

Departamento de Fermentaciones Industriales
Madrid

Nueva sustancia de carácter ácido en fermentados de mosto por distintas levaduras

por
B. Iñigo * y F. Bravo Abul

(Recibido para publicar el 26 de octubre de 1962)

En el estudio cualitativo (1) de los ácidos orgánicos producidos en la fermentación del mosto, por acción de diferentes especies de levaduras, hemos identificado, por cromatografía, manchas de sustancias ácidas capaces de producir el viraje del indicador ácido-base empleado; los ácidos correspondientes a estas manchas son los descritos en la bibliografía sobre el particular (2). Sin embargo, en los fermentados en pureza obtenidos, hemos podido detectar, mediante análisis cromatográfico, empleando comparativamente soluciones puras de diferentes ácidos orgánicos con existencia habitual o circunstancial en los vinos, una sustancia ácida con un R_f de valor 0,58-0,60 (fig. 1), distinto de los correspondientes a los ácidos descritos.

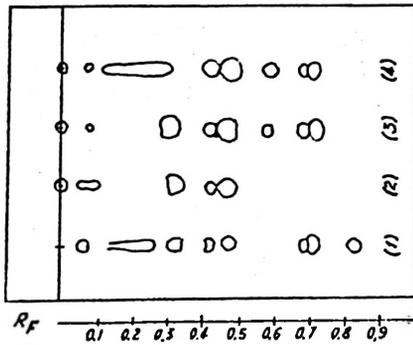
Estas observaciones han sido hechas a través de todo el trabajo cromatográfico realizado en los distintos fermentados en pureza, poniendo de manifiesto que esta sustancia de carácter ácido se forma durante la fermentación del mosto por acción de cualquiera de las especies ensayadas, exceptuando la *C. pul-*

(*) Investigador, Jefe del Laboratorio de Microbiología del Departamento de Fermentaciones Industriales del Instituto de Química «Alonso Barba» del C.S.I.C.

(**) Doctor en Ciencias, becario del Departamento de Fermentaciones Industriales del Instituto de Química «Alonso Barba» del C.S.I.C.

CROMATOGRAMAS DE ACIDEZ
DE

SOLUCION PATRON DE ACIDOS, MOSTO Y FERMENTADO EN PUREZA

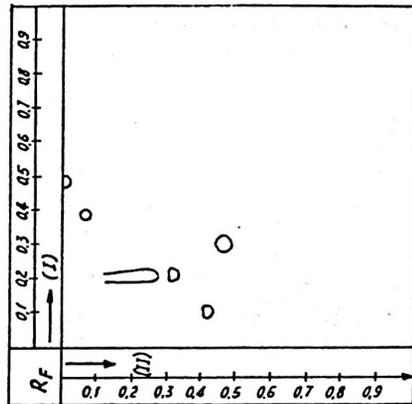


- (1) - Solución patron.
- (2) - Mosto pastado por resinas.
- (3) - Fermentado pasado por resinas.
- (4) - Fermentado.

SOLVENTE EMPLEADO
n-Butanol: Formico 4N
AGUA (1:1:2)

REVELADOR: Azul de bromofenol

Solución patron: oxálica, bitartrato potásico, tartárico, cítrico, málico, láctico, succínico y fumarico. (ordenados por valores crecientes de R_f).



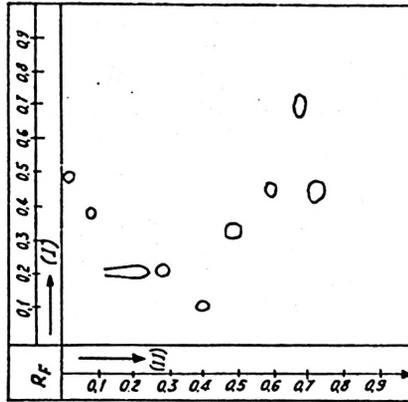
MOSTO: del empleado en las fermentaciones en pureza a cargo de las 18 especies de levaduras.

CROMATOGRAMA bidimensional sobre papel Whatman nº 1.

SOLVENTE EMPLEADO:

- (1) - Etanol absoluto: NH_4OH : $22^\circ B$: Agua (80:5:15).
- (2) - n-Butanol: Formico 4N: Agua (1:1:2).

REVELADOR: Azul de bromofenol.



FERMENTADO EN PUREZA por la cepa nº 1

CROMATOGRAMA bidimensional sobre papel Whatman nº 1: realizado en las mismas condiciones que el anterior.

