



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EL PAPEL DE LA MICROBIOLOGÍA ENOLÓGICA Y SU
IMPORTANCIA EN LA ELABORACIÓN DE VINOS DE
CALIDAD.”**

**TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIÓLOGO.**

PRESENTA:

VICTOR MANUEL NOGUEZ RAMÍREZ

MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Prof. Lilia Vierna García
Vocal: Prof. Francisco Ruiz Terán
Secretario: Prof. Maricarmen Quirasco Baruch
1er. Suplente: Prof. Ricardo Jasso Chavez
2º Suplente: Prof. Verónica Domínguez Valdez

Sitio en donde se desarrolló el tema: Diferentes bibliotecas y hemerotecas de la ciudad.

Asesor del tema: Q. Lilia Vierna García

Sustentante: Victor Manuel Noguez Ramírez

Doy gracias a mis padres y hermano por enseñarme que la perseverancia es una de las formas más satisfactorias de alcanzar los objetivos de la vida.

Un enorme agradecimiento a la Q. Lilia Vierna García.
Sin su apoyo incondicional esta tesis no hubiera sido posible.

Quiero expresar un gran agradecimiento a mi esposa Ericka,
por compartir conmigo la increíble experiencia de convertirnos en
profesionistas. Por buscar con pasión el crecimiento personal y de pareja.
Te amo.

Agradezco a mis abuelos Carmen, Delfina y Victor.
Porque siempre ha habido una palabra de aliento que
siempre he buscado corresponder.

Agradezco a todos mis amigos. Por estar presentes en las buenas y en las
malas compartiendo las emocionantes pláticas de los planes académicos,
personales y profesionales.

Por último, agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y
a la Facultad de Química, por brindarme una formación integral y
permitirme ser parte de su gran historia.

INDICE

	Pag.
Introducción	
1 EL VINO Y LA ENOLOGÍA TRADICIONAL	1
1.1. EL VINO	1
1.2. EL PROCESO DE PRODUCCIÓN, DE LAS UVAS AL VINO.	2
1.3. TIPOLOGÍA DE VINOS	8
1.4. EL PROCESO FERMENTATIVO	12
1.4.1. ANTECEDENTES	12
1.4.2. FERMENTACIÓN Y METABOLISMO MICROBIANO	12
1.4.3. BIOQUÍMICA DEL PROCESO FERMENTATIVO	13
1.4.4. FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA	20
1.5. COMPOSICIÓN DEL VINO	23
1.5.1. LA UVA	24
1.5.2. EL JUGO DE UVA Y EL VINO	25
1.6. MICROBIOLOGÍA ENOLÓGICA	37
1.6.1. MICROBIOTA NATURAL DE LA UVA Y EL MEDIO DE FERMENTACIÓN	37
1.6.2. LEVADURAS VÍNICAS	38
1.6.3. METABOLISMO DEL GÉNERO SACCHAROMYCES	42
1.6.4. BACTERIAS MALOLÁCTICAS	44
1.6.5. OENOCOCCUS OENOS	46
1.7. EFECTO DE LA DIVERSIDAD Y DINÁMICA POBLACIONAL EN LA CALIDAD DEL VINO	47
2 LA ENOLOGÍA MODERNA	48
2.1. BIOTECNOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL	49
2.2. PROPIEDADES DE UN MICROORGANISMO INDUSTRIAL	52
2.3. SELECCIÓN DE LEVADURAS	52
2.4. DESARROLLO DE LEVADURAS VÍNICAS	54
2.4.1. CONSTITUCIÓN GENÉTICA DE LEVADURAS VÍNICAS	56
2.4.2. TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL ANÁLISIS Y DESARROLLO DE LEVADURAS VÍNICAS	60
2.5. APLICACIONES TECNOLÓGICAS DEL DESARROLLO DE LEVADURAS VÍNICAS	69
3 VINOS TRANSGÉNICOS: COMERCIALIZACIÓN Y LEGISLACIÓN MUNDIAL DE ALIMENTOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS.	74
3.1. ORGANISMOS Y ALIMENTOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS	74
3.1.1. ¿POR QUÉ SE PRODUCEN ALIMENTOS GM?	75
3.2. EL DEBATE PÚBLICO SOBRE ALIMENTOS GM EN EL MUNDO	75
3.3. EVALUACIÓN DE ALIMENTOS GM	79
3.4. EL MERCADO DE LOS "TRANSGÉNICOS"	82
3.4.1. LAS EVIDENCIAS CIENTÍFICAS Y LA POLÍTICA DE CONVENCIMIENTO	86
3.5. LA LEGISLACIÓN MUNDIAL ANTE EL TEMA DE LOS OGM's	87
3.5.1. LA REGULACIÓN DE LA BIOSEGURIDAD EN MÉXICO	92
- Conclusiones	97
- Bibliografía	99

INTRODUCCION

El uso de los seres vivos para satisfacer las necesidades del hombre es milenario. La utilización de microorganismos para producción de bebidas fermentadas y otros productos como el queso ya era conocida desde hace decenas de años. Sin embargo, en años recientes los avances científicos que permiten alterar el material genético de las células, han dado lugar a un fenómeno con enorme potencial económico y social: la nueva biotecnología.

La presente revisión documental muestra la evolución que ha tenido el proceso de elaboración del vino a través de una serie de prácticas que ejemplifican como es que la aplicación del método científico a la elaboración del vino se ha valido de herramientas de la química, la bioquímica, la microbiología, la biotecnología y las técnicas industriales para al final mejorar las prácticas basadas en la tradición y la costumbre.

El vino es el resultado de la fermentación del azúcar de la uva a través de una reacción microbiológica compleja en la que se produce un desarrollo secuencial de levaduras y bacterias lácticas, sin embargo; el vino dista mucho de ser una simple solución de agua, ácidos y alcohol. La gama de reacciones bioquímicas que se dan durante la elaboración del vino, dan como resultado un amplio número de componentes que al encontrarse en perfecta armonía, producen un vino de calidad. Esta calidad, entendida como el cumplimiento de las exigencias de los actuales mercados, ha derivado en una mayor apertura a las innovaciones tecnológicas. La aplicación de dichos avances tecnológicos permitirá orientar la elaboración de vino a un mercado al que, las actuales restricciones (cambio en las tendencias de mercado, globalización y un abismo creciente entre la producción y el consumo) le imponen una gran competitividad. Un ejemplo de estas innovaciones son los numerosos artículos de investigación que constituyen la base documental de este trabajo y que ponen de manifiesto las enormes posibilidades que ofrecen el conocimiento y la manipulación de la funcionalidad biotecnológica de uno de los organismos estrella de la biotecnología, la levadura.

Las condiciones técnicas de la fermentación se han ido mejorando para facilitar el crecimiento de las levaduras e impedirlo a otros huéspedes indeseables que pueden estropear el vino. Dichas mejoras técnicas han evolucionado desde la adición de levaduras seleccionadas y cultivadas hasta la utilización de técnicas de ingeniería genética para obtener características específicas y poder tener así, "levaduras a la carta" que el enólogo pueda utilizar como una herramienta para producir el vino deseado en cada proceso de vinificación.

Se están desarrollando cepas de levaduras enológicas orientadas al mercado, cuyo principal objetivo es conseguir una producción más competitiva y con menores costos, mayor calidad y menor impacto ambiental, y todo ello optimizando las propiedades nutricionales y sensoriales del vino. Esto cumple con el objetivo de hacer uso de las herramientas de la biotecnología hacia la simplificación de procesos y a la obtención de un producto en cantidades y características reproducibles.

Saccharomyces cerevisiae ha sido el primer eucariota con el genoma completamente secuenciado, por lo que se ha convertido en un organismo modelo para estudios de análisis de genética funcional, a lo cual se suma su gran interés biotecnológico en sectores como el enológico.

En general, los beneficios ofrecidos por la biotecnología son enormes; sin embargo han aparecido un conjunto de preocupaciones respecto a su uso, principalmente al asociado con los eventuales riesgos de causar daños a la salud y al ambiente, al liberar organismos modificados por técnicas de ingeniería genética. Recientemente, el debate sobre la biotecnología ha venido a añadirse a la lista de temas de debate, con significativa dimensión ambiental, junto a otros como conservación, contaminación, uso y gestión de recursos, biodiversidad, salud, etc. Este debate, que excede los límites medioambientales, pues tiene incidencia sobre aspectos económicos, éticos, científicos y legales, ha empezado con fuerza y crecido rápidamente, saltando desde los ámbitos estrictamente científicos a los medios de comunicación, y llegando a la opinión pública y a las instituciones nacionales e internacionales. Los vinos fermentados con levaduras modificadas se han sumado ya al controvertido mundo de los alimentos “transgénicos” con potencial de ingresar al mercado mundial. Ante esto, se incluye una revisión del panorama global al desarrollo, comercialización, aceptación, regulación y consumo de alimentos derivados de procesos biotecnológicos.

Con todo esto, se pretende visualizar a grandes rasgos si el futuro del conjunto de investigaciones que serán revisadas en este trabajo será o no la aplicación a los procesos enológicos comerciales.

CAPITULO 1

EL VINO Y LA ENOLOGÍA TRADICIONAL

1.1. EL VINO

El vino es el resultado de la fermentación del azúcar de la uva tras los procesos de colecta, transporte, prensado y posterior reposo en recipientes adecuados hasta que el azúcar, mediante la fermentación se convierte en alcohol. Las reacciones bioquímicas de la fermentación del vino son causadas por cultivos microscópicos que crecen en el medio rico y natural del jugo fresco de la uva produciendo enzimas que convierten el azúcar mediante una serie de reacciones bioquímicas en alcohol, dióxido de carbono y otros productos de la fermentación (Vogt, J.; Lemperle, W, 1984).

A mediados del siglo XIX no se conocían las causas ni los agentes que determinaban la formación del vino, se sabía que los líquidos azucarados, una vez fermentados, contenían alcohol y dióxido de carbono. Los descubrimientos de Louis Pasteur (1822–1895) explicaron de un modo lógico muchas de las venerables prácticas procedentes de la antigua Grecia y Roma. De ahí en adelante se desarrolló el conocimiento para entender todos los mecanismos fermentativos, seguirlos, reproducirlos y dirigirlos.

El buen vino resulta del buen tratamiento de la uva más que de la buena suerte, y así, a lo largo de los siglos, el hombre ha ido aprendiendo, primero a base de ensayos y errores, más tarde con experimentos científicos, el modo de mejorar la técnica de obtención del vino (Vogt, J.; Lemperle, W, 1984). Este conocimiento sentó las bases para el surgimiento de lo que hoy se conoce como Enología o "ciencia que trata de todo lo relativo a los vinos" (Murno Hernan, 2001).

