

Tesis de Posgrado

Algunos factores que afectan la fermentación acética

Carlisle, Roberto Arturo

1950

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Carlisle, Roberto Arturo. (1950). Algunos factores que afectan la fermentación acética. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0642_Carlisle.pdf

Cita tipo Chicago:

Carlisle, Roberto Arturo. "Algunos factores que afectan la fermentación acética". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1950.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0642_Carlisle.pdf

MINISTERIO DE EDUCACION
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FISICAS Y
NATURALES
oOo

Algunos Factores que Afectan la
Fermentación Acética

por

Roberto Arturo Carlisle

Tesis: 642

Tesis presentada para optar
al título de Doctor en Química.

Buenos Aires

1950

AÑO DEL LIBERTADOR GENERAL SAN MARTIN

Al Dr. Alfredo A. Sordelli, cuya
dirección, ayuda y justas críti-
cas hicieron posible la realiza-
ción de este trabajo, dedico mi
tesis con todo agradecimiento.

de la Secretaría del I
del Poder Judicial
del Poder Judicial

70

CONTENIDO

<u>CAPITULO I</u>	Pág.
Introducción y objeto	1
<u>CAPITULO II</u>	
Antecedentes bibliográficos	2
<u>CAPITULO III</u>	
Materiales y métodos químicos y bacteriológicos.	
Características de la cepa empleada	10
Preparación de los medios empleados	12
Métodos de análisis y reactivos.-	
Determinación de la acidez	15
Determinación de Acetaldehído	16
Reactivos	21
<u>CAPITULO IV</u>	
Influencia de diversas tensiones de oxígeno sobre la fermentación del vino por el <u>Acetobacter ascendens</u>	23
Forma de trabajo	24
Experiencias realizadas	29
Resumen y comentarios	48
<u>CAPITULO V</u>	
Influencia de sustancias químicas sobre la fermentación del vino por el <u>Acetobacter ascendens</u> .	50
Experiencias con Cianuro de Potasio	50
Experiencias con Luminal.	51
Experiencias con Azul de Metileno	52
<u>CAPITULO VI</u>	
Formación y/o acumulación del aldehído acético durante la fermentación con <u>Acetobacter ascendens</u>	55
Forma de trabajo:	
Suspensión de bacterias	57
Experiencias en aire	58
Experiencias en oxígeno	60
Experiencias en anaerobiosis	61

<u>CAPITULO VI (cont.)</u>	Page
Resultados	63
Experiencias en aire	63
Experiencias en oxígeno	75
Experiencias en anaerobiosis	77
<u>CAPITULO VII</u>	
Resumen y conclusiones	80
Ensayos con cultivo en película	80
Ensayos con suspensión de bacterias	81
Conclusiones	85
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	88

CAPITULO I

Introducción y Objeto

Siendo la fermentación acética la base de una gran industria en todo el mundo, cualquier factor que pueda aumentar o disminuir su rendimiento es de gran interés industrial.

Por otra parte el mecanismo de la fermentación acética no está aún completamente explicada y todos los datos que puedan acumularse sobre las variaciones de la fermentación bajo condiciones y atmósferas distintas contribuirán eventualmente a su mejor entendimiento.

Teniendo en cuenta lo expuesto se estudió, mediante la determinación de la acidez producida, el desarrollo de la fermentación acética en atmósferas con distintas proporciones de oxígeno, con miras a la posibilidad de establecer una concentración óptima con la cual se podría efectuar la fermentación en un sistema cerrado de circulación de gases para evitar las pérdidas de ácido acético por evaporación; estudiándose además la influencia de algunas sustancias químicas en diversas concentraciones.

Dado que en el desarrollo de estas experiencias se comprobó en algunos casos la presencia de un olor aromático fuerte que resultó ser debido a la

formación y acumulación de aldehído acético en el medio, se efectuaron experiencias con el fin de establecer algunos datos cuantitativos sobre la formación del acetaldehído (además del ácido acético) bajo diversas condiciones.

Para lograr los propósitos anteriores hubo que cambiar los métodos originales de trabajo y durante los ensayos preliminares se comprobó que la cepa elegida, Acetobacter ascendens, daba lugar en presencia de aire a la acumulación de aldehído acético con poca formación de ácido acético cuando el substrato era una solución de alcohol etílico en agua destilada.

Dado que en ensayos paralelos de fermentación de vino en presencia de aire había mucha formación de ácido, también se trató de hallar al factor, existente en el vino, que permite la oxidación del acetaldehído a ácido acético.

En los capítulos que siguen se exponen los resultados de estos ensayos con la esperanza de haber contribuido, aunque en grado menor, al mejor conocimiento de la fermentación acética.

CAPITULO II

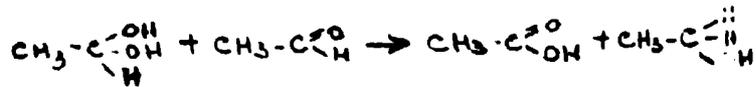
Antecedentes Bibliográficos

La fermentación acética del alcohol etílico por las bacterias acéticas es un proceso aerobio, aun cuando se ha demostrado que éstas pueden crecer en anaerobiosis sobre alcohol etílico, etc. en presencia de colorantes reducibles, que en ese caso actúan como aceptores de hidrógeno en lugar del oxígeno atmosférico.

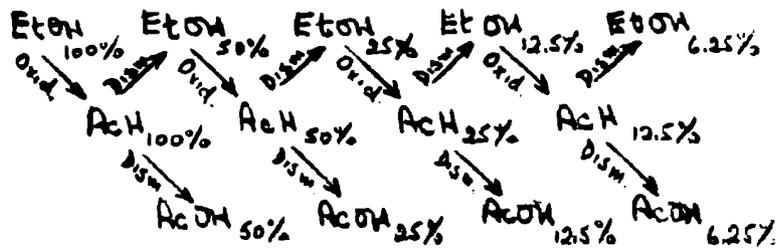
La presencia del acetaldehído como intermediario en la formación del ácido acético a partir del alcohol etílico fué demostrado por vez primera por Hoyer en 1899.

Esta afirmación fué luego confirmada por Neuberg & Nord en 1919 mediante la fijación del acetaldehído con sulfuro de calcio durante la fermentación por *Acetobacter orleanense*, *Acetobacter ascendens* y *Acetobacter pasteurianum*.

Bajo condiciones anaerobias Neuberg & Windisch demostraron que algunas cepas (*Acetobacter ascendens*, *Acetobacter pasteurianum* y *Acetobacter xylinum*) podían promover la dismutación del acetaldehído en solución diluida (0,2%) en cantidades equimoleculares de ácido acético y alcohol etílico:



y presentaron la teoría de que durante la fermentación acética el alcohol es oxidado aeróbicamente a acetaldehído, el cual luego sufre una reacción de Cannizzaro dando ácido acético y alcohol etílico nuevamente en la siguiente forma:-



(Stephenson, M. - Bacterial Metabolism)

Wieland & Bertho demostraron en 1928 que el alcohol y el acetaldehído podían oxidarse a ácido acético con oxígeno molecular en presencia de una suspensión de *Acetobacter orleanense*, llegando a la conclusión de que, dada la velocidad de reacción de la dismutación en comparación con la de la oxidación del acetaldehído a ácido acético, aquella tendría poca influencia en la formación del ácido acético.

Posteriormente Bertho y De la Torre

do con *Acetobacter ascendens*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter orleanense* y *Acetobacter pasteurianum* confirmó el trabajo anterior.

Por otra parte estos autores y Molinari demostraron la presencia de reacciones de dismutación, semejantes a los observados por Neuberger & Windisch, cuando las bacterias actuaban en anaerobiosis sobre diversos aldehídos.

En 1930 Simon afirmó que las velocidades relativas de reacción de la dismutación y de la oxidación dependen de la reacción del medio. En pH ácido la dismutación se encuentra en un mínimo y en la zona alcalina se produce alcohol y ácido a partir del acetaldehído en un 8 - 10% del rendimiento teórico.

Basándose en trabajos realizados con *Acetobacter ascendens*, Janke & Kropacsy (1) afirmaron que la zona de pH óptimo para cada enzima es la siguiente:

	<u>Cultivos jóvenes</u>	<u>Cultivos viejos</u>
Alcohol deshidrogenasa	5,57-6,0	5,93-6,7
Aldehído deshidrogenasa	5,9 - 6,5	6,3 - 6,0
Aldehído m.tasa	óptimo	8,4

y que por lo tanto hay acumulación de acetaldehído en cultivos jóvenes a valores de pH inferiores a 6.

Según Butlin (1) sería probable

que en la acetificación normal el acetaldehído es deshidrogenado a ácido acético, actuando el oxígeno como aceptor de hidrógeno; y que cuando la situación es favorable puede haber alguna dismutación del aldehído.

Wieland & Bertho afirman que otras sustancias tales como la quinona y el azul de metileno pueden actuar como aceptores de hidrógeno. Señalan además que el efecto inhibitor del ácido cianhídrico es menor en los casos en que la quinona actúa como aceptor en lugar del oxígeno.

En 1932 Mosel, trabajando con soluciones alcohólicas con asparagina como fuente de nitrógeno halló que el ácido formado era más asimilable que el alcohol, y que cuando en el medio coexisten el alcohol y el ácido las bacterias acéticas tienden a usar éste antes de aquel. La presencia de azúcares evitaba el consumo del ácido.

Según Dratvina las bacterias acéticas tendrían cada una un límite de pH por encima del cual la bacteria sobre-oxida al ácido acético si ya se ha consumido todo el alcohol. Sus investigaciones se realizaron con dos cepas distintas: el *Bacterium rancens* y el *Bacterium vini acetati*, hallando que este límite era de pH 3,1 para el *B. rancens* (que sobre-oxida con facilidad) y 4,5 para el segundo.

Wieland & Pistor hallaron que

soluciones diluidas (0,11 - 0,67 M) de alcohol etílico se deshidrogenaban por el *Acetobacter peroxydans* en oxígeno a pH 4,5 a 7 dando acetaldehído y un poco de ácido acético.

Influencia del agregado de sustancias químicas sobre la fermentación

Muchos han sido los trabajos efectuados con el agregado de diversas sustancias durante la fermentación acética para estudiar su influencia sobre ésta. Es de hacer notar que la mayoría de las experiencias han sido efectuadas en el manómetro de Warburg o aparatos similares y eran de muy corta duración.

La influencia del cianuro de potasio sobre el crecimiento y respiración de diversas cepas fué estudiada por Queré, Cozic y Wieland & Pistor, y sus conclusiones se resumen en el cuadro de la página 8.

También se han efectuado trabajos sobre la acción de diversas sustancias tales como los derivados halogenados del ácido acético y sus ésteres (Queré (1) Queré (2), Cozic); esencias de mostaza, canela, clavo de olor, etc., (Blum & Fabian, Queré (2)); y diversos productos químicos y metales (Tanaka, Queré (2), Rozenblatt & Mordkovich, Tošic, Bertrand & Sazerac, Mulder y Wieland & Pistor).

Inhibición de la respiración y/o crecimiento de bacterias acéticas por el CNK

Investigador	Queré (1)	Queré (2)	Cozic (1)	Wieland & Pistor
Bacteria	Ac. acetigenum	-	6 cepas distintas	Ac. Peroxydans
Respiración	N/1000	50% N/30.000	M/260(°)	M/4000
Crecimiento	-	N/60.000	-	M/8000

(°) Salvo el Ac. xylinum, con el que no se inhibe el consumo de oxígeno con concentraciones altas de cianuro.

Tanaka afirma en su trabajo que el barbital y el fanobarbital tuvieron poca o ninguna influencia sobre la fermentación.

Mulder señala que el *Acetobacter acetii* requiere la presencia del cobre para su crecimiento y Bertrand & Sazerac observaron un máximo en la activación de la fermentación acética por sales de manganeso con 1 parte de Mn en 40.000 de medio.

Stokes & Larsen observan una mejora en el crecimiento del *Acetobacter suboxydans* mediante el agregado de cistina o metionina, y Prechel recomienda el agregado de 0,025% de cistina a los medios de crecimiento.

Underkofler, Bantz & Peterson y Landy & Streighthoff hallaron que el *Acetobacter suboxydans* no requiere riboflavina pues lo puede sintetizar, pero en cambio sí requiere el ácido pantoténico o uno de sus componentes. Por otra parte Karabinos & Dicken demostraron que el ácido nicotínico era esencial para el crecimiento de esta bacteria.

La necesidad de Vitamina B₁ (o de agua de levadura) para las bacterias acéticas empleadas en la fermentación del sorbitol fue demostrada por Palei.

CAPITULO III

Materiales y Métodos Químicos y Bacteriológicos

Características de la Cepa Empleada

En los ensayos efectuados se empleó una cepa clasificada como Acetobacter ascendens por Porcel & Porcel, no habiéndose efectuado ensayos de identificación para confirmar esta clasificación.

Esta cepa, designada con el N°119, fue gentilmente suministrada por el Ing. Agrónomo S. Soriano, y su elección se debe a ciertas ventajas que ofrece para este trabajo, a saber:·

- a.- No forma ácido a partir de las sustancias hidrocarbonadas (Henneberg, Hermann & Neuschel, Porcel & Porcel).
- b.- Resistencia a altas concentraciones de alcohol (12%) y de ácido (9%).
- c.- No sobre-oxida en presencia de gran cantidad de ácido.
- d Para los primeros trabajos ofrecía la comodidad de una película lo suficientemente estable como para poder cambiar el líquido sobre el cual flotaba.

El Acetobacter ascendens fué aislado por Henneberg en 1898 desde vinos turbios, siendo una característica

de esta cepa enturbiar el medio.

Forma una película delgada y ascendente, llegando a subir hasta aproximadamente 10 cms. por las paredes del recipiente.

En el vino se presenta como pequeñas bacterias, ya sea aisladas o unidas de a pares en una típica formación de 8 alargado.



Acetobacter ascendens (Henneberg).
1500 A

En otros medios, tales como agua de levadura glucosada, agua de levadura y macerado de maíz y sobre agar de estos dos medios se forman, además de las formas anteriores, otras de involución en forma de clavos, con ramificaciones, de largos filamentos y formas

que se aproximan a cocos.

El tamaño de las células normales varía entre 1,8 a 2 μ . No son móviles y no se colorean con iodo. Los cultivos jóvenes son Gram negativos. Su temperatura óptima es de 31°C, la máxima de 44°C y la mínima de 10°C.

Preparación de los Medios empleados

Con el objeto de facilitar la exposición del trabajo efectuado se detalla a continuación la forma en que se prepararon los diversos medios empleados para cultivar las bacterias o para efectuar los ensayos de fermentación.

1.- Agua de levadura glucosada. Se autolizan 200 gramos de levadura prensada durante 48 horas a 50°C. Luego se agregan 1000 ml. de agua corriente, se filtra por papel, se lleva a pH7 y después de agregar 2% de glucosa y 0,025% de cistina (según indica Prechel) se esteriliza a 110°C durante 30 minutos.

2.- Agar de agua de levadura glucosada.
Se prepara agregando 2% de agar al medio anterior.

3.- Vino clarete pasteurizado. El vino se pasteuriza mediante calentamiento en estufa de 80°C durante 30 minutos, enfriándolo después. Las características de este medio son:

Alcohol:	8,3%	Acidez:	aprox. 0,8 ml
pH	: 3,6		de NaOH N/10
			por ml.

4.- Agar de agua de levadura glucosada y macerado de maiz. Se prepara mezclando cantidades iguales de agar de agua de levadura glucosada y de macerado de maiz.

a) Se autoliza levadura preensada durante 48 horas a 50°C y luego se la diluye con igual volumen de agua corriente. Se filtra por papel, se lleva a pH 7, se agrega 2% de glucosa y 5% de agar y se esteriliza a 120°C durante 20 minutos.

b) Se colocan 700 gr. de maiz con 1 lt. de agua corriente a macerar con 10 ml. de cloroformo (para evitar el desarrollo de microbios) durante 4 ó 5 días en estufa de 50°C. Cada 24 horas se cambia el maiz y se lleva el líquido nuevamente a 1 lt. con agua. Al terminar la maceración se filtra el líquido resultante por papel y luego se esteriliza por filtro Seitz. Antes de emplearse se coloca durante 48 horas a 37°C o 24 horas a 50°C para eliminar el cloroformo.

Se mezclan cantidades iguales de a) y de b) dentro de un recipiente estéril, cuidando que la temperatura del agar no pase de 60°C para evitar la coagulación del macerado de maiz.

5.- Vino tinto 2 partes; Agua corriente 1 parte: Pasteurizado. Se diluye el vino en las proporciones indicadas y se lo pasteuriza mediante inmersión del recipiente en agua hirviente durante 10 minutos, seguido por enfriamiento rápido.

