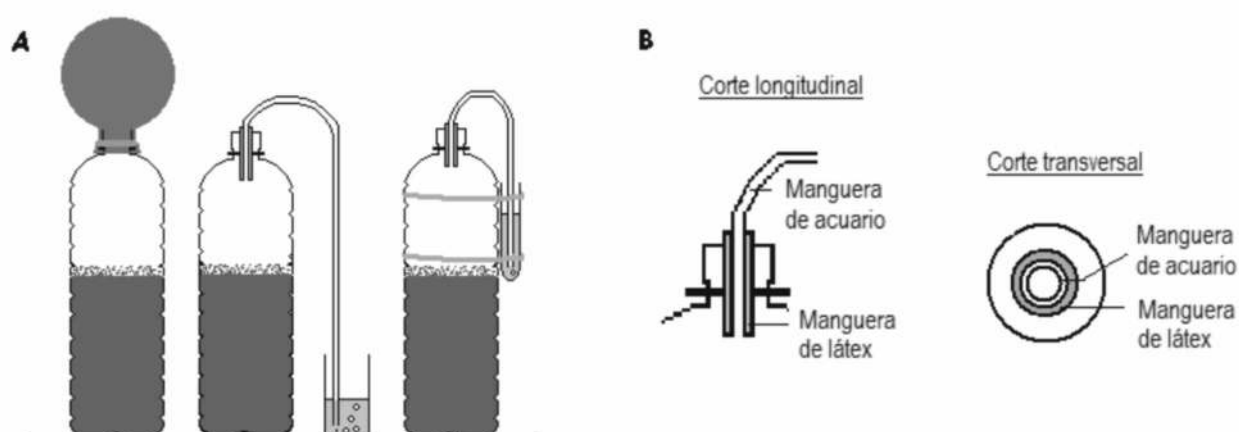
Las botellas plásticas de agua mineral son el material más práctico para construir un fermentador. Además de fáciles de obtener, las hay de diversos tamaños.

En caso de querer preparar vino de frutas, ya sea porque ese es el objetivo final o porque es una etapa en la producción de vinagres, conviene reemplazar la tapa por un globo ajustado con una gomita elástica a la boca de la botella. Pero si el objetivo es monitorear la vinificación acompañando el desarrollo de la fermentación alcohólica, habrá que sofisticar un poco el montaje y colocar una válvula de salida para el gas (Figura 4).

Figura 4: El montaje del fermentador

A = De izquierda a derecha, el montaje simple y dos versiones de montaje más elaborado.

B = Detalle del montaje elaborado, mostrando la disposición de las mangueras al pasar por la tapa.



Como se observa en la figura, el gas desprendido durante la fermentación sale por una manguera de acuario que atraviesa la tapa. Un pedazo de manguera de látex colocado entre la manguera de acuario y la tapa es suficiente para sellar el sistema. La extremidad de la manguera de acuario permanece sumergida en un

tubo de ensayo con agua de modo de permitir la salida de gas e impedir la entrada de aire. Para dar mayor estabilidad al conjunto se fija con gomitas el tubo a la botella.

Esto facilita las operaciones de pesaje y transporte. Sin embargo todo cuidado es poco, de modo que es aconsejable agarrar los fermentadores por la parte superior (tapa) cuando se los traslade de un lugar a otro. Apretar las botellas plásticas puede echar a perder el experimento, al producirse una liberación brusca de gas y refluo de líquido.

2.2.2. EL MONITOREO DE LA FERMENTACIÓN

Este tema es el objetivo de la Actividad 3 (Del mosto al vino: monitoreando la fermentación). Lo ideal es obtener datos diariamente, pero si no es posible, se recomienda disminuir la velocidad del proceso de modo de registrar medidas que representen cada una de las etapas de la fermentación. ¿Cómo? Utilizando levadura natural o disminuyendo la cantidad inicial de levadura seca.

Hay dos formas sencillas de monitorear la fermentación: midiendo el desprendimiento de CO_2 o la pérdida de masa del fermentador.

DESPRENDIMIENTO DE CO_2

En una fermentación, la cantidad de gas liberado no es constante a lo largo del tiempo; será pequeña al inicio, aumentará hasta llegar a un máximo en la fase tumultuosa y decaerá posteriormente hasta la conclusión del proceso.

La medida diaria (o en días alternados) del número de burbujas desprendidas por minuto da una buena estimación de la intensidad de la fermentación y del desarrollo del proceso (Figura 5).

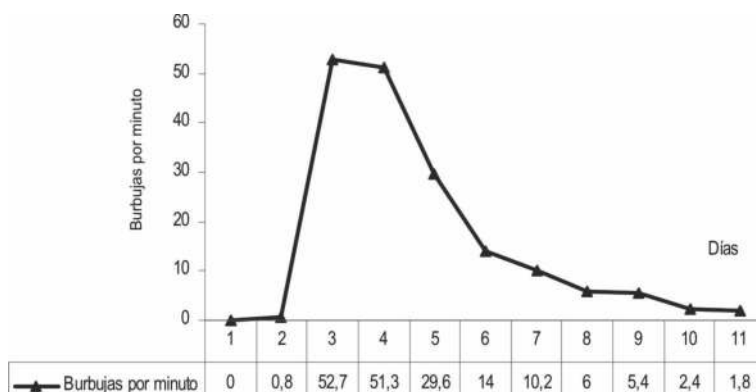
Figura 5: Detalle de un fermentador, mostrando la liberación de burbujas durante la fermentación



Cuántas mediciones? Si las burbujas son numerosas (20-60), tres a cinco mediciones de un minuto serán suficientes, pero si son pocas será preferible contar las burbujas durante 5 o 10 minutos.

Ejemplo 1: Liberación de CO_2 durante la vinificación

En un fermentador de 1500 ml de capacidad, se preparó un mosto con 750 ml de jugo de uva y 250 ml de una solución de azúcar (proporción 1:1); se lo inoculó con 9 uvas cortadas en pedacitos. Todos los días, aproximadamente a la misma hora, contamos el número de burbujas liberadas por minuto. El experimento duró 11 días durante los cuales la temperatura osciló entre 25 y 29°C.

Gráfico 1: Número de burbujas de CO₂ liberadas por minuto durante la vinificación

PÉRDIDA DE MASA

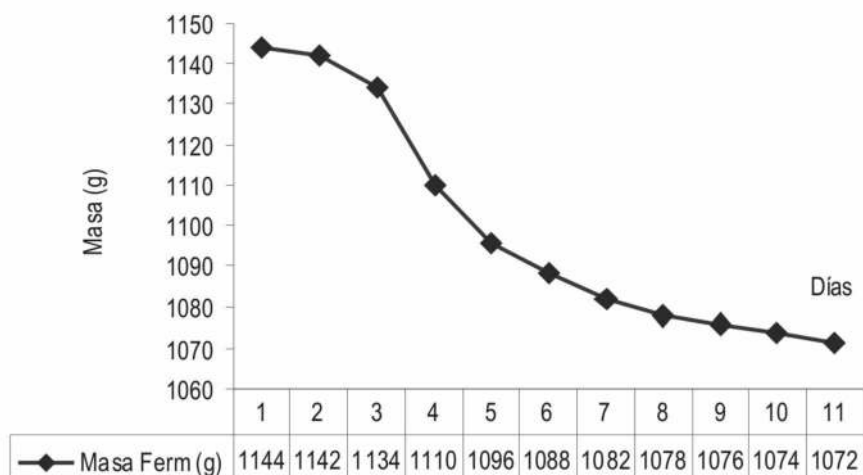
Durante la fermentación, el azúcar es transformado en alcohol y dióxido de carbono (CO₂). Con la salida del gas del fermentador se produce una disminución de la masa del mosto que sólo cesa cuando todo el azúcar es consumido en la fermentación. Pueden obtenerse dos tipos de datos:

- disminución de la masa de todo el conjunto (fermentador + anexos + mosto),
- disminución de la masa del mosto calculada a partir de la masa del "fermentador + anexos" y de la masa inicial del mosto.

La primera alternativa trae incorporado un error sistemático ya que sólo el mosto fermenta, pero es más sencilla. La segunda es más exacta pero demanda más cálculos.

Ejemplo 2: Disminución de la masa (g) durante la vinificación

Los datos fueron obtenidos con el fermentador grande del experimento anterior. Todos los días, y aproximadamente a la misma hora, pesamos los fermentadores en una balanza digital casera ($d = 2g$).

Gráfico 2: Disminución de la masa (g) del fermentador, debida a la liberación de CO₂ durante la vinificación.

Si se quiere representar la disminución de la masa (g) del mosto de ese fermentador hay que restar a cada valor 92 g, que es la masa del conjunto botella-mangueras-tubo de ensayo en este experimento. Obviamente, se obtendrá un gráfico semejante.

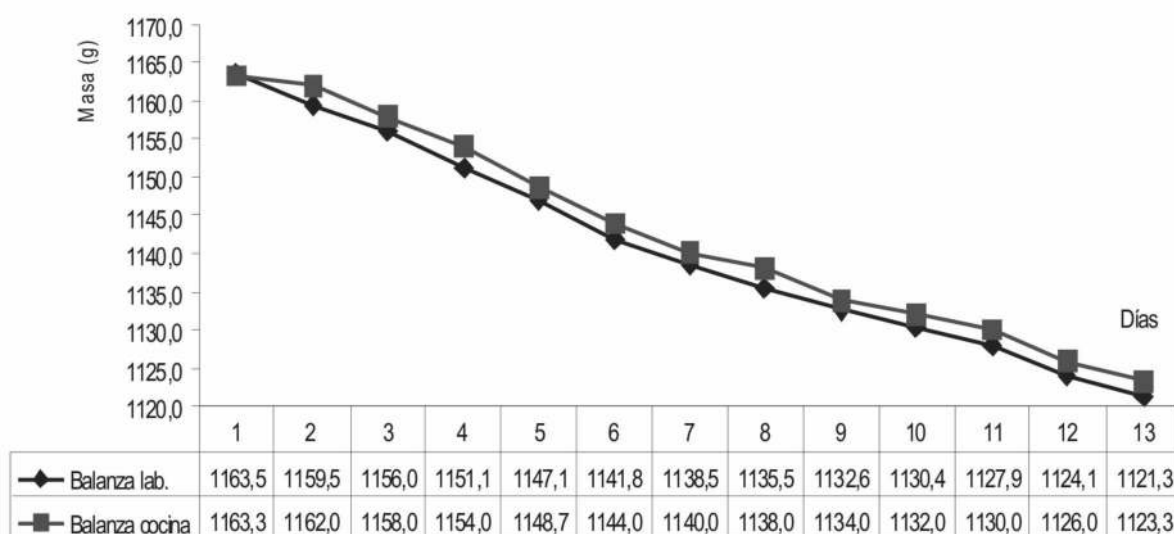
2.2.3. MASA Y BALANZAS

Es más cómodo trabajar con volúmenes superiores a 0,5 litros y medir la pérdida de masa con una balanza. Actualmente existen balanzas digitales de cocina que pesan masas de hasta 3 Kg. Son relativamente baratas y se encuentran con cierta facilidad. La que utilizamos en el ejemplo 3 fue comprada en un bazar y sólo marca diferencias de masa de 2 en 2 g.

Ejemplo 3: Comparación entre dos series de mediciones

Realizamos dos series de mediciones en el mismo experimento, una de ellas con esa balanza comercial y la otra con una balanza de laboratorio que también pesa hasta 3 Kg, pero tiene una sensibilidad mayor (0,1 g). La correlación entre ambas series de mediciones fue muy alta (0,9985).

Gráfico 3: Comparación entre dos series de mediciones realizadas con dos balanzas digitales de diferente sensibilidad.



Otros métodos de medición

Existen otros métodos físicos, químicos o electrónicos que no analizaremos aquí porque demandan una formación más avanzada, instrumentos analíticos adecuados o reactivos peligrosos. Comprenden el uso de densímetros, sondas de temperatura o pH, medidas de refracción de la luz, cuantificación de azúcar y ácidos por métodos químicos, picnometría y cuantificación de alcohol.

Se pueden encontrar algunos protocolos un poco más complejos, que requieren de un laboratorio químico equipado, en <http://www.ac-reims.fr/datice/svt/docpedagacad/lycee/sciencvie/biotechn/levures/levur1.htm>.

2.2.4. SELECCIONANDO VARIABLES

Para elaborar proyectos extendiendo las actividades anteriores vale la pena tener en cuenta algunas variables que inciden en la calidad del producto final:

- Tipo de fruta. Es probablemente la variable más divertida. Se pueden obtener vinos de frutas muy diversas, desde sandía hasta tomate, pasando por guayaba y chirimoya.
- Temperatura. Es una variable complicada, porque hay que encontrar dos lugares en la escuela que tengan entre 5 a 10°C de diferencia de temperatura, donde se puedan hacer las mediciones y dejar los fermentadores.
- Cantidad de levadura. Es una variable fácil de trabajar y los resultados son interesantes.
- Cantidad de azúcar. Una variable interesante también (Ejemplo 4). Sin embargo hay que tener un poco de cuidado, porque pensando en obtener un vino con mayor graduación alcohólica se tiende a agregar el azúcar a montones, y el azúcar en exceso inhibe la actividad metabólica de las levaduras.

Ejemplo 4: Disminución de la masa del mosto en fermentadores con diferentes cantidades de azúcar.

Se montaron tres fermentadores en los que colocamos:

Fermentador 1: 350ml de jugo de uva + 100 ml de agua

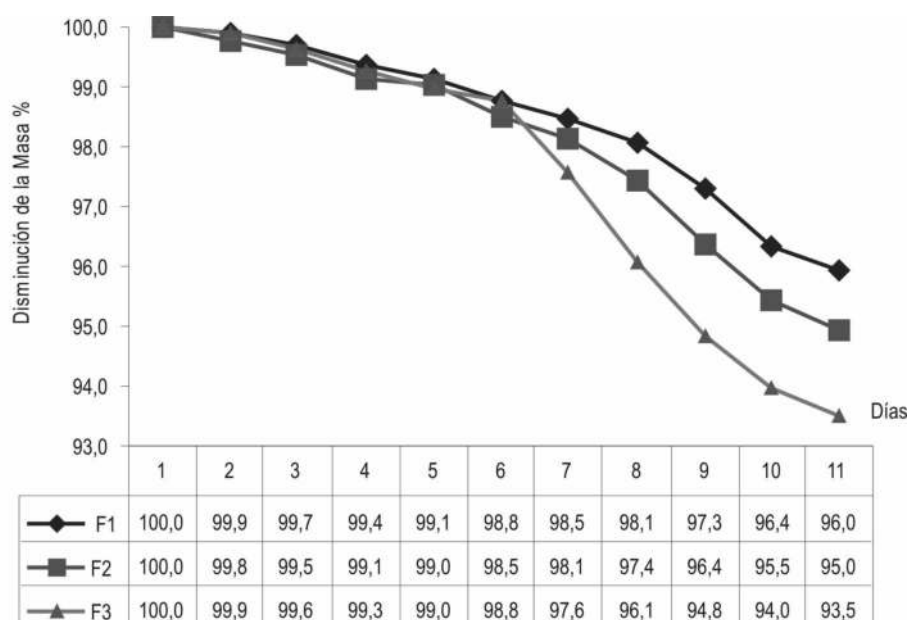
Fermentador 2: 350 ml de jugo de uva + 50 ml de solución de sacarosa + 50 ml de agua

Fermentador 3: 350 ml de jugo de uva + 100 ml de solución de sacarosa

La solución de sacarosa fue preparada mezclando 200 g de azúcar común con 200 ml de agua caliente.

Como inóculo de cada fermentador se utilizaron 6 uvas cortadas en pedacitos.

Gráfico 4: Disminución (%) de la masa del mosto en fermentadores con diferentes cantidades de azúcar.



Se elaboró el gráfico con los porcentajes porque al agregar diferentes cantidades de azúcar en cada fermentador, la masa inicial no era igual en los tres. Durante los primeros 6 días no hubo diferencias que parecieran significativas. Sin embargo, a partir del séptimo día las curvas comienzan a diferenciarse, mostrando que la cantidad de azúcar es un factor limitante en la fermentación.

2.2.5. TRATAMIENTO DE LOS DATOS

En los ejemplos anteriores acompañamos la vinificación ya sea contando el número de burbujas por minuto, o midiendo la masa del fermentador. Vimos también que para poder comparar los resultados de varios experimentos realizados simultáneamente conviene trabajar con porcentajes.

La masa inicial M_m (g) del mosto en un determinado fermentador representa el 100%. La disminución de la masa relativa a la masa inicial (100%) también es un valor interesante para visualizar.

Ejemplo 5: Transformaciones y representaciones gráficas

A partir de los datos brutos presentados en el ejemplo 2, calculamos la masa (%) y la disminución de la masa, esta última relativa a la masa inicial ($\Delta\% = 100 - M_m\%$). Los valores figuran en la tabla siguiente:

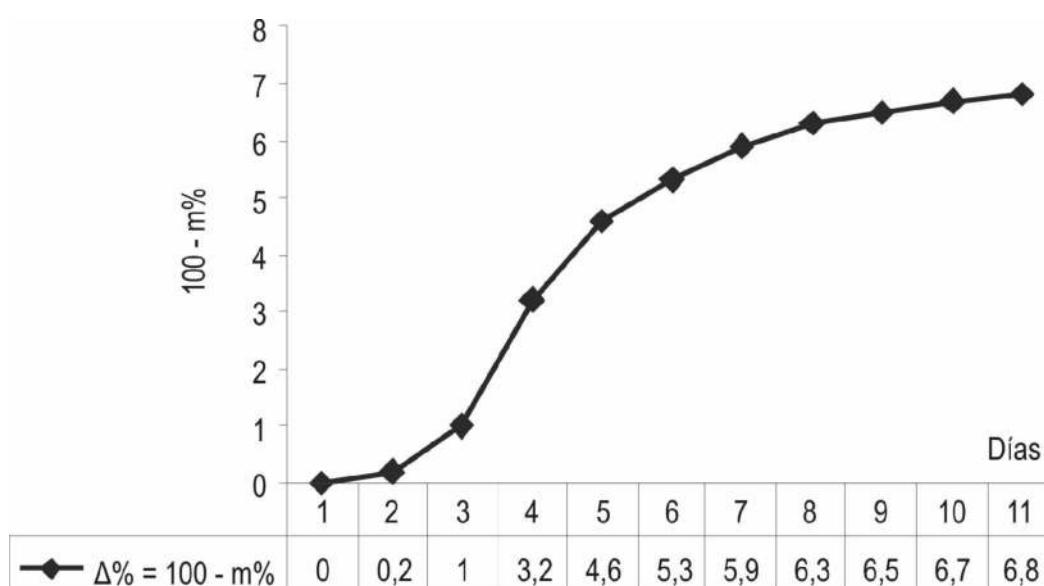
Tabla 2: Transformaciones realizadas sobre los datos brutos

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
M_{f+m} (g) = Masa del fermentador	1144	1142	1134	1110	1096	1088	1082	1078	1076	1074	1072
(*) M_m (g) = Masa del mosto	1052	1050	1042	1018	1004	996	990	986	984	982	980
$M_m(\%)$ = Masa del mosto %	100,0	99,8	99,0	96,8	95,4	94,7	94,1	93,7	93,5	93,3	93,2
$\Delta\% = 100 - M_m\%$	0,0	0,2	1,0	3,2	4,6	5,3	5,9	6,3	6,5	6,7	6,8

(*) Medida correspondiente a la masa del fermentador con la tapa, las mangueras y el tubo con agua. $M_f = 92$ g.