1.2. EL PROCESO DE PRODUCCIÓN, DE LAS UVAS AL VINO

El ingrediente básico del vino es, a todas luces, la uva. Si bien, distintos tipos o variedades de uva muestran diferencias considerables, la piel, la pulpa y con algunas excepciones las semillas dotarán al vino de cualidades propias. El proceso de vinificación parte del conocimiento de la naturaleza de cada uno de los componentes de la uva y de su aportación al producto final. Con base en esto, se determinan las operaciones a realizar hacia la obtención del tipo de vino deseado.

A continuación se detallan las principales operaciones que se llevan a cabo para la fabricación del vino:

a.- Vendimia y recepción

A finales de Septiembre en el hemisferio norte y a finales de Febrero en el sur, se inicia la vendimia (Fig. 1.1.). Hay que esperar a que las uvas hayan alcanzado el grado de madurez deseado.

Es muy importante que la uva llegue en buenas condiciones a las bodegas, sin haber sufrido roturas, ni haberse iniciado fermentaciones prematuras. Previamente, todas las instalaciones de la bodega, recepción de la uva, prensas, tanques de fermentación, se deben haber limpiado y preparado convenientemente. Importante también es que la uva no tenga que esperar muchas horas para entrar en la bodega. Lo ideal sería que conforme llegase se fuera procesando.

(Madrid A. et. al, 1994)



Fig. 1.1. Vendimia y Recepción.

b.- Estrujado

La primera operación que se lleva a cabo una vez que la uva se encuentra en la tolva de recepción, es enviarla a una máquina estrujadora (Fig. 1.2.) con despallado o no.

Los frutos son triturados para obtener el jugo fresco que posteriormente será fermentado. La pulpa y la piel constituyen los elementos básicos en el proceso de fabricación del vino. Las semillas contienen tanino y una sustancia oleaginosa y resinosa que puede llegar a estropear el vino, por lo que se ha de evitar romperlas al prensar la uva.

Otro elemento que puede tomar parte en la fabricación del vino es el raspón que es la parte leñosa del racimo. Asimismo es rico en tanino y se utiliza en la zona de vinos suaves durante el encubado. No obstante, en la mayoría de los casos es separado del mosto antes de introducirlo en la cuba de fermentación.

Por lo que respecta a los vinos blancos, la semilla debe ser separada del mosto ya que libera una enzima oxidasa que provoca en el jugo, y mas tarde en el mismo vino, una coloración marrón. (Madrid A. et. al, 1994)

El viticultor elige un método de estrujado adecuado para la variedad de uva y el vino que se pretende conseguir (Simon Joanna, 2002).



Fig. 1.2. Estrujado

c.- Sulfitado

Posterior al proceso de estrujado, se añade a la vendimia, dióxido de azufre con el propósito de:

- Inhibir el crecimiento de levaduras y bacterias de manera que la fermentación no se produzca de manera tumultuosa e incontrolada.
- Proteger al mosto del aire.
- Inactivación de oxidasas para evitar la oxidación de los mostos.
- Seleccionar la población microbiana, inhibiendo el crecimiento de las levaduras no productoras de alcohol, dando oportunidad de acción a las levaduras productoras del mismo.
- Facilita la disolución de materias colorantes con lo que se obtienen vinos con características de color que hoy en día demanda el mercado.
- Obtener vinos con mayor grado alcohólico y menos contenido residual de azúcares.

(Madrid A. et. al, 1994)

d.- Ecurrido y prensado

Una vez realizado el estrujado de la vendimia, esta pasa a un proceso de escurrido (Fig. 1.3.) para la obtención del mosto que posteriormente se fermentará. Esta operación se realiza en máquinas escurridoras provistas de prensas con el fin de separar totalmente el mosto de la vendimia.

En los vinos tintos la piel es conservada, mientras que en los blancos es separada de la uva desde el principio. La presión que hay que ejercer sobre un grano depende como es lógico de muchos factores tales como: variedad, grado de madurez, dimensiones, piel, presencia o no de partes leñosas, etc. Esta rotura selectiva se traduce en el prensado por una composición variable de los mostos liberados. Cuando se trata de uva que ha sido despalillada, estrujada y escurrida previamente el grano está ya dividido y roto, lo que hace el la mayoría del mosto no tenga que llegar a la prensa. Cuando el prensado se hace en presencia de partes leñosas y las pepitas hay que tener cuidado para no dañarles ya que transmitirán sustancias de sabor desagradable al caldo.

(Madrid A. et. al, 1994)



Fig. 1.3. Ecurrido y Prensado

e.- Fermentación

La conversión clásica del mosto de uva en vino es un proceso de tipo biológico realizado por los microorganismos que de modo natural se adhieren a la piel de la uva transformando el azúcar en alcohol y dióxido de carbono. (Madrid A. et. al, 1994)

Existe gran variedad de microorganismos capaces de llevar a cabo el proceso de fermentación, pero no todos pueden ser utilizados por el viticultor. Estos microorganismos se clasifican según el género, la especie y la variedad, siendo la especie de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* la utilizada principalmente en la producción del vino. La familia antes citada goza del principal crédito entre viticultores debido a su capacidad de transformar el azúcar más íntegramente que cualquier otra. Pero no es el único microorganismo que contribuye en el proceso; existen otros que ayudan a desarrollar el aroma y sabor del vino y según su cantidad y género influyen de modo considerable en la calidad de los caldos (Vogt, J.; Lemperle, W, 1984).

En adelante se tratarán a fondo los temas del proceso fermentativo y de los microorganismos que lo llevan a cabo.

f.- Clarificación

Tras la fermentación, el vino resultante suele ser opaco. Para que el caldo gane en equilibrio y mejore su aspecto, los viticultores emplean diversos métodos a fin de clarificarlo (Fig. 1.4.).

Esto se puede conseguir por cualquiera de los siguientes métodos:

- Decantación.
- Decantación con ayuda de clarificantes o tratamientos enzimáticos.
- Centrifugación.
- Separación en filtros rotativos al vacío.

El vino obtenido después de la operación de clarificación es más suave, más fresco, más aromático y se oxida menos (Simon Joanna, 2002).

Como ya se ha mencionado, con el fin de acelerar el clarificado de los vinos, la decantación se puede combinar con la adición de agentes clarificantes y/o enzimas. Los agentes clarificantes (bentonita, gelatinas y albúminas) precipitan los sólidos en suspensión, que sedimentan en el fondo. Las enzimas descomponen las pectinas presentes en el vino procedentes del mosto, consiguiendo así una disminución de la viscosidad y una clarificación más rápida. En general se llaman sustancias pectínicas a un conglomerado de hidratos de carbono, que aparecen en estado coloidal en los jugos de frutas (Madrid A. et. al, 1994).

El filtrado por si mismo, no es perjudicial para el vino si el equipo con el que esta operación se lleva a cabo es competente y los filtros son buenos. Mientras se evite el contacto con el aire y los materiales de los filtros sean buenos, el vino mejora tras este tratamiento (Vogt, J.; Lemperle, W, 1984).



Fig. 1.4. Clarificación

g.- Añejamiento

Muchos vinos nunca entran en contacto con el roble de las barricas y se embotellan directamente después del filtrado. Otros, tanto blancos como tintos, se añejan (Fig. 1.5.) para que desarrollen sabores más complejos y una textura más rica (bouquet).

La mayor parte de los buenos vinos gana con el paso del tiempo, tanto en barril como en botella, pero siempre llega un momento en que empiezan a decaer y, finalmente, se echan a perder por completo. ¿Qué le sucede al vino durante su añejamiento? Las sales se precipitan, la acidez disminuye y los alcoholes, ácidos y demás componentes se transforman en innumerables compuestos como ésteres, aldehídos, acetatos, etc.

El añejamiento es importante para acelerar la clarificación y la estabilidad de los vinos, confiriéndoles ciertas características propias de la madera pues, una vez embotellados, los vinos ya no pueden recibir más tratamientos ni cuidados (Simon Joanna, 2002).

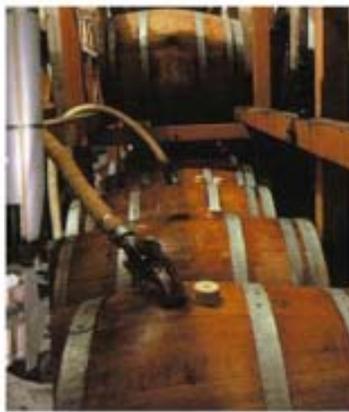


Fig. 1.5. Envejecimiento

El envejecimiento en botella es un tema controversial entre científicos y viticultores ya que se ha discutido que tan significativa resulta la influencia del aire que logra entrar a la botella a través del corcho. El hecho es que el vino cuando se embotella, ya contiene algo de aire, y este aire puede jugar cierto papel en las subsiguientes transformaciones. Al embotellar el vino, es preciso cuidar la cantidad de aire que se permite entrar a la botella, a fin de que los cambios oxidativos sean mínimos y los cambios reductivos puedan desarrollarse adecuadamente (Simon Joanna, 2002).

1.3. TIPOLOGÍA DE VINOS

Dependiendo de la variedad de uva empleada y al tipo de proceso de fermentación seguido, los vinos de mesa se pueden clasificar en los siguientes estilos:

➤ BLANCOS

CARACTERÍSTICAS

- Frescos, secos, ligeros de cuerpo.
- Secos a semidulces, aromáticos y florales.
- Fuertes, de cuerpo medio.
- Profundos y potentes con cuerpo.
- Dulces a muy dulces.



➤ ROSADOS

CARACTERÍSTICAS

- Secos y afrutados.
- Secos.



➤ ESPUMOSOS

CARACTERÍSTICAS

- Champagne francés.
- Imitaciones de Champagne.



➤ TINTOS

CARACTERÍSTICAS

- Frescos, afrutados, bajos en tanino, para beber hoy.
- De cuerpo medio a pleno sin exceso de madera.
- Plenos, potentes y especiados envejecidos en roble.



(Simon Joanna, 2002)

Para simplificar la descripción del proceso de vinificación, se considerarán los tipos de vino más significativos, el vino tinto y el blanco.

Algunas diferencias en el proceso de elaboración de estos vinos (Fig.1.6) son las siguientes:

- **Vinos tintos:**

En los vinos tintos, se deja fermentar la uva con sus pieles durante un periodo de tiempo variable según el tipo de vino que se desee. El tiempo de fermentación varía según la tradición de la región vinícola desde cinco días a cuatro semanas. Con respecto a la temperatura de fermentación, la misma debe mantenerse entre 25° y 30°C, siendo lo ideal 27°C. Durante la fermentación, la pulpa y las pieles - que dan color y liberan el tanino - flotan en la parte superior del jugo formando una capa también llamada sombrero. Esta capa es continuamente removida para mezclar los elementos que la contienen con el jugo. Una vez finalizada la fermentación, se saca el vino y la capa cae al fondo de la cuba de fermentación. El vino, al añejarse en madera, se va clarificando y se siguen dando distintas reacciones fisicoquímicas hasta completarse la fermentación.