Características del medio:-

Alcohol: 7,3% Acidez total: 4,62%
pH : 4,6 (en tartárico)
Cenizas: 2,6g/lit. Acidez volat: 0,66%
(en acético)

6.- Solución Salina A. Una solución acuosa esterilizada de las siguientes

sales:	g/lit
SO ₄ Mg. 7H ₂ O	0,98
PO ₄ HNa ₂ . 12H ₂ O	2,86
ClK	2,98
Cl ₂ Ca	0,33
Cl ₃ Fe	0,016
(SO ₄) ₄ Al ₂ K. 24H ₂ O	0,0494
SO ₄ Mn. 4H ₂ O	0,022
ClNa	11,7

7.- Solución Salina B. Una solución acuosa esterilizada de las siguientes sales:

	g/lit
PO ₄ HK ₂	0,835
Cl ₂ Ca	0,246
SO ₄ Mg. 7H ₂ O	0,715
SO ₄ K ₂	0,314
Tartrato de K	2,51

El pH de este medio era 4,4.

8.- Extracto en Alcohol Etílico 95° de Vino desecado. Se evapora el vino (Medio N°3, pag.12) hasta sequedad en vacío (30°-40°C), se extrae el residuo con una cantidad de alcohol etílico 95% igual al 8% del volumen del vino que se evaporó y se esteriliza por filtro Seitz.

Al agregar un 8% de esta solución al agua se tiene una solución de alcohol al 8% que tiene además las sustancias extraídas en la misma concentración con que se encuentran en el vino.

9.- Vino calentado. Se emplearon dos tratamientos distintos en el calentamiento del vino.

a) Se hierve el Medio N°3 durante 30 minutos, se lleva a su volumen inicial con agua y luego se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Una vez frío se agrega 8% de alcohol. El líquido resultante tiene un pH de 2,2 y una acidez equivalente a 9,04 % de ácido tartárico.

b) Se cierra el Medio N°3 en ampollas de vidrio y se calientan a 120°C durante 20 minutos en autoclave. El pH final es 3,5 y la acidez corresponde a 4,64 % de ácido tartárico.

10.- Agua de levadura 1:1. Se autoliza levadura prensada durante 48 horas a 50°C y luego se diluye con igual volumen de agua corriente. Después de filtrar por papel se neutraliza y se esteriliza a 110°C durante 30 minutos.

-0-

Métodos de Análisis y Reactivos

Determinación de la acidez.- En los primeros ensayos la acidez se determinó sobre 1 ml. de medio filtrado por algodón para separar los restos de película y diluido con agua caliente exenta de anhídrido carbónico.

Empleando como indicador a la fenolftaleína se titula con hidróxido de sodio N/10. El viraje de la fenolftaleína está precedido por él de las materias

colorantes del vino, lo cual permite una titulación rápida hasta este punto.

En las experiencias en las cuales se determinó además el contenido de acetaldehído se tituló la acidez directamente sobre la muestra a destilarse para aquella determinación, tal como se detalla a continuación. En estos casos se calculó la acidez total considerándola como si fuera debida exclusivamente a ácido acético.

Determinación de Acetaldehído.- Para la determinación de la formación o consumo de aldehído acético durante el proceso de fermentación se empleó una modificación del método de Tomoda, reducida a semi-micro método debido a la pequeña cantidad de sustrato disponible.

Este método se vale de la titulación iodimétrica a pH 8 del sulfito combinado al aldehído pues a este pH la combinación bisulfítica está ligeramente disociada.

Durante los primeros ensayos del macro-método, modificado por Jaulmes & Espezel, se pudo observar que en el destilado de vino existía cierta sustancia o sustancias que reducían al iodo a pH 7-8, pero no en la zona ácida, introduciendo así un error pues el método se vale de la estabilidad de la combinación bisulfítica en medio ácido para destruir las sustancias que puedan interferir.

Puesto que ensayos en blanco demostraron que esta sustancia no era el

acetaldehído ni el alcohol se decidió eliminarla, directamente despues de recibido el destilado en el buffer de pH 7 con solución de bisulfito, mediante el agregado de un pequeño exceso de iodo aproximadamente N/5, volviendo luego a agregar solución de bisulfito de sodio para luego dejar reposar por lo menos 30 minutos para asegurarse la formación completa del compuesto bisulfítico.

La determinación consta de cuatro etapas:-

- a) Destilación - desde una solución de ácido fosfórico, recogiendo en solución buffer de pH 7 con bisulfito de sodio.
- b) Oxidación con solución de iodo y agregado posterior de bisulfito de sodio.
- c) Reposo - a pH 7 para que se forme la combinación bisulfítica entre el aldehído y el bisulfito de sodio.
- d) Titulación. Previa destrucción del exceso de bisulfito de sodio en medio ácido, se descompone la combinación bisulfítica a pH 8 y se titula al bisulfito desprendido con solución de iodo.

a) Destilación.- Se empleó un aparato de destilación con las características que indica la Figura 1 (pag.18).

La muestra extraída esterilmente desde el frasco de fermentación se pasa a un tubo de ensayo, desde el cual se toma la cantidad requerida con pipeta de doble aforo. Para contenidos de acetaldehído hasta 2% se toman 5 ml. de muestra

FIGURE 1

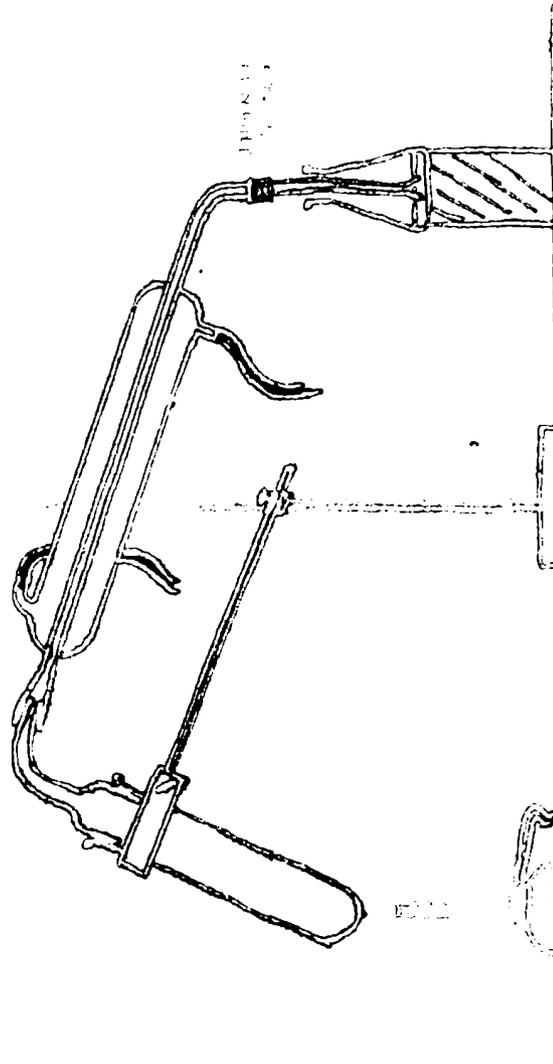


FIGURE 1

de 2% a 4% se toma 2 ml. y para concentraciones superiores a 4% se destila 1 ml de muestra convenientemente diluido.

La cantidad correspondiente se coloca en el tubo de destilación y previo agregado de solución alcohólica de fenolftaleína se titula con hidróxido de sodio N/10 cuando hay poca formación de ácido y con hidróxido de sodio N/1 en los casos de mucha acetificación (pues sino el volumen a destilar sobre-pasa la capacidad del tubo de destilación) hasta color rojo de fenolftaleína.

A la muestra neutralizada se le agrega polvo de piedra pomez y 5 a 6 gotas de ácido fosfórico (85%) y luego se la destila a casi sequedad, recogiendo el destilado en un frasco Erlenmeyer, de aproximadamente 150 ml. de capacidad y con tapón esmerilado, en el cual hay 10 ml. de solución Buffer de pH 7 (Reactivo N°1 pag.21) y 3 ml. de solución de bisulfito de sodio (Reactivo N°2, pag.21). Cuando hay gran cantidad de ácido en el líquido que se destila se agrega al Buffer una cantidad de hidróxido de sodio igual a la acidez volátil de la muestra.

Una vez que se ha terminado la destilación se lava el interior del refrigerante con unos pocos mililitros de agua destilada, recogidos en el Erlenmeyer.

b) Oxidación con iodo.- Se agrega solución de iodo aproximadamente N/5 hasta color amarillo, agregando luego de 3 a 5 ml. de solución

de bisulfito de sodio (de acuerdo con la cantidad de acetaldehido que se encuentre presente y en forma de que haya un buen exceso al finalizar el periodo de reposo)

c) Reposo.- Se tapa el Erlenmeyer, se agita vigorosamente y se deja reposar para que se forme el compuesto bisulfítico. Janke & Kropacsy (2) recomiendan 20 minutos de reposo, pero se adoptó el sistema de dejar por lo menos 30 minutos. Debido a las exigencias del trabajo en muchas ocasiones se dejó en reposo hasta el día siguiente.

d) Titulación.- Completado el periodo de reposo se agregan 20 ml. de agua destilada y 2 ml. de solución de ácido clorhídrico (Reactivo N°3, pag. 21), agregando luego rápidamente una solución de iodo aproximadamente N/5 hasta color amarillo para destruir el exceso de bisulfito (en medio ácido la combinación bisulfítica es muy estable).

Previo agregado de almidón soluble se elimina el exceso de iodo con una solución de tiosulfato de sodio N/10.

Empleando la misma solución de iodo que se ha de emplear en la titulación del bisulfito liberado (N/20 ó N/100), se lleva el color de la solución a un azul pálido y luego se agrega un exceso (más o menos 10 gr.) de bicarbonato de sodio sólido, cuidando que la efervescencia producida no ocasione pérdidas de líquido.

En el caso de haber aldehído en la muestra, desaparecerá el color.

azul e inmediatamente se agrega solución de iodo N/100 ó N/20 en forma de que siempre haya un pequeño exceso de iodo en el líquido. El punto final se toma cuando el color violeta azulado persiste durante medio minuto.

El cálculo de acetaldehído se hace en consideración de que 1 ml. de solución de iodo N/100 equivale a 0,00022 gr. de acetaldehído y que 1 ml. de solución de iodo N/20 equivale por consiguiente a 0,0011 gr. de acetaldehído.

Reactivos.- En las determinaciones anteriores se emplearon los siguientes reactivos:-

- 1.- Solución Buffer pH 7: 3,36 gr de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ y 7,45 gr. de $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en un litro de agua destilada.
- 2.- Solución de bisulfito de sodio: Se prepara disolviendo 18,9 gr de sulfito de sodio anhidro ó 37,8 gr de sulfito de sodio con siete moléculas de agua en un litro de agua destilada con 150 ml. de ácido sulfúrico normal.
- 3.- Solución de ácido clorhídrico: Se disuelven 250 ml. de ácido clorhídrico concentrado en un litro de agua destilada.
- 4.- Solución de hidróxido de sodio N/10.
- 5.- Solución de hidróxido de sodio N/1
- 6.- Solución de iodo aproximadamente N/5

- 7.- Solución de iodo N/20.
- 8.- Solución de iodo N/100, preparada en el momento de usar mediante dilución de la solución de iodo N/20.
- 9.- Solución de tiosulfato de sodio aproximadamente N/10.
- 10.- Solución de almidón soluble 0,2%.
- 11.- Solución alcohólica de fenolftaleína.
- 12.- Acido fosfórico (85%)
- 13.- Bicarbonato de sodio.

oOo

CAPITULO IV

Influencia de Diversas Tensiones de Oxígeno sobre la Fermentación del Vino por el Acetobacter ascendens

Con el objeto de tratar de establecer la concentración óptima de oxígeno para la fermentación acética se estudió el efecto de diversas mezclas de oxígeno con anhídrido carbónico o nitrógeno sobre la formación de ácido acético.

Se empleó para este fin la cepa de Acetobacter ascendens (Nº119) suministrada por Ing. Agrónomo S. Soriano y cuyas características se detallan en la página 10.

La cepa se conservó en estrias de agar de agua de levadura glucosada con cistina (Medio Nº2, pag.12) y mediante repiques sucesivos se emplearon bacterias de 48 horas para que el estado del material empleado fuera uniforme, según el método empleado por Tösis & Walker.

Antes de iniciar las experiencias se ensayaron diversos substratos como ser agua de levadura glucosada con cistina (Medio Nº1, pag.12) con 2% de alcohol etílico; cerveza; y vino clarete pasteurizado (Medio Nº3, pag.12), obteniéndose los mejores resultados con el vino pasteurizado, puesto que en los otros medios no se forma bien la película característica, y por esta razón todas estas experiencias se realizaron sobre este substrato.

Forma de Trabajo

Se emplearon dos métodos de siembra. En el primero (Sistema A) se flota un ansa de película sobre 50 ml de vino pasteurizado contenidos en un Erlenmeyer de 150 ml. de capacidad, y se incuba a 28-30°C. La película que se siembra se obtiene desde tubos de ensayo con vino que se siembran 4 días antes por suspensión de un ansa de bacterias desde agar de levadura glucosada con cistina.

Dado que con esta forma de sembrar la película no crece bien en todos los casos, se procedió de la siguiente forma para lograr una mayor uniformidad entre los diversos ensayos (Sistema B):

En frascos Erlenmeyer estériles de 150 ml. (los que se emplearon fueron todos de la misma forma, marca Jena, para tener la misma relación de superficie a volumen) se colocan 10 ml. de vino, cantidad que apenas cubre el fondo, y dentro de éstos se suspende un ansa lleno de bacterias.(°)

A los cuatro días de incubación a 28-30°C casi todos los Erlenmeyer tienen una buena película ascendente que a veces llega casi hasta el tapón de algodón.

(°) Si la cantidad de medio es grande y las bacterias pocas, éstas se sedimentan dando formas de involución.

Se desechan los frascos que no tienen película o en los cuales no está bien formada, y a los restantes se les quita cuidadosamente todo el líquido con una pipeta esteril, tratando en lo posible de no dañar la película. A continuación se introducen 50 ó 75 ml. de vino por debajo de la película en forma de que ésta flote sobre ellos.

Desde este momento el frasco debe manipularse con sumo cuidado, puesto que la película se rompe con facilidad.

Cuando la siembra se efectúa por el sistema A se procede inmediatamente a cambiar el tapón de algodón por uno de caucho con tubos de vidrio (previamente esterilizado) como indica la Figura 2 (pag.26) y se hace pasar la mezcla gaseosa correspondiente.

Cuando se emplea el sistema B de siembra el cambio de tapones se efectúa después de introducir el nuevo substrato.

En el caso de estudiar la fermentación en aire se deja el tapón de algodón, puesto que ensayos con circulación forzada de aire dieron los mismos resultados que con tapón de algodón.

En algunos casos se efectuó la fermentación en frascos Erlenmeyer de 1 litro de capacidad y con 300 ml. de vino, sembrando en estos casos por el sistema B sobre 20 ml. de vino.

Con 50 ml. y 75 ml. en frasco

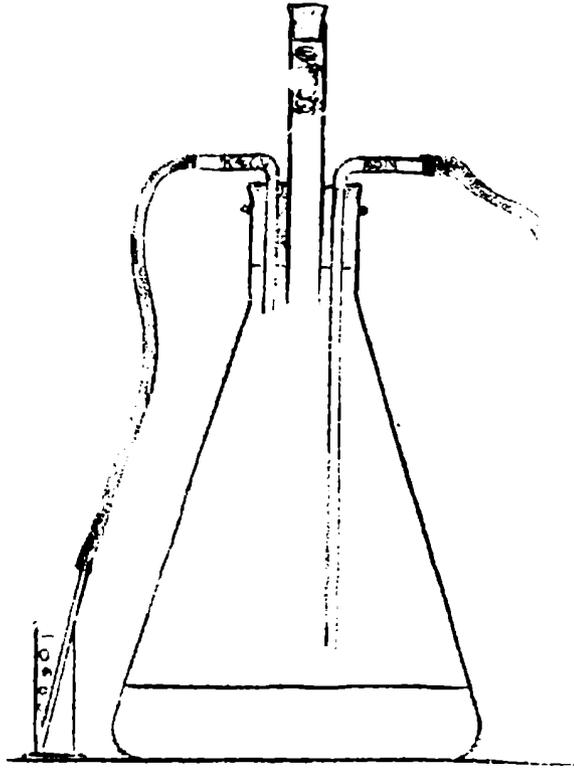


Figura 2

de 150 ml. la capa de líquido es de aproximadamente 2 cms. y 3 cms. respectivamente; con 300 ml. de medio en frasco de 1 litro el espesor de la capa líquida es de aproximadamente 3,5 cms.

Para asegurar la constancia de la composición del ambiente gaseoso se hace pasar constantemente a la mezcla de gases a través de los frascos a razón de 3 a 4 burbujas por minuto.

La muestra se retira quitando el tapón de caucho del tubo central, sacando el taponcito de algodón mediante un hilo al cual está atado, flameando previamente el tubo y sacando 2 ml. con una pipeta esteril, flameando nuevamente y reponiendo los dos tapones. Finalmente se hace pasar por un rato una corriente fuerte de mezcla gaseosa para desalojar al aire que pudiera haber entrado al frasco. Durante todo este proceso el frasco se mantiene en posición vertical para no dañar la película.

Los dos mililitros retirados se filtran por un pequeño embudo con algodón para eliminar los restos de película y del filtrado se retira 1 ml. con pipeta de doble aforo para determinar su acidez.