Masa del mosto $M_m = M_{f+m} - M_f$

Gráfico 5: Disminución de la masa del mosto ($\Delta\%$) durante la vinificación, a lo largo de 11 días.



2.3. LA INMOVILIZACIÓN, UNA TECNOLOGÍA NOVEDOSA

Las técnicas de inmovilización se aplican tanto a células como a microorganismos y enzimas. Sus principales ventajas son facilitar la separación del producto y permitir la recuperación del agente biológico. En general se utilizan con agentes biológicos difíciles de obtener o de precio elevado.

Sin embargo, recientemente también han encontrado aplicación en la producción de vinos espumantes. Después de concluidas las fermentaciones alcohólicas y malolácticas, se introduce en el vino más sacarosa y las levaduras inmovilizadas. Se desencadena dentro de la botella una segunda fermentación alcohólica que durará meses, obteniéndose una bebida burbujeante.

La técnica de inmovilización en alginato de sodio es descrita en la [Actividad 4](#) (Una tecnología nueva: la inmovilización de levaduras). El alginato de sodio es un polímero que se extrae de las algas. Debe ser puro y de buena calidad, no obtuvimos buenos resultados con el alginato de sodio vendido como espesante alimenticio, aunque tal vez sea necesario aumentar la concentración.

Se disuelve el alginato de sodio con un poco de agua caliente, y una vez frío se lo mezcla con las levaduras. Se deja caer esa mezcla, gota a gota, en una solución de cloruro de calcio. El intercambio de iones calcio (del medio) y sodio (del alginato) atrapa a las levaduras en una matriz de alginato de calcio. A pesar de tener consistencia sólida, esa matriz permite el pasaje de sustancias, de modo que los agentes biológicos conservan su actividad. Una vez acabadas las transformaciones químicas esperadas, las esferas se recuperan fácilmente (Figura 6).

Es interesante observar el movimiento vertical de las esferas de alginato de calcio durante la fermentación. Debido al CO_2 acumulado en la superficie, las esferas se tornan más livianas y suben hasta la superficie. Allí liberan el gas y descienden nuevamente. El sube y baja recuerda las pasas de uva de las gaseosas.

Ejemplo 6: Monitoreo de la fermentación alcohólica con levaduras libres e inmovilizadas.

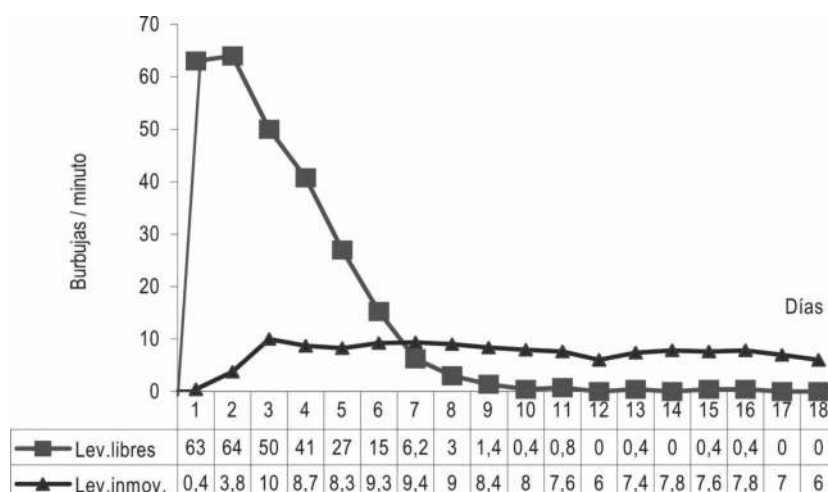
Colocamos 2 g de levaduras (libres o inmovilizadas) en 500 ml de jugo de guayaba + 100 ml de solución de azúcar 1:1. El primer día hicimos dos mediciones, con 12 horas de diferencia. Los primeros valores, que no figuran en la tabla pero sí en el gráfico, fueron:

Fermentador con levaduras libres: Masa inicial = 556 g, número de burbujas por minuto = 0

Fermentador con levaduras inmovilizadas: Masa inicial 603 g, número de burbujas por minuto = 0

Gráfico 6: Monitoreo de la fermentación, en dos fermentadores, uno con levaduras libres y otro con inmovilizadas.

A - Número de burbujas por minuto



B - Masa (%) de los fermentadores

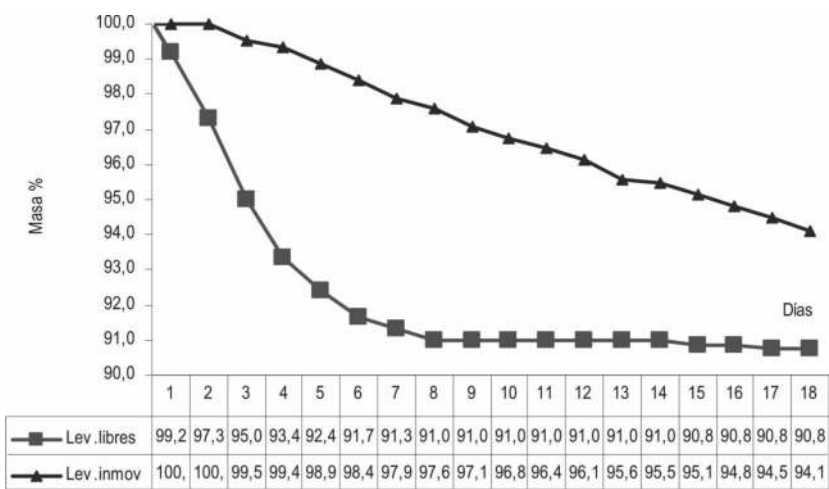
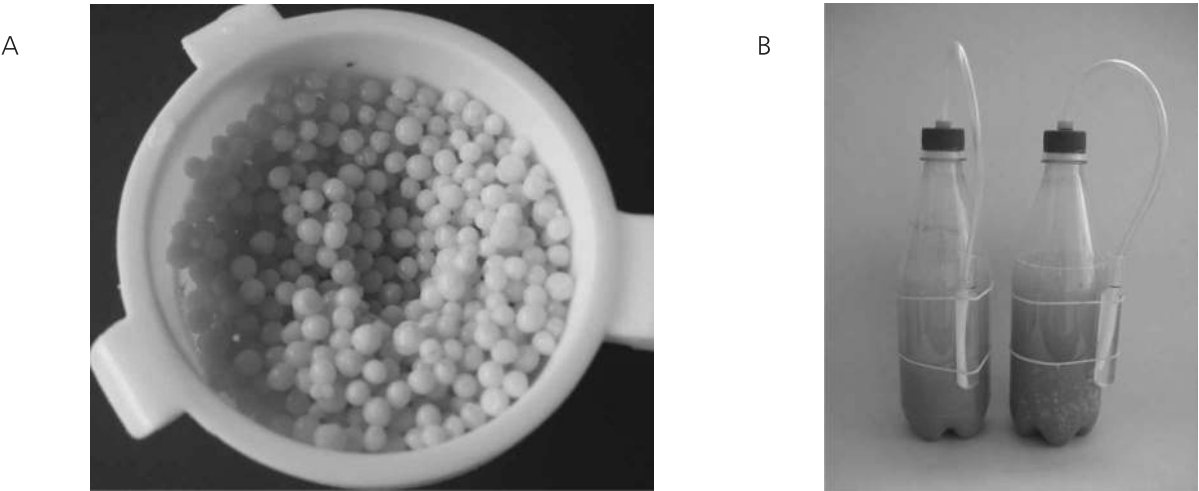


Figura 6: Preparación de vinos de frutas.

A. Levaduras inmovilizadas en un colador de 6 cm de diámetro

B. Montaje con levaduras libres (izquierda) y con levaduras inmovilizadas (derecha)



3. AGRADECIMIENTOS

A la Licenciada Tassia Torres Furtado por su entusiasta colaboración en el montaje de las actividades prácticas sobre vinos. A Roberta de Oliveira Garcia, Vítor Soares Mann y Alessandra Sor por el apoyo técnico. A los alumnos de Biotecnología del Instituto de Tecnología ORT de Río de Janeiro por su participación en este proyecto. A Hugo Malajovich por la lectura crítica del texto. A la Dra. Gabriela Levitus por la revisión del texto.

4. BIBLIOGRAFÍA

ACADEMIA DO VINHO. A história do vinho. <http://academiadovinho.com.br/biblioteca/historia.htm>

ARGENBIO. Biotecnología tradicional: la fabricación del vino. Edición nº 22, 2003
http://www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno/ec_22.asp?cuaderno=22

BIOPLANET. <http://www.bioplanet.net>

BISSON L.F. et al. The present and future of the international wine industry. *Nature* (418): 696-699, 2002.

BOSCH X. Genetic secrets of a good wine. *The Scientist* 5(1), 2004.
En <http://www.the-scientist.com/2004/5/>

CAMPBELL-PLATT G. Fermented foods: origins and applications.
En: Academic Press Encyclopedia of Food Microbiology, Online Version, 2000.
Disponible en <http://www.academicpress.com/companions/0122270703/>

CENTURY WINE <http://www.centurywine.8m.com/picture.html>

CHECKBIOTECH. <http://www.checkbiotech.org>

DÍAZ A. Biotecnología en Industrias de Alimentos. CEPAL, ONU, Buenos Aires, 2003.

FLETCHER A. Grape DNA study promises better quality wine. En
<http://www.foodqualitynews.com/news/printNewsBis.asp?id=66631>

FRUTAS A à Z <http://www.todafruta.com.br>

GACAR P. Du côté de chez Monsieur Pasteur. Paris, Editions Odile Jacob - Seuil, 1986

GIL PONCE J.V. La nueva biotecnología enológica.
En <http://www.porquebiotecnologia.com.ar/doc/documentos/pdf/la-nueva-biotec.pdf>

GRILLO TRUBBA D. Vinos: perfiles productivos. SAGYPA.
En http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r_38/cadenas/Bebidas_Vinos.htm

HASHIZUME T. Tecnologia do vinho. En Biotecnologia Industrial Vol 4, São Paulo, Editora Edgar Blucher Ltda., 2001.

HEALTH CANADA. Wines derived from the genetically modified wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* ML01.
En http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/gmf-agm/appro/nf-an107decdoc_e.html

INSTITUT PASTEUR.
<http://www.pasteur.fr/ip/easysite/go/03b-00000I-009/institut-pasteur/mus-es/actualit-s/l-oeuvre-de-pasteur>

KIU W., L. KOVACS Do we need to be concerned about genetically modified grapevine? *Vineyard and vintage view* 18(4), 2003.

LA PLANÈTE-VIN / LE PRODIGE DU VIN. <http://www.abrege.com/lpv/prodig.htm>

LAUREN HILL ACADEMY. The chemistry of wine making.
<http://www.emsb.qc.ca/laurenhill/science/wine.html>

MALAJOVICH M.A.M. Biotecnología. Bernal, Editora de la Universidad Nacional de Quilmes, 2007

MARRIS E. Winning the wine war. En <http://www.bioedonline.org/news/news.cfm?art=1655>

NATIONAL CENTRE FOR BIOTECHNOLOGY EDUCATION (NCBE)
<http://www.nvbe.reading.ac.uk/NCBE/GMFOOD/issues.html>

OFICINA REGIONAL DE LA FAO PARA AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE. Tabla de Composición de Alimentos de América Latina, disponible en <http://www.rlc.fao.org/bases/alimento/busca.asp>

RASTOIN J.L et al. Globalisation du marché international du vin et restructuration de l'offre. Recherches en économie et Sociologies rurales n°5-6 INRA Sciences Sociales, 2006

REVISTA INTERNET DE VITICULTURA E ENOLOGIA <http://www.infowine.com/default.asp>

SASSON A. Food and Nutrition Biotechnology: achievements, prospects and perceptions. UNU-IAS Report, 2005. Disponible en <http://www.ias.unu.edu>

SENBA Tablas de Composición de los alimentos http://www.senba.es/recursos/tablas_comp_alim.htm

THE WINEMAKING HOME PAGE <http://winemaking.jackkeller.net/recipes.asp>

UC DAVIS VITICULTURE & ENOLOGY HOMEWINEMAKING Making table wine at home. En <http://wineserver.ucdavis.edu/WineGrape/Homewine/index.htm>

USDA Agricultural Research Service. Nutrient Data Laboratory
<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>

WALKER G.M. Microbiology of wine-making En: Academic Press Encyclopedia of Food Microbiology, Online Version, 2000. Disponible en <http://www.academicpress.com/companions/0122270703/>

WINE INFORMATION SITE. <http://wwwcenturywine.8m.com/index.hym>

WINE INTERNATIONAL <http://www.wineint.com/>

5. ACTIVIDADES PRÁCTICAS

GUÍAS DEL ALUMNO



5. ACTIVIDADES PRÁCTICAS - GUÍAS DEL ALUMNO

Todos los protocolos son versátiles y pueden ser aplicados a criterio y conveniencia del docente. La Actividad 1 (Una bebida diferente) y la Actividad 2 (Del mosto al vino: las etapas fundamentales) son aparentemente equivalentes pero difieren en el nivel de conocimientos exigido, de manera que la elección de una u otra dependerá de la edad de los alumnos. La Actividad 3 (Del mosto al vino: monitoreando la fermentación) permite un tratamiento elaborado de los datos, que incluye tablas y gráficos. La Actividad 4 (Una tecnología nueva: la inmovilización de levaduras) no tiene mayores dificultades pero exige algunos reactivos. Pudiendo desarrollarla, habrá que pensar en comparar la actividad fermentativa de las levaduras, libres e inmovilizadas, utilizando como base el protocolo de la Actividad 3.





A1. UNA BEBIDA DIFERENTE

La fermentación alcohólica es la base de conocimiento sobre la cual se apoya la industria de bebidas como el vino o la cerveza. En esta actividad, vamos a utilizar la fermentación para preparar una bebida gaseosa con un poco de alcohol. Cada equipo diseñará y elaborará su propio producto, a partir de una formulación básica. Todos los productos serán evaluados posteriormente.

MATERIAL

PRIMERA ETAPA - REALIZACIÓN DEL PROYECTO. Por equipo: 1 botella plástica, 1 embudo, 1 gomita elástica, 1 globo, 1 cuchara plástica, 0,5 l de agua tibia, 50 g de azúcar, una pizca de levadura seca instantánea, otros ingredientes de acuerdo con el proyecto.

SEGUNDA ETAPA - EVALUACIÓN DE LOS PRODUCTOS. Para todos los equipos: muestras de cada bebida en vasitos plásticos rotulados convenientemente, por lo menos un cuenta-gotas.

PROCEDIMIENTO

ETAPA PREVIA - PLANIFICACIÓN

Cada equipo anotará los ingredientes (tipo, cantidad) que utilizará para preparar la bebida.

Materia prima	0,5 l de agua tibia	50 g de _ _ _ _ _
Agente biológico	1 pizca de levadura seca instantánea	
Otros		

PRIMERA ETAPA - REALIZACIÓN DEL PROYECTO



SEGUNDA ETAPA – EVALUACIÓN DE LOS PRODUCTOS

1 El juez evalúa las bebidas (aspecto, olor, color, sabor) dándoles un puntaje...  Excelente = 5 Muy bueno = 4 Regular = 3 Malo = 2 Muy malo = 1	2 ...y anotando los valores en la Tabla Juez _____ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="padding: 5px;">Bebida</th> <th style="padding: 5px;">Aspecto</th> <th style="padding: 5px;">Olor</th> <th style="padding: 5px;">Color</th> <th style="padding: 5px;">Sabor</th> <th style="padding: 5px;">Media</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 5px;">1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">2</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">3</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">4</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Bebida	Aspecto	Olor	Color	Sabor	Media	1						2						3						4					
Bebida	Aspecto	Olor	Color	Sabor	Media																										
1																															
2																															
3																															
4																															

DISCUSIÓN

Después de promediar las notas de todos los jueces,

1. ¿Cuál es la composición de la bebida que recibió la nota más alta?
2. ¿Cuál es la composición de la bebida que recibió la nota más baja?
3. ¿A qué conclusión se puede llegar comparando la composición de las dos bebidas?



A2. DEL MOSTO AL VINO: las etapas fundamentales

Llamamos “vino” a la bebida obtenida por fermentación alcohólica de la uva. La transformación de la uva en vino es una tecnología compleja de la cual reproduciremos solo algunas etapas: preparación del mosto, fermentación y tratamiento final.

MATERIAL

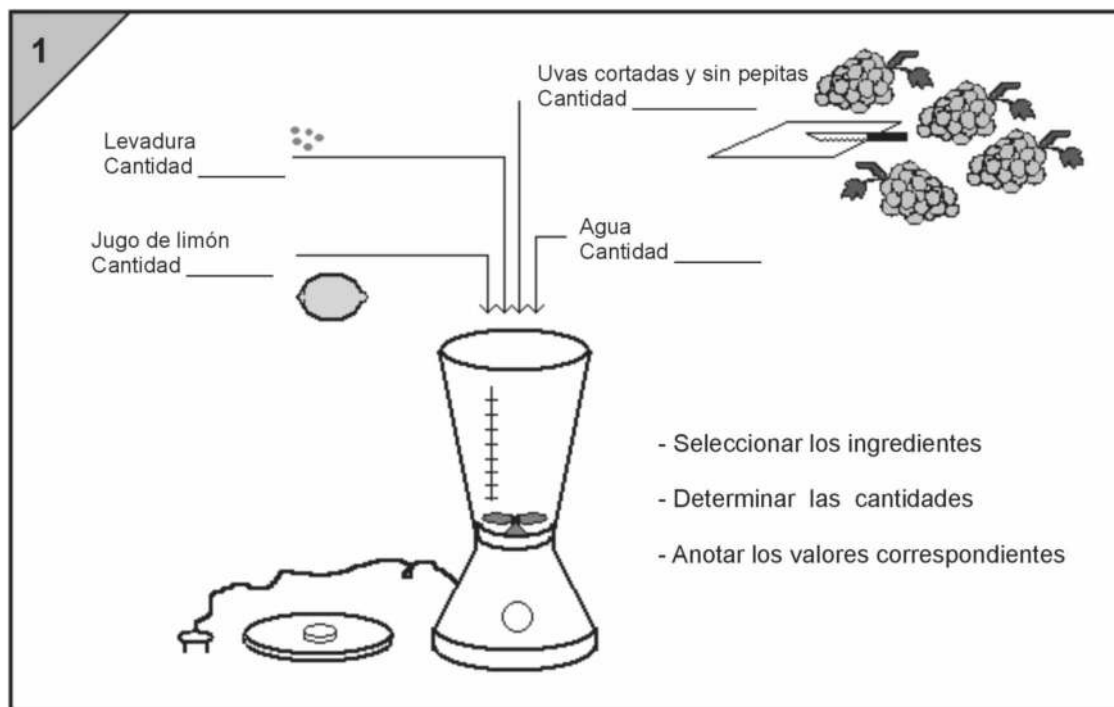
ETAPA 1 - PREPARACIÓN DEL MOSTO: Licuadora o bolsa plástica y gomita, 1 cuchillo, 1 azulejo, uvas, jarabe de azúcar (proporción 1:1), jugo de limón, levadura seca instantánea (no es indispensable).