Durante el primer año de añejamiento, el vino tinto se dispone en barriles o barricas cuya tapadera permanece solo ajustada, a fin de ir llenándolas a medida que el caldo se evapora. Con el paso de los meses, el vino pierde la aspereza del tanino y va convirtiéndose en más agradable al gusto. El color que subirá de tono, desde tonos poco vívidos, alcanzará en un año el rojo profundo. Durante la primera fase el vino está en reposo y las pequeñas partículas resultantes de la fermentación se depositan lentamente en el fondo de la barrica; a continuación el vino es trasvasado a una barrica limpia y estéril y los sedimentos o posos quedan en la vieja. Este proceso de trasvase se denomina trasegado. En adelante, el vino se torna más oscuro y el sabor más profundo además, el contacto con la madera le imprime carácter y lo madura. El vino finalmente es clarificado, embotellado y comercializado (Vogt, J.; Lemperle, W, 1984).

- **Vinos blancos:**

Significativa importancia en la elaboración de cualquier vino blanco tiene la pronta separación de las pieles de la uva del mosto. La uva es separada y prensada tan pronto llega a la bodega, y el mosto es recogido aparte en cubas o tanques para que fermente.

Para obtener el vino blanco de mayor calidad, es importante que el mosto de la uva aparezca tan libre de sólidos suspendidos como sea posible antes de iniciar el proceso de fermentación.

Para que así ocurra se deja reposar el mosto durante una noche y, a continuación, se trasiega dejando los posos en la primera barrica.

El secreto para obtener un buen vino blanco reside en una fermentación lenta y controlada alrededor de los 20°C, ya que si la fermentación se realiza a temperaturas elevadas es posible que se eliminen una parte de los aromas. Fermentando a temperaturas bajas se produce una mayor cantidad de glicerina.

El oxígeno juega un papel menos importante en la maduración en madera que en la de los tintos, y su presencia no es imprescindible durante su elaboración. Al finalizar los procesos de la primera fermentación, los posos empiezan a asentarse y, a continuación, debe realizarse un segundo trasiego ligero con el fin de no eliminar la totalidad de los microorganismos y así permitir una segunda fermentación, la maloláctica. Esta segunda fermentación es de inmensa importancia para los vinos blancos puesto que permite a las zonas de climas fríos, poder obtener vinos bajos en acidez propiciando la conversión del ácido málico en ácido láctico. Por otro lado, en zonas climáticas cálidas, si se desea un vino con un grado de acidez adecuado, es posible impedir que esta fermentación secundaria se lleve a cabo (Vogt, J.; Lemperle, W, 1984).

Sobre el proceso de la fermentación maloláctica se hablará más adelante.

Muchos viticultores consideran que la temperatura óptima para la fermentación va de los 16 a los 21°C, pero hay quienes aún utilizan temperaturas más bajas. Una fermentación lenta y fría aprovecha mejor las cualidades frutales de la uva y da como resultado un vino de mejor calidad que el procedente de una fermentación rápida. Los vinos blancos se envejecen a temperaturas más bajas que los tintos. Los tartratos y otras sustancias disueltas en los caldos –más importantes en cuanto a cantidad que en los tintos- se precipitan mejor a baja temperatura, lo cual es importante si se considera que en la actualidad son más apreciados los vinos transparentes o claros.

Los vinos blancos secos son embotellados bastante pronto, antes que los dulces. Normalmente, un año a dieciocho meses en barriles bastan para clarificarlos antes de refinarlos, trasegarlos y embotellarlos o comercializarlos. La clarificación de los vinos blancos, al igual que en los tintos, debe realizarse sólo si organolépticamente y químicamente se juzga necesario.

El proceso de añejamiento en botella es similar tanto para los vinos blancos como para los tintos. Menos tiempo para los secos y más para los dulces. Por lo general, en los vinos blancos secos espreciado sobre todo el aroma fresco y nuevo de la uva, mientras que en los dulces ese mismo aroma se desarrolla con el tiempo, tras varios años de permanecer en la botella (Vogt, J.; Lemperle, W, 1984).

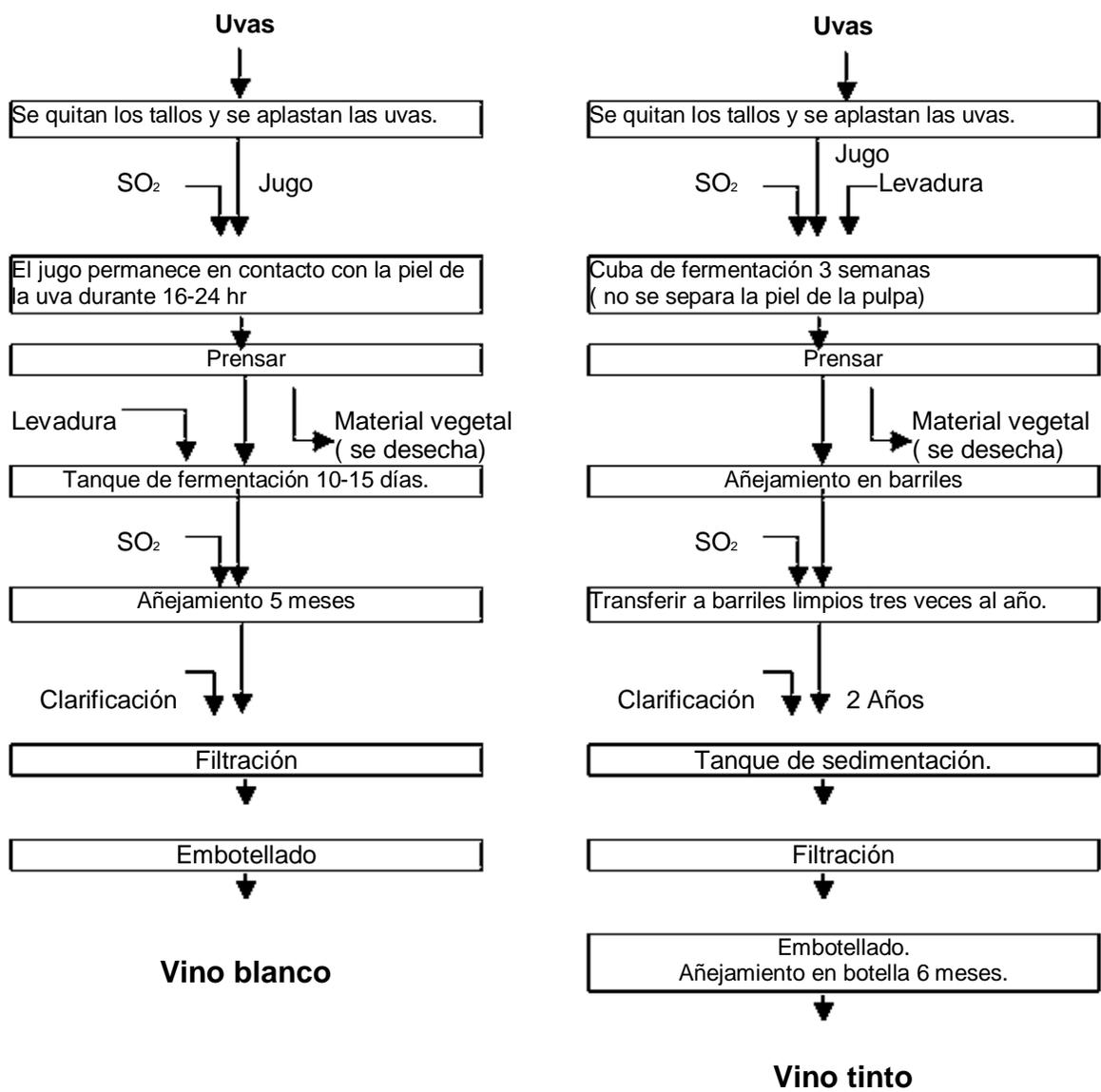


Fig. 1.6. Esquema que ejemplifica el proceso que sigue la producción de un vino blanco y un vino tinto dejando ver los puntos en los que difieren uno del otro.

1.4. EL PROCESO FERMENTATIVO

1.4.1. ANTECEDENTES

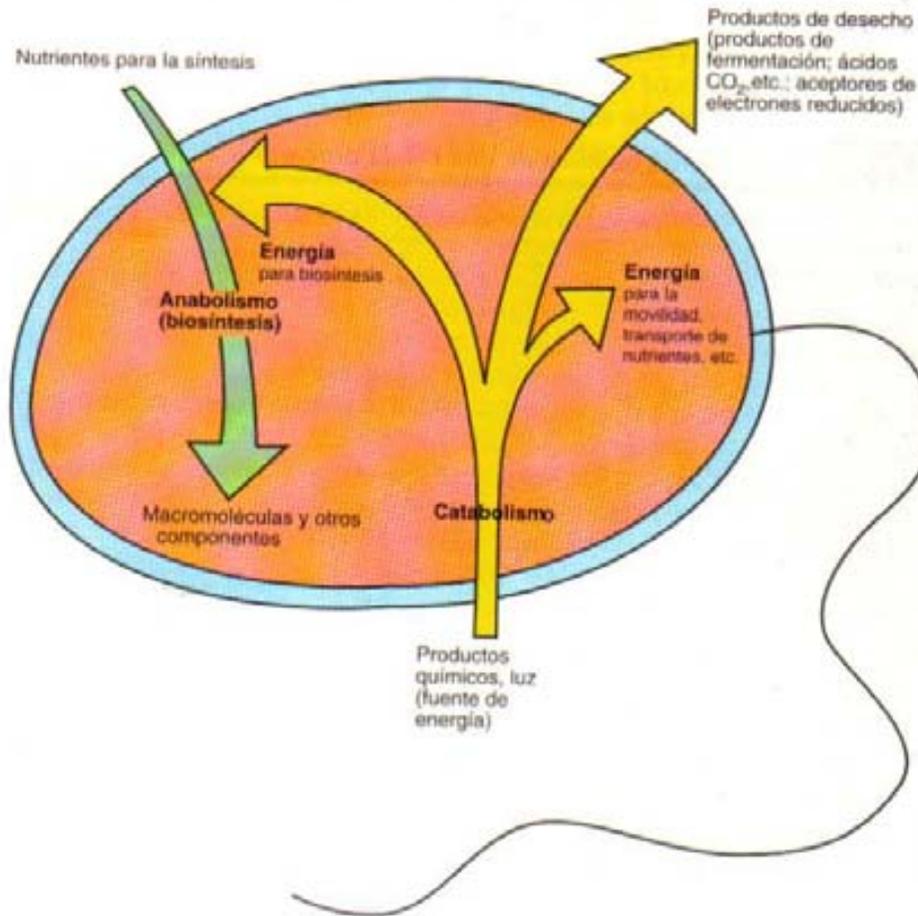
La idea básica que se tiene sobre el proceso fermentativo es que agentes microscópicos transforman azúcar en alcohol. En lo que se refiere al vino, la fermentación fue considerada durante siglos en muchas escuelas de cata y vinos como una sola entidad, como un proceso único mediante el cual el azúcar se transforma en alcohol por acción de levaduras generándose como efecto secundario dióxido de carbono (CO₂). (De Serdio Ernesto, 2001)

Cabe señalar que al proceso descrito anteriormente se le llama fermentación primaria o básica. Más técnicamente se le conoce como fermentación alcohólica. A partir de ahí, se derivan otros tipos o variantes de fermentación, las cuáles se dan dependiendo de los agentes microbiológicos implicados o a condiciones de proceso determinadas.