SOLVENTE EMPLEADO:

- (1) Etanol absoluto: NH_4OH : $22^\circ B$: Agua (80:5:15)
- (2) n-Butanol: Formico 4N: Agua (1:1:2).

REVELADOR: Azul de bromofenol.

cherina que, de producirlo, sería en cantidades que escapan a la sensibilidad del método.

Por la extensión e intensidad de las manchas correspondientes a esta sustancia, comparadas con las de otros ácidos presentes en los fermentados, deducimos que la concentración de la misma es baja, del orden de 10^{-1} gramos por litro como máximo. Se cromatografiaron, junto al fermentado en pureza, soluciones acuosas de ácidos puros, cuya presencia se había descubierto en toda clase de vinos, y de los que accidentalmente pueden formar parte de los mismos; además ampliamos este tipo de ensayos con algunos de los ácidos que, desde un punto de vista teórico, podrían estar implicados en el mecanismo fermentativo.

De la diferencia de valores de Rf obtenidos para los ácidos empleados como patrones y el valor del Rf de la sustancia que tratamos de identificar, así como teniendo en cuenta los ácidos que forman bandas o dan lugar a dos o más manchas, hemos podido descartar los siguientes ácidos: láctico, β -hidroxipropiónico, β -hidroxibutírico, glioxílico, glicólico, α -hidroxiisobutírico, α -hidroxicaprónico, α -hidroxiisocaprónico, mevalónico, α -cetoglutárico, oxalacético, pirúvico, succínico, málico, tartárico, cítrico, isocítrico, cis-aconítico, fosfoglicérico y oxálico.

Material y métodos

AISLAMIENTOS DE LA NUEVA SUSTANCIA.

A) *Ensayos previos.*

Con estos primeros datos negativos acerca de la naturaleza química de esta sustancia con carácter ácido, presente en los fermentados en pureza, y habiendo obtenido en el estudio que hicimos sobre la metabolización de ácidos (1), en los fermentados por la acción de diferentes especies de levaduras, que las especies *H. anómala*, *C. micoderma*, *C. pulcherrima* son capaces de agotar, en cultivos sumergidos, todos los ácidos excepto esta sustancia, pensamos aplicar la capacidad de estas levaduras como un paso intermedio en su aislamiento.

Decidimos hacer una serie de ensayos para determinar el tiempo de metabolización de los restantes ácidos en función de la relación S/V.

Realizamos ensayos en matraces erlemmeyer de 100 ml de capacidad, poniendo 25 y 50 ml de substrato.

Se dispone de mosto fermentado en pureza a cargo de la cepa n.º 1 (*S. italicus*) al que previamente se ha privado de alcohol por destilación al vacío. Una vez distribuido en las se-

ries respectivas, esterilizado y sembrado con las tres especies en estudio, se coloca en el agitador-bandeja de 72 r. p. m. Se realizan cromatogramas control a las 12, 24, 48, 72, 96, 120 y 148 horas.

C. micoderma y *H. anómala* agotan todos los ácidos, exceptuando la sustancia problema, en un tiempo que oscila entre las 24 y 48 horas de agitación, para los matraces con 25 ml de substrato.

Adoptamos como más conveniente la relación de 50 ml de substrato en erlemmeyer de capacidad total de 100 ml; y utilizamos la cepa n.º 15 (*H. anómala*), como la especie de levadura encargada de privar al substrato de ácidos orgánicos, exceptuando la sustancia que tratamos de aislar.

B) *Técnica de aislamiento y purificación.*

Empleamos mosto de idéntica composición al que hemos venido utilizando en estos trabajos; una vez terminada la fermentación a cargo de la cepa n.º 1 (*S. italicus*), efectuando un análisis de control de los ácidos presentes, se destila al vacío hasta conseguir que la concentración de alcohol sea menor del 1 %. Después de esterilizado se procede a otro análisis cromatográfico de ácidos (3), (4), (5), (6), y posteriormente se siembra con la cepa n.º 15 (*H. anómala*).

El cultivo (1.000 ml. de substrato en erlemmeyer de 2.000 ml.) se coloca en un agitador-bandeja de 72 r. p. m. Se realizan medidas de pH, siguiendo por el aumento de éste la marcha del proceso; cuando los valores de pH se aproximan a 6, se empieza el control cromatográfico; observándose que para un pH comprendido entre 6,7 y 7,2 han sido degradados los ácidos orgánicos, pues sólo aparece la mancha correspondiente a la sustancia ácida que tratamos de aislar.