ETAPA 2 - FERMENTACIÓN: 1 botella de plástico, 1 gomita elástica, 1 globo

ETAPA 3 - TRATAMIENTO FINAL: botellas plásticas, embudo, tela de algodón, 1 m de manguera de látex

PROCEDIMIENTO

ETAPA 1 - PREPARACIÓN DEL MOSTO



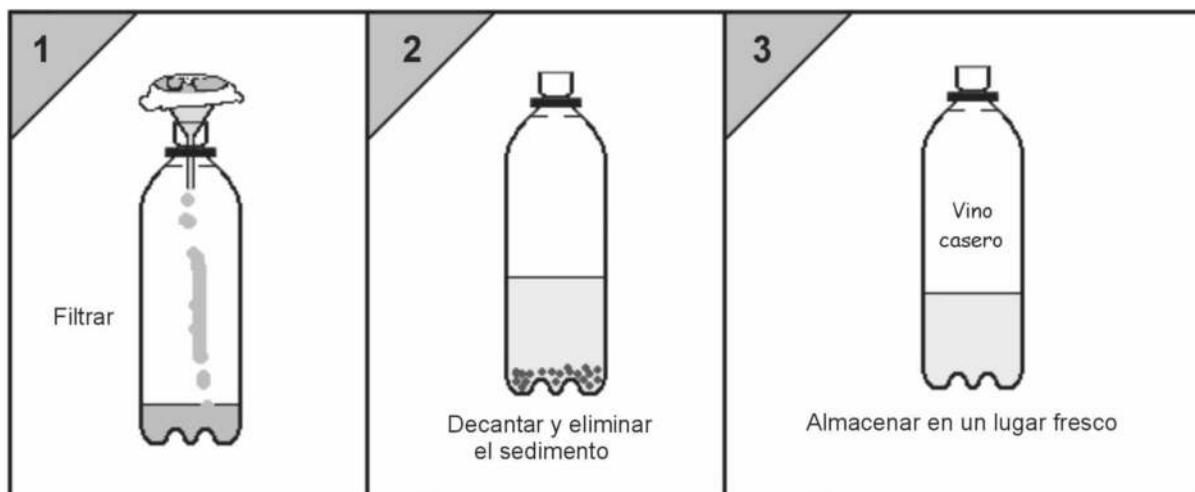
ETAPA 2 – FERMENTACIÓN

El mosto es colocado en una botella plástica.

Se reemplaza la tapa por un globo, ajustado con una gomita. ¿Por qué?

La fermentación dura entre 1 semana y 10 días.

ETAPA 3 – TRATAMIENTO FINAL



RESULTADOS

1. Completar la siguiente tabla.

Tabla: Evaluación del producto final de la vinificación

Apariencia	Olor	Color	Sabor	Nota Final

Escala: excelente (5), muy bueno (4), regular (3), malo (2) y muy malo (1).

2. Redactar un comentario breve sobre el producto obtenido.

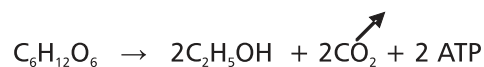
DISCUSIÓN

1. Discutir los siguientes aspectos técnicos:
2. La inoculación del mosto con levadura seca es dispensable, ¿por qué?
3. ¿Por qué se agrega azúcar al mosto? ¿Y jugo de limón?
4. ¿Cómo se puede eliminar el sedimento que queda después de la decantación?
5. Investigar cómo se pasteuriza el vino.
6. Elaborar un proyecto para preparar "vino" a partir de otra fruta diferente a la uva.



A3. DEL MOSTO AL VINO: monitoreando la fermentación

La fermentación alcohólica se desarrolla según la ecuación



En un fermentador que no permite la entrada de gases pero sí la salida de CO_2 , el proceso fermentativo puede ser monitoreado:

- Directamente, midiendo el número de burbujas de CO_2 liberadas por unidad de tiempo.
- Indirectamente, acompañando la disminución de la masa del mosto debido a la formación y liberación de CO_2 .

En esta actividad montaremos un fermentador, prepararemos el mosto y acompañaremos la marcha de la fermentación a lo largo de varios días.

MATERIAL

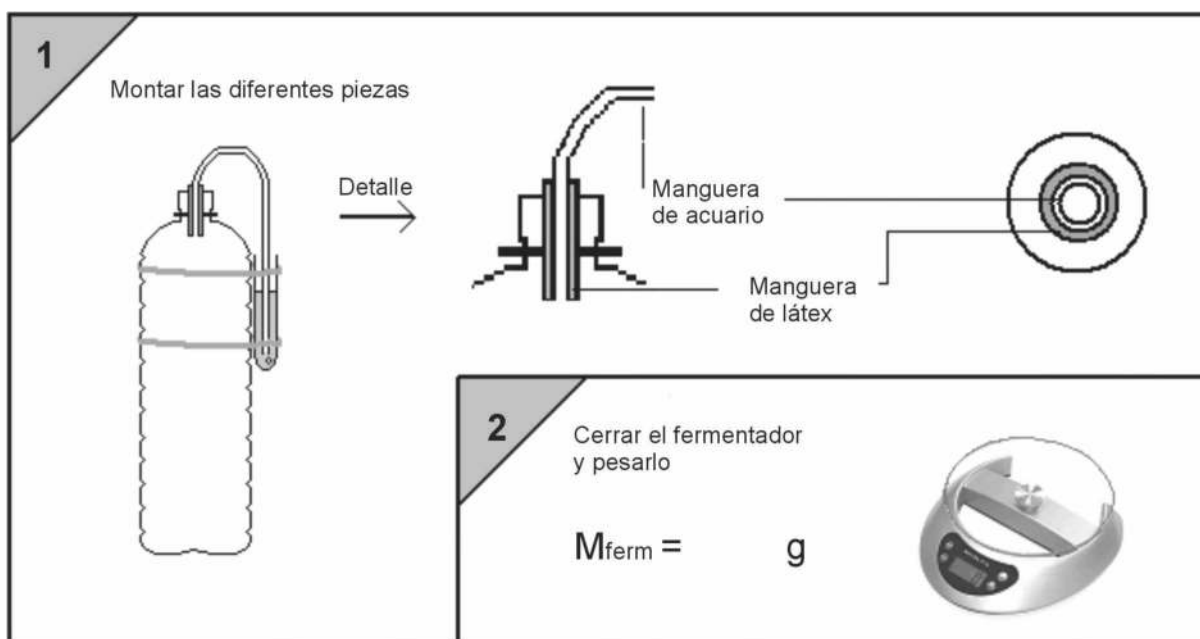
PRIMERA ETAPA - MONTAJE DEL FERMENTADOR. Para cada grupo: Botella plástica, tapa agujereada en el centro, 25 cm de manguera de acuario, 4 cm de manguera de látex, 1 tubo de ensayo o recipiente, gomitas elásticas

SEGUNDA ETAPA - PUESTA EN MARCHA DE LA FERMENTACIÓN. Para cada grupo: Jugo de fruta pasteurizado, levadura seca instantánea, jarabe de azúcar (proporción 1:1), jugo de limón, balanza.

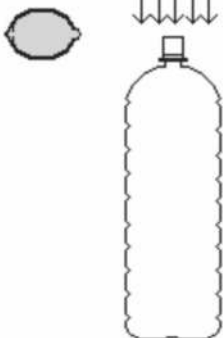
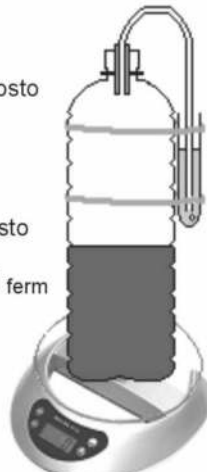
TERCERA ETAPA - MONITOREO DE LA FERMENTACIÓN. Para todos: Cronómetro, balanza

PROCEDIMIENTO

PRIMERA ETAPA – MONTAJE DEL FERMENTADOR



SEGUNDA ETAPA - PUESTA EN MARCHA DE LA FERMENTACIÓN

1 Preparar el mosto Levadura Cantidad _____ Jugo de limón Cantidad _____  Jugo de frutas Cantidad _____ Agua Cantidad _____ Jarabe (1:1) Cantidad _____ 	2 Puesta en marcha - Colocar el mosto en el fermentador - Cerrar el fermentador - Pesar el fermentador con el mosto $M_{\text{ferm} + \text{mosto}} = \text{_____ g}$ - Calcular la masa inicial del mosto $M_{\text{mosto}} = M_{\text{ferm} + \text{mosto}} - M_{\text{ferm}}$ $M_{\text{mosto}} = \text{_____ g}$ - Se inicia la fermentación 
--	--

TERCERA ETAPA – MONITOREO DE LA FERMENTACIÓN

- Medir periódicamente el número de burbujas liberadas en un determinado tiempo y la masa del fermentador.
- Anotar cuidadosamente los datos y cómo fueron obtenidos (tiempos, repeticiones de cada medida).

CUARTA ETAPA – ANÁLISIS DE LOS DATOS

Número de burbujas / minuto

- Preparar una tabla con los datos y representarlos gráficamente en función del tiempo.
- Interpretar el gráfico obtenido.

Masa del fermentador

Preparar una tabla con los datos, incluyendo las siguientes columnas:

Día	M _{ferm + mosto}	M _{mosto} = M _{ferm + mosto} – M _{ferm}	*M _{mosto} (%)

- (*) El valor porcentual de la masa del mosto se calcula en relación a la masa inicial del mosto, que representa el 100%.
- Representar gráficamente M_{mosto} % en función del tiempo. Interpretar el gráfico obtenido.

DISCUSIÓN

1. Comparar los gráficos obtenidos en las dos series de mediciones.
2. Investigar otros métodos de monitorear la fermentación destacando sus ventajas y desventajas.



A4. UNA TECNOLOGÍA NUEVA: la inmovilización de levaduras

En muchos procesos biotecnológicos es necesario que, al finalizar las transformaciones químicas previstas y antes de purificar el producto, se separe el agente biológico.

En varios procedimientos industriales modernos se utilizan técnicas para inmovilizar el agente biológico en una matriz que facilite no sólo su remoción sino también su re-utilización. En esta actividad emplearemos una de ellas: la inclusión en esferas de alginato de calcio.

MATERIAL

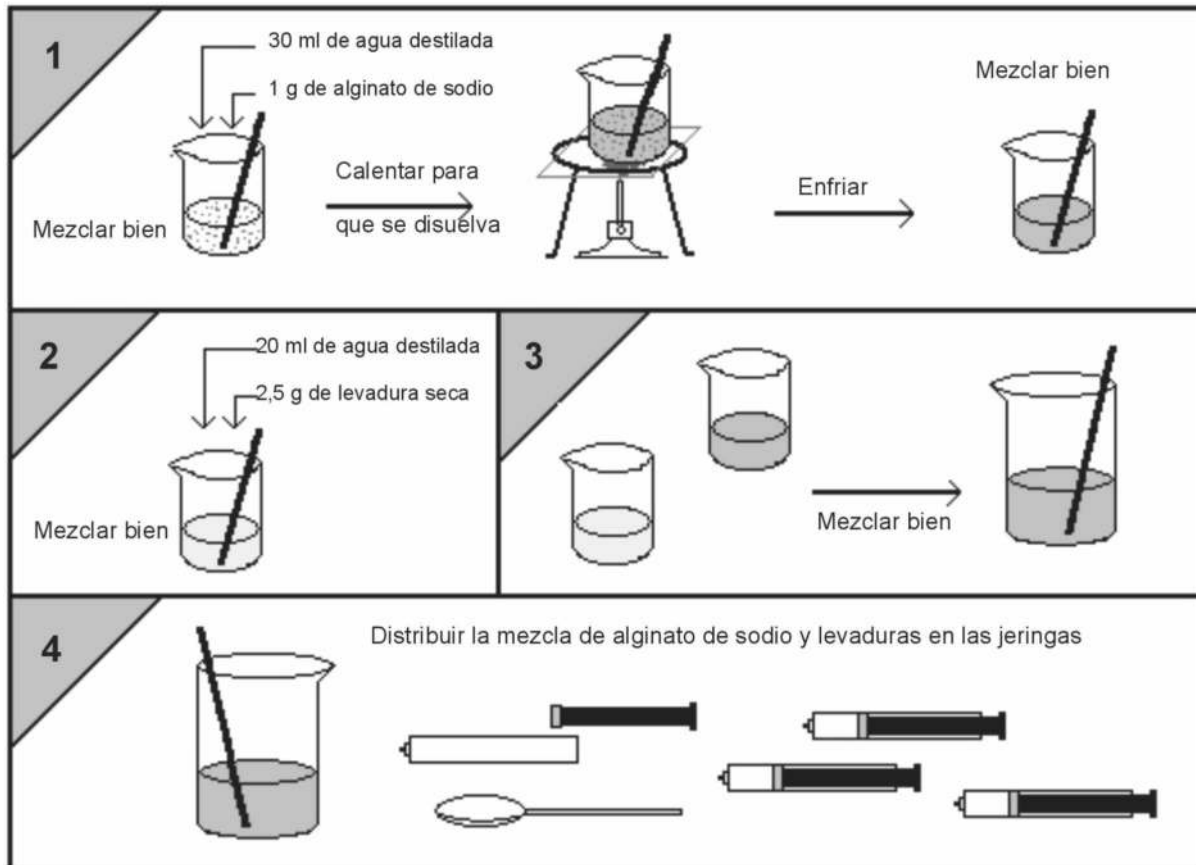
PRIMERA ETAPA - PREPARACIÓN DE LA MEZCLA ALGINATO DE SODIO-LEVADURAS. Para 5 grupos: balanza, mechero, trípode y tela, 3 vasos de precipitado de 100 ml, 1 probeta de 50 ml, 1 espátula, 5 jeringas de 10 ml (sin agujas), 2,5 g de levadura seca, 1 g de alginato de sodio, agua destilada, 1 cuchara plástica.

SEGUNDA ETAPA - INMOVILIZACIÓN. Para cada grupo: una jeringa con mezcla de alginato de sodio y levaduras, 1 vaso con 100 ml de solución de cloruro de calcio al 2%

TERCERA ETAPA - PRIMERA UTILIZACIÓN DE LAS LEVADURAS INMOVILIZADAS. Para todos: 1 colador, un fermentador con mosto

PROCEDIMIENTO

PRIMERA ETAPA - PREPARACIÓN DE LA MEZCLA ALGINATO DE SODIO-LEVADURAS

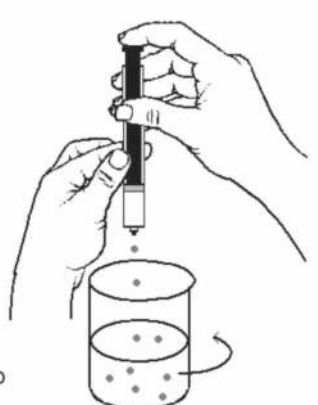


SEGUNDA ETAPA: INMOVILIZACIÓN (cada grupo por separado, a continuación de la etapa anterior)

5

Dejar caer, gota a gota, la mezcla de alginato de sodio y levaduras en la solución de cloruro de calcio (2%)

Agitar suavemente el líquido durante el procedimiento



Conservar las esferas de alginato de calcio con levaduras inmovilizadas en la solución de cloruro de calcio (2%), en la heladera.

Aguardar por lo menos 24 horas antes de proceder a la primera fermentación

TERCERA ETAPA: UTILIZACIÓN DE LAS LEVADURAS INMOVILIZADAS

1 Separar las esferas con un colador...  ... y lavarlas con agua destilada	2 Colocarlas en el mosto para iniciar la fermentación 	3 Terminada la fermentación, colar las esferas y lavarlas con agua destilada. Conservarlas en una solución de cloruro de calcio al 2%, en la heladera.
--	---	--

DISCUSIÓN

1. Explicar químicamente qué ocurrió al dejar caer las gotas de la mezcla de alginato de sodio y levaduras en la solución de cloruro de calcio.
2. Durante la fermentación se observa que las esferas de alginato se desplazan verticalmente. ¿Por qué?

INVESTIGAR

- ¿Qué otras formas de inmovilización se utilizan en procesos biotecnológicos?
- ¿Cuáles son las principales aplicaciones de la tecnología de inmovilización de agentes biológicos?



Segunda Parte

VINAGRES

VINAGRES

1.1 EL VINAGRE

El vinagre (del francés, vin aigre) se origina por fermentación espontánea del vino de uvas y de la cerveza. Por eso no es sorprendente que fuera conocido en Egipto y Mesopotamia. Los griegos y los romanos lo utilizaban para sazonar alimentos y se protegían de los miasmas (gérmenes) bebiendo agua avinagrada.

En la Edad Media es tan valorizado como las especias. En 1394 se crea en Orléans (Francia) una corporación que monopoliza la fabricación y comercialización del vinagre.

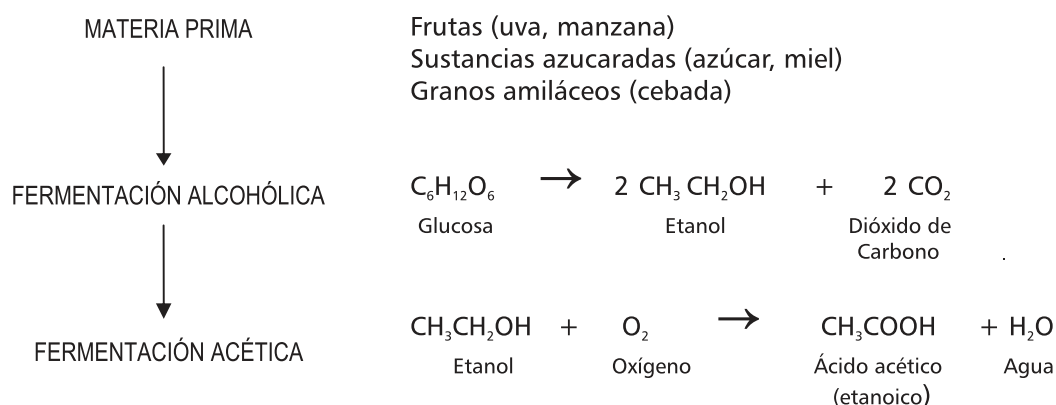
En 1832 Schuetzenbach introduce en Alemania modificaciones técnicas que aceleran la acetificación. Sin embargo, el paso de la producción artesanal a la era industrial sólo se inicia con los trabajos de Pasteur sobre la fermentación acética en la segunda mitad del siglo XIX. Estos culminan con la publicación de sus "Etudes sur le vinaigre" (1868) que explican científicamente el proceso de fabricación del vinagre y orientan a los productores sobre cómo obtener una calidad constante.