1.4.2. FERMENTACIÓN Y METABOLISMO MICROBIANO

El término metabolismo se refiere a todos los procesos químicos que tienen lugar dentro de una célula con el fin de transformar los elementos del medio en constituyentes celulares (Fig.1.7). Las células microbianas están constituidas de sustancias químicas de una amplia diversidad de tipos y, cuando una célula crece, todos sus constituyentes químicos aumentan en cantidad apropiada. Los elementos químicos básicos de una célula vienen del exterior, pero estos elementos químicos son transformados por la propia célula en los constituyentes característicos. El proceso por el cuál una célula se constituye a partir de nutrientes del medio se denomina anabolismo. Debido a que el anabolismo da como resultado la síntesis bioquímica de un nuevo material celular, también se le conoce como biosíntesis.

La biosíntesis es un proceso que requiere energía y, cada célula debe poseer los medios para obtener energía. La mayor parte lo hacen por oxidación de compuestos químicos. Los productos químicos utilizados como fuente de energía son degradados en constituyentes más simples liberando energía. A este proceso se le denomina catabolismo (Madigan, M.T, et.al., 2003).



(Madigan, M.T., J.M. Martinko, J. Parker, 2003)

Fig. 1.7. Metabolismo celular.

En esta figura se muestra una simplificación del metabolismo celular en la cual se pueden observar las funciones anabólicas de constitución de componentes celulares a partir de nutrientes del medio, mientras que en el catabolismo, las fuentes de energía del medio son convertidas en productos de desecho.

1.4.3. BIOQUÍMICA DEL PROCESO FERMENTATIVO

Como ya se ha comentado, existen dos formas principales por las cuáles los microorganismos obtienen energía para realizar todos los procesos involucrados en el metabolismo, uno de ellos es la obtención de energía por medio de la luz y la otra es por oxidación de los nutrientes del medio.

Las rutas para la obtención de energía por oxidación de nutrientes puede dividirse en dos grandes grupos:

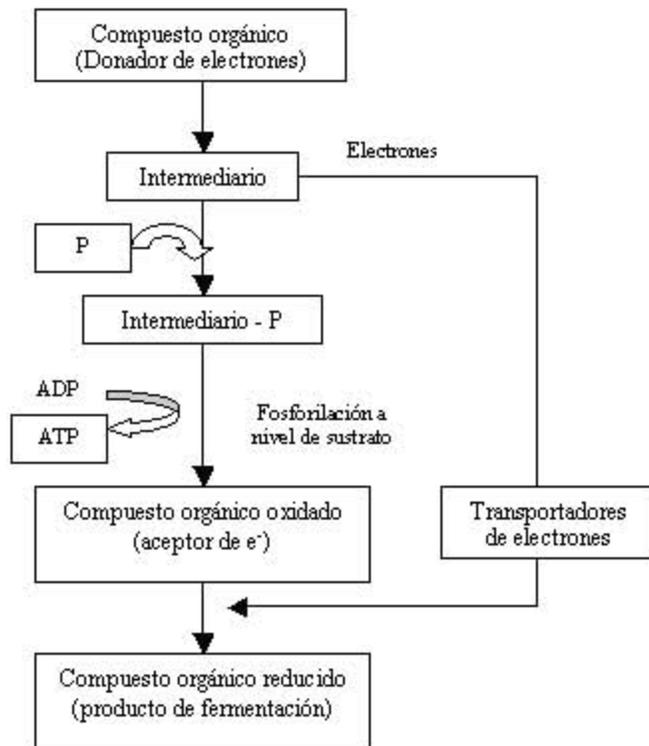
- 1) **Fermentación**, en que los procesos de oxidación-reducción ocurren en ausencia de oxígeno como aceptor final de los electrones del NADH producido en la glicolisis (que funciona como proceso anaerobio).
- 2) **Respiración**, en el que el oxígeno molecular u otros oxidantes (NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2) sirven como aceptores terminales de electrones.

La fermentación es un proceso catabólico de oxidación incompleto, siendo el producto final un compuesto orgánico. Estos productos finales son los que caracterizan los diversos tipos de fermentaciones.

La necesidad de un aceptor final, para los electrones procedentes del NADH, distinto del oxígeno (NO_3^- , Fe^{3+} , SO_4^{2-} , CO_2) hace que se emplee un compuesto orgánico que se reducirá para poder reoxidar el NADH. El compuesto orgánico que se reduce (acetaldehído, piruvato, ...) es un derivado del sustrato que se ha oxidado anteriormente (Madigan, M.T, et.al., 2003).

En ausencia de aceptores de electrones, muchos organismos llevan a cabo las reacciones de oxidación-reducción de compuestos orgánicos balanceados internamente con liberación de energía, proceso denominado fermentación.

La oxidación en una fermentación está acoplada a la reducción concomitante de un compuesto orgánico generado por catabolismo a partir del primer sustrato fermentable. Por ello no se necesita la adición de un aceptor exógeno de electrones (Fig.1.8).



(Madigan, M.T., J.M. Martinko, J. Parker, 2003)

Fig. 1.8. En las fermentaciones, el ATP se produce por un proceso denominado fosforilación a nivel de sustrato. En este proceso el ATP se sintetiza durante el catabolismo del compuesto orgánico y en pasos enzimáticos muy concretos.

Durante el catabolismo de la glucosa por bacterias lácticas el resultado es el siguiente:



De igual manera, el catabolismo de la glucosa por las levaduras en ausencia de oxígeno, presenta la siguiente ecuación:



La energía liberada en la fermentación de la glucosa hasta etanol o lactato (-235 y -198 KJ/mol, respectivamente) se conserva, a través de la fosforilación a nivel de sustrato, como enlaces fosfato de alta energía en ATP, con producción neta de dos enlaces de este tipo en cada caso (Madigan, M.T, et.al., 2003).

GLUCÓLISIS: LA RUTA DE EMBDEN-MEYERHOF

Una vía común para la fermentación de la glucosa es la glucólisis, también conocida como ruta de Emden Meyerhof.

La glucólisis puede ser dividida en tres etapas principales, cada una de las cuáles implica reacciones individuales catalizadas enzimáticamente (Fig. 1.9.).

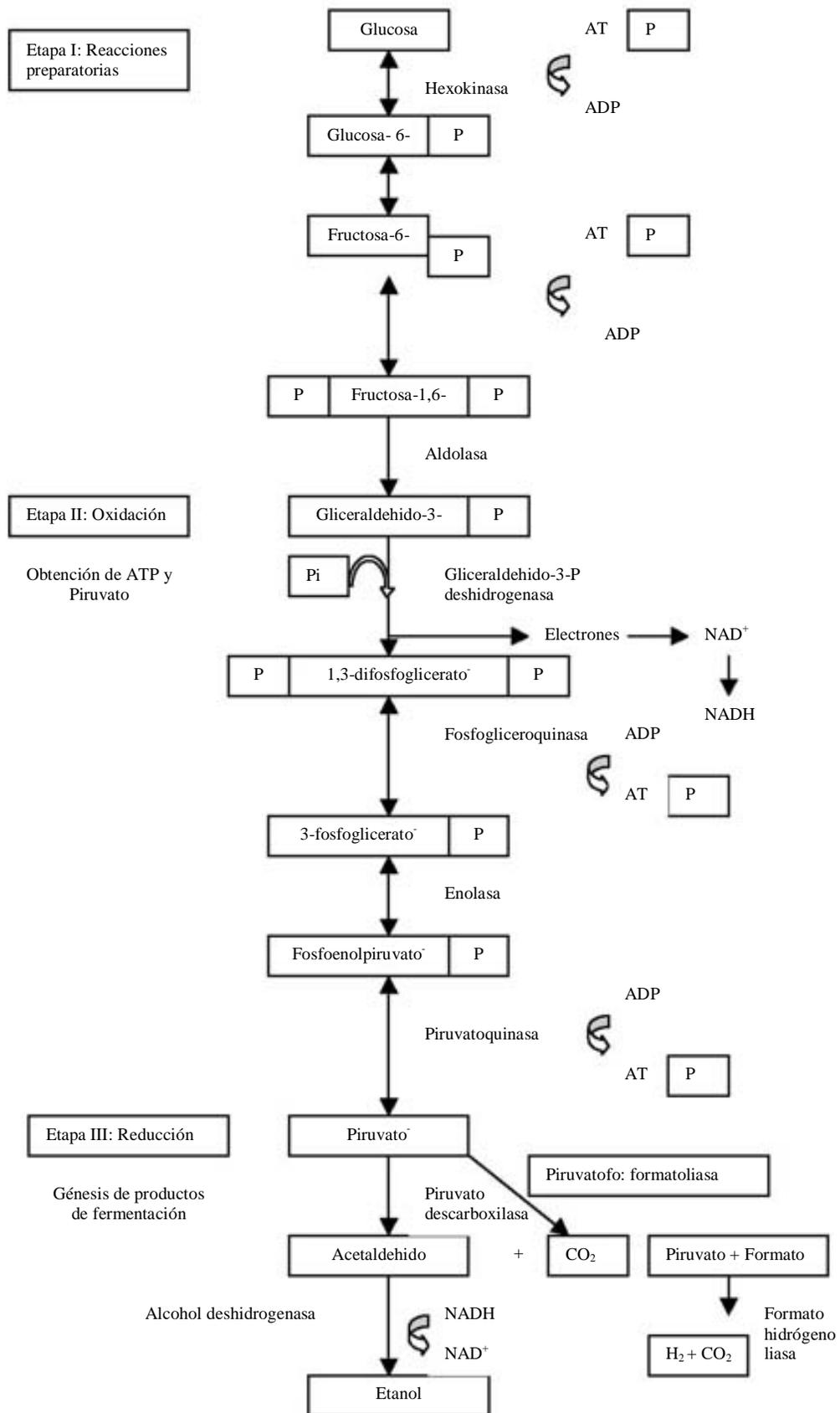


Fig. 1.9. La ruta de Embden-Meyerhof o glucólisis.