La provisión de la mezcla gaseosa se aseguraba mediante presión hidráulica ejercida en una damajuana de veinte litros mediante un sifón desde otra damajuana superior como indica la Figura 3 (pag. 28).

Para cargar la damajuana B con

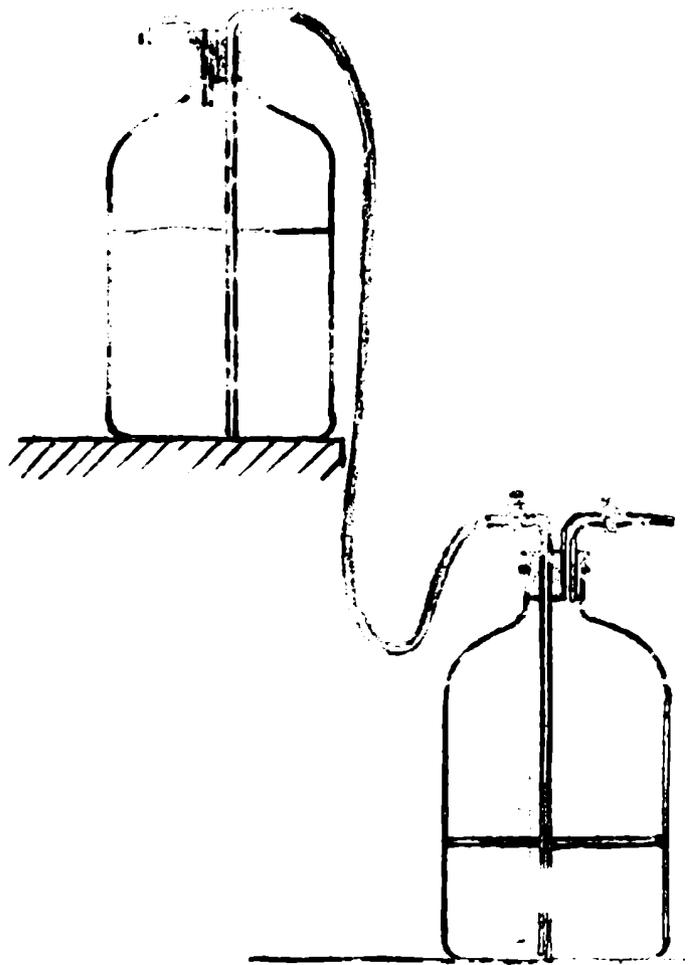


Figura 3

con la mezcla deseada se la llena completamente con agua y luego, pasando el frasco A a un nivel inferior, se hace entrar uno de los componentes de la mezcla en la cantidad deseada (efectuando la lectura con las superficies líquidas a un mismo nivel).

En la misma forma se carga el otro componente y luego mediante la colocación de la damajuana A sobre la B se tiene la mezcla gaseosa con una presión que depende de la diferencia de nivel.

Experiencias Realizadas

Se efectuaron experiencias en aire y con oxígeno puro. Además se emplearon mezclas de oxígeno y anhídrido carbónico con las siguientes concentraciones de oxígeno: 75%, 50%, 25% y 10% y una mezcla de 25% de oxígeno con 75% de nitrógeno.

Las experiencias se siguieron durante periodos de 15 a 45 días a 28-30°C, sacando muestras a intervalos convenientes.

Los datos consignados en las tablas y gráficos que siguen se refieren a mililitros de solución de hidróxido de sodio N/10 requeridos para neutralizar a la fenolftaleína un mililitro del medio fermentado.

Experiencias en Aire.- En el Gráfico I (pags. 31 y 32) se presentan los resultados de las experiencias N°1^a, 2^a, 5^a y 6^a en las cuales se empleó el Sistema A de siembra sobre 50 ml. de vino. La película ascendente apareció al 3er y 4o. día.

En el Gráfico II (pags. 33 y 34) se encuentran los datos referentes a las experiencias N°3, 11, 32 y 42 que se efectuaron todos con película pre-formada (Sistema B).

Las experiencias N°3 y 42 se efectuaron sobre 50 ml. de medio, el N°11 sobre 75 ml. y el N°32 sobre 300 ml

Las formas de las curvas son todas semejantes, mostrando un periodo inicial de poca acetificación seguida por otro en el cual hay mucha formación de ácido. En los casos en que se emplea película pre-formada con poco líquido el primer periodo se reduce hasta desaparecer (Exp. N°3 y 42, Gráfico II).

El segundo periodo dura aproximadamente 6 días (desde el comienzo de la gran acetificación) y después de éstos la formación de ácido es pequeña. A partir del día 25 el frasco N°3 tenía muy poco líquido, lo cual quizás explica la fuerte acidificación observada.

En la mayoría de los casos la acidificación prácticamente se ha completado al 10° día, no observándose casos de sobre-oxidación. Las excepciones son las experiencias con mayor volumen y espesor de la capa líquida, en las
(sigue pag.35)

Gráfico I

Experiencias en Aire. Siembra sistema A

Día	1 ^a	2 ^a	5 ^a	6 ^a
0	0,9	0,9	0,7	0,7
1	-	-	0,74	0,72
2	0,9	0,9	-	-
3	1,5	0,91	x3,74	x3,05
4	x -	x -	8,18	6,13
5	5,3	2,07	11,15	9,52
6	9,35	6,05	12,06	10,73
7	12,05	8,82	12,16	11,1
8	-	-	12,3	11,68
9	14,6	11,1	-	-
10	15,3	12,5	12,3	11,68
11	15,7	14,05	-	-
12	15,8	14,4	-	-
13	15,9	14,6	-	-
14	-	-	12,3	11,8
15	-	-	12,6	11,82
16	15,95	15,15	-	-
17	16,22	15,2	12,6	12,05
18	16,3	15,45	12,69	12,05
19	16,4	15,53	12,72	12,05
20	16,5	15,53	12,87	12,2
21	16,65	15,81	-	-
22	-	-	-	-
23	16,93	16,31	-	-
24	17,2	16,56	-	-

x Día en que apareció la película ascendente.

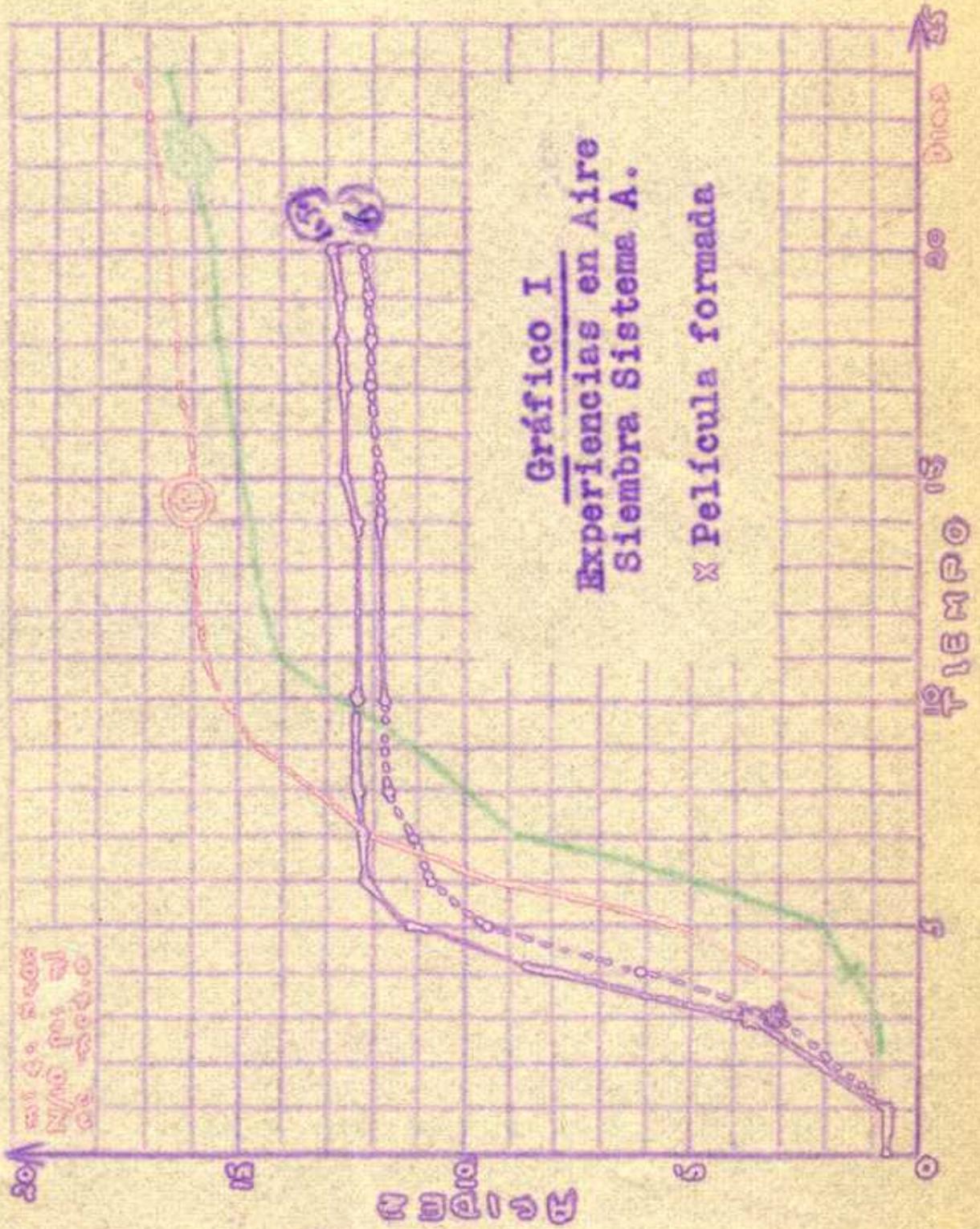
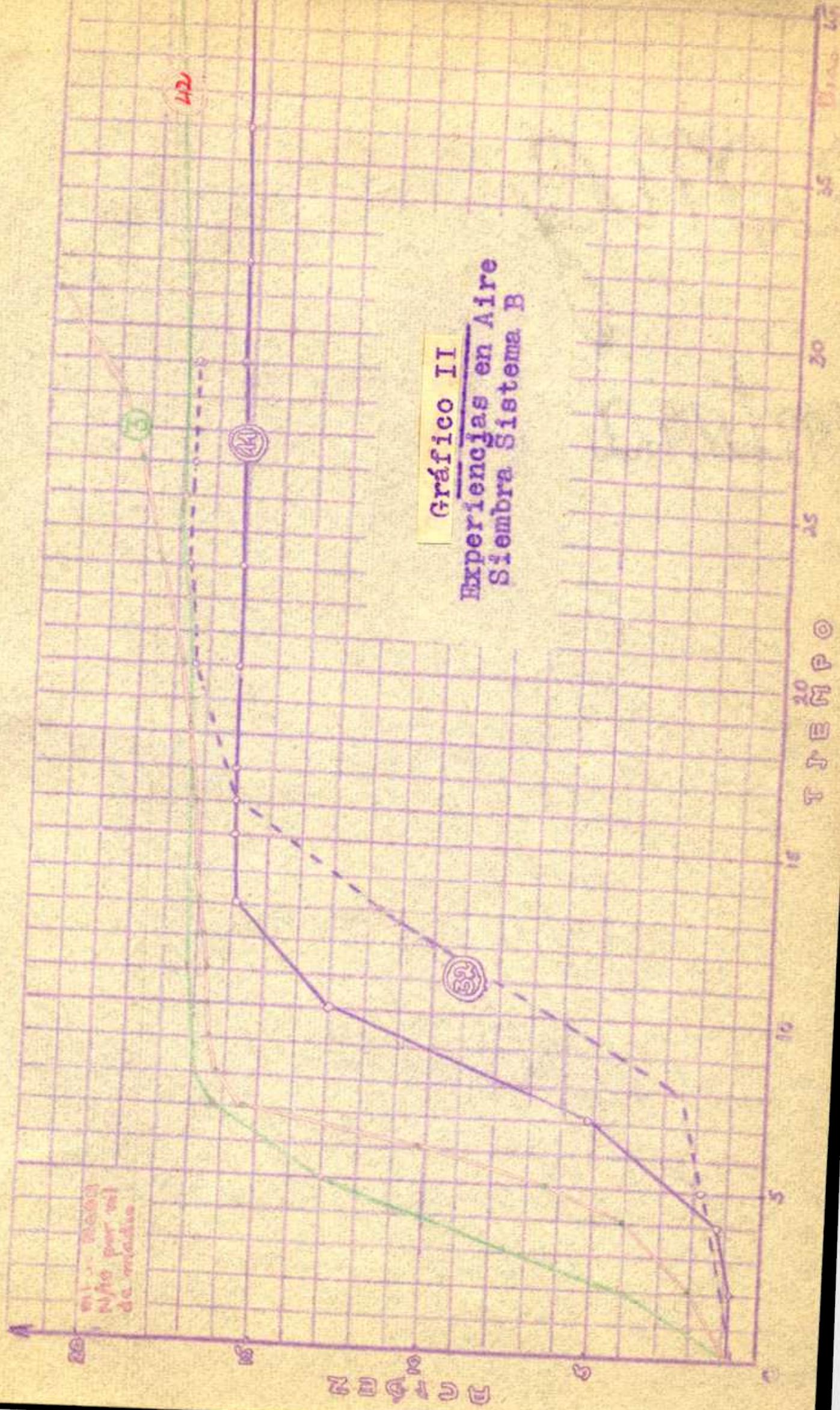


Gráfico I
Experiencias en Aire
Siembra Sistema A.
x Película formada



cuales las curvas de acetificación se encuentran desplazadas.

Se observan datos de acidez equivalentes a ácido acético en concentraciones de 7 a 12%.

Experiencias en Oxígeno.- En el Gráfico III (pags. 36 y 37) se anotan los resultados de las experiencias N°1', 2', 3" y 4", que eran ensayos preliminares efectuados por siempra directa (Sistema A).

En estos ensayos se nota una disminución notable en la formación de ácido acético y un gran atraso en la formación de la película característica, que recién aparece al 14° y 17° día.

La forma de las curvas también es muy distinta a la de las curvas en aire.

Se nota desde ya la formación de un olor aromático (debido a aldehído y ácido acético), aunque en distintos tiempos de fermentación. Estas cuatro experiencias se efectuaron con 50 ml. de vino.

En experiencias posteriores con película pre-formada se confirmó la disminución del rendimiento en ácido acético y la presencia del olor mencionado. En el Gráfico IV (pags. 38 y 39) se presentan los resultados de las experiencias N°7 y 8 (con 50 ml. de vino) y de las N°16 y 51 (con 300 ml. de vino).

Experiencias efectuadas con

Gráfico III

Experiencias en Origeno. Siembra sistema A

Día	1'	2'	3"	4"
0	0,7	0,7	0,9	0,9
1	0,75	0,7	"	-
2	-	-	0,9	0,9
3	0,98	0,75	0,95	0,95
4	0,98	0,79	"	-
5	1,05	0,81	1,15	1,2
6	1,2	0,86	1,3	1,3
7	1,3	0,94	1,45	1,5
8	1,6	0,96	-	-
9	-	-	1,72	1,67
10	1,75	1,35	1,88	1,9
11	-	-	2,0	2,0
12	-	-	2,4	-
13	-	-	2,75	2,45
14	x2,9	x1,9	-	-
15	3,3	2,12	-	-
16	-	-	4,7	4,3
17	4,65	2,57	x5,35	x4,6
18	5,2	2,85	5,8	4,9
19	6,1	3,31	5,85	5,23
20	°6,4	°4,05	6,7	5,58
21	-	-	8,95	6,2
22	-	-	-	-
23	-	-	11,65	6,5
24	-	-	12,5	7,1
25	-	-	12,85	8,1

x Día en que apareció la película ascendente

° Olor aromático

Gráfico III
 Experiencias en Oxígeno
 Siembra Sistema A.