Actualmente, el método francés y el método alemán coexisten con otros métodos tecnológicamente más avanzados (Frings) de alta productividad.

1.2 LA ACETIFICACIÓN

El vinagre es una bebida que contiene ácido acético en una concentración de 5-6%. Se obtiene como resultado de una fermentación alcohólica seguida por una fermentación acética durante la cual el etanol es oxidado a ácido acético por un agente biológico, en una reacción exotérmica.

Las principales etapas que llevan a la formación de ácido acético se indican en el siguiente esquema:



Aunque durante mucho tiempo se pensó que el agente biológico era un hongo al que se denominó *Mycoderma aceti*, hoy se sabe que la acetificación se debe a diversas especies de bacterias del género *Acetobacter*. En la fabricación de vinagre no se trabaja con cepas puras porque las propias condiciones del proceso (etanol, acidez alta) seleccionan las cepas más productivas. Por lo tanto, no hay necesidad de mantener condiciones asépticas.

Las condiciones básicas necesarias para llevar a cabo la acetificación son: materia prima de buena calidad, aireación, temperatura entre 25 y 30° C, concentración de alcohol y acidez adecuadas, penumbra y vigilancia de eventuales contaminaciones. No son muy complicadas.

El oxígeno es un factor limitante en la producción de vinagre. Los métodos de fabricación se distinguen entre sí por la solución técnica encontrada para asegurar el suministro de oxígeno para la acetificación. De ella dependen el rendimiento y la productividad.

El envejecimiento del vinagre, a través de numerosas reacciones de esterificación, mejora notablemente las propiedades organolépticas (brillo, olor, color, sabor). Actualmente algunos vinagres de excelente calidad tienen denominación de origen. Son ellos los vinagres de Jerez y del condado de Huelva (España) además del *aceto balsámico* o vinagre de Módena (Italia). Este último llega a pasar 12 años en una serie de toneles de maderas diferentes.

1.3. TRADICIÓN Y MODERNIDAD

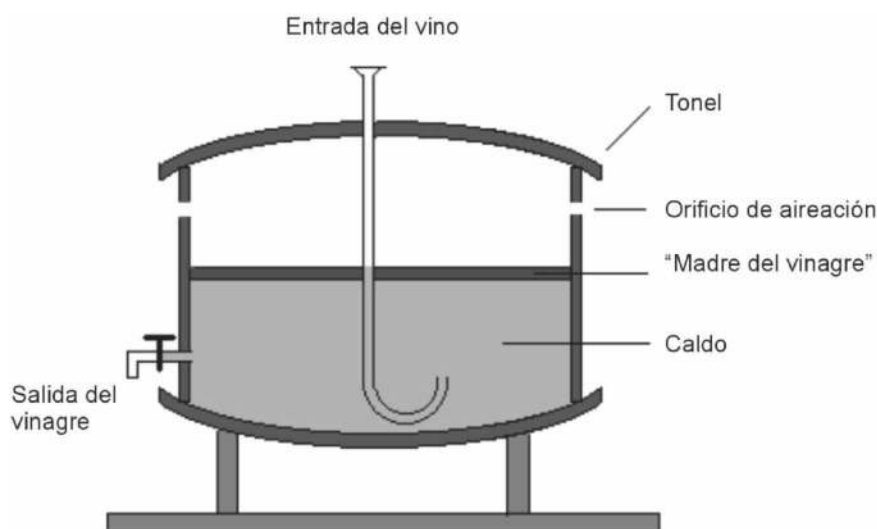
Todos los métodos de fabricación de vinagre pueden realizarse de manera discontinua o semicontinua. En el primer caso, al alcanzar las características de acidez deseadas se retira todo el vinagre producido y se comienza de nuevo. En el segundo, alcanzada una cierta acidez se retira parte del producto y se agrega una cantidad equivalente de materia prima.

1.3.1. PROCESO DE FABRICACIÓN LENTO, FRANCÉS O DE ORLÉANS

Es el método más antiguo. En un barril de roble de unos 200 litros se coloca vino hasta ocupar las tres cuartas partes de su capacidad. En la superficie, es decir en contacto simultáneo con el aire y el vino, se forma la "madre del vinagre", una película gelatinosa de *Acetobacter*. Un soporte cuadrículado de madera le impide hundirse en el líquido (Figura 1).

La acetificación ocurre en la superficie con aireación natural. El proceso es lento, exige espacio y tiene una productividad muy baja. Sin embargo, proporciona los mejores vinagres.

Figura 1: El método lento de producción de vinagre



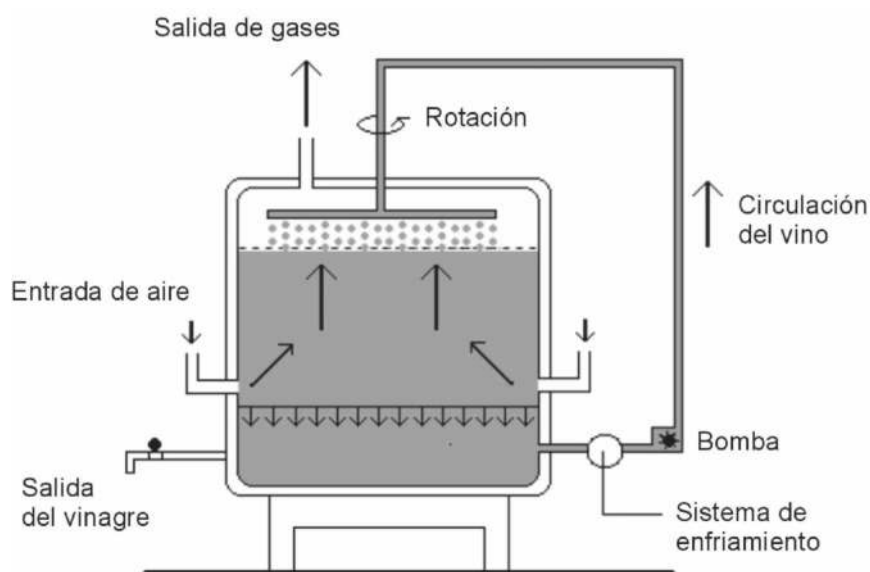
1.3.2. PROCESO DE FABRICACIÓN RÁPIDO, SCHUETZENBACH O ALEMÁN

El generador o fermentador es un recipiente de 100 a 100.000 litros de capacidad, relleno con virutas de madera u otro material que tenga una superficie de contacto grande y sobre el cual se fijan las bacterias acéticas.

El vino circula repetidas veces en el generador mientras se inyecta aire en sentido contrario. El calor no se disipa tan fácilmente como en el método tradicional y es necesario un método de enfriamiento, estableciendo un gradiente de temperatura que impulsa la circulación del aire (Figura 2).

La productividad es mayor pero la calidad del vinagre es inferior a la del obtenido con el método lento.

Figura 2: El método rápido de producción de vinagre



1.3.3. PROCESOS DE FABRICACIÓN CON CULTIVOS SUMERGIDOS

A partir de 1950 se desarrollaron sistemas de producción en enormes cubas de acero inoxidable donde las bacterias están sumergidas en una mezcla hidroalcohólica. Son acetificadores que cuentan con modernos controles de temperatura, agitación y oxigenación. Diseñados y patentados por la empresa alemana Heinrich Frings, estos generadores son llamados "Acetators" y pueden ser encontrados en más de 50 países. A partir de 100 litros de alcohol absoluto pueden producir 920 a 960 litros de vinagre con 10% de acidez en turnos de 24 horas. Por consiguiente también son utilizados en la producción de ácido acético para otras finalidades.

1.4. USOS DEL VINAGRE

El vinagre cumple un papel importante en la culinaria como condimento, conservante y modificador de la textura de los alimentos. También se lo utiliza como agente de limpieza, desodorizante, quitamanchas, mordiente, solvente, cosmético, antiséptico con poder germicida, insecticida y espermicida.

Hay pocos datos actualizados sobre el mercado mundial de vinagre. Sin embargo parece haber concordancia en que el mercado de vinagres de calidad tiende a aumentar.

2. ACTIVIDADES PRÁCTICAS - GUÍA DEL DOCENTE

2.1. LOS PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS EN LA ENSEÑANZA

Es difícil encontrar un tema tan rico como este para la enseñanza de la Biotecnología. A diferencia de la fermentación alcohólica o de la fermentación láctica, la fermentación acética ocurre en aerobiosis. Las bacterias acéticas crecen en condiciones tan estrictas de acidez y nutrientes (etanol) que hay pocos riesgos de contaminación.

Por otro lado, la producción de vinagre es interesante no sólo desde el punto de vista microbiológico o ecológico, ya que permite simular condiciones industriales, abre la posibilidad de elaborar proyectos, construir fermentadores y discutir tópicos como rendimiento, productividad y, eventualmente, costos. Es una manera de introducir estos aspectos de la Biotecnología Industrial en la enseñanza de la disciplina.

Elaborado en condiciones adecuadas, el vinagre adquiere olor, color y sabor característicos. Su acidez elevada le confiere propiedades antisépticas, siendo utilizado como condimento sin peligro para la salud del consumidor.

La tecnología de vinos es de una complejidad extraordinaria, de modo que no todas las fantasías se cumplen y los vinos de frutas suelen ser bastante malos. Sin embargo, los vinagres pueden resultar excepcionales. Es cierto que la industria genera productos más baratos pero son de calidad inferior a los que se puede llegar a obtener con las técnicas de este fascículo.

Sólo hay que tener la precaución, en el momento de planificar las actividades, de asegurarse una buena cantidad de vinagre con bacterias acéticas vivas y alta concentración de ácido acético ("vinagre fuerte"). Por lo demás, sólo se necesita un ambiente en penumbra, una temperatura preferentemente entre 25-28°C, limpieza y mucha paciencia.

El inicio es lento, pero vale la pena. El esfuerzo compensa y los resultados pueden ser extraordinarios, además de creativos. Vale la pena probar.

2.2. INICIANDO LA PRODUCCIÓN DE VINAGRES

Los vinagres se pueden elaborar a partir de vinos comerciales económicos y honestos, pero no malos. Los vinos tintos suelen dar mejores resultados que los blancos. También se pueden elaborar a partir de vinos de diversas frutas, como se indica en la [Actividad 1](#) (¿Cómo preparar vinagre artesanalmente?). La manzana, la ciruela y el caqui suelen dar muy buenos vinagres.

Dependiendo de la materia prima elegida, el producto obtenido será denominado vinagre de manzana o vinagre de ciruela, por ejemplo, en contraposición a un vinagre de vino tinto o vinagre de vino blanco. Si el vinagre se elabora a partir de una mezcla de vino tinto y vino de banana, se lo llamará vinagre de vino tinto con aroma a banana.

2.2.1. EL MONITOREO DE LA ACETIFICACIÓN COMO PRE-REQUISITO

2.2.1.1. PROCEDIMIENTO

La concentración de ácido acético presente en el vinagre puede ser estimada periódicamente por titulación ácido-base (volumetría), con fenolftaleína como indicador.

En los laboratorios de Química se usan para la titulación pipetas, buretas y soluciones estándar. Estos materiales no son frecuentes en los laboratorios escolares, de modo que simplificamos el procedimiento como se describe en la [Actividad 2](#) (¿Cómo medir la acidez del vinagre?).

Además de utilizar una solución de NaOH sin estandarizar, reemplazamos las pipetas por jeringas de 1 ml, las buretas por jeringas de 10 ml y los frascos Erlenmeyer por vasos plásticos de café. Cada grupo de alumnos recibe su

material, haciéndose responsable por la limpieza y conservación del mismo. Las jeringas no llevan aguja; al terminar el trabajo se limpian y guardan desarmadas.

Usamos una única solución de NaOH (0,66%) para acompañar la evolución de la acidez a lo largo de todo el trabajo. Aunque las medidas resulten menos exactas que cuando se trabaja con soluciones estándar, el método es económico y sencillo. También resulta repetible (un operador obtiene resultados muy parecidos o idénticos cuando titula la misma muestra varias veces) y reproducible (dos operadores obtienen resultados muy parecidos o idénticos titulando la misma muestra).

Se adiciona una gota del indicador fenolftaleína a un volumen conocido de vinagre ($V = 1 \text{ ml}$). A seguir se agrega muy lentamente al vinagre una solución de hidróxido de sodio (NaOH) de concentración $C_{\text{NaOH}} = 0,66\%$. Llegará un momento en que todo el ácido acético (CH_3COOH) del vinagre habrá sido neutralizado por el NaOH de la solución. Ese momento se identifica fácilmente. Al agregar una gota más de la solución de NaOH se produce una variación brusca del pH; el indicador se vuelve rosa y así permanece. El cambio es visible aún cuando se trabaje con vinagres de vino tinto, porque se trata de un rosa fucsia muy característico.

El volumen V' de la solución de NaOH que se necesitó para llegar al punto de equivalencia es igual a la concentración de ácido acético en la muestra de vinagre. Por ejemplo, si gastamos 4 ml de una solución de NaOH 0,66% para llegar al punto de equivalencia, quiere decir que la concentración de ácido acético en el vinagre es de 4%.

2.2.1.2. ¿POR QUÉ $C_{\text{NaOH}} = 0,66\%$?

En el punto de equivalencia, el número de moles de NaOH es igual al número de moles de CH_3COOH . Sabiendo que la masa de 1 mol de CH_3COOH es de 60 g y que la de 1 mol de NaOH es de 40 g, podemos calcular el número de moles de cada sustancia:

$$\text{Número de moles de } \text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow V_{\text{CH}_3\text{COOH}} \times \text{Concentración } \text{CH}_3\text{COOH} / 60$$

$$\text{Número de moles de NaOH} \rightarrow V_{\text{NaOH}} \times \text{Concentración NaOH} / 40$$

Al ser ambos valores iguales, escribimos que $V_{\text{CH}_3\text{COOH}} \times C_{\text{CH}_3\text{COOH}} / 60 = V_{\text{NaOH}} \times C_{\text{NaOH}} / 40$

Como $V_{\text{CH}_3\text{COOH}} = 1 \text{ ml}$, entonces $C_{\text{CH}_3\text{COOH}} / 60 = V_{\text{NaOH}} \times C_{\text{NaOH}} / 40$

$$C_{\text{CH}_3\text{COOH}} \times 0,66 = V_{\text{NaOH}} \times C_{\text{NaOH}}$$

Si el valor de C_{NaOH} es de 0,66%, entonces $C_{\text{CH}_3\text{COOH}} = V_{\text{NaOH}}$

Por consiguiente, basta leer el volumen V_{NaOH} necesario para neutralizar el ácido acético para determinar el valor de $C_{\text{CH}_3\text{COOH}} \%$.

2.2.1.3. LA ELABORACIÓN DE LOS DATOS

En la Actividad 2 se pide que cada medición sea repetida tres veces, para considerar la media

$$\text{Media} = \bar{x} = \frac{1}{3} (x_1 + x_2 + x_3)$$

Dependiendo del nivel de los alumnos se puede profundizar un poco más y ampliar el análisis de los datos con medidas de dispersión como la varianza o el desvío estándar.

$$\text{Varianza} = s^2 = \frac{1}{n-1} [(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2 + (x_3 - \bar{x})^2]$$

$$\text{Desvío estándar} = s = \sqrt{s^2}$$

Un parámetro interesante es el:

$$\text{Coeficiente de variación } C\% = 100 (s / \bar{x})$$

Si el valor del coeficiente de variación es inferior a 10%, los resultados son considerados muy buenos. Si el valor está entre 11% y 20%, buenos; y si está entre 21% y 30%, regulares.

2.2.1.4. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES

Solución de hidróxido de sodio 0,66%

Pesar 6,6 g de hidróxido de sodio (seco) y disolverlos en agua hasta completar 1 litro. Conviene preparar de antemano una buena cantidad de solución de hidróxido de sodio, porque como es higroscópico, habrá variaciones entre una solución y otra preparada en otro momento.

Solución de fenolftaleína

Disolver 1 g de fenolftaleína en 50 ml de etanol y agregar 50 ml de agua. Es preferible, aunque no indispensable, utilizar agua destilada. Si se tiene un buen inóculo de vino tinto y se quiere obtener un vinagre de vino de color blanco se puede intentar un tratamiento con carbón activado (1 g en 50 ml de vino). La otra posibilidad es ir "aclarando" paulatinamente el vinagre de vino tinto agregándole vino blanco.

2.2.2. OBTENCIÓN DEL INÓCULO

En la producción de vinagre no se utilizan especies puras sino mezclas de diferentes variedades o especies del género *Acetobacter*. El primer objetivo del docente es obtener el inóculo en cantidad adecuada, procedimiento descrito en la [Actividad 3](#) (¿Cómo iniciar la producción de vinagre?). Hay tres modos de lograrlo:

- La primera es a partir de una botella de vino con la mitad de su contenido. Se la deja mal cerrada y al cabo de un tiempo el vino se habrá transformado en vinagre. Demora pero funciona.
- La segunda es conseguir el inóculo con algún colega o un productor de vinagre. Se trata de un poco de vinagre fuerte sin pasteurizar en el cual puede haber algún fragmento gelatinoso de madre del vinagre. Se prepara el caldo mezclando en una botella cantidades iguales de vino y vinagre fuerte y se aguarda el crecimiento de una capa o película gelatinosa en la superficie del líquido (caldo).
- La tercera es más elaborada. Se trata de recurrir a los conocimientos biológicos sobre sucesión ecológica y flora microbiana en la superficie de la uva. A medida que la fruta madura, las levaduras fermentan transformando el azúcar de la fruta en alcohol. Este es el sustrato que utilizan las bacterias acéticas para obtener energía y mantener su actividad metabólica.

Hay que separar algunas uvas muy maduras, de esas que nadie come y van quedando en el racimo. Pero cuidado, aunque estén un poco "pasadas" no debe haber crecimiento visible de hongos. Se las coloca en un

recipiente que contenga un caldo compuesto por iguales cantidades de vinagre comercial y vino tinto, blanco o de frutas. Se cierra dejando bastante aire pero impidiendo la entrada de moscas. Al cabo de algunas semanas se observará en la superficie la capa gelatinosa de la “madre del vinagre”.

Independientemente del camino elegido, a partir del momento en que aparece la “madre del vinagre” se amplifica lentamente el cultivo, agregándole vino y monitoreando la acidez como se indica en la [Actividad 3](#).