La etapa I de la Glucólisis la constituyen una serie de arreglos preparatorios que no implican ni oxidación ni reducción y no liberan energía, pero que conducen a la producción a partir de la glucosa de dos moléculas del intermediario clave, gliceraldehído 3-fosfato. En la segunda etapa sí ocurre oxidación-reducción, se producen enlaces de alta energía en forma de ATP a la vez que se originan dos moléculas de piruvato.

En la etapa III tiene lugar una segunda oxidación-reducción así como la síntesis de los productos de fermentación (por ejemplo, etanol y CO_2 o ácido láctico).

ETAPAS I Y II: REACCIONES PRELIMINARES Y REDOX

En la etapa I, la glucosa es fosforilada por ATP dando lugar a glucosa 6-fosfato; reacciones de fosforilación de este tipo a menudo ocurren antes que la oxidación. La fosforilación inicial de la glucosa activa la molécula para las subsiguientes reacciones. La glucosa 6-fosfato es convertida en una forma isomérica, la fructosa 6-fosfato y una fosforilación adicional la convierte en fructosa 1,6-difosfato, que es el metabolito intermediario clave de la glucólisis. La enzima aldolasa cataliza la ruptura de la fructosa 1,6-difosfato en dos moléculas de tres carbonos, el gliceraldehído 3-fosfato y su isómero dihidroxiacetona fosfato. Hasta este momento no se presenta reacción de oxidación-reducción y todas las reacciones incluyendo las de consumo de ATP, proceden sin transferencia de electrones. La reacción de oxidación en la glucólisis ocurre en la etapa II durante la conversión del gliceraldehído 3-fosfato en ácido 1,3-difosfoglicérico. En esta reacción (que ocurre dos veces, una por cada molécula de gliceraldehído 3-fosfato), una enzima cuyo coenzima es NAD^+ acepta dos átomos de hidrógeno y el NAD^+ se convierte en NADH; a la enzima que cataliza esta transformación se llama gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Simultáneamente cada molécula de gliceraldehído 3-fosfato es fosforilada por la adición de una molécula de fosfato inorgánico. Esta reacción, en la que el fosfato inorgánico se convierte en orgánico, prepara el escenario para la conservación de la energía por fosforilación a nivel de sustrato; la formación de ATP resulta posible porque cada uno de los fosfatos en la molécula de ácido 1,3-difosfoglicérico representa un enlace fosfato de alta energía (Fig. 1.10.).

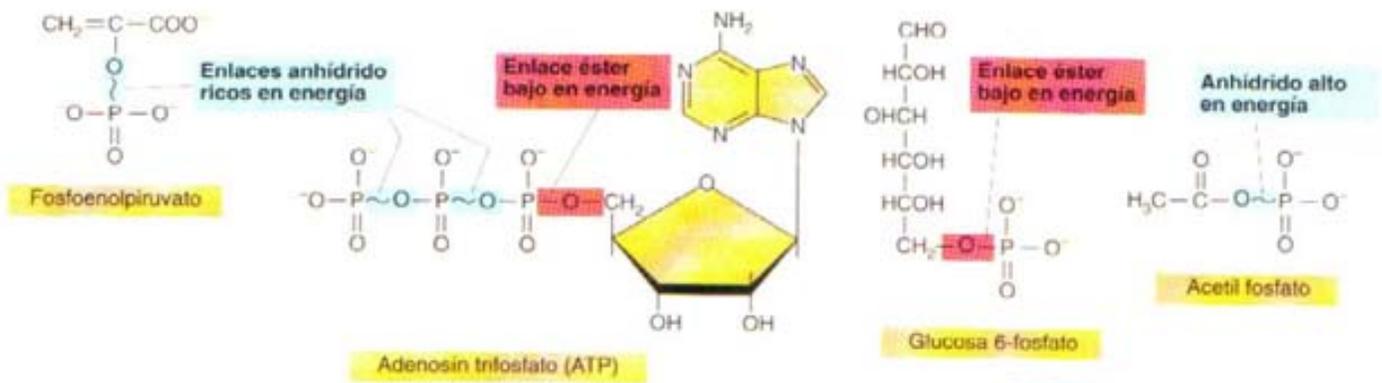


Fig. 1.10. Fosforilación a nivel de sustrato.

La síntesis de ATP tiene lugar cuando cada molécula de ácido 1,3-difosfoglicérico se convierte en ácido 3-fosfoglicérico y más tarde en la vía, cuando cada molécula de fosfoenolpiruvato se convierte en piruvato.

En la Glucólisis se consumen dos moléculas de ATP en las dos fosforilaciones de la glucosa y se sintetizan cuatro moléculas (dos de cada ácido ,3-difosfoglicérico que se convierten en piruvato). Por tanto la ganancia neta del organismo son dos moléculas de ATP por molécula de glucosa fermentada (Madigan,M.T, et.al., 2003).

ETAPA III: OBTENCIÓN DE PRODUCTOS DE FERMENTACIÓN

Durante la formación de dos moléculas de ácido 1,3-difosfoglicérico, se reducen dos moléculas de NAD^+ hasta NADH. Sin embargo, una célula contiene solamente pequeñas cantidades de NAD^+ y si todo fuese convertido en NADH, la oxidación de glucosa se detendría; la oxidación continua de gliceraldehído 3 fosfato puede proseguir, si existe NAD^+ que puede aceptar los electrones liberados. Este bloqueo en la fermentación se solventa por la oxidación de NADH de nuevo en NAD^+ a través de reacciones que implican la reducción de piruvato hasta uno de los muy diversos productos de fermentación. En el caso de las levaduras, el piruvato se reduce a etanol con la producción de CO_2 en la fermentación alcohólica mientras que en las bacterias ácido lácticas, el piruvato se reduce a lactato para dar a cabo la llamada fermentación láctica (Madigan,M.T, et.al., 2003).

1.4.4. FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA

Transformar azúcar en alcohol es la premisa básica de todos los tipos de fermentación alcohólica. Cuando se trata de la fermentación maloláctica (FML), la primera característica que la diferencia de las otras es que su efecto principal no es la conversión de azúcar en alcohol, sino la transformación de ácido málico en láctico. La segunda premisa es que ahora las levaduras no juegan papel alguno. Aquí las estrellas son las bacterias, más concretamente las bacterias lácticas. La única coincidencia con otras variantes fermentativas es que durante la FML también se genera dióxido de carbono, aunque de ninguna manera en las cantidades que producen durante la fermentación alcohólica. Su representación química fue establecida por primera vez por Seifert en 1901:



La FML es un proceso natural por el cual principalmente el ácido málico del vino se transforma por acción de bacterias lácticas en ácido láctico.

Tiene lugar espontáneamente, total o parcialmente, en todos los tipos de vinos así como en otros jugos fermentados de frutas (manzanas, peras, ciruelas, cerezas...) en cuyos hollejos o pieles frutales están presentes bacterias lácticas. Es más común y se completa más rápidamente en vinos tintos que en blancos. La FML siempre viene acompañada de crecimiento bacteriano y reacciones físico-químicas típicas de todos los procesos fermentativos, tales como turbidez, formación de nuevos compuestos, desprendimiento de CO₂ y variaciones del color, que afectan a las propiedades organolépticas y estructura de la bebida que la soporta (Boulton Roger B, 1999).

Como ya se ha descrito, los agentes biológicos responsables de la fermentación maloláctica son las bacterias lácticas, las cuáles pueden ser clasificadas taxonómicamente como sigue:

Clase	Familia	Género
Bacilos	I: <u>Lactobacillaceae</u>	I: <u>Lactobacillus</u>
		III: <u>Pediococcus</u>
	V: <u>Leuconostocaceae</u>	II: <u>Oenococcus</u>

(Garrity G, et.al, 2001)

Se ha probado que las más importantes son Oenococcus oenos y Pediococcus sp.

Los enólogos emplean los diferentes tipos de fermentación por diversas y variadas razones, que en principio dependerán del 'estilo' que se pretenda conseguir en el vino final, ya sea suave o dominado por la madera, exuberante o frutal. Las condiciones del viñedo, el suelo, la uva, climatología, aspectos nutricionales, reacciones físico-químicas, son todos factores que influirán en la decisión del enólogo a la hora de provocar y/o impedir las fermentaciones. La fermentación maloláctica no es en este sentido ninguna excepción.

Una vez que los factores externos a la bodega han sido tomados en consideración, la FML puede verse controlada dentro de la bodega por los siguientes factores:

- **El pH del vino:** Tanto los pHs bajos (<3.0) como los altos (>4.5) inhiben el crecimiento de las bacterias lácticas y por lo tanto la FML.
- **Temperatura:** Las bacterias lácticas crecen y se desarrollan mejor con temperaturas entre 20° C y 30°C. Temperaturas más frías (menos de 15°C) harían que la FML se detuviese. Antes de que se introdujese la tecnología del frío, la FML ocurría de manera natural conforme subían las temperaturas en el verano.
- **Dióxido de azufre:** Las bacterias lácticas son muy sensibles a este compuesto. Por ello, el agregar pequeñas cantidades (<15mg/L), puede prevenir la FML. Como el SO₂ se volatiliza rápidamente, su desaparición puede provocar un abrupto desencadenamiento de la fermentación maloláctica.
- **Etanol:** Un contenido volumétrico alto de alcohol (14% Alc.Vol.) previene la FML, pues éste destruye las bacterias lácticas. Es por ello que si se inoculan cepas de bacterias iniciadoras, se suele hacer justo después de que haya comenzado la fermentación alcohólica, pues los niveles de alcohol son todavía relativamente bajos, las temperaturas son altas y el SO₂ se ha evaporado.
- **Micronutrientes:** Las bacterias lácticas necesitan de nutrientes específicos. Las lías (células muertas de levaduras) representan una fuente importante de nutrientes. Debido a ello, la eliminación de la lías era originalmente llevado a cabo para coadyuvar el comienzo de la fermentación maloláctica, aunque actualmente ya tienen otros parámetros que son tan o incluso más importantes para causar la FML.