x Película formada
 → Clor aromático

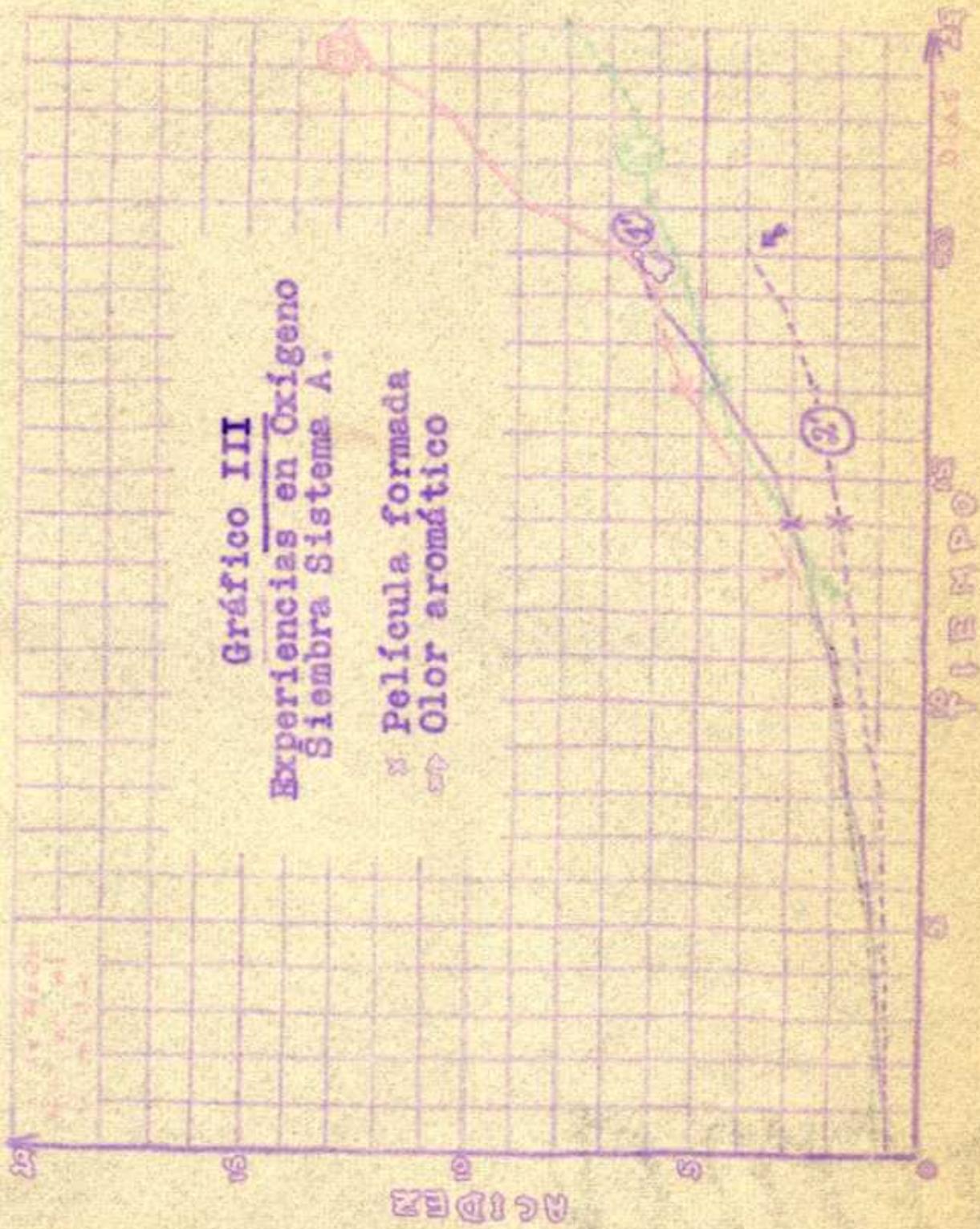
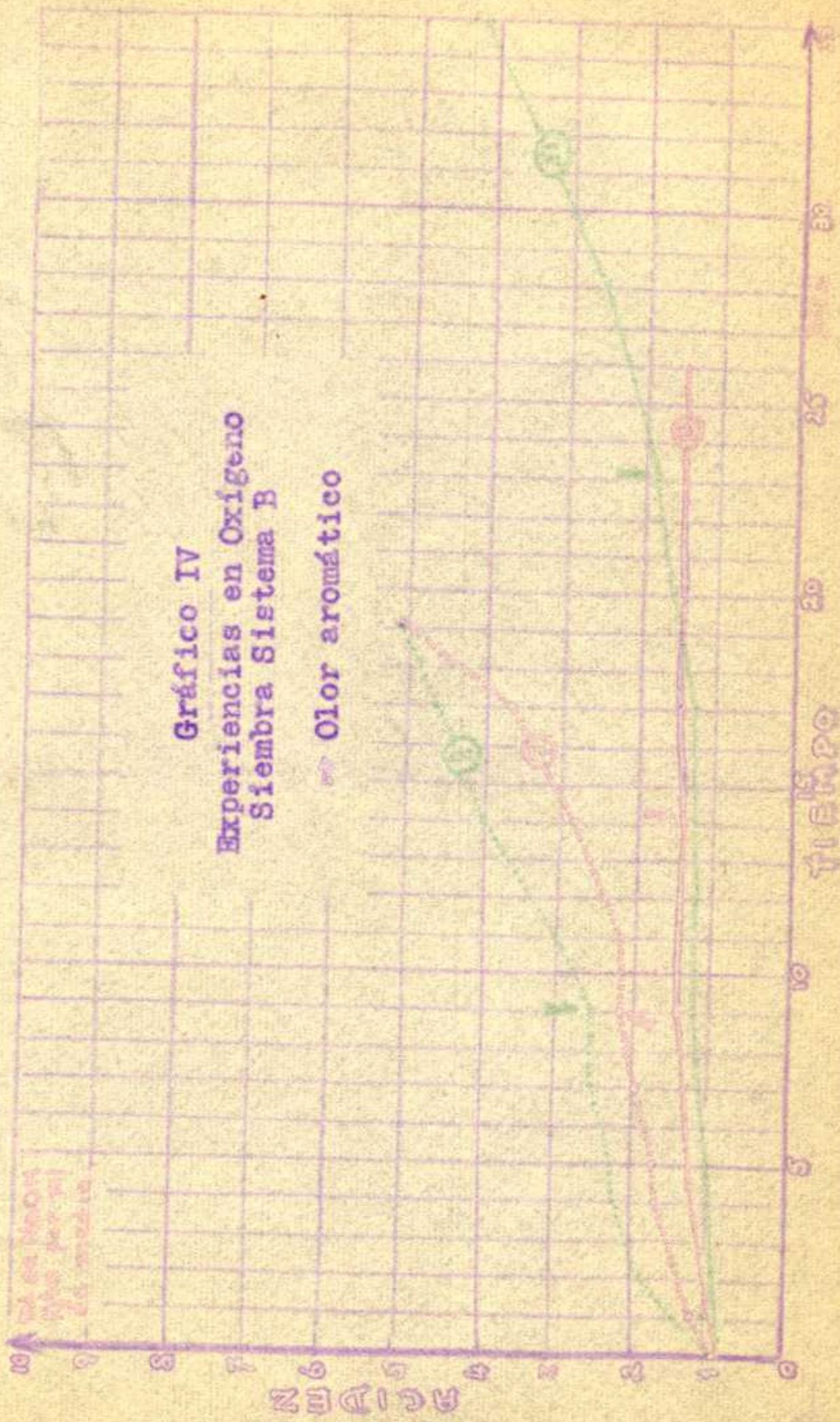


Gráfico IV

Experiencias en Oxígeno. Siembra sistema B

Día	7	8	15	51
0	0,8	0,8	0,8	0,8
1	1,19	1,4	-	-
2	-	1,85	-	-
3	-	-	-	-
4	1,68	2,2	-	-
5	1,68	2,27	1,2	1,0
6	-	-	-	-
7	1,93	2,5	-	-
8	-	-	-	-
9	°2,13	°2,53	1,4	1,2
10	-	-	-	-
11	2,13	3,0	-	-
12	-	-	-	1,2
13	-	-	-	-
14	2,82	4,0	°1,4	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	3,65	4,64	-	1,3
18	-	-	-	-
19	5,11	5,15	1,45	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	-	-	-	°1,8
25	-	-	-	-
26	-	-	-	-
27	-	-	1,45	-
28	-	-	-	-
29	-	-	-	2,55
30	-	-	-	-
31	-	-	-	-
32	-	-	-	-
33	-	-	-	-
34	-	-	-	-
35	-	-	-	4,15

° Olor aromático.



vino en oxígeno (sin bacterias) mostraron que no hubo variación de acidez ni aparición del olor a acetaldehído mientras duraron las experiencias (30 y 35 días)

25% Oxígeno y 75% Anhídrido Carbónico. -

Si bien las curvas tienen forma semejante a las de las experiencias en aire, los valores de acidez alcanzados son inferiores a los obtenidos en aire y se tarda más en alcanzar la meseta de la curva.

Las experiencias N°12 y 13 en el Gráfico V (pags. 42 y 43) se efectuaron con película preformada (sistema B) sobre 75 ml. de vino.

La acidez a partir del 25° día se mantiene en los alrededores del 6% de ácido acético.

Un hecho notable es que los medios estaban aún claros en el 35° día a diferencia de lo que comúnmente ocurre en la fermentación con *Acetobacter ascendens*.

25% Oxígeno y 75% Nitrógeno. - Las experiencias N°33 y 34 en el Gráfico V (pags. 42 y 43) dan curvas muy semejantes en su forma a las obtenidas con 25% Oxígeno y 75% Anhídrido carbónico si bien los valores finales de acidez de estas dos experiencias son algo distintas.

Las experiencias se efectuaron con 50 ml. de medio con película preformada (Sistema B), v, como las expe-

riencias consideradas anteriormente, tampoco dieron olor a acetaldehído.

50% Oxígeno y 50% Anhídrido Carbónico - Las experiencias con partes iguales de oxígeno y anhídrido carbónico evidencian mayor inhibición de la acetificación y acumulación de acetaldehído, que dió lugar a un fuerte olor al 18° y 23er. día.

Las curvas N°1 y 2 del Gráfico V (pags. 42 y 43) se refieren a ensayos con 50 ml. de vino y se asemejan mucho en forma y valores generales a algunas de las experiencias en oxígeno puro.

75% Oxígeno y 25% Anhídrido Carbónico.-

En el Gráfico VI (pags. 44 y 45) se presentan los resultados de las experiencias N° 4, 5, 6, 9 y 15; las primeras tres mencionadas habiendo sido efectuadas sobre 50 ml. de medio y los restantes sobre 75 ml.

Como podrá observarse los valores de acidez son bajos, con excepción de la experiencia N°15 que alcanza una acidez de 5,4% de ácido acético al cabo de 24 días.

Todos dieron olor fuerte a acetaldehído.

10% Oxígeno y 90% Anhídrido Carbónico.-

Las curvas N°27 y 28 del Gráfico VII (pag 46 y 47) muestran que si bien en un principio la menor concentración de oxígeno ejerce un efecto retardador de la acetificación, al final de algún tiempo
(sigue pag. 48)

Gráfico V

Gas:	50% O ₂ ; 50% CO ₂		25% O ₂ ; 75% CO ₂		25% O ₂ ; 75% N ₂	
Dia	1	2	12	13	33	34
0	0,9	0,9	0,8	0,8	0,8	0,8
1	-	-	-	-	-	-
2	0,96	1,43	-	-	0,8	2,9
3	-	-	1,45	2,4	-	-
4	-	1,88	-	-	-	-
5	0,96	2,05	-	-	-	-
6	0,99	2,17	1,75	4,8	-	-
7	1,09	2,6	-	-	1,35	4,9
8	-	-	1,8	6,2	-	-
9	1,19	2,9	-	-	-	-
10	1,27	2,9	1,85	6,95	1,9	4,9
11	1,39	3,05	-	-	-	-
12	1,39	3,1	-	-	-	-
13	1,49	3,15	1,94	7,05	-	-
14	1,58	3,2	-	-	3,5	6,0
15	-	-	-	-	-	-
16	1,78	3,3	1,96	8,9	-	-
17	-	-	-	-	7,4	7,5
18	2,01	3,55	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-
20	2,28	3,8	-	-	8,95	7,7
21	-	-	-	-	-	-
22	-	-	8,31	9,25	-	-
23	-	4,25	-	-	10,07	7,8
24	3,16	4,34	-	-	-	-
25	-	-	10,5	9,35	-	-
26	3,7	4,61	-	-	-	-
27	-	-	-	-	-	-
28	4,65	5,1	10,6	9,5	12,3	7,7
29	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-
31	6,45	6,12	10,8	9,5	13,55	-
32	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-
34	-	-	10,9	9,57	13,75	7,5
35	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-
37	-	-	10,9	9,57	-	-
38	-	-	-	-	13,8	7,5
39	-	-	10,91	9,7	-	-
40	-	-	-	-	-	-
42	-	-	10,96	9,75	13,85	7,5

° Olor aromático

Die 1 die Masse
 sind gas: was
 die binden

Gráfico V

1, 2 : 50% O₂ , 50% CO₂
 12, 13 : 25% O₂ , 75% CO₂
 33, 34 : 25% O₂ , 75% N₂

★ Olor aromático

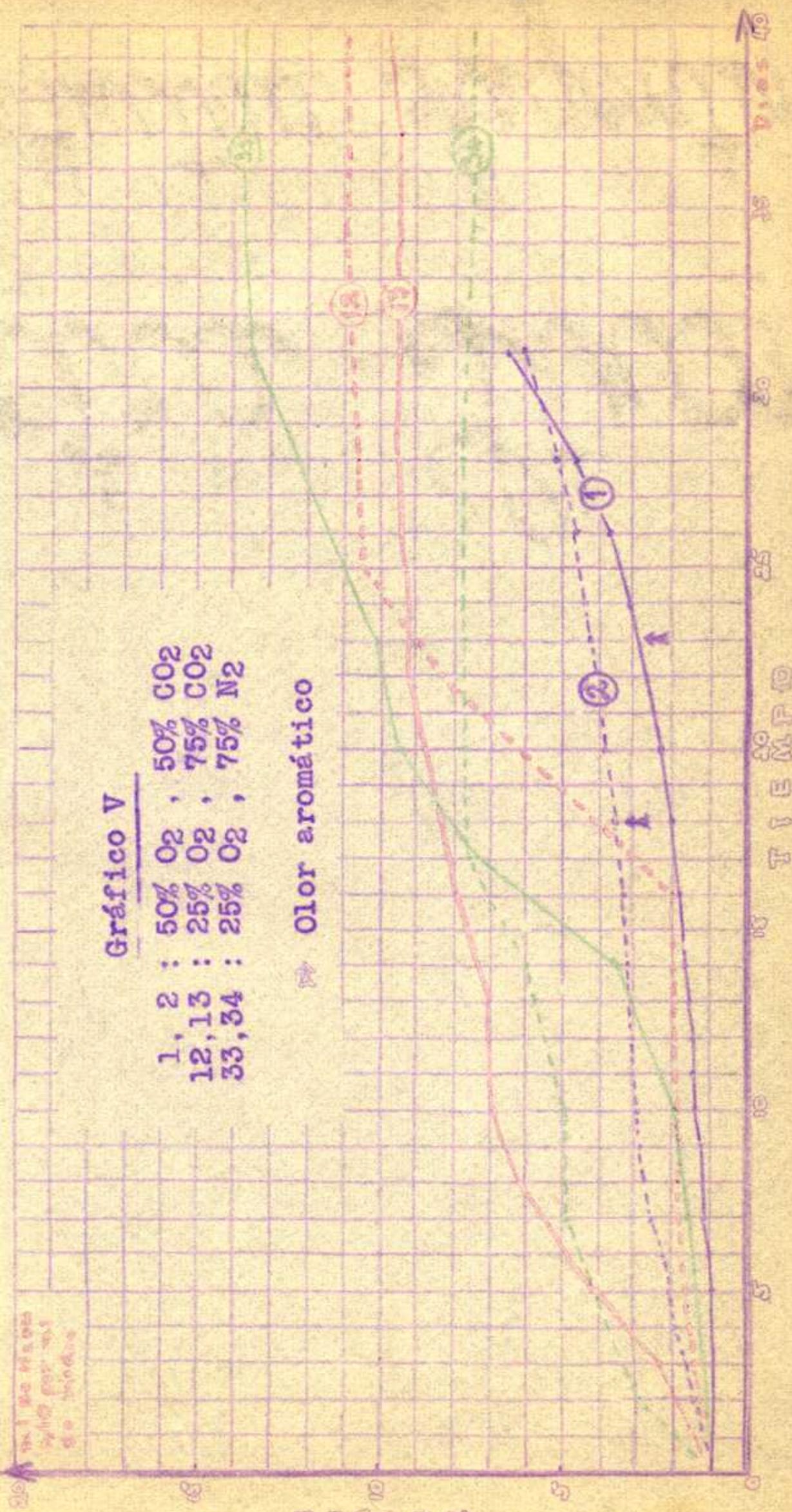


Gráfico VI

Experiencias con 75% O₂ ; 25% CO₂

Día	4	5	6	9	15
0	0,7	0,83	1,04	0,8	0,75
1	1,19	1,5	1,29	-	-
2	1,29	1,9	2,03	1,45	-
3	1,44	2,15	3,07	-	1,1
4	-	-	-	1,65	-
5	1,49	2,35	4,21	-	-
6	1,53	2,45	-	-	1,3
7	1,73	2,7	4,45	1,75	-
8	1,83	-	4,65	-	-
9	1,88	2,85	4,7	-	1,9
10	2,08	-	4,8	1,8	-
11	-	-	-	-	2,35
12	2,33	3,25	5,0	-	-
13	-	-	-	2,05	-
14	2,67	3,42	5,0	-	4,95
15	-	-	-	2,05	-
16	3,17	3,7	5,2	-	-
17	-	-	-	2,2	-
18	-	-	-	-	-
19	4,02	4,3	-	-	-
20	4,2	4,4	5,9	2,35	-
21	-	-	-	-	8,2
22	-	-	-	-	-
23	-	-	-	2,43	-
24	-	-	-	-	9,05

° Olor aromático

Gráfico VI
Experiencias en 75% O₂ , 25% CO₂.