2.3. EL PROCESO LENTO DE PRODUCCIÓN DE VINAGRES

2.3.1. MONTAJE DEL FERMENTADOR

Cualquier recipiente de plástico o vidrio puede servir. El fermentador debe estar cerrado para evitar la entrada de moscas, de modo que para que el vinagre permanezca en contacto con el aire el recipiente tendrá que tener una capacidad bastante mayor que el volumen máximo de vinagre. El oxígeno es un factor limitante de la fermentación acética.

Trabajamos con cajas de diverso tamaño, vasos de 500 ml y botellas de agua mineral o gaseosa, todos de plástico. Para impedir la entrada de moscas cerramos los recipientes con tela de algodón, tul muy espeso o película de PVC ajustada con gomitas o piolín. Si bien esta última deja pasar el aire no hay que llenar mucho el recipiente, porque a veces la aireación es insuficiente y se produce vacío.

Otra solución es agujerear la caja o la tapa y cubrir el agujero con gasa y cinta adhesiva, o con una curita grande. Así se impide la entrada de moscas dejando pasar el aire.

Los intentos de colocar canillas no dieron buen resultado, ya sea porque no conseguimos sellar bien la unión caja- canilla, o porque se formaron tapones de masa viscosa donde están retenidas las bacterias (zooglea).

2.3.2. EL FERMENTADOR EN FUNCIONAMIENTO

2.3.2.1. COMPOSICIÓN INICIAL DEL CALDO

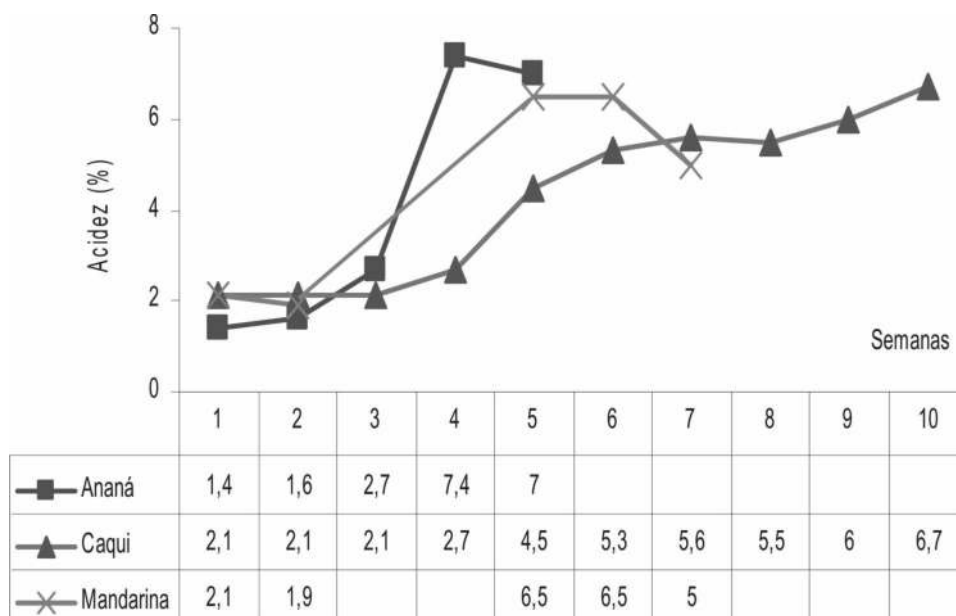
El caldo incluye vino y vinagre con bacterias vivas (“vinagre fuerte”). En el caso de tener muy poco “vinagre fuerte” se puede complementar con un poco de vinagre comercial. Las proporciones de vino-vinagre-“vinagre fuerte” en el caldo inicial pueden modificarse en función de los tenores de alcohol y ácido acético respectivos y de la cantidad de inóculo disponible.

Pero independientemente del volumen existente, el caldo debe tener 5-8% de tenor alcohólico y 2-3% de acidez. Concentraciones más altas de etanol resultan tóxicas para una flora bacteriana cuando aún no está adaptada al medio, y concentraciones bajas de acidez favorecen las contaminaciones. No siempre es fácil mantener esta regla con los vinos de frutas, y a veces no salen bien.

Ejemplo 1: Monitoreo de la acetificación de algunos vinos de frutas

A pesar del grado de acidez inicial ser bajo, en esta oportunidad conseguimos algunos vinagres interesantes, como el de ananá y el de caqui. Obviamente, no siempre se tiene éxito.

Gráfico 1: Monitoreo de la acidez durante la acetificación de algunos vinos de frutas (ananá, caqui, mandarina).



2.3.2.2. LA MADRE DEL VINAGRE

Al cabo de un tiempo, que puede traducirse en días o semanas, aparece en la superficie del caldo la madre del vinagre, una película translúcida que crece hasta convertirse en una espesa capa gelatinosa.

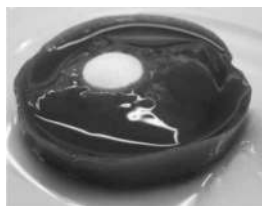
La madre del vinagre está formada por un polímero de celulosa que mantiene las bacterias simultáneamente en contacto con el aire y con el alcohol. Desde el punto de vista microbiológico la "madre del vinagre" es un biofilm, y tradicionalmente se la denomina zooglea (Figura 3). A medida que pasa el tiempo la madre del vinagre se espesa cada vez más hasta hundirse en el líquido, de donde hay que retirarla para que no se descomponga, dando al vinagre olor y sabor desagradables. Al poco tiempo se forma una capa nueva en la superficie.

Figura 3: La "madre del vinagre" (zooglea)

A: vista lateral del caldo y la zooglea; B: zooglea presa en la balsa; C y D: la zooglea ya liberada de la balsa aparece como una masa gelatinosa.



A



B



C



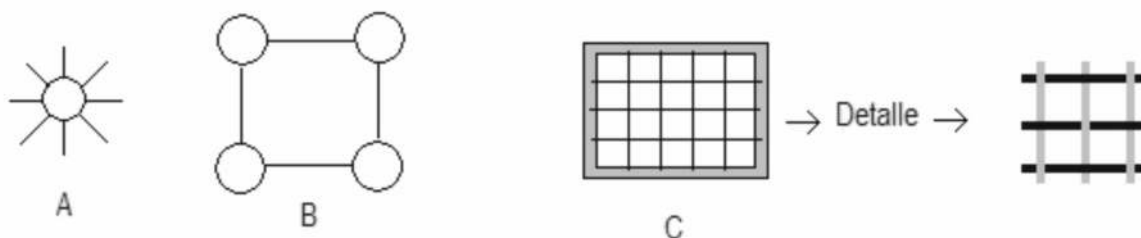
D

El problema anterior puede evitarse con una jangada o balsa de sustentación en la superficie del líquido. Una de las formas más simples de confeccionarla es con media bolita de telgopor y escarbadiantes. También puede hacerse un cuadro de telgopor y armar una red con hilo de nylon (Figura 4).

Figura 4: Formas simples de construir una balsa

A y B: Balsas hechas con bolitas de telgopor cortadas por la mitad y escarbadiantes.

C: Balsa hecha con un marco de telgopor e hilo de nylon grueso; trama entrecruzada.



2.3.2.3. REALIZANDO LA FERMENTACIÓN

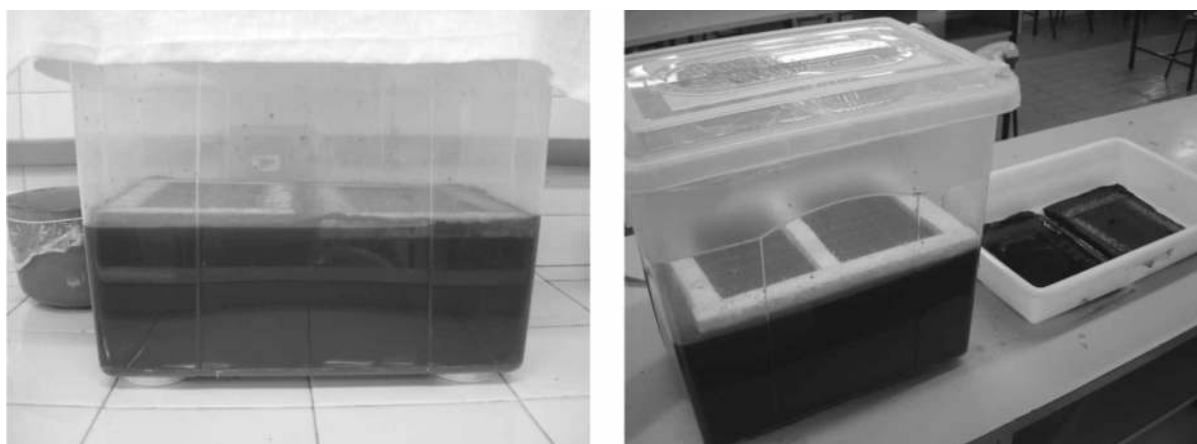
La puesta en marcha del proceso lento está descrita en la [Actividad 4](#) (Producir vinagre – Proceso lento). La cantidad de vino inicial depende de la cantidad de “vinagre fuerte” disponible. Se acompaña semanalmente el proceso hasta observar la estabilización de la acidez, cuando todo o casi todo el etanol ha sido transformado en ácido acético.

En ese momento surgen varias posibilidades:

- Sólo se agrega vino, porque el objetivo es el aumento de la producción.
- El vinagre formado en el fermentador es procesado, embotellado y pasteurizado. Este procedimiento representa un proceso por cargas.
- Se retira parte del vinagre (no más del 10%) del fermentador y se agrega una cantidad equivalente de vino. Se mantiene así el volumen de la producción, representando un proceso de producción semicontinuo. Llega un momento en que la zooglea es demasiado espesa y hay que retirarla (Figura 5)

Figura 5: El proceso lento de producción de vinagre

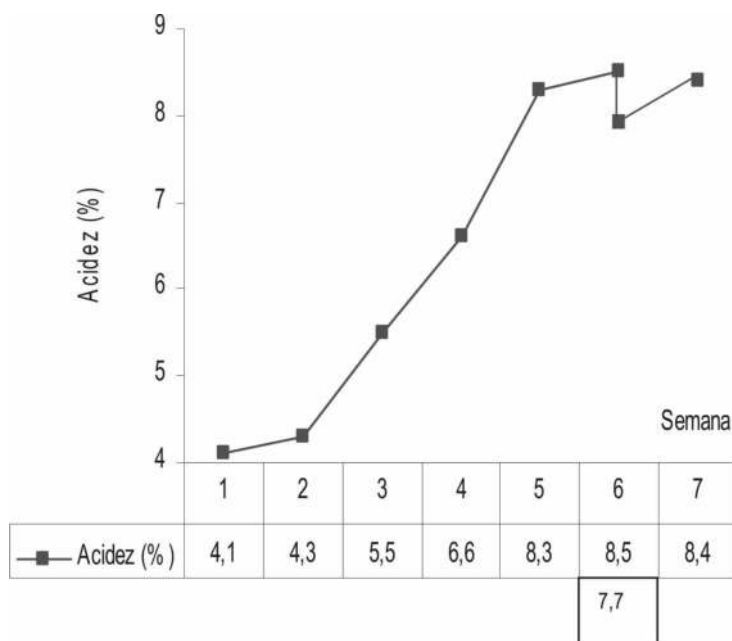
A la izquierda se muestra el fermentador con una balsa doble, a la derecha, el mismo fermentador después de retirada la balsa y colocada una nueva.



Ejemplo 2: Monitoreo de la acetificación en un fermentador (proceso lento)

Colocamos en el fermentador 1 litro de “vinagre fuerte” y 1 litro de vino a 10,7°GL, es decir con 10,7 ml de etanol en 100 ml de vino. Medimos semanalmente la acidez; los valores que figuran en la sexta semana fueron medidos antes y después de retirar 250 ml de vinagre y colocar 250 ml de vino. Ese momento marca la entrada del fermentador en ritmo de producción.

Gráfico 2: Acidez del vinagre a lo largo de la acetificación (proceso lento)



2.3.2.4. PROBLEMAS POSIBLES

A veces, la acidez de los vinagres de frutas no aumenta por falta de etanol. Hay algunas soluciones muy poco ortodoxas. La primera consiste en agregar algunos mililitros de vodka para aumentarla lentamente en 1 a 2%. Cuidado con exagerar porque el vodka tiene algo así como 38 a 40° GL de etanol y mucho etanol puede resultar tóxico para las bacterias acéticas. La segunda es congelar el vinagre, con lo que se separan dos fases, una sólida arriba y otra líquida abajo. Esta tiene una concentración de ácido acético bastante mayor, pero el inconveniente es que se reduce mucho el volumen disponible.

Otro problema surge cuando después de llegar a un valor máximo y estabilizarse, la acidez comienza a disminuir. Se explica porque al desaparecer el etanol del medio, algunas bacterias acéticas (*Gluconobacter*) pasaron a utilizar el ácido acético como nutriente. Se resuelve procesando rápidamente el vinagre o agregando más vino.

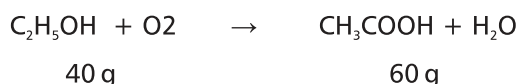
El exceso de nutrientes y poca acidez favorecen el crecimiento de *Acetobacter xylinum*, una especie que produce el polímero de la “madre del vinagre” en grandes cantidades. Este puede llegar a tapar los conductos del fermentador rápido.

También puede haber crecimiento de la población de bacterias lácticas, que dan al vinagre un olor extraño bastante desagradable. No tiene arreglo; se tira todo a la basura y se empieza de nuevo.

2.3.3. PRODUCCIÓN, RENDIMIENTO Y PRODUCTIVIDAD

El proceso lento permite obtener vinagres de acidez elevada (8-10%). La ventaja es que si se retiran semanalmente 200 ml de vinagre con 10% de acidez, después de diluido convenientemente se obtendrán 400 ml de vinagre con 5% de acidez. Podemos decir entonces que la producción de ese fermentador es de 400 ml por semana.

El rendimiento esperado de la fermentación acética puede ser calculado a partir de la relación estequiométrica según la cual 40 g de etanol pueden ser transformados en 60 g de ácido acético, o sea que 1 g de etanol genera 1,304g de ácido acético.



Industrialmente, se considera aceptable la transformación de 1 g de etanol en 1 g de ácido acético. Esto corresponde a un rendimiento de 76,7%, valor que expresa el porcentaje entre el ácido acético formado y el ácido acético que podría haberse formado.

En la práctica el rendimiento R se calcula mediante la fórmula

$$R = 100 (A_f - A_i) / E_i \times 1,304 \quad (1)$$

en que A_i = Acidez inicial % (v/v), A_f = Acidez final % (v/v), E_i = Etanol inicial % (v/v)

Ejemplo 3: Cómo calcular el rendimiento.

Colocamos en un fermentador 750 ml de vino y 750 ml de una mezcla de vinagre y vinagre fuerte. Medimos la acidez en la vinagrera encontrando un valor de 3%. Si el tenor alcohólico del vino era de 12°GL podemos decir que introdujimos $12 \times 750 / 100 = 90$ ml de etanol. Dado que la masa específica del etanol es de 0,78 g/ml, ese volumen corresponde a 70,2 g de etanol.

Siendo el volumen total del fermentador igual a 1500 ml, calculamos el etanol % (m/v) inicial según la fórmula

$$E_i \% = 70,2\text{g} \times 100 \text{ ml} / 1500 \text{ ml}$$

$$E_i \% = 4,7\%$$

Cinco semanas después, al medir nuevamente la acidez, encontramos el valor $A_f = 7\%$

Calculamos el rendimiento, aplicando la fórmula (1)

$$R = 100 (7 - 3) / 4,7 \times 1,304$$

$$R = 65,3\%$$

Ejemplo 4: Cómo calcular la productividad

La productividad se expresa como la cantidad de ácido acético formado, en gramos / litro x hora

En el ejemplo anterior, la diferencia entre A_f y A_i es de 4%, es decir que se formaron 4 g de ácido acético en 100ml de caldo. Considerando el volumen total de caldo, la cantidad de ácido acético formado es de $4\text{g} \times 1500 \text{ ml} / 100\text{ml} = 60$ que corresponden a una producción de $60 \text{ g} / 1,5 \text{ l} = 40 \text{ g/l}$

Por consiguiente, la productividad del fermentador a lo largo de 5 semanas (o sea 840 horas) fue de 0,0476 g/l.h

2.4. EL PROCESO RÁPIDO DE PRODUCCIÓN DE VINAGRES

2.4.1. MONTAJE DEL FERMENTADOR

El desafío está en construir un fermentador que permita simular las condiciones características del proceso rápido de producción de vinagre. La única condición indispensable es tener un volumen razonable de “vinagre fuerte”.

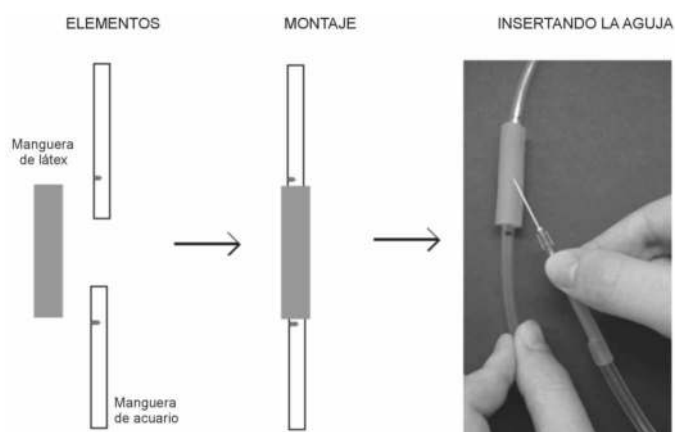
Montamos un sistema simple en que el vino circula repetidas veces sobre un soporte en el cual están fijadas las bacterias acéticas. En la literatura encontramos referencias a diversos materiales: telgopor, bagazo de caña de azúcar, de uva o de manzana, cerámica, piedras, etc. Sin embargo, no llegamos a hacer las pruebas correspondientes. Utilizamos virutas de madera previamente lavadas y hervidas, no sólo por razones higiénicas sino también para eliminar el olor y sabor correspondientes.

Las virutas se sumergen en una mezcla de vinagre fuerte y vino. La proporción ideal es de por lo menos 3:1, pero si no se tiene tanto vinagre fuerte se reemplaza una parte del vinagre fuerte por vinagre comercial. Después de 2 a 4 semanas se observa una película fina y brillante sobre la madera, revelando que las bacterias se han fijado al soporte. Es el momento de comenzar a armar el fermentador como se describe en la [Actividad 5](#) (¿Cómo construir un fermentador?).

Las botellas pueden variar, claro, pero hay que evitar las que tienen dibujos o relieves porque quedan agujeros por donde entran las moscas. Una bomba de acuario inyecta aire en la manguera que conecta la parte inferior a la parte superior del fermentador. Además de asegurar el suministro de oxígeno, el aire inyectado impulsa el líquido desde la parte inferior hasta la parte superior del fermentador.