- **Otros factores:** Son el nivel de oxígeno, ácidos orgánicos, taninos y otros polifenoles, levaduras y tipología de éstas, envejecimiento en barrica, así como factores técnicos tales como la vinificación a temperatura controlada, desfangado, escurrido, tiempo de maceración, remontado, trasegado, clarificación y filtrado, etc.

(De Serdio Ernesto, 2001).

A continuación se presentan los efectos más específicos de la FML por tipología de vinos:

a)Tintos

Los vinos tintos son normalmente más complejos en su composición, ácidos y tánicos que los blancos y, generalmente, necesitan ser suavizados. Algunos vinos de zonas muy soleadas y secas, provenientes de uvas maduras o sobremaduras pueden necesitar ser acidificados una vez transcurrida la FML. En el caso de vinos de calidad, no debería haber problemas si la vendimia se realiza a su debido tiempo.

b)Blancos

A algunos vinos blancos de uvas como la Macabeo o Chardonnay, que dan vinos afrutados, frescos, ligeramente ácidos y ligeros para consumo joven, se les impide que pasen por la FML.

Los vinos añejados o fermentados en barricas (vinos más estructurados, con niveles de alcohol más elevados) que precisan de un estilo más graso, complejo y de taninos más suaves, deben ser sometidos a la FML (Albariño, Verdejo y Malvasía).

c)Espumosos

Los vinos espumosos elaborados con el método de Champán sufren una segunda fermentación en botella causada por la introducción de levaduras anaerobias y por la cual se desprende CO₂ que se mantiene dentro del vino embotellado por lo que no es inusual que a muchos de estos vinos se les prevenga de sufrir la FML, ya que brindarán aromas y sabores más frescos si se consumen en su juventud. Algunas turbulencias pueden aparecer si arranca la FML en botella, pero esto no suele suceder dada la falta de oxígeno y nutrientes.

Provocar la FML o hacer que los vinos no la sufran, son hoy en día prácticas habituales en bodegas de todo el mundo y dependerán de los resultados que los elaboradores deseen obtener. Esta segunda fermentación, que siempre se ha visto ensombrecida por su hermana mayor, la muy conocida fermentación alcohólica, es ahora una materia ineludible e importantísima en la enología moderna (De Serdio Ernesto, 2001).

1.5. COMPOSICIÓN DEL VINO

El resultado último de la glucólisis es el consumo de glucosa, la síntesis neta de los ATP's (2 moléculas) y la formación de productos de fermentación. Para el organismo el compuesto crucial es el ATP, que es usado en una amplia gama de reacciones que requieren energía, y los productos de fermentación representan un mero producto de desecho.

Sin embargo, estos últimos no son considerados como tales por la industria vinícola mundial. Esto lleva a presentar detalladamente en este apartado, la totalidad de los productos de fermentación, su procedencia a partir de la uva y el mosto, y como intervienen en las características organolépticas del vino.

El vino es una combinación de distintos ingredientes extraordinariamente compleja e inconstante. Es precisamente por su capacidad de cambiar en múltiples formas, desde que se cosecha hasta que se sirve el vino en la copa, por lo que se dice que el vino "está vivo" y ciertamente lo está (Vogt, J.; Lemperle, W, 1984).

Para poder diferenciar de los componentes presentes antes y después del proceso fermentativo, partiremos de la composición de la uva como materia prima y del mosto como sustrato directo de fermentación.

1.5.1. LA UVA

El fruto de la vitis vinifera se presenta arracimado, distinguiéndose las siguientes partes en un racimo (Fig. 1.11.):

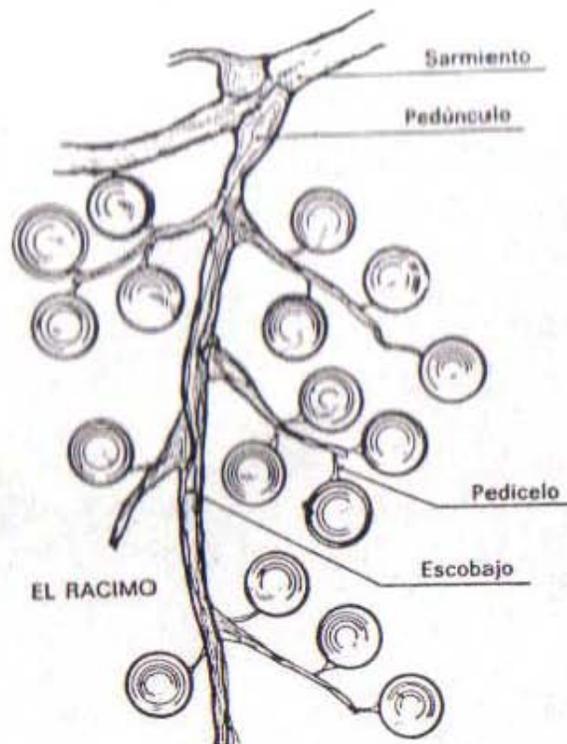


Fig. 1.11. Pedúnculo, escobajo y pedicelo se suelen agrupar bajo la denominación de raspón. Por este circula la savia alimentadora del grano. Según los sistemas de vinificación del raspón está presente o no durante la fermentación.

Para iniciar el recorrido de transformaciones que se llevan a cabo durante el proceso de vinificación, se presenta la composición porcentual de los componentes del material vegetal del cuál parte dicho proceso:

Composición de los raspones en %

AGUA	70-80
AZUCARES	0,5-1,5
ACIDOS ORGANICOS	0,5-1,6
pH	4-4,5
TANINOS	2-7
MINERALES	2-2,5
COMPUESTOS NITROGENADOS	1-1,5

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

Composición de la piel en %

AGUA	78-80
ACIDOS ORGANICOS	0,8-1,6
TANINOS	0,4-3
ANTOCIANOS	0-0,5
COMPUESTOS NITROGENADOS	1,5-2
MINERALES	1,5-2
CERAS	1-2
SUSTANCIAS AROMATICAS	NO DETERMINADO (ND)

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

Composición de las pepitas en %

AGUA	25-45
COMPUESTOS GLUCIDICOS	34-36
TANINOS	4-10
COMPUESTOS NITROGENADOS	4-6,5
MINERALES	2-4
LIPIDOS	13-20

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

La mayoría de los componentes encontrados en el mosto aparecen en mayor o menor grado en el vino. Durante la fermentación aparecen nuevas sustancias, lo que hace que el vino sea “algo más” que una solución de agua, ácidos y alcohol.

Para ejemplificar lo anteriormente citado, se presenta la siguiente serie de tablas en donde se observan los principales grupos de compuestos químicos que constituyen el vino.

1.5.2. EL JUGO DE UVA Y EL VINO

Esta tabla muestra la composición del jugo de uva y del vino posterior al proceso fermentativo:

Composición del jugo de uva y el vino en (g/L)

	JUGO	VINOS
AGUA	700-850	750-900
AZUCARES	140-250	0,1-2
POLISACARIDOS	3-5	2-4
ALCOHOLES	-	69-121
POLIOLES	-	5-20
ACIDOS ORGANICOS	9-27	3-20
POLIFENOLES	0,5	2-6
COMPUESTOS NITROGENADOS	4-7	3-6
MINERALES	0,8-2,8	0,6-2,5
VITAMINAS	0,25-0,8	0,2-0,7

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

AZUCARES Y POLIOLES

Como ya se estudió en el apartado de la bioquímica de la fermentación, la glucosa, que es el principal componente azucarado del jugo de la uva, representa el sustrato que inicia el proceso. En una fermentación azúcar-alcohol, el subproducto más importante es la glicerina o glicerol. Esta sustancia confiere cuerpo al vino.

Azúcares y polioles en (g/L)						
	JUGO		VINOS TINTOS		VINOS BLANCOS	
	MIN	MAX	MIN	MAX	MIN	MAX
GLUCOSA	70	125	0,01	0,95	0,09	0,50
FRUCTOSA	70	125	0,01	0,83	0,04	0,78
ARABINOSA	0,01	0,30	0,01	0,30	0,01	0,25
XILOSA	ND	0,15	ND	0,15	ND	0,12
TREALOSA	-	-	0,03	0,65	0,02	0,50
SACAROSA	0,50	15	-	-	-	-
GALACTOSA	-	-	ND	0,13	-	-
GLICEROL	-	-	3	14	0,50	15
BUTANODIOL 2,3	-	-	0,35	1,50	0,42	1,25
MESO- INOSITOL	0,32	0,75	0,11	0,69	0,18	0,68
MANITOL	0,03	0,10	0,09	0,53	0,08	0,39
ERITRITOL	-	-	0,06	0,14	0,03	0,11
ARABITOL	-	-	0,02	0,20	0,04	0,14
XILITOL	-	-	0,01	0,12	0,01	0,06
RIBITOL	-	-	ND	0,08	ND	0,05
SORBITOL	-	-	0,07	0,19	0,03	0,11

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

ALCOHOLES, ALDEHÍDOS, CETONAS Y ESTERES

Son los componentes del aroma y bouquet de los vinos. En la actualidad hay identificadas alrededor de 500 sustancias como componentes de aroma. Fundamentalmente pertenecen a tres familias:

- Alcoholes y alcoholes superiores.
- Aldehídos
- Cetonas.
- Esteres.

El etanol y los alcoholes superiores son los componentes del vino más característicos. Actúan como soporte de la mayoría de los aromas del vino. En las concentraciones habituales en los vinos tienen sabor dulce.

En los vinos de calidad, el contenido de alcohol –que influye tanto en la calidad como en la longevidad- resulta de vital importancia. A medida que los ácidos del vino van combinándose gradualmente con el alcohol, produciendo ésteres, se desarrollan también los elementos que determinan el bouquet (Vogt, J.; Lemperle, 1984).

Alcoholes y alcoholes superiores en (g/L)

	VINOS TINTOS		VINOS BLANCOS	
	MINIMO	MAXIMO	MINIMO	MAXIMO
ETANOL	72	120	72	120
METANOL	43×10^{-3} (*)	32×10^{-3}	5×10^{-3}	$14,8 \times 10^{-3}$
PROPANOL-1	11×10^{-3}	68×10^{-3}	9×10^{-3}	48×10^{-3}
METIL-2 PROPANOL-1	9×10^{-3}	14×10^{-3}	28×10^{-3}	17×10^{-3}
METIL-2 BUTANOL-1	18×10^{-3}	150×10^{-3}	15×10^{-3}	82.10^{-3}
METIL-3 BUTANOL-1	49×10^{-3}	49×10^{-3}	45×10^{-3}	$31,6 \times 10^{-3}$
BUTANOL-1	$0,5 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-3}$	$0,6 \times 10^{-3}$	$8,5 \times 10^{-3}$
HEXANOL-1	$0,3 \times 10^{-3}$	10×10^{-3}	$1,3 \times 10^{-3}$	12×10^{-3}
FENIL-2 ETANOL	10×10^{-3}	$18,3 \times 10^{-3}$	-	-

(*) Significa 43 mg/L. Es una forma de expresar g/L en forma de potencias. Se utiliza este método en todas las tablas.