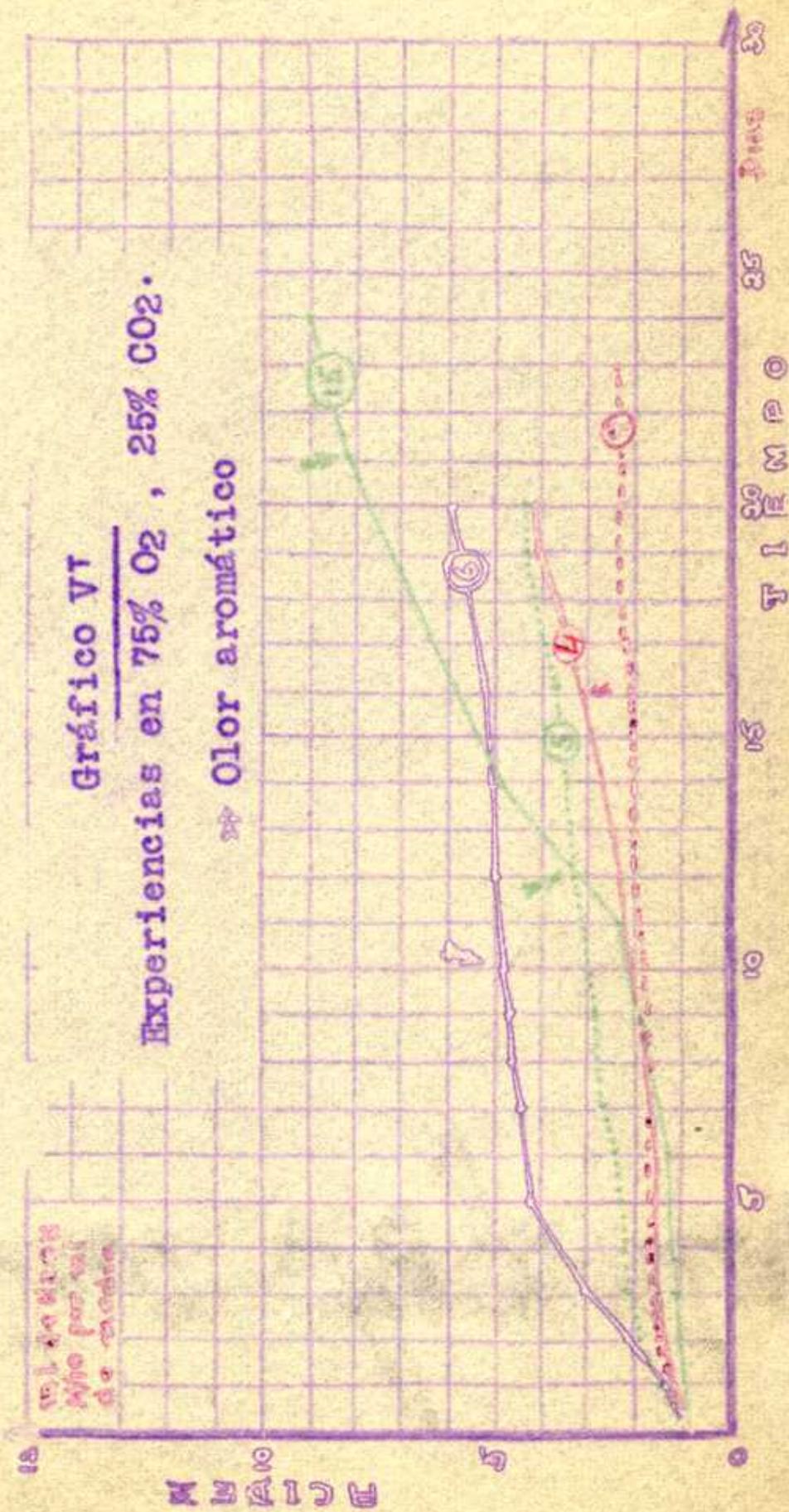
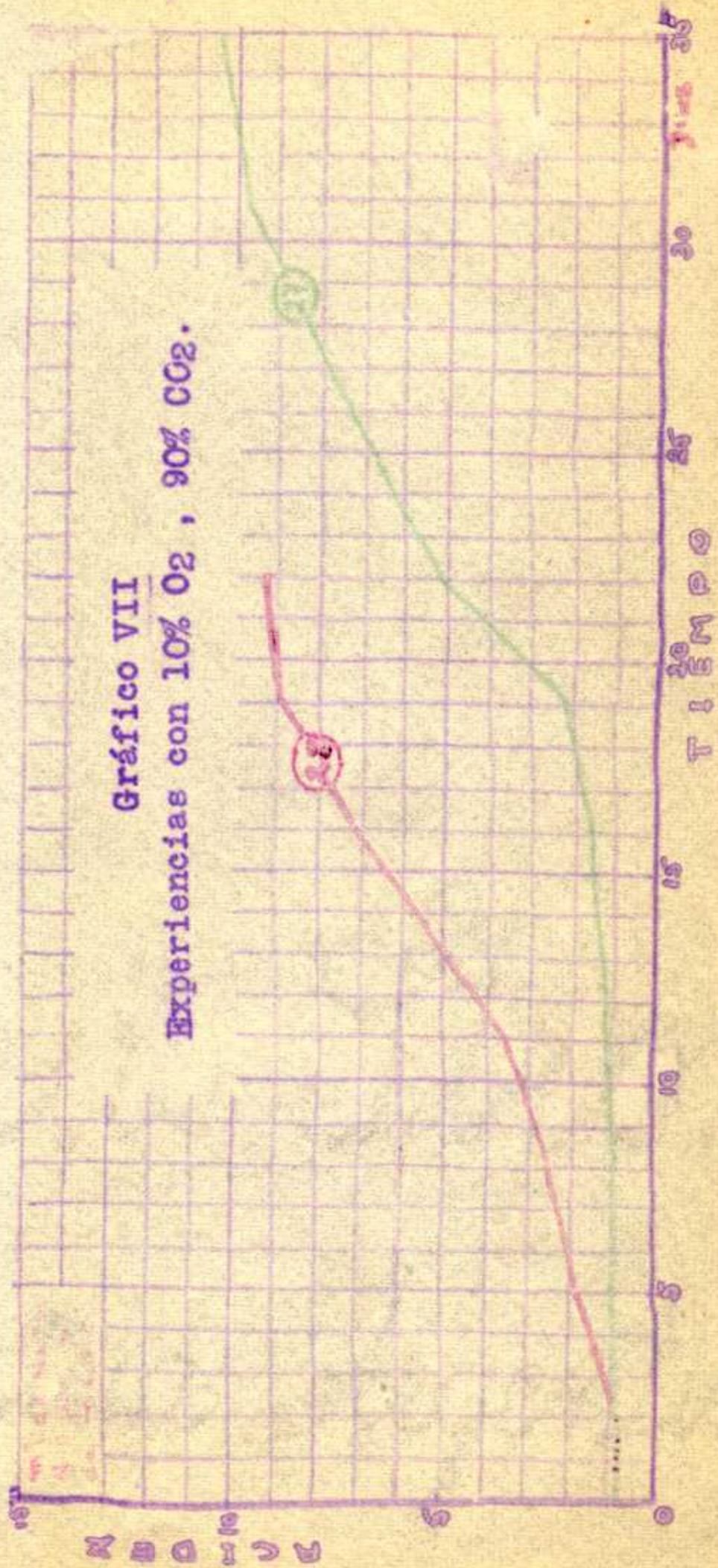


Gráfico VII

Experiencias con 10% O₂ + 90% CO₂

Día	27	28
0	0,8	0,8
1	-	-
2	0,95	0,85
3	-	-
4	-	-
5	0,95	1,65
6	-	-
7	-	-
8	0,95	2,55
9	-	-
10	-	-
11	1,12	3,55
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	1,6	7,1
17	-	-
18	-	-
19	2,05	8,95
20	-	-
21	-	-
22	5,23	9,3
23	-	-
24	-	-
25	-	-
26	7,2	-
27	-	-
28	-	-
29	-	-
30	-	-
31	9,75	-
32	-	-
33	-	-
34	-	-
35	10,4	-

Gráfico VII
Experiencias con 10% O₂ , 90% CO₂.



hay formación de cierta cantidad de ácido acético. Las experiencias se efectuaron sobre 50 ml. de vino y con película pre-formada. No se observó olor a acetaldehído.

Resumen y Comentarios

Se observó que el desenvolvimiento de la fermentación acética en las distintas mezclas gaseosas empleadas no era en ningún caso tan bueno como en el aire.

Una mezcla de 25% de oxígeno y 75% de nitrógeno presenta una curva de acidificación de la forma general de las observadas en aire, pero aún con esta pequeña cantidad adicional de oxígeno el rendimiento era menor y se tarda más en llegar al máximo de acidez.

Con oxígeno puro hay poca producción de ácido y acumulación de acetaldehído; y las curvas muestran una pendiente continua sin las inflexiones características de la curvas de fermentación en aire.

En mezclas de oxígeno y anhídrido carbónico se observa también que cuando la concentración de oxígeno es mayor a la del aire la acetificación es menor, dependiendo la forma general de las curvas de la concentración de oxígeno empleada.

Las experiencias con 25% de oxígeno y 75% de anhídrido carbónico dan curvas y valores semejantes a las experiencias en que se empleó el nitrógeno

para diluir al oxígeno.

Con mayor proporción de oxígeno (50% y 75%) las curvas en general tienen una forma parecida a las de experiencias efectuadas en ambiente de oxígeno y se nota además un olor a acetaldehído que indica que este se ha acumulado en el medio.

Con menor proporción de oxígeno (10%) se observa una disminución del rendimiento y un periodo inicial de poca acetificación que es mayor que la que se observa en el aire, presentando sin embargo las mismas inflexiones en las curvas.

El método empleado padece principalmente de dos inconvenientes: 1° la larga duración de cada experiencia y 2° la dificultad de mantener la constancia de todas las posibles variables durante este periodo.

Además debe tenerse en cuenta la pérdida de tiempo por las experiencias que, una vez iniciadas, no fermentan en forma alguna al substrato a pesar de tener una buena película formada.

Por estas razones se trató de simplificar y acortar el método en forma de obtener datos reproducibles sin gran pérdida de tiempo (ya sea por la duración del ensayo o ya sea por inconvenientes debidos a que las bacterias no fermentan bien).

Para evitar estos inconvenientes y además para determinar la formación de acetaldehído en el medio se empleó más tarde el método descrito en el Cap. VI.

OOO

CAPITULO VInfluencia de Sustancias Químicas
sobre la Fermentación del Vino
por el Acetobacter ascendens

Se efectuaron ensayos con cianuro de potasio, luminal y azul de metileno para determinar sus efectos sobre la formación de ácido durante la fermentación acética.

Las películas se preparan por el sistema B de siembra en la misma forma que en los ensayos con mezclas gaseosas (pag. 24 y 25), introduciendo en este caso 25 ó 50 ml. de vino agregados de la cantidad correspondiente del reactivo en consideración. Los frascos se incubaron a 28-30°C con tapón de algodón.

Experiencias con Cianuro de Potasio

Se efectuaron dos series de ensayos en triplicado, el primero durante 18 días y el segundo durante 27 días.

Para la primera serie se prepararon soluciones estériles de cianuro de potasio en vino con las siguientes concentraciones: M/50, M/100, M/500, M/1.000, M/5.000 y M/10.000, introduciendo 50 ml. de cada una de ellas bajo tres películas de 4 días sobre vino. Al final de 18 días de incubación las concentraciones superiores a M/5.000 no habían variado de acidez, no obstante seguir intacta la película de bacterias.

Los valores de acidez de los frascos que tenían vino con cianuro de

potasio M/5.000 (Experiencias N°72, 73 y 74) y vino con cianuro de potasio M/10.000 (Experiencias N°76, 77 y 78) se presentan a continuación:

Exp.	CNEK M/5.000			CNEK M/10.000		
	72	73	74	76	77	78
Día						
0	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
2	1,3	1,4	0,9	1,0	0,9	0,9
7	16,75	16,4	1,15	1,05	0,9	0,9
12	17,55	17,1	13,85	15,15	11,85	15,5
18	17,55	17,25	14,15	15,45	15,1	15,85

En una experiencia posterior se trató de definir aún más el límite sobre el cual no se produce acidez. En ensayos por triplicado se emplearon soluciones de cianuro de potasio en vino en concentraciones de: M/1.000, M/2.000, M/3.000 y M/4.000, sin observarse acidez en ninguna experiencia al cabo de 27 días. En la mayoría de los casos aún se conservaba la película intacta.

Experiencias con Luminal

En dos ensayos por duplicado se introdujeron 25ml. de soluciones de Luminal (ácido fenil-etil-barbitúrico) en vino con concentraciones de M/50, M/100, M/1.000, M/10.000 y M/100.000, por debajo de películas crecidas sobre vino.

En el primer ensayo no se observó acidez en ninguno de los frascos al cabo de 17 días, habiéndose sedimentado la película. En el segundo ensayo un solo frasco de los dos que tenían

Luminal M/1.000 dió una acidez equivalente a 13,1 ml. de hidróxido de sodio N/1 por mililitro de medio, no observándose acidez a mayor ni menor concentración. Con excepción de esta experiencia, todas las películas se habían desintegrado y sedimentado.

Las tentativas de seguir cultivando la bacteria que parecía haberse acostumbrado al Luminal no tuvieron éxito.

Experiencias con Azul de Metileno

Se efectuaron ensayos con el agregado de 0,05% de Azul de Metileno a vino que luego se fermentó en aire y en oxígeno. Los resultados obtenidos se presentan en el Gráfico VIII (page 53 y 54).

Las experiencias N°18 y 29 se efectuaron en aire con 50 ml de medio sembrados mediante el sistema B, y la experiencia N°50 se refiere a la fermentación de 300 ml. en ambiente de oxígeno (Siembra B).

Refiriendo los resultados a los obtenidos en aire sin agregado de Azul de Metileno se observa que en un caso se ha disminuido el rendimiento y en ambos se ha alargado el periodo inicial de poca acetificación.

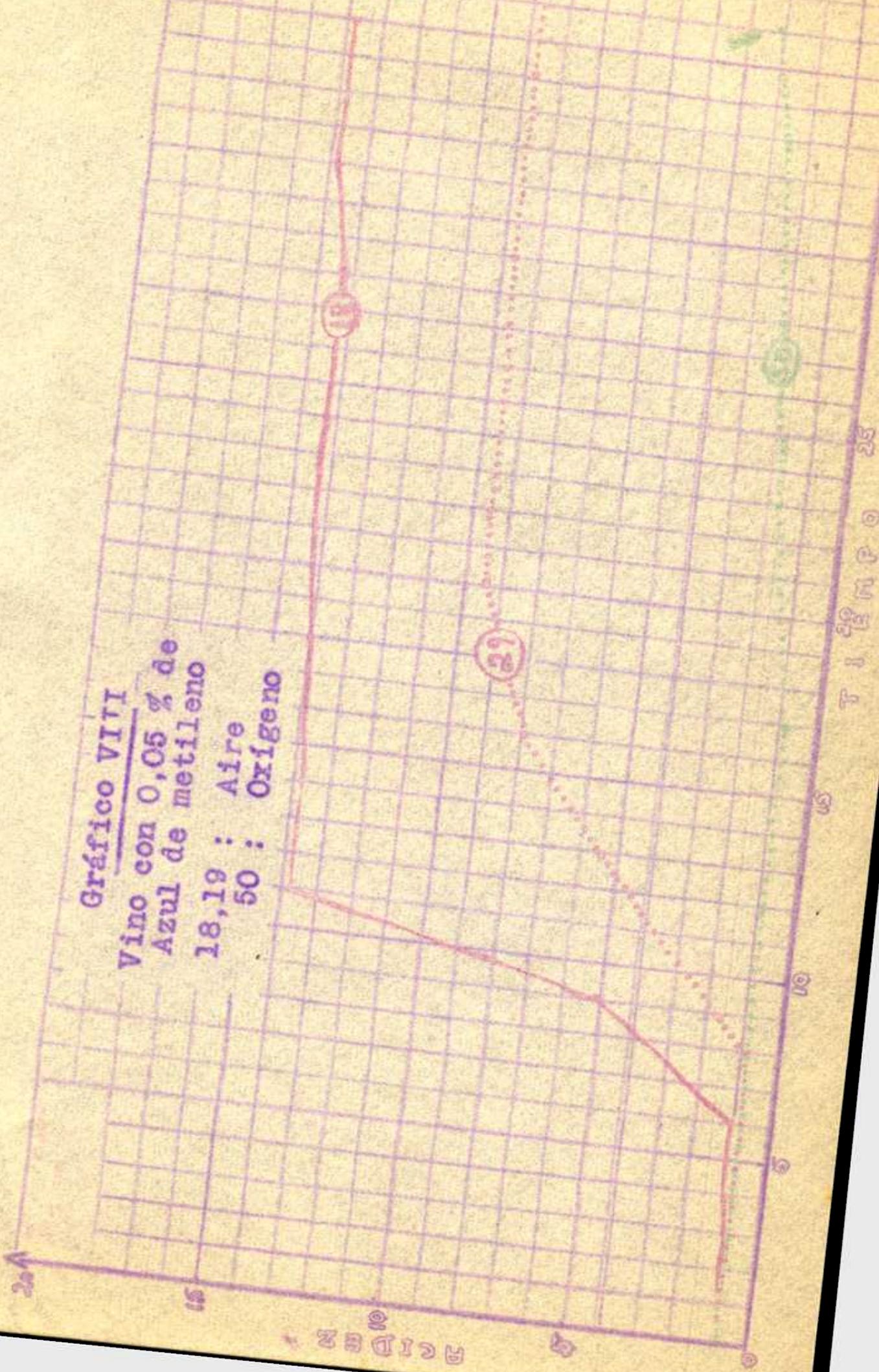
El agregado de Azul de Metileno no ha afectado mayormente la fermentación en ambiente de oxígeno, en comparación con experiencias sin este agregado, observándose el olor a acetaldehído al 36° día.