Una vez conseguida esta situación en el substrato, separamos por centrifugación la masa celular formada. Con una porción del líquido obtenido realizamos ensayos para aislar esta sustancia empleando resinas cambiadoras de ion. Los resultados de estos ensayos no son satisfactorios, ya que la sustancia aislada presenta impurificaciones, correspondientes a ácido tartárico y ácidos inorgánicos que, al encontrarse disueltos en forma de sales en el substrato, han sido retenidos por la resina aniónica y posteriormente liberalizadas al estado de ácidos en la resina catiónica.

Por este motivo recurrimos al método cromatográfico como técnica de purificación y aislamiento.

Realizamos los primeros ensayos en papel Whatman, n.º 1, poniendo la muestra por riegos repetidos sobre una banda de 1 cm de ancho y 40 cm de longitud. Empleamos como solvente butanol-n : ácido fórmico : agua (1 : 1 : 2).

Una vez desarrollado el cromatograma, se cortan dos tiras de 1 cm de anchura de las márgenes del papel y se revelan con azul de bromofenol; así podemos determinar la posición de la sustancia ácida y cortar exactamente la banda de papel que la soporta.

En un soxhlet extraemos del papel la sustancia problema, empleando éter. Al evaporar el éter nos queda un residuo, soluble en agua y en alcohol, pero no cristizable en ninguno de estos disolventes.

La sustancia aislada no presenta color, es pastosa, de aspecto céreo y presenta un marcado carácter ácido.

El empleo de papel Whatman, n.º 1, tiene el inconveniente de que la cantidad de substrato que se puede poner en la banda origen, es muy pequeña frente al volumen necesario para obtener una cantidad de sustancia problema significativa. Por este motivo empleamos cartones de celulosa pura, de 1 mm de espesor, en los que se pueden absorber en forma de banda de 1 cm de anchura unos 100 ml de substrato. Una vez desarrollado el cromatograma, para localizar la posición de la banda ácida sobre el cartón, se cortan dos tiras paralelas a los márgenes del mismo, pulverizando sobre ellas azul de bromofenol.

Las tiras de cartón, conteniendo la sustancia problema, se someten a una extracción con éter en un soxhlet; prolongando la misma hasta asegurarnos, mediante control cromatográfico, que están agotadas de sustancia.

Así hemos podido tener una solución concentrada de la sustancia problema en éter; sin embargo, el control cromatográfico acusa ligeras impurificaciones ácidas, probablemente debidas a impurezas de los cartones empleados y a vestigios de ácidos todavía presentes en el substrato.

La purificación se realiza a través de un nuevo cromatograma sobre papel Whatman, n.º 1. La solución en éter, obtenida después de esta operación, presenta pureza cromatográfica.

Resultados

CARACTERIZACION.

La identificación de esta sustancia ha tenido como principal inconveniente el hecho de no ser cristizable en condiciones normales, junto a las exiguas cantidades que hemos podido aislar, motivo por el que no hemos podido seguir la metodología del análisis clásico cualitativo, a la que nos hemos ajustado en cuantos ensayos ha sido posible.

Resumimos las propiedades del material obtenido:



Espectro del ácido β -hidroxibutírico

Fase : líquido viscoso ; Espesor : entre láminas ; Operador : doctor A. HIDALGO ; Prisma : red-ClNa ; Resolución : 927 ; Respuesta : 1.100 ; Ganancia : 2 ; Amplificación : 2 ; Supresión : 9.

- 1) Análisis elemental cualitativo : No contiene S, N, Cl., I, Br ni P.
- 2) Descomposición de Na_2CO_3 .
- 3) Reacción ácida al papel indicador Universal.
- 4) Ensayos con :
 - a) Reactivo de Benedict : negativo.
 - b) Reactivo de Felhing : negativo.
 - c) Reactivo de Barfoed : negativo.
 - d) Solución acuosa de KMnO_4 al 1 % : es reducida lentamente.
- 5) Reacción con FeCl_3 (solución acuosa al 2,5 %) : se produce un color amarillo típico de hidroxiaácidos.

Ante la imposibilidad, con la pequeña cantidad de que disponemos, de proceder a la preparación de derivados, se procede a un estudio de espectros de absorción infrarroja (*).