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

Cetonas en (g/L)

	VINOS TINTOS		VINOS BLANCOS	
	MIN	MAX	MIN	MAX
DIACETILO	$0,2 \times 10^{-3}$	$3,8 \times 10^{-3}$	$0,1 \times 10^{-3}$	$2,4 \times 10^{-3}$
ACETOINA	2×10^{-3}	43×10^{-3}	$2,9 \times 10^{-3}$	54×10^{-3}
2-3 PENTANODIONA	-	-	2×10^{-5}	$2,8 \times 10^{-4}$
3-OXI-2 PENTANONA	-	-	4×10^{-4}	$2,8 \times 10^{-3}$

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

Esteres en (g/L)

	VINOS TINTOS		VINOS BLANCOS	
	MIN	MAX	MIN	MAX
ESTERES NO VOLATILES				
TARTRATO DE DIETILO	-	150 x10 ⁻³	-	-
MALATO DE DIETILO	-	-	0,2 x10 ⁻³	0,8 x10 ⁻³
SUCCINATO DE DIETILO				
CAFEOIL TARTATRATO	-	-	55 x10 ⁻³	175 x10 ⁻³
ESTERES VOLATILES				
FORMIATO DE ETILO	1,8 x10 ⁻⁴	2,8 x10 ⁻³	1 x10 ⁻⁵	2,2 x10 ⁻³
ACETATO DE METILO	0,5 x10 ⁻⁴	1,3 x10 ⁻⁴	ND	1 x10 ⁻⁴
ACETATO DE ETILO	41 x10 ⁻³	180 x10 ⁻³	26 x10 ⁻³	160 x10 ⁻³
LACTATO DE ETILO	10 x10 ⁻³	25 x10 ⁻³	3 x10 ⁻³	15 x10 ⁻³
PROPIONATO DE ETILO	0,5 x10 ⁻⁴	2,5 x10 ⁻⁴	ND	4 x10 ⁻³
METIL-2 PROPIONATO DE ETILO	3 x10 ⁻⁵	1 x10 ⁻³	2 x10 ⁻⁵	0,8 x10 ⁻³
ACETATO DE 2 METIL PROPILO	1 x10 ⁻⁵	0,9 x10 ⁻³	1 x10 ⁻⁵	0,8 x10 ⁻³
ACETATO DE ISOAMILO	0,2 x10 ⁻³	1 x10 ⁻³	1,1 x10 ⁻³	6 x10 ⁻³
BUTIRATO DE ETILO	1 x10 ⁻⁵	3 x10 ⁻³	2 x10 ⁻⁵	3 x10 ⁻³
METIL-2 BUTIRATO DE ETILO	ND	0,9 x10 ⁻³	ND	3,2 x10 ⁻⁴
METIL-3 BUTIRATO DE ETILO	ND	0,7 x10 ⁻³	ND	0,7 x10 ⁻³
ACETATO DE METIL 3 BUTILO	3 x10 ⁻⁵	8 x10 ⁻³	3 x10 ⁻⁵	8 x10 ⁻³
HEXANOATO DE ETILO	7 x10 ⁻⁵	1 x10 ⁻³	9 x10 ⁻⁵	1,5 x10 ⁻³
OCTANOATO DE ETILO	5 x10 ⁻⁴	3,4 x10 ⁻³	5,5 x10 ⁻⁴	4 x10 ⁻³
DECANOATO DE ETILO	0,3 x10 ⁻³	1,8 x10 ⁻³	3,6 x10 ⁻⁴	2,5 x10 ⁻³
DODECANOATO DE ETILO	1 x10 ⁻⁴	5 x10 ⁻³	5 x10 ⁻⁵	0,7 x10 ⁻³
ACETATO DE HEXILO	1 x10 ⁻⁴	6 x10 ⁻⁴	7 x10 ⁻⁵	5 x10 ⁻⁴
ACETATO DE 2 FENIL ETILO	1 x10 ⁻⁵	2,1 x10 ⁻³	0,1 x10 ⁻³	4,5 x10 ⁻³

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

ÁCIDOS ORGÁNICOS

Los ácidos confieren frescor y aspereza al sabor del vino. Un vino deficiente en ácidos resulta insípido; con un exceso de ellos, es imbebible.

Ácidos orgánicos en (g/L)

	MOSTOS		VINOS	
	MIN	MAX	MIN	MAX
TARTARICO	3,56	7,42	1,2	4,8
L- MALICO	0,70	8,60	0,16	5,20
D-MALICO	46 x10 ⁻³	76 x10 ⁻³	11 x10 ⁻³	79 x10 ⁻³
CITRICO	0,13	0,90	0,12	0,88
ASCORBICO	10 x10 ⁻³	75 x10 ⁻³	5 x10 ⁻³	12 x10 ⁻³
L(+)-LACTICO	-	-	40 x10 ⁻³	4,2
D(-)-LACTICO	-	-	40 x10 ⁻³	0,39
SUCCINICO	-	-	35 x10 ⁻³	0,90
ACETICO	-	-	0,15	0,90
PIRUVICO	-	-	11 x10 ⁻³	0,46
OXO- GLUTARICO	-	-	2 x10 ⁻³	0,34
CITRAMALICO	-	-	10 x10 ⁻³	0,14
GLICERICO	-	-	5 x10 ⁻³	5 x10 ⁻³
DIMETIL- GLICERICO	-	-	ND	ND
OXALICO	ND	50 x10 ⁻³	ND	30 x10 ⁻³
FUMARICO	ND	10 x10 ⁻³	4 x10 ⁻³	50 x10 ⁻³
GLICURONICO	-	-	0,12	2,50
GALACTURONICO	-	-		1,5
GLUCONICO	-	-	10 x10 ⁻³	2,8
MÚCICO	-	2	80 x10 ⁻³	0,45
OXO-2 GLUCONICO	-	-	ND	0,70
OXO-5 GLUCONICO	-	-	ND	0,5

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

Por su interés organoléptico, es importante profundizar algo más en los ácidos mayoritarios del vino (Fig.1.12.):

- **Ácido tartárico:**

Es el ácido específico de la uva y del vino y por tanto el mayoritario. Es un ácido fuerte por lo que influye mucho en el pH. Su concentración disminuye en el vino por precipitación en forma de sal, provocada por el enriquecimiento en alcohol y descenso de la temperatura.

- **Ácido málico:**

Es el ácido más extendido del reino vegetal. Se encuentra en hojas, frutos, etc.

Al contrario que el ácido tartárico, este es un ácido fácilmente metabolizable por los microorganismos.

Este ácido se encuentra en gran cantidad en la uva verde, pero desaparece poco a poco en el transcurso de la maduración de la uva.

Durante la fermentación las levaduras metabolizan el 20-30% del ácido málico. Como ya se revisó, posteriormente vendrá la transformación más importante (que no ocurre en todos los vinos): el ácido málico es completamente fermentado por bacterias lácticas que lo transforman en ácido láctico y anhídrido carbónico.

- **Ácido cítrico:**

Al igual que el málico, el ácido cítrico es fácilmente metabolizable por las bacterias, por lo que en vinos que hacen la fermentación maloláctica suele desaparecer. Esto es importante ya que a partir del metabolismo del ácido cítrico, las bacterias lácticas producen ácido acético y diacetilo. El impacto del diacetilo en el perfil aromático del vino es muy variable. Dependiendo de la concentración alcanzada, los aromas aportados pueden ser muy diferentes. Así, con una concentración de 5 a 14 mg/L, los aromas dominantes son los de mantequilla, mientras que con una concentración de 2 a 4 mg/L los aromas presentes son de nueces, caramelo, levadura y piel mojada. Así, dependiendo del objetivo de vino, interesa o no evitar el consumo del ácido cítrico como fuente de diacetilo (Pardo, I, 2003).

- **Ácido succínico:**

Es un ácido formado por las levaduras que acompaña siempre a la fermentación del azúcar. Es estable frente a las fermentaciones lácticas, por lo que su contenido no evoluciona en la vida de un vino. Su sabor es una mezcla de gustos ácidos, salados y amargos; proporciona a las bebidas fermentadas ese gusto específico que les es común (sabor vinoso).

- **Ácido láctico:**

Tiene su origen según los vinos hayan hecho o no la fermentación maloláctica confiriéndoles suavidad al gusto.

- **Ácido acético:**

Es un producto secundario normal de la fermentación alcohólica.

Los contenidos superiores a 0,8 gr/litro son destacables por el olfato, con un característico olor a vinagre. (Blasco Iñaki, 2001)

Ácido	Fórmula	P.M.	pK _a
L-(+) Tartárico	HOOC-CHOH-CHOH-COOH	150	3,01 4,37
L-(+) Málico	HOOC-CH ₂ -CHOH-COOH	134	3,46 5,13
Cítrico	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	192	3,14 4,77 5,74
L-(+) Láctico	HOOC-CHOH-CH ₃	90	3,86
Succínico	HOOC-CH ₂ -CH ₂ -COOH	118	4,18 5,23

Fig. 1.12. Principales ácidos orgánicos presentes en el mosto y en el vino.

POLIFENOLES

Son los componentes que proporcionan a los vinos su color y una gran parte de su sabor. Concretamente estos compuestos tienen sabor amargo y astringente. Los principales son los taninos que se encuentran en las pepitas y en el hollejo de la uva, además de los que provienen de la madera de las barricas. La diferencia de sabor entre un vino blanco y un vino tinto se debe a estas sustancias. Los compuestos fenólicos se pueden dividir en dos grupos que se subdividen como sigue:

No flavonoides

- Ácidos benzoicos.
- Ácidos hidroxicinámicos.
- Fenoles volátiles.
- Otros.