Gráfico VIII

Vino con Azul de Metileno 0.05%

Día	Gas:		
	18	20	Oxígeno
0	0,8	0,7	0,8
1	-	-	-
2	-	-	-
3	0,9	-	-
4	-	-	-
5	-	0,78	0,8
6	1,1	-	-
7	-	-	-
8	-	0,95	-
9	5,2	-	0,9
10	-	-	-
11	13,8	-	-
12	-	-	0,9
13	-	5,5	-
14	13,8	-	-
15	-	-	-
16	-	7,9	-
17	-	-	0,9
18	14,0	-	-
19	-	-	-
20	-	9,4	-
21	14,35	-	-
22	-	-	-
23	-	9,5	1,75
24	14,35	-	-
25	-	-	-
26	-	9,55	-
27	-	-	-
28	14,35	-	2,2
29	-	9,7	-
30	-	-	-
31	14,75	-	-
32	-	-	-
33	-	-	2,65
34	-	9,7	-
35	14,75	-	-
36	-	-	3,2
37	-	9,7	-
38	-	-	-
39	-	-	-
40	-	10,1	-

Gráfico VITI
 Vino con 0,05 % de
 Azul de metileno
 18,19 : Aire
 50 : Oxígeno



CAPITULO VI

Formación y/o Acumulación del Aldehido Acético durante la Fermentación con Acetobacter ascendens

Como ya se ha señalado en un capítulo anterior, se observó en algunos casos de fermentación del vino por el Acetobacter ascendens en atmósferas ricas en oxígeno la formación de un fuerte olor aromático despues de algunos días de fermentación.

Este aroma resultó ser debido, como ya se dijo, a los olores combinados de acetaldehido y ácido acético en baja concentración.

Con el propósito de seguir el curso de la formación del acetaldehido durante la fermentación se intentó en un principio continuar con el tipo de experiencias empleadas hasta entonces, pero usando mayores cantidades de medio para poder sacar mayor volumen de muestra para la determinación del aldehido acético. Debido a las dificultades halladas en formar la película y conservar la intacta una vez formada en mayor superficie y volumen de líquido, hubo que abandonar esta forma de trabajo.

Se intentó como solución de emergencia la aplicación de una técnica semejante a la de las bacterias quiescentes, gracias a la posibilidad de obtener facilmente masas relativamente grandes de bacterias de la especie considerada.

Esto no fué factible con el

agar de agua de levadura glucosada con cistina empleado en las experiencias anteriores, pero siguiendo las sugerencias del Dr. A. Sordelli se ensayó un medio empleado por él para el cultivo de bacterias lácticas, obteniéndose un crecimiento asombroso con varias cepas distintas de bacterias acéticas que se ensayaron sobre este medio.

Este medio de cultivo es una mezcla de partes iguales de macerado de maíz y agua de levadura concentrada, al cual además se le hizo un agregado de glucosa. La preparación de este medio se encuentra detallada bajo el N°4 en la página 13

Con suspensiones concentradas de bacterias provenientes del medio anterior se sembraron varios frascos con 10 ml. de vino diluido (Medio N°5, pag.13), lográndose la formación de 40 a 60 grs. de ácido acético por litro en dos días de fermentación en aire a 30°C.

Puesto a punto la determinación del acetaldehído (pag.16) y establecida la forma de trabajo que se detalla más adelante, se trató de hallar un medio más sencillo que el vino (es decir, si fuera posible un medio sintético). El primer ensayo de esta naturaleza fué con una solución acuosa de alcohol etílico al 8%, observándose que en este substrato las bacterias daban poca acidez y acumulaban gran cantidad de acetaldehído.

En experiencias subsiguientes se trató de hallar la razón de este fenómeno, además de estudiar la formación

y acumulación del aldehído acético en el vino durante la fermentación en atmósfera de oxígeno puro y en anaerobiosis.

Forma de Trabajo

Suspensión de bacterias - Se siembran unas gotas de suspensión concentrada de Acetobacter ascendens sobre el Medio N°4 en frascos chatos acortados (se emplearon botellas vacías de "Gin"), y se las distribuye sobre toda la superficie del agar mediante un brozo de varilla de vidrio estéril que se introduce dentro de los frascos.

Después de incubar durante 24 horas a 30°C se vuelve a hacer correr la varilla sobre la superficie y el frasco se coloca nuevamente en estufa a 30°C hasta el día siguiente.

Completadas las 48 horas de incubación, se controla la pureza del cultivo y luego se introduce unos 5 a 7 ml. de agua estéril. Haciendo deslizar la varilla que está dentro del frasco se suspende el cultivo, luego se retira la emulsión con una pipeta estéril y se pasa a un tubo de centrifuga estéril.

Esta operación se repite 4 o 5 veces hasta que se haya retirado la mayor parte del cultivo del frasco. La suspensión resultante se centrifuga hasta que las bacterias estén bien depositadas, luego se decanta el líquido sobrenadante. Se suspenden las bacterias en agua estéril agregada a cada tubo de centrifuga, se centrifuga nuevamente y se decanta el líquido sobrenadante.

Se reúnen los sedimentos de los tubos de centrifuga suspendiéndolos en unos 10 ml. de agua esteril.

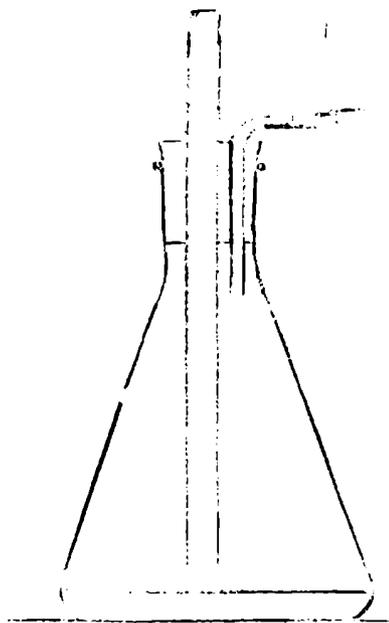
Empleando la escala nefelométrica de MacFarland (según indica Kolmer & Boerner) se hace un cálculo de la concentración de bacterias por mililitro de suspensión y se agrega la cantidad necesaria de la suspensión para que los líquidos que se ensayan tengan una concentración de aproximadamente 3.000 millones de bacterias por mililitro.

Cuando se usa una superficie de agar de aproximadamente 180 cms² se obtienen unos 10 ml. de suspensión con 35.000 a 75.000 millones de bacterias por mililitro.

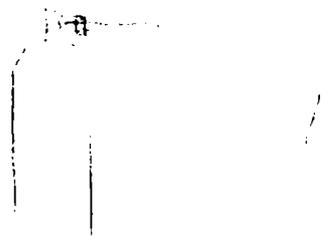
Experiencias en Aire.- Las experiencias en presencia de aire se efectuaron en dos formas: con tapón de algodón y con tapón de caucho con tubo capilar.

Los tapones de algodón se emplearon principalmente cuando el substrato era vino (°), en el cual hay poca formación de acetaldehído y gran cantidad de ácido acético (que ataca al caucho). Para los otros medios (y también en algunos casos con vino) se empleó un tapón de caucho con tubos de vidrio como indica la Figura N°4a (pag.59). El tubo grande solo se destapa cuando se saca la muestra o para agregar el medio al iniciar la experiencia; el tubo pequeño (B) se conecta mediante un tubito de cau-

(°) También se usó el tapón de algodón en tres casos en que el substrato era alcohol.



1



cho a un tubo de vidrio estirado a capilar (C), cuyo objeto era permitir la entrada de aire pero impedir en lo posible la pérdida de acetaldehído que es muy volátil.

El tapón de caucho y el frasco Erlenmeyer (con tapón de algodón) se esterilizan por separado y solo se cambian los tapones cuando el frasco está frío y seco. El Erlenmeyer tiene 150 ml. de capacidad.

Experiencias en Oxígeno. - Para estos ensayos se empleó el mismo dispositivo que para el aire, con la diferencia de que el tubo chico (B) se conecta a un tubo de oxígeno y todo el tapón se cubre con cera para evitar pérdidas. El tubo de goma que va al cilindro de oxígeno lleva un tubo en T que conecta a un tubo de vidrio con el extremo sumergido en agua (como indica la Fig.4b, pag.59) para evitar presiones dentro de los frascos mayores a 2 ó 3 cm de agua.

Antes de introducir el medio se hace pasar una corriente de oxígeno a través del frasco durante varias horas (quitando el tapón del tubo A) y también por unos minutos luego de haber introducido el medio. Una vez introducida la muestra se cierra la llave de entrada del gas.

Para retirar la muestra se homogeneiza el medio por agitación, se empuja el tubo A hacia abajo hasta que toque la superficie del líquido, se lo destapa y mediante presión de oxígeno se hace subir el líquido.

Una vez retirada la muestra con una pipeta estéril se vuelve a subir el tubo A, se hace bajar el líquido que quede en él y se hace pasar oxígeno durante unos minutos para desalojar el aire que pueda haber entrado, cuidando que no fuera excesiva la corriente en el caso en que había acetaldehído en el medio.

Sacando la muestra en la forma descripta se evita que el aire pueda entrar al frasco propiamente dicho y por lo tanto no es necesario pasar gran cantidad de oxígeno, que en el caso de medios de cultivo con acetaldehído arrastrarían a éste.

Experiencias en Anaerobiosis. - Los medios se preparan con agua recién esterilizada y enfriada haciendo pasar nitrógeno para impedir la disolución del oxígeno del aire.

Los agregados de alcohol, acetaldéhído y suspensión bacteriana se efectúan con la mayor velocidad posible y luego se pasa el medio sembrado a jeringas hipodérmicas de 10 ó 5 ml. de capacidad (de acuerdo al volumen que se requiera para dos determinaciones del contenido de acetaldéhído).

Se cargan las jeringas sin que entre aire y se sella el orificio y la junta del émbolo con el pistón con cera.

Con el vino se lo empleó tal cual sin tratamiento con nitrógeno, es decir, estaba saturado con oxígeno a la presión de la atmósfera.

Para retirar la muestra se agita el contenido, se funden los sellos de

cera con calor suave y se expulsa la cantidad necesaria, volviendo luego a sellar los puntos indicados.

Todos los experimentos fueron llevados a cabo teniendo presente las siguientes normas:

La determinación de acetaldehído y ácido acético se efectúa en el punto cero (antes de agregar las bacterias al medio), a las 24 horas y a las 48 horas de sembradas. En algunos casos se hicieron determinaciones al 3er., 4o 5o., 6o. y 15o. día.

Las experiencias se efectuaron por lo menos por duplicado. Se prepara todo el medio y se le agrega la suspensión de bacterias antes de distribuirse entre los frascos correspondientes, asegurando así igualdad entre ellos.

Como el método de determinación del acetaldehído es relativamente largo, las experiencias se efectuaron en lotes de 10 a 12 frascos para dar tiempo a analizarlos todos cada día. Cuando se ensayaban nuevos medios o agregados se incluía además por lo menos una fermentación en aire sobre vino y otro sobre alcohol etílico al 8% en agua destilada para asegurarse de que la suspensión empleada tenía un comportamiento normal sobre estos medios.

A cada lote se le designó con una letra y a cada experiencia o frasco con esta letra seguida por un número. En esta forma todas las experiencias con la misma letra han sido efectuadas al mismo tiempo y con la misma suspensión.

Cada frasco Erlenmeyer de 150 ml. lleva 13 ml. de medio, cantidad suficiente como para retirar dos veces unos 6 ml. esterilmente y luego sacar de éstos, 5 ml. de muestra con pipeta de doble aforo. Esta cantidad de líquido formaba una capa de aproximadamente 0,6 cm de espesor en el fondo del Erlenmeyer.

Se efectuaron experiencias en Aire, Oxígeno puro y en Anaerobiosis con Vino diluido 2:1 (Medio N°5), con solución de alcohol etílico al 8% en agua destilada y con soluciones de acetaldéhidó en las dos anteriores y en agua destilada. Además se efectuaron experiencias en aire con una diversidad de substratos, que se detallan más adelante.

Resultados

Se considerarán por separado los resultados obtenidos bajo las tres condiciones, es decir, en aire, en oxígeno y en anaerobiosis.

Experiencias en Aire (°).- Se efectuaron sobre Vino diluido, solución de alcohol en agua, y soluciones de acetaldéhidó en las dos anteriores y en agua destilada.

(°) De estas experiencias las de la serie A se efectuaron con tapón de goma y con pequeña sobre-presión de oxígeno para reponer el que consumieran las bacterias. Se abandonó luego este sistema por temor de que una pérdida en el frasco permitiese que todo el ambiente se cargara de oxígeno. Las determinaciones de tiempo 0 se efectuaron en este caso después de agregada la suspensión de bacterias.

Vino 2:1 pasteurizado (Medio N°5).- Las experiencias con vino en aire se efectuaron con tapón de algodón y con tapón de caucho con tubo capilar (Fig.4a).

En las experiencias en que se empleó tapón de algodón se observó una buena acetificación al segundo día (50-60 % de ácido acético) manteniéndose bajos los valores de acetaldehído (menos de 0,1 %) y en algunos casos desapareciendo completamente del medio (Tabla I pag. 65).

Al emplear el tubo capilar, sin embargo, se observan valores más altos de aldehído acético a la vez que se nota una inhibición parcial de la acetificación. Así es que al segundo día de fermentación se obtienen valores de ácido acético que varían entre 10 y 29 % mientras que la concentración de acetaldehído llega en algunos casos hasta 0,5 %. Es durante estas experiencias que se producen los únicos casos de reducción del tenor de ácido acético, tal como si se tratara de sobre-oxidación, observados durante la fermentación con vino.

Así, durante la experiencia B7 al primer día se tiene una acidez de 9,75 % que baja a 1,62% al cuarto día, y en la experiencia C8 la acidez baja de 9,85 % a 5,35 % de ácido acético entre el primer y segundo día.

Solución de alcohol al 9%.- La acidez producida en la solución en agua destilada de al-

TABLA I

Experiencias con Vinagre en Aire

Exper. No.	Tapón de algodón		1 Día		2 Días		4 Días		5 Días	
	ACH %	ACH %	ACH %	ACH %	ACH %	ACH %	ACH %	ACH %	ACH %	ACH %
(a) Frascos cc										
D9	3,56	0,52	59,57	0,047	52,92	0,34				
D10	3,35	0,52	58,43	0,038	60,60	0,18				
E9	3,28	0,45	57,30	0,038	55,80	0,91				
E10	3,28	0,45	57,00	0,042	60,00	0,68				
F3 (c)	3,28	0,45	56,90	0,061	60,30	0,61	54,20	0,041	55,50	0
F4 (c)	3,28	0,45	56,60	0,082	49,20	0,75	54,20	0,079	55,50	0,023
F6	3,28	0,45	56,40	0,011	61,10	0,70				
G1	3,35	0,32	57,85	0,07	55,10	0,46				
H1	3,32	0,39	56,62	0,07	59,20	0				
NS	3,34	0,36	56,60	0,07	61,10	0,43				
N9	3,34	0,36	56,55	0,07	60,50	0,68				
N10	3,34	0,36	56,00	0,05	60,00	0,68				
O11	3,34	0,36	56,80	0,07	49,00	0,71				
(b) Frascos cc										
A1 (2)	3,39	0,66	56,65	0,07	24,00	1,75				
A2 (2)	3,39	0,66	56,67	0,07						
A3 (2)	3,39	0,66	56,40	0,07						
B7	3,72	0,51	57,75	0,12			1,63	0,177		
C7	3,50	0,50	56,40	0,16						
C8	3,50	0,50	56,85	0,23						
J1	3,40	0,35	56,10	0,11	10,40	0,39				
J2	3,40	0,35	56,61	0,11	5,35	0,90				
N1	3,34	0,36	56,10	0,12	10,60	0,20				
N2	3,34	0,36	56,95	0,059	29,50	0,34				
N3	3,34	0,36	56,32	0,076	16,65	0,53				
N4	3,34	0,36	56,32	0,076	12,60	0,20				
N5	3,34	0,36	56,50	0,130	11,20	0,07				
N6	3,34	0,36	56,08	0,055	10,40	0,34				
N6	3,34	0,36	56,13	0,063	12,40	0,07				
N7	3,34	0,36	56,20	0,162	11,80	0,34				
N7	3,34	0,36	56,20	0,162	12,25	0,30				

(1) Experiencias realizadas con 30 ml. de vinagre en una capsula de 0,6 cm. de espesor.
 (2) Ver nota en página 63.

cohol etílico es baja, con un máximo de 6,43 % de ácido acético en las experiencias con tubo de algodón y de 5,86 % en las experiencias con tubo capilar. En la mayoría de los casos, sin embargo, la acidez oscila alrededor de 3% de ácido acético al segundo día de fermentación (Tabla II, pag. 67).