La conexión para inyectar aire es algo delicada. La cabeza de la aguja encaja en la manguera de acuario que viene de la bomba. Para facilitar la tarea se puede recortar la cabeza de la aguja y ablandar la manguera con la llama de un fósforo, o utilizar un pedacito de manguera de látex para hacer la conexión. La punta de la aguja se inserta en el pedazo de manguera de látex (Figura 6).

Figura 6: Montaje de un sistema para impulsar el líquido por inyección de aire.



Hay dos problemas frecuentes. El primero surge cuando se deja la bomba de acuario a una altura menor que el nivel del líquido en la parte inferior del fermentador. En caso de corte de energía, el líquido entra en la bomba, inutilizándola. El segundo es el reflujo de aire hacia el fermentador, porque el líquido deja de circular y la falta de nutrientes resulta perjudicial para las bacterias acéticas que están en el compartimiento superior.

El reflujo se evita dejando un pedazo de manguera bastante largo entre la salida del fermentador y la aguja de inyección. Pero cuando ocurre hay que reestablecer rápidamente la circulación. Una manera simple de hacerlo es apretar la manguera de látex antes del lugar donde se insertó la aguja, esperar que el líquido llegue hasta allí y soltar.

2.4.2. EL FERMENTADOR EN FUNCIONAMIENTO

Es indispensable verificar con agua el funcionamiento del fermentador y tener una buena cantidad de virutas inoculadas antes de lanzarse a la Actividad 6 (Producción de vinagre – Proceso Rápido).

Se desmonta el fermentador para colocar las virutas inoculadas en el compartimiento superior y el caldo (vinagre fuerte y vino en proporción 3:1) en el compartimiento inferior. Se monta nuevamente el fermentador, se inserta la aguja y se acciona la bomba de acuario. El líquido comienza a circular rápidamente.

Después de 48 a 72 horas el fermentador empieza a empañarse como consecuencia del aumento de la temperatura en el interior. Es una buena señal que revela la actividad bacteriana, ya que la acetificación es una reacción exotérmica. Se agrega un poco de vino (si fuera necesario después de retirar algo de vinagre) y se acompaña la fermentación, titulando el ácido acético cada dos días.

Al estabilizarse la acidez en el fermentador, se extrae parte del vinagre y se agrega igual cantidad de vino. No tiene sentido dar aquí valores porque las cantidades varían con el tamaño del fermentador. Pero hay que estar alertas para que la acidez no llegue nunca a valores inferiores a 4%.

El fermentador pasa a funcionar como un sistema semicontinuo (Figura 7). La producción es mucho mayor que con el proceso lento aunque el vinagre sea de menor calidad. La productividad llega a ser hasta 10 veces mayor.

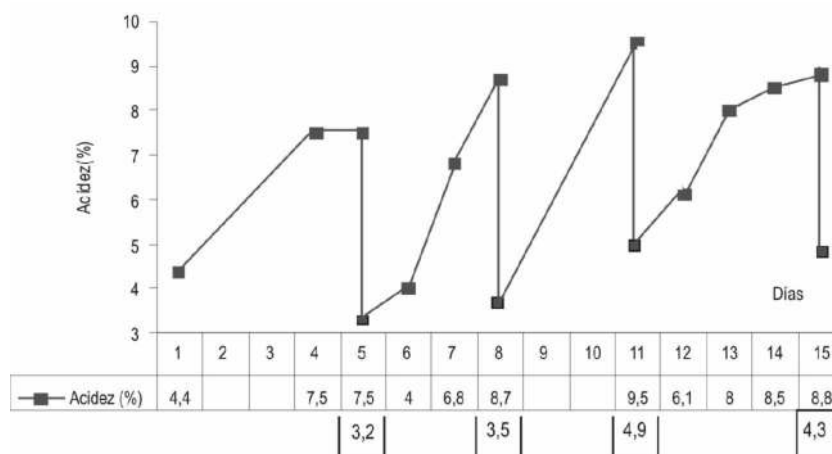
Figura 7: Proceso rápido de producción de vinagres. Se observa el fermentador en funcionamiento y al lado recipientes en los que se desarrolla el proceso lento.



Ejemplo 5: Monitoreo de la acetificación (proceso rápido)

Al retirar vinagre y agregar vino, la acidez cae. Los dos valores de acidez registrados en los días 5, 8, 11 y 15 corresponden a las medidas tomadas antes y después de retirar 500 ml de vinagre y colocar 500 ml de vino.

Gráfico 5: Acidez del vinagre a lo largo de la acetificación (proceso rápido)



2.4.3. PASAJE A UN SISTEMA CONTINUO DE PRODUCCIÓN

Es posible transformar el fermentador anterior de manera de obtener un sistema continuo de producción. El vino gotea lentamente siendo la velocidad regulada por un dispositivo como el de las bolsas de suero que se utilizan para hidratar pacientes en clínica médica. Es una transformación interesante pero que resulta cara.

2.5. EL ACONDICIONAMIENTO DEL VINAGRE COMO PRODUCTO FINAL

El vinagre obtenido por cualquiera de los dos procesos pasa luego por las siguientes etapas:

- Filtración
- Dilución (para obtener un producto con 5 a 6% de acidez). Es preferible un porcentaje más alto que el comercial (4%) para compensar el error experimental causado por el uso de una solución no estandarizada de NaOH para medir la acidez.
- Embotellamiento.
- Pasteurización: calentar a 65°C durante 5 minutos.
- Etiquetado. En la etiqueta constan el producto y su origen, la marca de fantasía, la firma responsable, la forma de obtención (fermentación acética), la acidez, la composición del producto, el volumen y eventualmente el precio. Vale la pena consultar en las góndolas del supermercado cuál es la información exigida por las autoridades locales. En general, en el vinagre no se indica una fecha de vencimiento.

2.6. ALTERACIONES DEL VINAGRE

El vinagre puede sufrir diversos tipos de alteraciones. Algunas son de origen químico, provocadas por metales; otras se deben a la acción de organismos contaminantes.

Ya hemos comentado que algunos vinagres toman olor y sabor desagradable cuando la acidez es muy baja, una condición que probablemente estimula el crecimiento de bacterias lácticas. Algunos organismos, como el gusano nematodo *Anguillula aceti* y el ácaro o piojo del vinagre, son citados en la literatura como fuentes de alteraciones.

Pero sin duda, la peor tragedia es la entrada de moscas (*Drosophila*) porque al cabo de algunas horas sus larvas se pasean por la zooglea. Por haber menospreciado el peligro, excelentes vinagres acabaron en la basura.

3. AGRADECIMIENTOS

A los Profesores Dr. Eugênio Aquarone y Dr. Orlando Zancanaro Junior de la Facultad de Farmacia de la USP (Brasil) por su orientación cuando comencé a preparar actividades prácticas de Biotecnología sobre este tema. A la Licenciada Cristina Sid Carvalho por su colaboración en los estudios iniciales sobre el tema. A la Licenciada Tassia Torres Furtado por su creatividad, empeño y dedicación en el montaje de los fermentadores y también por su ayuda en la conservación de inóculos. A Roberta de Oliveira Garcia, Vítor Soares Mann y Alessandra Sor por el apoyo técnico. A los alumnos de Biotecnología del Instituto de Tecnología ORT de Río de Janeiro por su participación en el proyecto. A Hugo Malajovich por la lectura crítica del texto. A la Dra. Gabriela Levitus por la revisión del texto.

4. BIBLIOGRAFÍA

AQUARONE E. et al. Alimentos e bebidas produzidos por fermentação. Biotecnologia, Vol.5. São Paulo, Editora Edgar Blucher Ltda., 1983

AQUARONE et al. (Coord). Biotecnologia Industrial. Biotecnologia na produção de alimentos. Vol.4. São Paulo, Editora Edgar Blucher Ltda., 2001.

FUNDACIÓN EROSKI <http://www.consumaseguridad.com> HEINRICH FRINGS <http://www.frings.com>

MALAJOVICH M.A. Fazer vinagre. não é deixar o vinho azedar. ORT Brasil, 1989

MALAJOVICH M.A.M. Biotecnología. Bernal, Editora de la Universidad Nacional de Quilmes, 2007

SAGYPA Análisis de la cadena de vinagres,
http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/especies/01_Cadenas/Vinagre/Vinagre.htm

THE VINEGAR INSTITUTE <http://www.versatilevinegar.org/index.html>

ZANCANARO Jr. O. Vinagres. En: Biotecnologia Industrial Vol 4, São Paulo, Editora Edgar Blucher Ltda., 2001.

5. ACTIVIDADES PRÁCTICAS - GUÍAS DEL ALUMNO



5. ACTIVIDADES PRÁCTICAS - GUÍAS DEL ALUMNO

Los protocolos que figuran a seguir pueden ser utilizados de diversos modos. Todos pueden adaptarse a un número variable de alumnos y demandan recursos materiales relativamente simples y económicos. ¿Cómo utilizarlos? ¿Cuál es la mejor secuencia? La respuesta depende del tiempo disponible, de los objetivos docentes y del lugar que ocuparán en la planificación del docente.

La **Actividad 1** (¿Cómo preparar vinagre artesanalmente?) es independiente de las restantes. Muestra una forma muy simple de hacer vinagre sin necesidad de mayores conocimientos químicos.

La **Actividad 2** (¿Cómo medir la acidez del vinagre?) es indispensable para el desarrollo de las actividades siguientes. Utiliza conceptos de volumetría, pero es posible hacerla sin profundizar en la parte química.

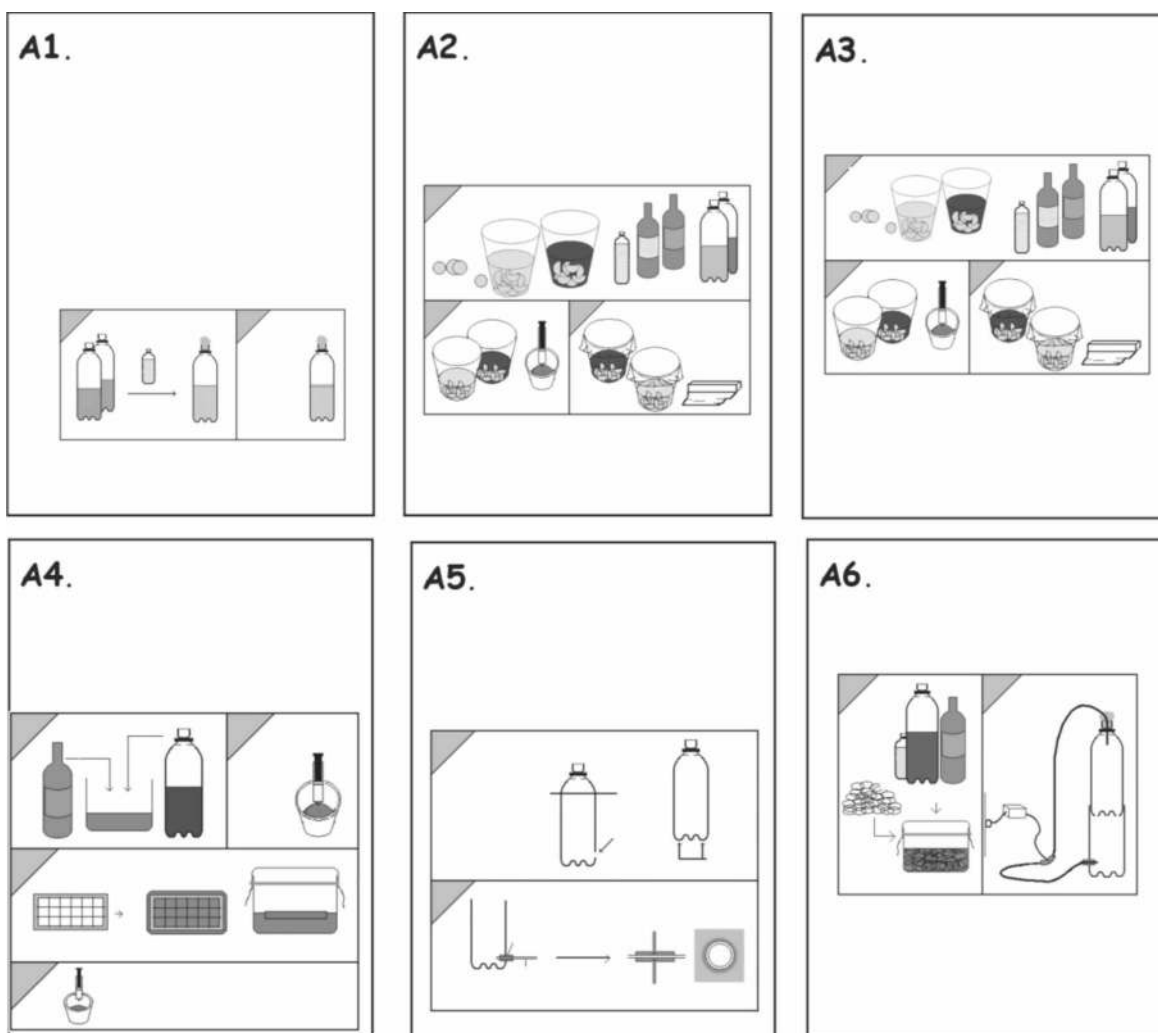
La **Actividad 3** (¿Cómo iniciar la producción de vinagre?) es indispensable para iniciar la producción de vinagre, ya sea por el proceso lento o por el proceso rápido.

La **Actividad 4** (Producción de vinagre – Proceso lento) muestra cómo obtener una buena cantidad de “vinagre fuerte”, que puede ser acondicionado como producto final y/o utilizado para inocular las virutas.

La **Actividad 5** (¿Cómo construir un fermentador? – Proceso Rápido) y la **Actividad 6** (Producción de vinagre – Proceso rápido) son dos etapas inseparables del proceso rápido de producción de vinagre.

Por consiguiente, las actividades pueden desarrollarse según cuatro secuencias:

A1; A2 → A3; A2→A3→A4 ; A2→A3→A4→A5→A6





A1. ¿CÓMO PREPARAR VINAGRE ARTESANALMENTE?

El vinagre es el producto de una fermentación alcohólica seguida de una fermentación acética. En la primera las levaduras transforman el azúcar de la fruta en etanol; en la segunda las bacterias acéticas convierten el etanol en ácido acético.

En esta actividad prepararemos artesanalmente el vinagre a partir de uvas o de otras frutas, por doble fermentación (alcohólica y acética). Aunque el proceso exige paciencia, el resultado vale la pena.

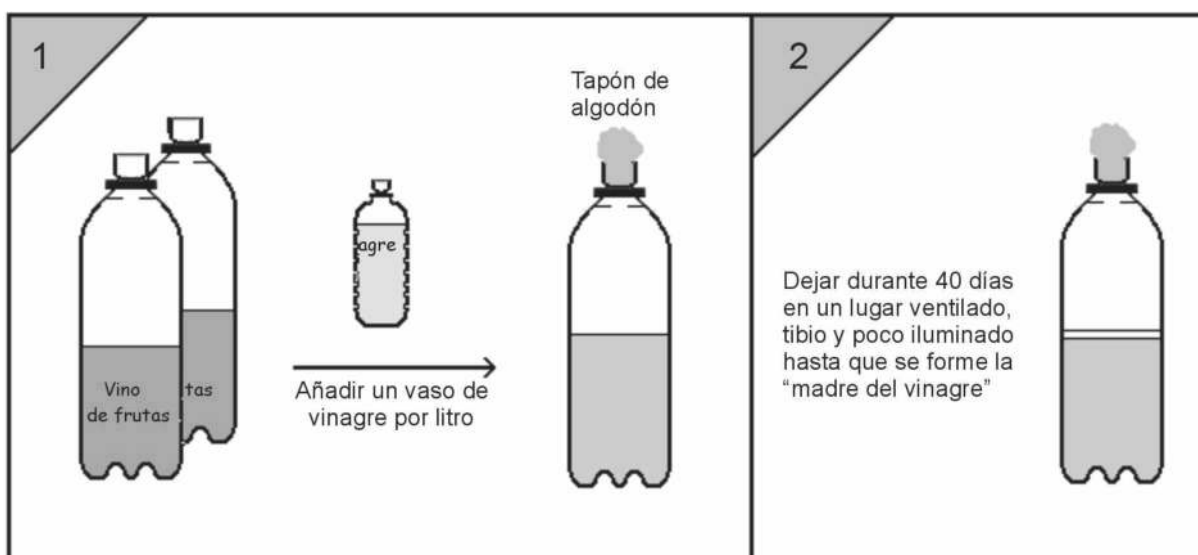
MATERIAL

Para cada grupo: 1-2 Kg de uvas, 200-250 g de azúcar, agua, 1 limón, 2 botellas de plástico, 1 globo, 1 gomita, licuadora, tabla, cuchillo, embudo, 1 pedazo de tela de algodón o un filtro de tela, papel pH.

PROCEDIMIENTO

PRIMERA ETAPA - PREPARACIÓN PREVIA DE UN BUEN VINO DE FRUTAS (Ver Actividad 2, de Vinos)

SEGUNDA ETAPA - LA TRANSFORMACIÓN DEL VINO EN VINAGRE



RESULTADOS

1. ¿Qué aspecto tiene la "madre del vinagre"?
2. Describir las características organolépticas del vinagre: color, olor y sabor.

DISCUSIÓN

1. La transformación termina cuando el vinagre se pone muy ácido. Una vez filtrado y embotellado, se lo pasteuriza (65° C durante 5 minutos). ¿Qué ventajas y desventajas tiene ese tratamiento?
2. ¿Cuál es el interés de producir vinagre artesanalmente para una comunidad rural?