Se han registrado los espectros de absorción infrarroja de la sustancia problema y de una serie de oxiácidos conocidos, para que pudieran servir de términos de comparación. Los registros se han efectuado con un espectrofotómetro para infrarrojo Perkin-Elmer 221, de doble haz, equipado con un prisma de NaCl y una red, lo que permite estudiar los espectros en la zona espectral comprendida entre 4.000 y 650 cm^{-1} con una buena dispersión.

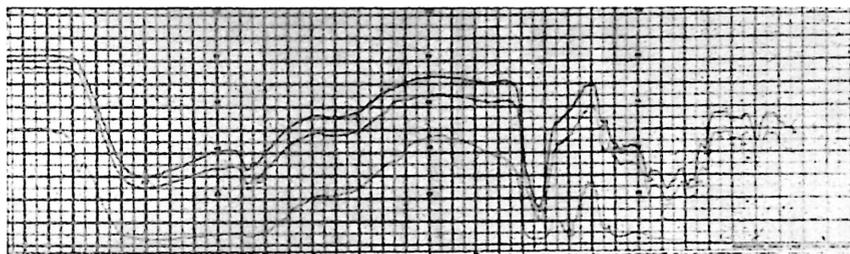
En el espectro obtenido (fig. 2) se pueden observar bandas de absorción características de los siguientes grupos :

(*) Los espectros han sido registrados en el Laboratorio del transporte y Mecánica del Suelo del Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas ; la interpretación de los mismos se ha realizado por la Sección de Espectros Moleculares del Instituto de Optica «Daza de Valdés».

a 3.000 cm^{-1} una banda ancha originada por los OH ligados por puentes de hidrógeno; a 3.975 y 3.935 cm^{-1} absorciones intensas originadas por la vibración de valencia de los grupos CH_3 y CH_2 ; a 1.125 cm^{-1} se encuentra la banda más intensa del espectro atribuible a la vibración de valencia del grupo $\text{C}=\text{O}$.

Puede, por lo tanto, asegurarse que la sustancia estudiada es un oxiácido.

Se han registrado los espectros de varios oxiácidos conocidos, y al comparar los espectros así obtenidos con el de la sustancia problema, se observa una cierta semejanza en líneas generales con el del β -hidroxibutírico, lo que permite suponer que el compuesto estudiado tiene una estructura semejante



Espectro de la sustancia problema

Fase : sólido pastoso ; Espesor : entre láminas ; Operador : doctor A. HIDALGO ; Prisma : red-ClNa ; Resolución : 927 ; Respuesta : 1.100 ; Ganancia : 2 ; Amplificación : 2 ; Supresión : 9 ;

Resumen

Un estudio cualitativo de los ácidos orgánicos producidos en los fermentados en pureza a cargo de 18 diferentes especies de levaduras vínicas, empleando técnicas cromatográficas, nos llevó a detectar una sustancia con carácter ácido, con un valor de R_f : 0,58-0,60, distinto de los correspondientes a los ácidos descritos en los vinos. Esta sustancia se forma durante la fermentación del mosto, por acción de cualquiera de las especies ensayadas, exceptuando la *C. pulcherrima*. Fue aislada mediante técnicas cromatográficas; junto a datos de análisis clásico orgánico damos el correspondiente espectro de absorción infrarroja.

Summary

New substance with acid character in fermentations of grape-juice by different yeasts

A qualitative study about organic acids produced in several pure fermentations by action of eighteen different species of

yeasts, isolated from grape-juice, leads us to discover a substance with acid character which has a different Rf value of the others acids found in wines. This substance is formed during fermentation of grape-juice by any of the species of yeasts tested, except *C. pulcherrima*.

It was isolated employing chromatographic techniques.

We give its infra-red absorption spectrum together with other data of organic analysis.

Bibliografía

- (1) IÑIGO LEAL, B. y BRAVO ABAD, F. : *Rev. Cien. Apl.* (En prensa)
- (2) CARLES, J., SCHNEIDER, A. et LACOSTE, A. M. : *Bull. Soc. Chim. Biol.* **40**, 221. 1958.
- (3) RESNIK, E., CONARD, L., LEE, A., WALLAN POWELL : *Anal. Chem.*, 928. 1955.
- (4) ZAMPELAS, D. A. and CLARK, W. L. : *Am. J. of Enol.*, **2**, 43. 1957.
- (5) ISHERWOOD, F. A. : *Biochem. J.*, **40**, 688. 1946.
- (6) BUBEN, W. A. : *Anal. Chem.*, **24**, 187. 1952.