En cambio se nota que la producción de acetaldehído durante estas experiencias es mucho mayor que en las efectuadas con vino, dando valores de hasta 4,4 % en las experiencias efectuadas con tubo capilar.

Las experiencias con tapón de algodón ponen en evidencia la pérdida de acetaldehído por volatilización. Es de hacerse notar que es posible que en algunos casos también los capilares no hayan evitado por completo la pérdida de acetaldehído.

Soluciones de Acetaldehído.- Las experiencias se efectuaron con tres líquidos de diferente composición: 1° en solución de agua destilada, 2° en agua destilada con alcohol 8%, 3° en vino diluido 2:1 con agua (Medio N°5). Ver Tabla III página 68.

1° Soluciones en agua destilada.- Se efectuaron experiencias con soluciones acuosas con aproximadamente 0,1 y 2 % de acetaldehído, observándose la desaparición de éste a la vez que aumenta levemente la acidez.

2° Soluciones en agua con alcohol.- Se prepararon soluciones de acetaldehído

TABLA II

Experiencias en Aire con Alcohol Etílico 8% aq.

Exp. No	0		1 Día		2 Dias		3 Dias		4 Dias		6 Dias		15 Dias	
	ACOH %	ACh %	ACOH %	ACh %	ACOH %	ACh %	ACOH %	ACh %	ACOH %	ACh %	ACOH %	ACh %	ACOH %	ACh %
(a).	Frascos con tapón de algodón													
F1 (1)	0	0	2,39	0,232	4,24	0,521	-	-	5,7	0,272	6,20	0,191	-	-
F2 (1)	0	0	1,79	0,093	3,59	0,266	-	-	5,7	0,348	6,43	0,026	-	-
F5	0	0	1,54	0,055	4,00	0,118	-	-	-	-	-	-	-	-
(b).	Frascos con tubo capilar													
A4 (2)	0	0,031	1,45	0,342	3,60	1,015	-	-	-	-	-	-	-	-
A5 (2)	0	0,031	1,21	0,317	2,40	0,722	-	-	-	-	-	-	-	-
A6 (2)	0	0,031	1,21	0,299	2,40	0,722	1,51	0,226	-	-	-	-	-	-
B1	0	0	0,55	0,134	-	-	-	-	2,25	2,250	2,40	3,670	-	-
B2	0	0	0,73	0,615	-	-	-	-	-	-	-	-	2,99	4,417
B3	0	0	-	-	1,21	1,260	-	-	-	-	-	-	-	-
B4	0	0	0,95	0,619	1,21	0,605	1,51	1,130	-	-	-	-	-	-
C9	0	0	0,95	0,605	2,14	1,295	-	-	-	-	-	-	-	-
D1	0	0	1,19	0,971	2,29	2,019	-	-	-	-	-	-	-	-
D2	0	0	1,19	0,971	2,23	2,575	-	-	-	-	-	-	-	-
E1	0	0	1,55	0,155	1,78	0,234	-	-	-	-	-	-	-	-
E2	0	0	1,55	0,155	2,86	0,920	-	-	-	-	-	-	-	-
G2	0	0	1,61	0,158	2,96	0,880	-	-	-	-	-	-	-	-
H2	0	0	1,00	0,215	2,94	1,700	-	-	-	-	-	-	-	-

(1) Experiencias realizadas con 30 ml. de medio en una capa de 0,6 cm.

(2) Ver nota página 63

TABLA I

Experiencias en Aires con Soluciones de Acetaldehido

Experiencia N°	Q		T I R M P		2 Dias		6 Dias	
	AcOH %	ACH %	AcOH %	ACH %	AcOH %	ACH %	AcOH %	ACH %
(1°)	Soluciones en Agua Destilada							
A7	0,12	0,101	0,24	0,00	0,18	0		
A8	0,12	0,101	0,24	0,010	0,18	0		
A9	0,12	0,101	0,30	0	0,18	0		
B5	0	1,940	1,82	0,750	3,02	0,008		
B6	0	1,940	-	-	3,15	0		
(2°)	Soluciones en Agua con Alcohol							
C3	0,30	1,760	0,60	2,250	1,60	2,600	3,00	3,610
C4	0,30	1,760	1,06	2,440	1,51	2,760	2,10	4,560
C5	1,50	7,250	1,51	6,840	1,87	6,800	3,00	8,620
C6	1,50	7,250	1,63	6,520	1,50	6,620	2,10	8,660
(3°)	Soluciones en Vino diluido con...							
J3	5,00	4,260	5,10	4,20	5,28	5,38		
J4	5,00	4,260	5,12	4,17	5,12	5,08		
J5	6,11	7,390	6,11	7,18	6,47	7,85		
J6	6,11	7,390	6,16	7,50	6,18	8,03		

(1) Ver nota pag.63

aproximadamente 2% y 7% en solución de agua destilada con 8% de alcohol etílico y se fermentaron en la forma normal con tubo capilar.

En las experiencias con 2% de aldehído acético se observa un comportamiento muy semejante a la observada con solución pura de alcohol, formándose aproximadamente la misma cantidad de aldehído que en ésta pero con menor producción de ácido, es decir, la concentración final de acetaldehído en los dos casos difiere por la cantidad inicial de aldehído en el medio.

Con 7 % de acetaldehído hay al principio muy poca producción de ácido y consumo de aldehído, pero al sexto día el contenido de acetaldehído ha alcanzado 8,5% y la acidez también ha aumentado levemente.

3° Soluciones en vino.- En las experiencias en las cuales se agregó el acetaldehído al vino se nota que si bien casi no hay aumento de acidez con 4 % y 7 % de acetaldehído, la concentración de éste aumenta levemente al segundo día después de haber bajado a las 24 horas.

Diversos substratos.- Con el deseo de aclarar los fenómenos observados en las experiencias descritas se efectuaron ensayos con diferentes medios para observar el curso de la fermentación acética sobre ellos.

En todos los casos se utilizó el tubo capilar, y cuando se agregó alco-

hol estílico al medio se lo empleaba al 8%.

Se efectuaron ensayos con vino sometidos a altas temperaturas durante tiempos más o menos largos. y luego se ensayó el efecto de dos soluciones de sales sobre la fermentación.

La solución salina A (Medio N°6) fué preparado al hacerse un error en los cálculos y lleva una muy alta concentración de sales. Contiene SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , Cl, Mg, Na, K, Ca, Fe, Al y Mn.

La solución salina B (Medio N°7) se preparó con datos de Sherman, Villavecchia y Häger. Las concentraciones de los aniones y cationes se ajustan a los datos de Sherman para contenido salino del vino normal, con excepción de la del Cl, la cual excede la concentración dada por Sherman. Contiene los siguientes elementos SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , Cl, Mg, K, Ca y tartrato.

Luego se ensayó el agregado de diversas sustancias a la solución anterior (solución salina B), haciendo a la vez ensayos de control con estas mismas sustancias sin las sales de la solución salina B.

En la Tabla IV (pags. 71 y 72) se detallan los resultados de estas experiencias.

a) Con el vino hervido y luego esterilizado (Medio N°9a) se observa la desaparición del poco alcohólico contenido y ninguna producción de acidez, resultado

TABLA IV

Experiencias en Aire con Diversos Substratos

Exper. No	T I E M P O					
	0		1 Día		2 Días	
	AcOH %	AcH %	AcOH %	AcH %	AcOH %	AcH %
(a). Vino Calentado (Medio N°9a)						
E7	6,69	0,010	5,80	0,013	6,99	0
E8	6,69	0,010	7,10	0,011	6,99	0
(b). Vino Calentado (Medio N°9b)						
K1	3,36	0,041	3,39	0,055	10,08	0,205
K2	3,36	0,041	6,20	0,037	15,20	0,365
(c). Solución Salina A (Medio N°6) con 8% EtOH						
C1	0,12	0,009	1,20	0,072	3,56	0,170
C2	0,12	0,009	1,63	0,126	4,16	0,250
(d). Solución Salina B (Medio N°7) con 8% EtOH						
D5	0,78	0,011	1,97	0,283	5,38	1,859
D6	0,78	0,011	2,33	0,430	5,50	2,343
(e). Sol. salina B con 0,04 gr de Cl₃N						
D7	0,84	0,009	3,59	0,134	6,60	1,497
D8	0,84	0,009	4,42	0,097	7,48	1,099
(f). Solución acuosa 0,7 gr% Glicerina y 8% EtOH						
D3	0	0,052	1,37	0,311	3,41	1,828
D4	0	0,052	1,24	0,420	3,41	2,302
(g). Sol. salina B con 0,04 gr de Cl₃N						
E3	0,84	0,009	3,93	0,068	9,35	0,063
E4	0,84	0,009	5,49	0,066	11,8	0,079
(h). Sol. salina B con 0,023 gr de Cl₃N						
E5	0,84	0,009	5,12	0,060	10,40	0,990
E6	0,84	0,009	7,05	0,059	15,65	0,141

TABLA IV (cont.)

Experiencias en Aire con Diveros Substratos

Expt. No.	T I R M P O				2 Dias	
	AcOH %	AcH %	AcOH %	AcH %	AcOH %	AcH %
(j) Sol. salina B con 8% EtOH y 1% Agua de Levadura						
1:1 (Medio N°10)						
H5	0,79	0	2,29	0,126	6,29	0,206
H6	0,79	0	2,76	0,154	6,47	0,715
(j) Sol. salina B con 8% EtOH y 1% Macerado de Maiz						
(Medio N°2b)						
H7	0,78	0	2,11	0,097	3,94	0,565
H8	0,78	0	2,76	0,147	4,40	0,965
(k) Solución acuosa EtOH 8% con 1% Agua de Levadura						
1:1 (Medio N°10)						
G3	0	0	0,83	0,064	3,04	0,099
G4	0	0	1,16	0,096	8,55	0,441
H9	0	0	1,88	0,218	4,29	1,200
(l) Solución acuosa EtOH 8% con 1% Macerado de Maiz						
(Medio N°2b)						
G5	0	0	0,95	0,110	1,78	0,301
G6	0	0	1,08	0,156	2,14	0,428
H10	0	0	1,53	0,218	4,00	1,510
(m) Agua con Extracto alcohólico de vino (Medio N°8)						
G7	1,16	0,014	2,87	0,106	6,19	0,031
G8	1,15	0,014	2,69	0,076	6,19	0,031
(n) Sol. salina B con Extracto alcohólico de vino						
(Medio N°2b)						
H3	1,76	0,014	8,20	0,084	20,60	0,525
H4	1,76	0,014	9,50	0,084	29,40	0,118
(o) Solución acuosa EtOH 8% con 2% Vino pasteurizado						
G9	0,10	0	3,11	0,156	5,75	0,106
G10	0,10	0	1,20	0,106	3,21	0,062
(p) Agua con Extracto alcohólico de vino (Medio N°8)						
y 0,825 gr % de PO ₄ H K ₂						
J9	1,77	0,015	4,64	0,084	14,90	0,063
J10	1,77	0,015	5,86	0,084	9,31	0,294

que quizás sea debido al bajo pH del medio (2,2).

- b) Con el vino esterilizado solamente (Medio N°9b) se observan resultados perfectamente comparables con los datos obtenidos con vino en aire con tubo capilar (Tabla I, pag.65).
- c) Con la solución salina A (Medio N°6) los resultados difieren poco de los de las experiencias con solución de alcohol 8% en agua destilada, sin alcanzar los altos valores de acetaldehído que muestran algunas de éstas. La acidez se mantiene baja (5,5 % de ácido acético).
- d) Con la solución salina B se encuentra un comportamiento que apenas se distingue de la observada con soluciones puras de alcohol etílico, pues solo se produce un poco más de acidez.
- e) El agregado de 0,7 gr % de glicerina a la solución salina B no hace variar este comportamiento.
- f) El ensayo efectuado con glicerina (0,7 %) agregada al alcohol en agua destilada da resultados semejantes a las de la experiencia con solución salina, aunque se produce menos ácido y un poco más aldehído.
- g) El agregado de 0,04 gr % de Cl₂Fe (concentración indicada por König como existente en el vino) a la solución salina B con glicerina y alcohol hizo aumentar la producción de acidez a un nivel comparable al observado en la fermenta-

ción del vino con tubo capilar. La producción de acetaldehído fué mayor en el vino.

h) En una experiencia semejante con 0,023 gr % de $\text{Cl}_2\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (según König) en vez del Cl_3Fe también se consiguió buena acetificación (como la del vino) pero observándose además la producción de una cantidad apreciable de acetaldehído en uno de los casos (Experiencia E5 con 0,99 % de acetaldehído al segundo día).

i), j), k) y l) El agregado de pequeña cantidad (1%) de agua de levadura concentrada (Medio N°10) y macerado de maíz a soluciones de alcohol en agua y con mezcla salina B dió resultados en los cuales se observa en general una pequeña producción de ácido acético y alta producción de acetaldehído, en forma semejante a lo observado con solución acuosa de alcohol etílico.

m) Las experiencias con el extracto soluble en alcohol de 95° del vino desecado al vacío (Medio N°8), si bien evidencian solo una leve producción y luego disminución del acetaldehído, dieron muy poca acidez.

n) Con el agregado de este extracto alcohólico del vino a la solución salina B se observó la producción de gran cantidad de ácido (más aún si se considera que la acidez inicial es menor que la del vino) con poca formación de aldehído, reproduciendo así los resultados observados con el vino como sustrato.

o) El agregado de 2% de vino diluido y pasteurizado (Medio N°5) a una so-

lución acuosa de alcohol etílico tuvo como resultado la producción de poca acidez y poco aldehído.

p) Las experiencias con el extracto alcohólico de vino con solución de fosfato bi-potásico (0,835 %) también produjeron ácido acético en buena cantidad, manteniéndose baja la concentración de aldehído. La acetificación fue menor que con vino.

Experiencias en Oxígeno. - Se efectuaron ensayos con vino diluido 2:1 (Medio N°5), solución de alcohol etílico 8% en agua destilada, y con soluciones de acetaldehído en agua destilada con alcohol.

Vino 2:1 pasteurizado. - Los datos consignados en la Tabla V (pag. 76) muestran un aumento general en la producción de aldehído con respecto a los datos obtenidos durante la fermentación del vino en aire. Una excepción a lo expuesto son las experiencias 03 y 04, y cabe hacer notar que estos dos frascos se encontraban comunicados por medio de un tubo en T al mismo tubo de provisión de oxígeno y que al tubo A del frasco 03 se le observó una rajadura al finalizar la experiencia, con la probabilidad de que haya entrado aire durante el transcurso de ésta, pudiendo ésta ser la razón de la divergencia en este caso.

Un ensayo en blanco (17), sin bacterias, casi no muestra variación de acidez ni del contenido de aldehído.

TABLA V

Experiencias en Oxígeno

Exper. No	T I R M P O					
	0		1 Día		2 Días	
	AcOH %	AcH %	AcOH %	AcH %	AcOH %	AcH %
a) Vино Diluida 2:1 Pasteurizado						
I1	3,37	0,038	6,61	0,121	14,60	0,132
I2	3,37	0,038	5,33	2,265	5,58	2,920
I7(1)	3,37	0,038	3,40	0,040	3,51	0,036
O1	3,34	0,036	5,40	0,101	10,80	0,094
O2	3,34	0,036	5,10	0,780	6,60	2,630
O3	3,34	0,036	5,50	0,112	11,65	0,116
O4	3,34	0,036	5,30	0,138	10,90	0,116
O5	3,34	0,036	5,00	0,538	7,50	1,700
O6	3,34	0,036	4,30	1,620	4,77	3,140
b) Solución de Alcohol al 8%						
I3	0	0	2,40	1,300	3,67	3,280
I4	0	0	2,30	1,620	4,40	4,070
I8(1)	0	0	0	0	0	0
M6	0	0	1,30	1,125	2,26	2,240
M7	0	0	1,60	1,610	2,21	2,730
c) Solución de Acetaldehido en Agua con Alcohol						
I5	1,47	4,46	2,40	5,24	3,52	6,86
I6	1,47	4,46	2,30	5,18	3,36	6,25
I9(1)	1,47	4,46	1,40	3,90	1,47	3,80
M8	1,56	2,86	2,30	5,04	2,95	5,95
M9	1,56	2,86	2,30	4,65	2,54	5,40

(1) Ensayos en blanco sin bacterias.

Solución de Alcohol al 8%. - Todas estas experiencias (Tabla V) muestran gran producción de aldehído y poca acidez. Las concentraciones alcanzadas de aldehído en algunos casos en dos días son equivalentes a los que se producen en 15 días en aire sobre el mismo substrato (3-4 %).

Soluciones de Acetaldehído. - Las experiencias se efectuaron con aldehído acético en una solución de alcohol etílico 8% en agua destilada, y en las dos concentraciones empleadas (3% y 4%) han dado gran aumento de aldehído, llegando a casi 6% y 8% respectivamente. La acidez se mantiene baja.