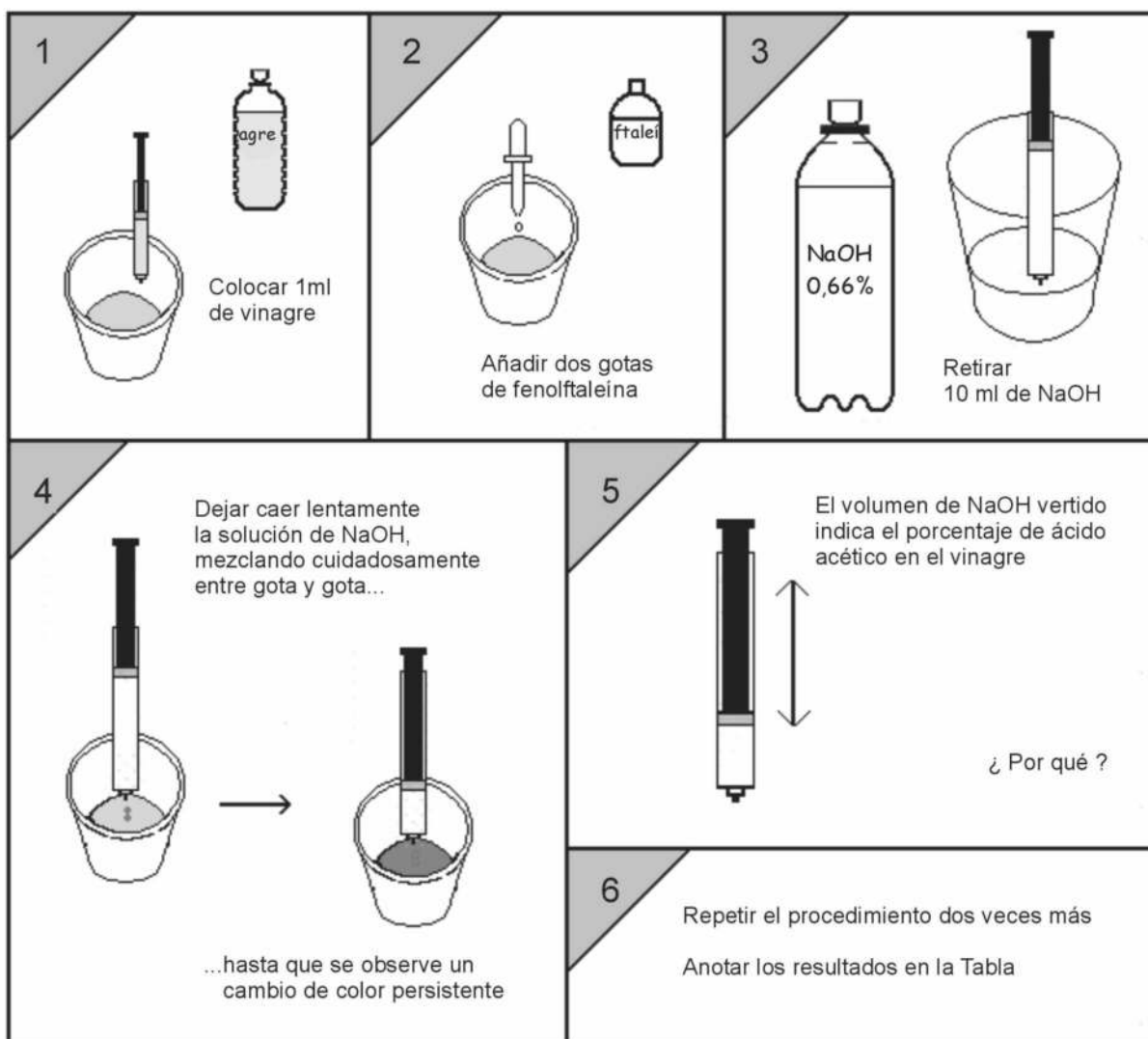
A2. ¿CÓMO MEDIR LA ACIDEZ DEL VINAGRE?

En muchos países la legislación determina que un producto sólo puede ser llamado "vinagre" si es el resultado de una fermentación y presenta una concentración de ácido acético superior al 4%. En esta actividad mediremos la concentración de ácido acético del vinagre utilizando un método simplificado de titulación volumétrica.

MATERIAL

Para cada grupo: Vinagre comercial, solución de fenolftaleína (1%), solución de hidróxido de sodio NaOH (0,66%), 3 vasitos plásticos pequeños (50 ml), 1 jeringa de 1 ml, 1 jeringa de 10 ml (ambas sin agujas).

PROCEDIMIENTO



RESULTADOS

1. Anotar los valores obtenidos en la tabla siguiente y calcular la media aplicando la fórmula

$$\bar{x} = (x_1 + x_2 + x_3) / 3$$

Tabla: Concentración de ácido acético del vinagre

ENSAYO	1	2	3	MEDIA
ÁCIDO ACÉTICO (%)				

2. ¿Hay mucha diferencia entre los valores obtenidos por una única persona?
3. ¿Hay mucha diferencia entre los valores obtenidos por personas diferentes?
4. Una de las cualidades de un buen método de medición es que dé valores iguales o muy parecidos al ser repetido varias veces, sea por una o por varias personas. ¿Cómo calificaría el método de titulación aplicado en esta actividad?



A3. ¿CÓMO INICIAR LA PRODUCCIÓN DE VINAGRE?

La producción de vinagre puede ser considerada como un cultivo de bacterias acéticas en media o gran escala. Para obtener el cultivo inicial ("estárter") conviene recurrir a frutas un poco pasadas porque cuentan con una flora microbiana variada que incluye levaduras y bacterias acéticas.

Las bacterias acéticas se multiplican en presencia de etanol y en condiciones aerobias; no sólo soportan bien la acidez del ambiente sino que la aumentan al transformar el etanol en ácido acético. Por consiguiente, el desarrollo de las bacterias acéticas se verá favorecido en un medio ácido que contenga etanol y esté en contacto con el aire. En esta actividad seguiremos ese raciocinio para obtener un cultivo rico en bacterias acéticas, en cantidad adecuada para nuestras necesidades.

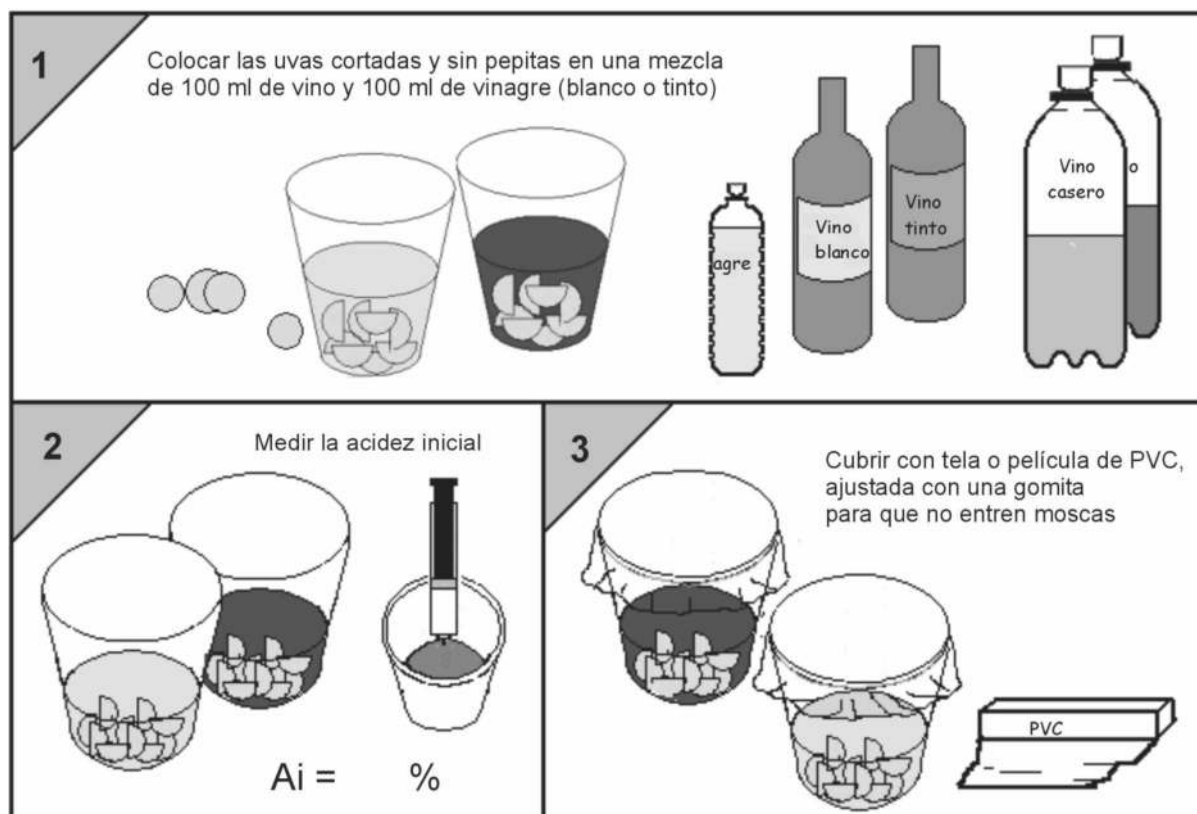
MATERIAL

PRIMERA ETAPA - CONSEGUIR "VINAGRE FUERTE". Para cada grupo: 2 vasos plásticos de 500 ml, película de PVC, gomitas, 4-6 uvas muy maduras, 100 ml de vino tinto, 100 ml de vino blanco, 200 ml de vinagre comercial, material para titulación (Actividad 2)

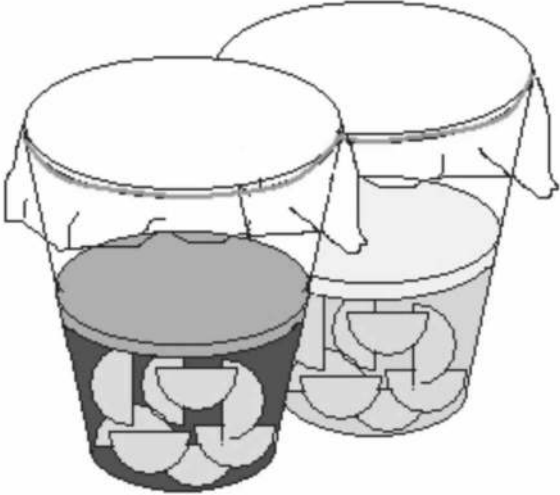
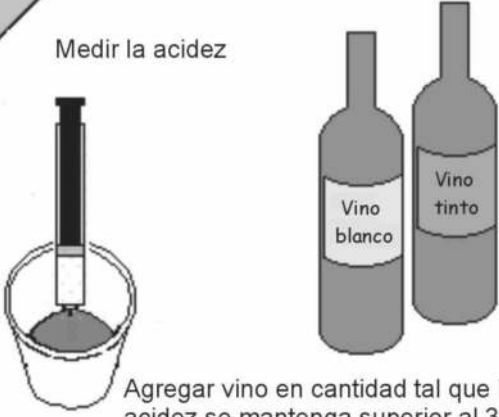
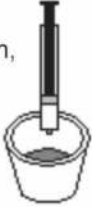
SEGUNDA ETAPA - AUMENTAR LA CANTIDAD DE "VINAGRE FUERTE". Para cada grupo: recipientes mayores, película de PVC, gomitas, vino tinto, vino blanco, material para titulación (Actividad 2), telgopor y escarbadiantes para construir una jangada o balsa de sustentación.

PROCEDIMIENTO

PRIMERA ETAPA – CONSEGUIR "VINAGRE FUERTE"



SEGUNDA ETAPA - AUMENTAR LA CANTIDAD DE "VINAGRE FUERTE"

1 Aguardar unos días hasta que se desprenda un acentuado olor ácido  Al cabo de 2 o 3 semanas más se formará en la superficie una capa gelatinosa ("madre del vinagre")	2 Medir la acidez  Agregar vino en cantidad tal que la acidez se mantenga superior al 3% 3 Aumentar progresivamente el volumen, controlando periódicamente la acidez  Llegado el momento, reemplazar el recipiente por otro mayor, agregando una balsa de sustentación para la "madre del vinagre"
--	--

RESULTADOS

¿Cuánto "vinagre fuerte" se obtuvo?

DISCUSIÓN

¿Cómo podríamos mantener indefinidamente este cultivo de bacterias acéticas?



A4. PRODUCCIÓN DE VINAGRE - PROCESO LENTO

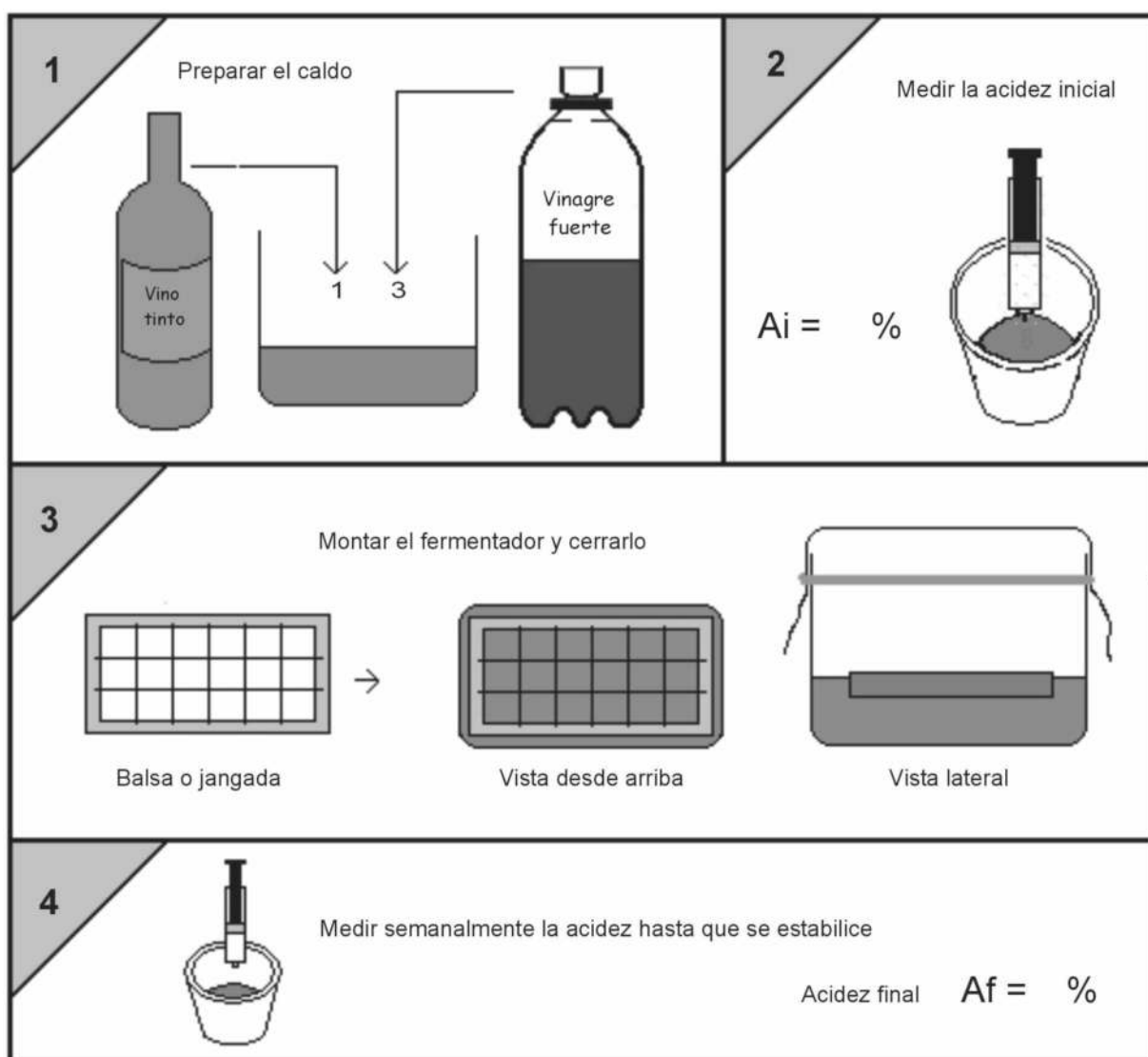
En esta actividad produciremos vinagre por el proceso lento. El vino es colocado en un recipiente, del cual podrá ocupar hasta tres cuartas partes de su capacidad e inoculado con bacterias del género *Acetobacter*. Estas fermentan y se multiplican formando una película gelatinosa en la superficie del líquido, un lugar donde están simultáneamente en contacto con el oxígeno del aire y el etanol del vino.

MATERIAL

Una caja de plástico, 1 balsa o jangada, película de PVC, piolín para ajustarla, material para titulación (Actividad 2), vino (12 a 14°GL) y "vinagre fuerte" (7 a 8%) en igual proporción. Las cantidades se calculan en función de la capacidad del recipiente, que sólo se llena hasta las $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad.

PROCEDIMIENTO

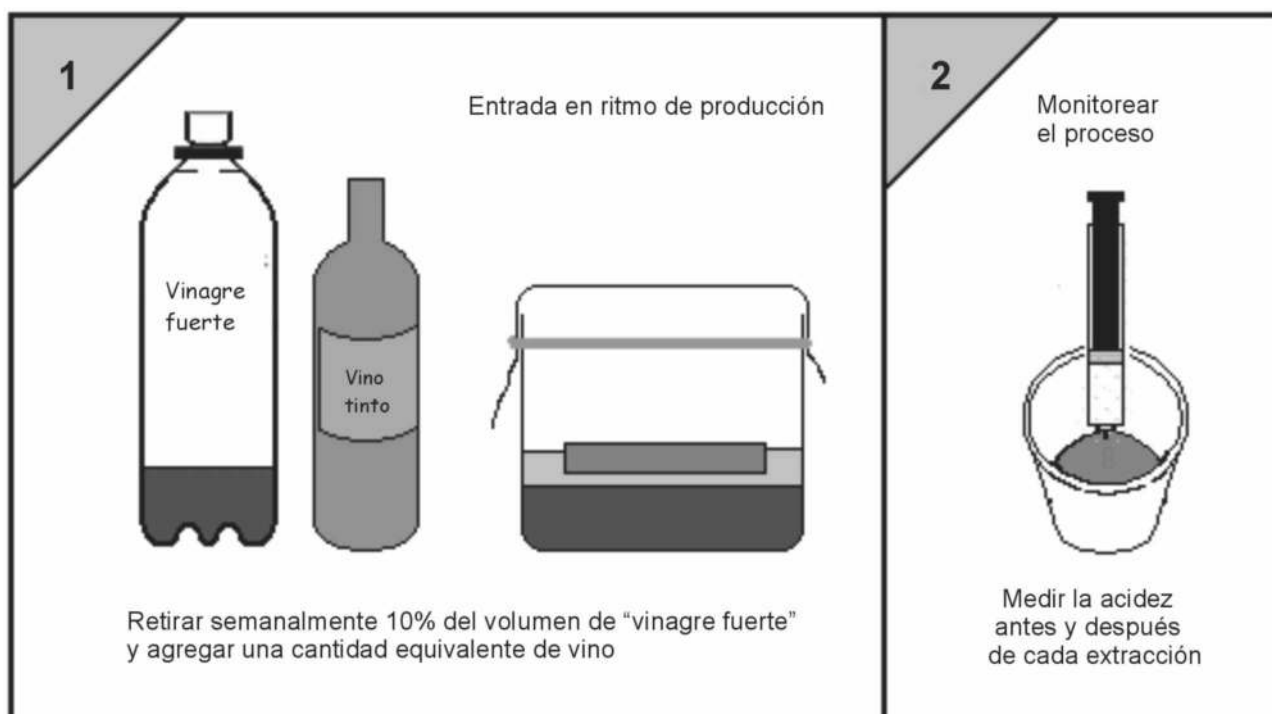
PRIMERA ETAPA – INICIO DE LA PRODUCCIÓN



ANÁLISIS DE LOS DATOS

1. ¿Cuál era el volumen de etanol en 100 ml de caldo al iniciar la producción?
2. La masa específica del etanol es de 0,78 g/ml. ¿Cuántos gramos de etanol (Ei) había en 100ml de caldo al iniciar la producción?
3. A partir de 1 g de etanol puede llegar a formarse 1,304 g de ácido acético. Justifique esta afirmación sabiendo que la ecuación de la fermentación acética es $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{H}_2\text{O}$
4. El rendimiento expresa la relación entre la cantidad de ácido acético obtenido y la cantidad de ácido acético esperado. Su valor es calculado utilizando la fórmula $\text{R\%} = 100 (\text{Af} - \text{Ai}) / (\text{Ei} \times 1,304)$.
¿Cuál fue el rendimiento del proceso? ¿Cómo se lo podría mejorar?