El ensayo en blanco sin bacterias (19) evidenció una pequeña disminución de acetaldehído sin aumento de acidez, lo cual podría ser debido a arrastre por la corriente de oxígeno al introducir el medio de cultivo y al sacar la muestra.

Experiencias en Anaerobiosis. - Se efectuaron con vino y solución alcohólica en agua y con soluciones de acetaldehído en agua destilada y en vino y agua con alcohol.

Vino 2:1 pasteurizado. - Las experiencias no evidencian cambios notables de concentración de ácido ni aldehído.

Solución de Alcohol al 8%. - Tampoco se observan cambios en estas experiencias.

Soluciones de Acetaldehído.- Se efectuaron experiencias con soluciones de acetaldehído en agua destilada, en agua destilada con 8% de alcohol y en vino diluido 2:1 y pasteurizado (Tabla VI, pag. 79), observándose en casi todos los casos un consumo de aldehído y una leve reducción de la acidez.

Las experiencias en agua y solución de alcohol en agua se efectuaron con aproximadamente 4 % de aldehído y las experiencias en vino con aproximadamente 2% de acetaldehído.

oOo

TABLA T

Experiencias en Anaerobiosis

Exper. No	T I E M P O					
	0		1 Dia		2 Dias	
	AcOH %	Ach %	AcOH %	Ach %	AcOH %	Ach %
<u>a) Vino Diluido 2:1 Pasteurizado</u>						
O7	3,34	0,036	3,39	0,039	3,40	0,030
O8	3,34	0,036	3,40	0,042		0,036
<u>b) Solución de Alcohol al 8%</u>						
L3	0	0		0		0
L4	0	0		0		0
<u>c) Soluciones de Acetaldehido</u>						
1. En agua destilada						
L7	1,65	3,84	1,65	3,56		3,65
L8	1,65	3,84	1,59	3,29		3,50
2. En agua con alcohol 8%						
L5	1,48	3,76	1,36	3,52		3,55
L6	1,48	3,76	1,36	3,52		3,64
3. En vino 2:1						
O9	5,30	2,20	5,03	1,80		1,87
O10	5,30	2,20	5,00	1,78		1,75

CAPITULO VII

Resumen y Conclusiones

Ensayos con cultivo en película. - Estos ensayos fueron realizados con cultivos de *Acetobacter ascendens* bien flotados sobre la superficie del medio (Vino pasteurizado) y que tienen la característica particular de la especie que consiste en la ascensión del cultivo por las paredes del frasco. Las tentativas de reproducir de manera uniforme el cultivo fueron muy numerosas, introduciendo despues de cada fracaso variantes del método para lograr la uniformidad buscada. Desgraciadamente no se pudo obtener con absoluta certeza un cultivo óptimo en todos los casos y largas series de experiencias, llevadas a cabo en el curso de casi dos años, fracasaron porque alguno de los grupos no cultivo en forma correcta. De todos modos se pudieron obtener algunos resultados que por su concordancia merecen un comentario.

- a) La acetificación en una atmósfera de aire (20,93 % de oxígeno) tiene lugar regularmente; se inicia bien pronto y el tenor de ácido acético es alto (9%) a la terminación del proceso.
- b) Sustituyendo la atmósfera de aire por una de oxígeno la acetificación se inicia muy tardíamente; la curva asciende poco y los cultivos tienen marcado olor a aldehído acético. La concentración máxima de ácido acético es menor que la que se obtiene con el aire.
- c) Con atmósfera de anhídrido carbónico

y proporciones variables de oxígeno, aún en concentración menor que la del aire, la acetificación es muy lenta y el contenido máximo de ácido acético es más bajo que en aire.

d) La acción del ácido cianhídrico (CNK) es muy marcada y con concentraciones ya un poco superiores a M/5.000 hay inhibición del proceso de acetificación sin que la película sufra por la acción del ácido cianhídrico.

e) Por acción del Luminal hubo también inhibición de la acetificación desde la concentración M/50 hasta M/100.000; en un solo caso hubo acetificación (1 frasco entre 4) a la concentración de M/1.000. El cultivo no pudo ser recuperado de ese frasco y no se pudieron seguir las experiencias para comprobar si existió una adaptación del sistema enzimático.

f) El azul de metileno retarda la acetificación en presencia de aire y no modifica prácticamente los resultados observados cuando se fermenta en presencia de oxígeno y aparece también como en tal caso el olor del aldehído acético.

Ensayos con suspensión de bacterias.-

Habiéndose podido obtener el cultivo abundante de *Acetobacter ascendens* en un medio de extracto de levadura y de maíz se iniciaron ensayos con suspensiones lavadas de cultivos obtenidos en medio sólido. Los cultivos fueron lavados por centrifugación, con lo cual se pueden considerar a las bacterias usadas como

bacterias quiescentes. En resumen los resultados obtenidos son los siguientes:

a) Una suspensión de bacterias en vino pasteurizado en frascos con libre acceso de aire a través de un tapón de algodón y con buena superficie de aereación produce rápidamente ácido acético hasta la concentración del 60 % en dos días siendo el tenor de aldehído acético muy bajo (alrededor de 0,1 %).

b) Ensayos análogos en que el acceso del aire tiene lugar por un tubo capilar muy fino de tal modo que no existe buena aereación, revelan una producción menor de ácido acético (12%) y una mayor cantidad de aldehído acético que llega hasta el 0,5 %. Este comportamiento se puede interpretar admitiendo que el acetaldehído formado se acumula dentro del frasco sin pasar a la atmósfera pues lo impide el tubo capilar y su alta concentración inhibe el proceso de acetificación normal.

c) Con suspensión de bacterias en solución de alcohol al 8% en agua destilada en frascos con tubo capilar se produce rápidamente una cantidad muy elevada de aldehído acético, hasta 4 %, y la acidez se eleva lentamente y solo llega al 6 % de ácido acético. Parece que el sistema no tuviera algún elemento esencial para oxidar el aldehído acético, y que se encuentra en el vino.

d) Si la suspensión de bacterias se hace en agua que contiene una proporción mediana de acetaldehído como único sustrato (2 %), ésta es consumida transfor-

mándose en ácido acético. Si el aldehído acético es agregado a una solución de alcohol al 8% ocurre por el contrario un incremento muy notable del aldehído acético que puede llegar hasta 8 %.

e) Si a la solución de alcohol en agua destilada se le agrega una mezcla salina que contiene los elementos minerales del vino sin hierro ni manganeso (SO_4 , PO_4 , Cl, Mg, K, Ca y tartrato) se obtienen los mismos resultados que con la solución del alcohol en agua.

f) Si a la solución de alcohol en agua se le añade el extracto soluble en alcohol 95° obtenido del vino desecado a baja temperatura el proceso de oxidación tampoco cambia con respecto al control de alcohol en agua.

g) Si se añaden al alcohol en agua las mismas sales anteriormente citadas y el extracto alcohólico del vino se reestablece la acetificación tal como ocurre en el vino. Igual resultado se obtiene si se reemplazan dichas sales por el fosfato bipotásico.

h) Si a las sales mencionadas se le añade una sal de hierro o de manganeso la acetificación tiene lugar normalmente.

i) El agregado del medio de cultivo (extracto de levadura y extracto de maíz) al alcohol disuelto en agua deja el proceso de acetificación tal como ocurre en el alcohol disuelto en agua destilada sin ninguna adición.

j) Los ensayos hechos con atmósfera de oxígeno usando vino como sustrato revelan un comportamiento semejante al

obtenido anteriormente con *Acetobacter ascendens* crecido en película, es decir, una acumulación relativamente grande de aldehído acético y una acetificación mucho menor que la que se obtiene en aire.

En solución de alcohol etílico en agua destilada la producción de acetaldehído es aún más notable que la observada en atmósfera de aire, siendo la acetificación comparable a la observada en este caso. En cuanto al comportamiento de las mezclas de acetaldehído, alcohol y agua destilada se observa una acumulación mayor de aldehído que la vista en casos con alcohol en agua o con vino. En cuanto a la acetificación es prácticamente la misma que la observada con alcohol.

k) Los ensayos hechos en ausencia de oxígeno (anaerobiosis) utilizando como substrato tanto el vino pasteurizado como alcohol etílico en agua destilada o soluciones de acetaldehído en agua, en mezcla hidro-alcohólica o en vino no han permitido observar ningún cambio en la proporción inicial de acetaldehído y de ácido acético, es decir, las bacterias no han sido capaces de realizar la dismutación del tipo de la reacción de Cannizzaro.

Conclusiones

1°.- Se ha comprobado la acetificación del vino por Acetobacter ascendens (cultivado en película) pudiéndose establecer que dicho proceso ocurre más intensamente cuando la tensión de oxígeno corresponde a la de este gas en la atmósfera. En atmósfera de oxígeno puro la acetificación es muy lenta y se produce en cambio una cantidad relativamente grande de aldehído acético. El anhídrido carbónico parecería actuar también como inhibidor de la acetificación, retardando el proceso considerablemente, faltaría sin embargo mayor experimentación para poder hacer una afirmación definitiva.

2°.- La acción del ácido cianhídrico se manifiesta por una inhibición de la acetificación con Acetobacter ascendens en concentraciones de hasta M/5.000. El Luminal inhibe la acetificación hasta con concentración de M/100.000. El azul de metileno demora la acetificación en presencia del aire y no modifica el curso lento del proceso en presencia de oxígeno puro, apareciendo también una cantidad de acetaldehído como ocurre sin el azul de metileno.

3°.- Las bacterias (Acetobacter ascendens) lavadas y agregadas al vino en suspensión tienen la propiedad de acetificar rápidamente en presencia de aire, produciendo poco acetaldehído. En este proceso tiene importancia la aereación abundante que eliminaría el aldehído acético impidiendo su acumulación que

parece retardar la acetificación propiamente dicha.

Si se utiliza como sustrato para acetificar, usando una suspensión de bacterias, a una mezcla de alcohol etílico y agua se produce muy poco ácido y el aldehído acético se acumula considerablemente. El acetaldehído en ausencia de alcohol es consumido y se transforma en ácido acético.

4°.- Empleando siempre la suspensión de bacterias la adición de sales (PO_4HK_2 , Cl_2Ca , SO_4Mg , SO_4K_2 , Tartrato de K) al alcohol en agua destilada no modifica el curso de la oxidación del alcohol, mencionado más arriba; formándose poco ácido y mucho acetaldehído. El agregado de un extracto soluble en alcohol 95° obtenido del vino desecado a baja temperatura tampoco modifica el comportamiento mostrado en alcohol acuoso. Si en cambio se añaden la solución salina, o aún solo PO_4HK_2 , junto con el extracto soluble en alcohol del vino, el fenómeno de acetificación del alcohol disuelto en agua adquiere las mismas características que las observadas con el vino como sustrato. Se pudo comprobar también que si se añaden hierro o manganeso a la mezcla salina indicada el alcohol en solución acuosa se acetifica de manera normal, es decir, en forma análoga a la observada en el vino como sustrato.

5°.- Las experiencias realizadas en atmósferas de oxígeno utilizando la suspensión de bacterias lavadas muestran una acumulación anormal de acetaldehído,

tanto en vino como en solución de alcohol etílico 8% en agua o en mezclas de alcohol, agua y acetaldehído. En todos los casos hubo muy pequeña acetificación.

6°.- Las experiencias hechas en anaerobiosis, también con suspensión de bacterias lavadas, usando vino, alcohol etílico acuoso o solución de aldehído acético en agua, alcohol o vino, como substrato no permitieron comprobar la formación de ácido acético ni la desaparición de acetaldehído, tal como si no existiera el proceso de dismutación del aldehído en alcohol y ácido.

oOo

Gndes

Abartile

Bibliografía

En los casos en que no ha sido posible consultar la obra original se da la fuente utilizada para el conocimiento de su contenido. Las iniciales C.A. significan: Chemical Abstracts.

BERTHO, A. - Ann. 474, 1-64 (1929)

BERTRAND, G. & SAZERAC, R. -
Bull. soc. chim. 15, 627-30
Bull. sci. pharm. 21, 321-4

BLUM, H.B. & FABIAN, F.W. -
Fruit Products J. 22, 326-9,
347 (1943). C.A. 38.46383

BREED, R.S., MURRAY, E. & HITCHENS, A. -
BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology. (1948)

BUTLIN, K.R. -
(1) The Biochemical Activities of the Acetic Acid Bacteria. Spec. Report 2. H.M. Stationary Office. London (1936)
(2) Biochem. J. 32, 1185 (1938)
(3) Biochem. J. 30, 1871 (1936)

COZIC, M. - (1) Rev. Gen. Botan. 48, 212-14, (1936). C.A. 30.48972
(2) Compt. Rendu soc. biol. 112 1387-8 (1933)

DONNALLY, L.H. -
Ind. Eng. Chem. Anal. ed. 6, 241 (1933).

DRATVINA, T.V. -
Microbiology USSR 6, 468-80 (1937). C.A. 32.34473

FRERICHS, G. et al. -

Häuser: Tratado de Bacteriología
tica. 3 ed. 1942.

HAGER. - Ver Frerichs, G. et al.

HENNEBERG, W. -

- (1) Gen.f.Bakt. II Abt 3, 223-8 (1897)
- (2) Gen.f.Bakt. II Abt. 4, 14-20; 67-73; 138-47 (1898)
- (3) Gen.f.Bakt. II Abt. 4, 933-7
- (4) Gen.f.Bakt. II Abt. 17, 789, 804 (1907)
- (5) Handbuch der Gärungsbakteriologie. 2e Abt. 2 bände. Berlin (1926)

HERMANN, S. & NEUSCHEL, P. -

Biochem.Z. 233, 129.

JANKE, A. & KROPACSY, S. -

- (1) Biochem.Z. 278, 37, (1930)
- (2) Biochem.Z. 278, 30, (1930)

JAULMES, P. & ESPEZEL, R. -

Ann. fals. 28, 325-35 (1935).
C.A. 29. 70087

KARABINOS, J.V. & DICKEN, D.M. -

Arch. Biochem. 4, 211-5 (1944).
C.A. 39. 11925

KOLMER, J.A. & BOERNER, F. -

Métodos de laboratorio clínico.
(1943). pag. 143.

KÖNIG, J. - Chemie der Menschlichen Nahrungs
und Genussmittel. Berlin 1903.

LAMPIN, J.O., UNDERKOFER, L.A., PETERSON, W. -
J. Biol. Chem. 146, 277-8 (1942)

- LANDY, M. & STREIGHTHOFF, F.
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 52,
338-341 (1948) PORTER, J.R.
- LEA, C.H. - Ind. Eng. Chem. Anal. ed. 6, 241 (1934)
- LEVINE, M. & SCHOENLEIN, H.W. -
A compilation of culture media.
Baltimore (1930).
- McFARLAND, F. -
J.Amer.Med.Assoc. 49, 1176-8 (1907)
- MOLINARI, H. -
Biochem.Z. 216, 187 (1929)
- MOSSEL, H. - Gen.f.Bakt. II Abt. 87, 193-229
(1932). C.A.27.1710.
- MULDER, E.G. -
Arch.Mikrobiol. 10, 72-86 (1939)
C.A.33.78398
- NEUBERG, C. & NORD, F. -
Biochem.Z. 96, 158-179 (1919)
C.A.14.1133
- NEUBERG, C. & WINDISCH F. -
(1) Biochem.Z. 166, 454 (1925)
C.A.20.2867
(2) Naturwissenschaften 13, 993-6
(1925). C.A.20.929.
- PALMI, T. Ya. -
Microbiology USSR 7, 841-9 (1938)
Deut.Essigind. 44, 5-10 (1940)
C.A.34.40974
- PORCEL, M. & PORCEL, N. -
Estudio morfológico, fisiológico
y bioquímico de bacterias
acéticas. Tesis. FCFN (1947)
- PORTER, J. R. -
Bacterial Chemistry & Physiolo-
gy. N.York (1946)

- PRECHEL, W.-
Estudio del proceso de acetificación por el proceso rápido. Tesis Fac.CEPN (1947)
- PRESCOTT, S.C. & DUNN, C.G.-
Industrial Microbiology. N.York. (1948).
- QUERÉ, H.-
(1) Compt.rendú.193, 445-6 (1931)
(2) Compt.rendú.soc.biol.110, 958-959 (1932)
- ROZENBLATT, M. & MORDKOVICH, M.-
Biochem.Z.209, 83-9 (1929)
C.A.23.42956
- SHERMAN, H. C.-
Chemistry of Food & Nutrition, N.York (1941)
- SIMON, H.-Biochem.Z.224, 253-91 (1930)
- SOC. OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS.-
Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria.
- STEPHENSON, M.-
Bacterial Metabolism. 3 ed. N.York (1949).
- STOKES, J.L. & LARSEN, A.-
J.Bact.42, 495-501 (1945).
- TANAKA, K.-
J.Sci.Hiroshima Univ. B.II 3, 101-20 (1938). C.A.33.58846
- TOMODA, Y.-
* J.Soc.Chem.Ind.48, 76-77 (1929)
- TOŠIĆ, J.-Biochem.J.40, 209-14 (1946)
- TOŠIĆ, J. & WALKER, T. K.-
J.Soc.Chem.Ind.65.104 (1946)

100

111111

111111, 111111
111111, 111111

100