SEGUNDA ETAPA – ENTRANDO EN RITMO DE PRODUCCIÓN



ANÁLISIS DE LOS DATOS

1. Calcule la productividad del fermentador en gramos / litro x hora.
2. ¿Cuánto vinagre a 4% se podría obtener semanalmente?

DISCUSIÓN

Al estabilizarse la acidez en la primera etapa de esta actividad, podíamos haber acabado la fermentación para extraer el producto, limpiado el fermentador y empezado todo de nuevo. Eso hubiera caracterizado al sistema de producción como discontinuo. Sin embargo en la segunda etapa, al extraer una parte del producto y agregar más materia-prima, transformamos el sistema de producción en semicontinuo.

¿Cuáles son las ventajas y desventajas de cada sistema de producción?



A5. ¿CÓMO CONSTRUIR UN FERMENTADOR?- PROCESO RÁPIDO

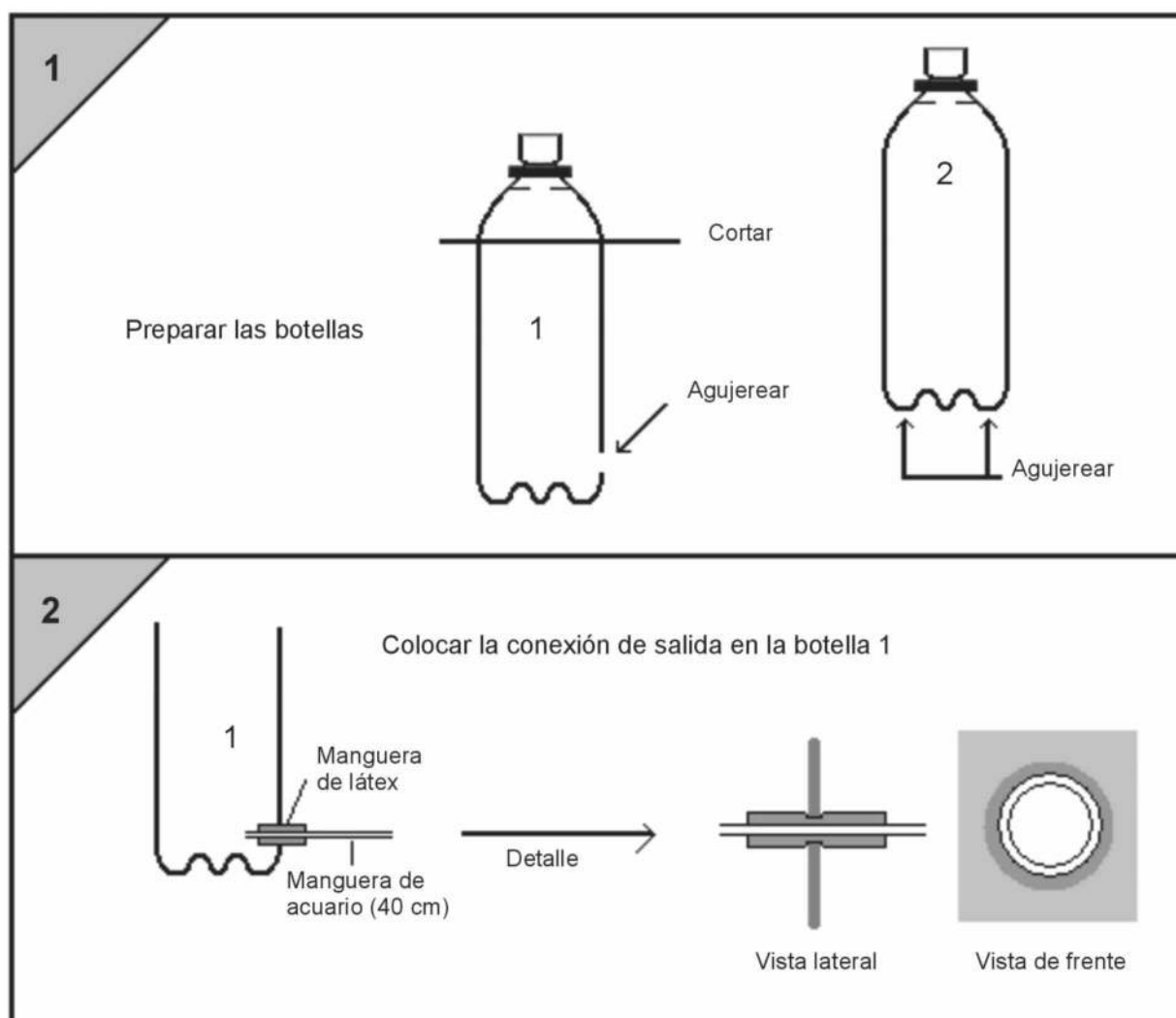
Se trata de construir un fermentador que permita recrear las condiciones características del proceso rápido de producción de vinagre: el agente biológico está fijo en un material inerte, el caldo circula rápidamente por ese material y la oxigenación es abundante.

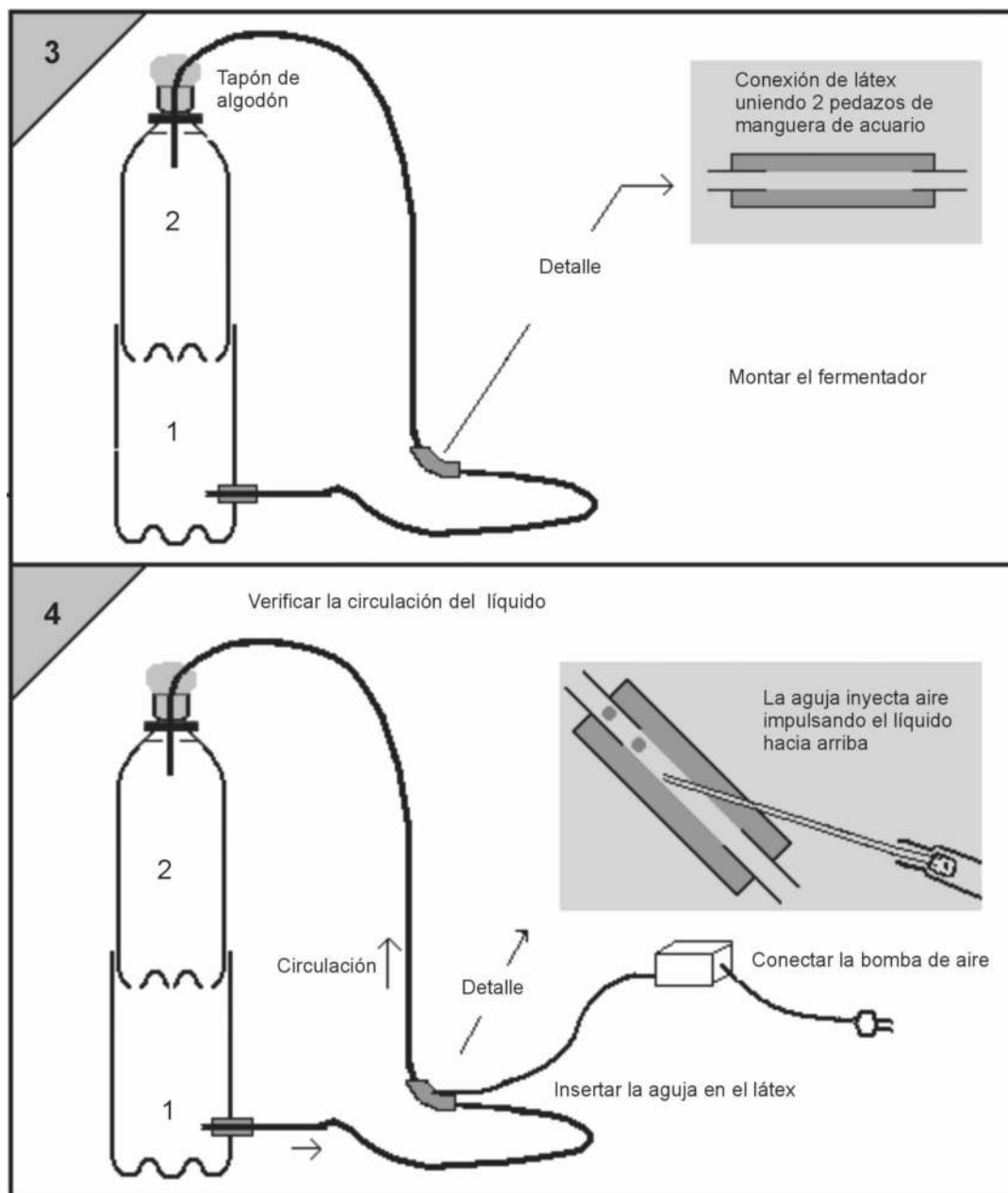
En esta actividad construiremos un fermentador con un compartimiento donde se pueda colocar un material inerte con las bacterias inmovilizadas y un sistema de propulsión del líquido que asegura también la oxigenación.

MATERIAL

Botellas plásticas, algodón, tijeras para cortar las botellas, clavo u otro instrumento para agujerearlas, manguera de acuario, manguera de látex, bomba de acuario, aguja de inyección, fósforos.

PROCEDIMIENTO





RESULTADOS

1. Los problemas más frecuentes suelen ser la pérdida de líquido en alguna conexión y el reflujo de la circulación. ¿Cómo se solucionaron estos problemas?
2. La botella 2 se cierra con un tapón de algodón enrollado alrededor de la manguera. Sin embargo, entre las dos botellas pudo haber quedado algún agujero que permita la entrada de moscas. ¿Qué solución se propuso para sellarlo?



A6. PRODUCCIÓN DE VINAGRE - PROCESO RÁPIDO

En esta actividad produciremos vinagre por un proceso rápido. El vino circulará repetidas veces sobre un material en el cual habremos fijado las bacterias acéticas (virutas de madera, por ejemplo).

MATERIAL

PRIMERA ETAPA - PREPARACIÓN PREVIA

Inoculación de las virutas: "vinagre fuerte", vinagre comercial, virutas de madera lavadas y hervidas.

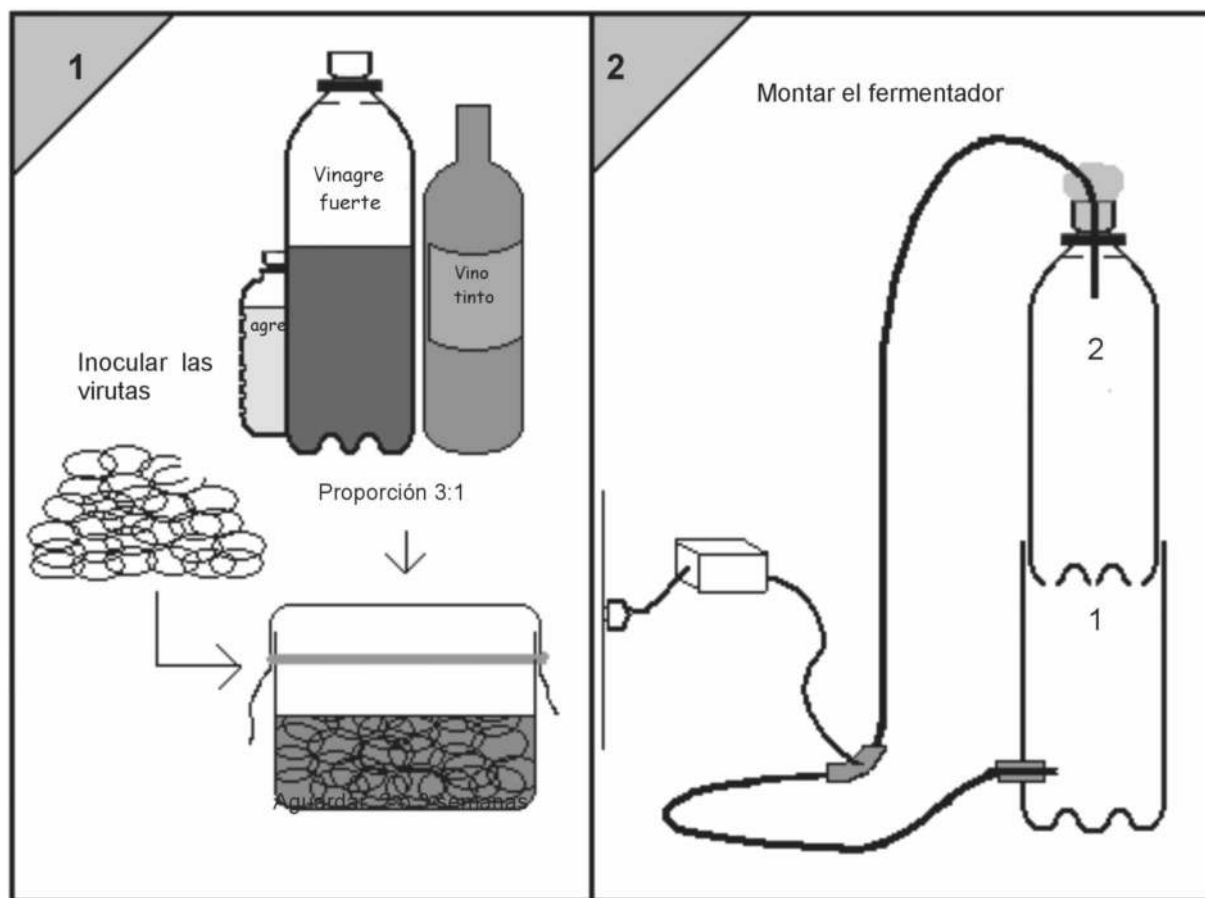
Montaje del fermentador (Verificación del sistema de circulación y aireación, Actividad 5).

SEGUNDA ETAPA - INICIAR LA PRODUCCIÓN

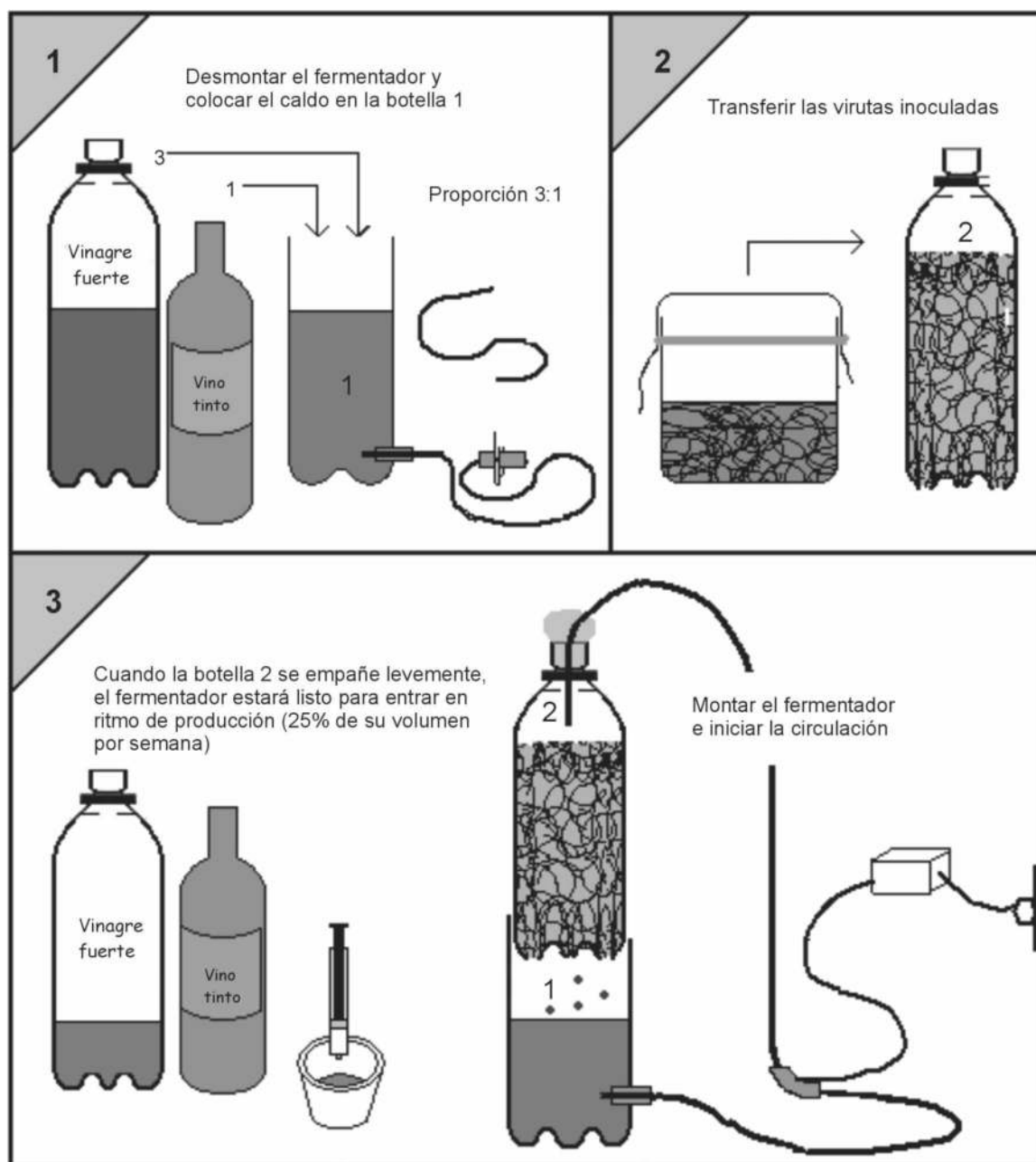
Fermentador, virutas de madera previamente inoculadas con bacterias acéticas, vino, "vinagre fuerte", material para titulación (Actividad 2)

PROCEDIMIENTO

PRIMERA ETAPA - PREPARACIÓN PREVIA



SEGUNDA ETAPA – INICIAR LA PRODUCCIÓN



RESULTADOS

1. Representar gráficamente la evolución de la acidez en el fermentador.
2. ¿Cuánto vinagre a 4% representa el volumen de vinagre fuerte que es retirado por semana?
3. ¿Cuál es la productividad del fermentador (gramos/litro x hora)?

DISCUSIÓN

¿Cómo calificaría este tipo de producción, como discontinua o semicontinua? ¿Cómo se podría llegar a un sistema continuo de producción?



ArgenBio 

Consejo Argentino para la Información
y el Desarrollo de la Biotecnología

www.argenbio.org



por qué Biotecnología

www.porquebiotecnologia.com.ar