Ácidos benzoicos en (g/L)		
	VINOS BLANCOS	VINOS TINTOS
	MEDIA	MEDIA
ACIDO GALICO	7 x10 ⁻³	95 x10 ⁻³
AC. PIROCATEQUICO	-	12 x10 ⁻³
ACIDOP-HIDROXIBENZOICO	-	5 x10 ⁻³
AC. VANILLICO	-	4 x10 ⁻³
AC. SIRINGICO	-	8 x10 ⁻³
AC. SINAPICO	-	1 x10 ⁻³

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

Ácidos hidroxicinámicos en (g/L)		
	V. BLANCOS	V. TINTOS
	MEDIA	MEDIA
ACIDO CAFEICO	4 x10 ⁻³	10 x10 ⁻³
AC. P-CUMARICO	-	6 x10 ⁻³
AC. FERULICO	-	-
ACIDO CAFEOIL TARTARICO	50 x10 ⁻³	60 x10 ⁻³
ACIDO P-CUMAROIL TARTARICO	15 x10 ⁻³	15 x10 ⁻³
ACIDO 2-S-GLUTATIONIL CAFEOILTARTARICO (grp)	20 x10 ⁻³	-

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

Fenoles volátiles en (g/L)		
	V. BLANCOS	V. TINTOS
	MEDIA	MEDIA
4-VINIL FENOL	0,3 x10 ⁻³	0,03 x10 ⁻³
4-VINIL GUAYACOL	0,2 x10 ⁻³	0,01 x10 ⁻³

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

Otros: no flavonoides en (g/L)		
	V. BLANCOS	V. TINTOS
	MEDIA	MEDIA
TIROSOL	-	25 x10 ⁻³
TRIPTOFOL	-	8 x10 ⁻³
TRANS-RESVERATROL	0,04 x10 ⁻³	1,5 x10 ⁻³
CIS-RESVERATROL	0,056 x10 ⁻³	0,7 x10 ⁻³
TRANS-PICEIDO	0,16 x10 ⁻³	1,5 x10 ⁻³
CIS-PICEIDO	0,12 x10 ⁻³	0,3 x10 ⁻³

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

Flavonoides

- Antocianos.
- Flavonoles.
- Flavanoles.

Antocianos en (g/L)	
TINTO	
	MINIMO-MAXIMO
3-GLUCOSIDO DE DELFINIDOL	$2 \times 10^{-3} / 70 \times 10^{-3}$
3-GLUCOSIDO DE CIANIDOL	$0,4 \times 10^{-3} / 30 \times 10^{-3}$
3-GLUCOSIDO DE PETUNIDOL	$4 \times 10^{-3} / 60 \times 10^{-3}$
3- GLUCOSIDO DE MALVIDOL	$24 \times 10^{-3} / 240 \times 10^{-3}$
ESTER ACETICO DEL 3 GLUCOSIDO DE MALVIDOL	$1 \times 10^{-3} / 12 \times 10^{-3}$
ESTER P-CUMARICO DEL 3-GLUCOSIDO DE PETUNIDOL	$1 \times 10^{-3} / 8 \times 10^{-3}$
ESTER P-CUMARICO DEL 3-GLUCOSIDO DE MALVIDOL	$2 \times 10^{-3} / 35 \times 10^{-3}$

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

Los antocianos, son los responsables de dar a los vinos tintos la coloración roja.

Flavonoles en (g/L)	
TINTO	
	MEDIA
3-GLUCOSIDO DE MIRICETOL	3×10^{-3}
3-GLUCOSIDO DE QUERCETOL	9×10^{-3}
MIRICETOL	10×10^{-3}
QUERCETOL	10×10^{-3}
RUTINO*	15×10^{-3}

*Valores obtenidos por coinyección con un compuesto testigo.

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

Flavonoles en (g/L)		
	V. BLANCOS	V. TINTOS
	MEDIA	MEDIA
CATEQUINA	35×10^{-3}	190×10^{-3}
EPICATEQUINA	20×10^{-3}	80×10^{-3}
PROCIANIDOL B1	6×10^{-3}	80×10^{-3}
PROCIANIDOL B2	4×10^{-3}	40×10^{-3}
PROCIANIDOL B3	2×10^{-3}	17×10^{-3}
PROCIANIDOL B4	$1,5 \times 10^{-3}$	50×10^{-3}
PROCIANIDOL A2*	$0,3 \times 10^{-3}$	$6. \times 10^{-3}$
PROCIANIDOL C-1	1×10^{-3}	$20. \times 10^{-3}$

*Valores obtenidos por coinyección con un compuesto testigo.

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

Las flavonas, de coloración amarilla, suelen existir en cantidades muy pequeñas, y se les atribuye el color de los vinos blancos.

NITRÓGENO Y COMPUESTOS NITROGENADOS

Apenas tienen influencia sobre el sabor, pero son indispensables para el desarrollo de las levaduras y bacterias, siendo las principales:

- Nitrógeno total.
- Aminoácidos.
- Aminas biógenas.

Nitrógeno en (g/L)

	MOSTOS		VINOS TINTOS		VINOS BLANCOS	
	MIN.	MAX.	MIN.	MAX.	MIN.	MAX.
N. TOTAL	0,20	-	0,15	0,60	0,10	0,40
N. AMONIAICAL	30×10^{-3}	0,10	ND	10×10^{-3}	ND	10×10^{-3}
N. NITRICO	4×10^{-3}	25×10^{-3}	2×10^{-3}	25×10^{-3}	-	-
N. AMINADO	80×10^{-3}	0,30	60×10^{-3}	0,20	10×10^{-3}	0,15
N. PEPTIDICO	0,10	0,20	80×10^{-3}	0,20	80×10^{-3}	0,35
N. PROTEICO	10×10^{-3}	0,10	10×10^{-3}	80×10^{-3}	5×10^{-3}	80×10^{-3}

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

Aminoácidos en (g/L)

	MOSTOS		VINOS TINTOS		VINOS BLANCOS	
	MIN.	MAX.	MIN.	MAX.	MIN.	MAX.
Ac. ASPARTICO	15×10^{-3}	0,10	1×10^{-3}	28.10-3	4×10^{-3}	32×10^{-3}
AC. GLUTAMICO	53×10^{-3}	0,27	12×10^{-3}	0,22	8×10^{-3}	0,21
ALANINA	7×10^{-3}	0,26	$2,6 \times 10^{-3}$	64.10-3	6×10^{-3}	49×10^{-3}
ARGININA	55×10^{-3}	1,20	18×10^{-3}	0,42	15×10^{-3}	0,18
CISTINA	ND	2×10^{-3}	1×10^{-3}	30.10-3	2×10^{-3}	25×10^{-3}
GLICINA	2×10^{-3}	42×10^{-3}	5×10^{-3}	50.10-3	4×10^{-3}	22×10^{-3}
HISTIDINA	8×10^{-3}	26×10^{-3}	3×10^{-3}	14.10-3	2×10^{-3}	12×10^{-3}
ISOLEUCINA	2×10^{-3}	10×10^{-3}	2×10^{-3}	36.10-3	4×10^{-3}	30×10^{-3}
LEUCINA	3×10^{-3}	58×10^{-3}	6×10^{-3}	13.10-3	7×10^{-3}	15×10^{-3}
LISINA	5×10^{-3}	63×10^{-3}	5×10^{-3}	72.10-3	ND	62×10^{-3}
METIONINA	ND	15×10^{-3}	1×10^{-3}	10.10-3	ND	8×10^{-3}
ORNITINA	ND	5×10^{-3}	1×10^{-3}	80.10-3	55×10^{-3}	9×10^{-3}
PROLINA	40×10^{-3}	3,80	40×10^{-3}	2,60	ND	0,59
HIDROXI-PROLINA	ND	14×10^{-3}	ND	8,9.10-3	ND	10×10^{-3}
FENIL- ALANINA	4×10^{-3}	62×10^{-3}	5×10^{-3}	34.10-3	4×10^{-3}	22×10^{-3}
SERINA	5×10^{-3}	81×10^{-3}	2×10^{-3}	20.10-3	5×10^{-3}	18×10^{-3}
TREONINA	9×10^{-3}	0,13	2×10^{-3}	90.10-3	2×10^{-3}	54×10^{-3}
TIROSINA	2×10^{-3}	75×10^{-3}	2×10^{-3}	58.10-3	2×10^{-3}	17×10^{-3}
TRIPTOFANO	5×10^{-3}	0,31	ND	25.10-3	ND	12×10^{-3}
VALINA	ND	0,11	1×10^{-3}	45.10-3	ND	36×10^{-3}

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

Aminas biógenas en (g/L): uva

	MOSTOS		VINOS TINTOS		VINOS BLANCOS	
	MIN.	MAX.	MIN.	MAX	MIN.	MAX.
CADAVERINA	ND	ND	ND	21,3 x10 ⁻³	ND	29 x10 ⁻³
PUTRESCINA	ND	3 x10 ⁻³	0,4 x10 ⁻³	82 x10 ⁻³	0,1 x10 ⁻³	9,1 x10 ⁻³
ESPERMINA	1 x 10 ⁻⁴	0,2 x10 ⁻³	10-5	0,4 x10 ⁻³	-	-
ESPERMIDINA	0,3 x10 ⁻³	2,2 x10 ⁻³	0,5 x10 ⁻³	5,2 x10 ⁻³	-	-

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

Aminas biógenas en (g/L): vino

	MOSTOS		VINOS TINTOS		VINOS BLANCOS	
	MIN.	MAX.	MIN.	MAX	MIN.	MAX.
ETILAMINA	ND	ND	0,1 x10 ⁻³	17 x10 ⁻³	0,1 x10 ⁻³	20 x10 ⁻³
HISTAMINA	ND	ND	0,2 x10 ⁻³	30 x10 ⁻³	ND	4,0 x10 ⁻³
ISOAMIL- AMINA	ND	ND	ND	16 x10 ⁻³	ND	20 x10 ⁻³
ISOPROPIL-AMINA	ND	ND	ND	0,3 x10 ⁻³	ND	1 x10 ⁻³
METIL- AMINA	ND	ND	ND	1,9 x10 ⁻³	ND	2,2 x10 ⁻³
TIRAMINA	ND	ND	ND	16,7 x10 ⁻³	ND	6,5 x10 ⁻³

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

ELEMENTOS MINERALES

La clase y la cantidad de los elementos minerales presentes dependen en gran parte del suelo en el que se cultivaron las uvas, de los minerales que nutrieron la vid y de los elementos que entraron en contacto con el vino.

Los principales elementos minerales son:

- Elementos mayoritarios.
- Oligoelementos.
- Elementos traza.

Elementos mayoritarios (g/L)

MOSTOS O VINOS		
	MINIMO	MAXIMO
POTASIO*	0,4	1,84
CALCIO*	30×10^{-3}	0,20
MAGNESIO	40×10^{-3}	0,16
SODIO	3×10^{-3} - 30×10^{-3}	50×10^{-3} - 0×35
SILICIO	20×10^{-3}	90×10^{-3}
FOSFATOS	0,10	0,80
SULFATOS	40×10^{-3}	0,60
CLORUROS	10×10^{-3} - 60×10^{-3}	0,2 - 0×8

Las concentraciones en los mostos son más elevadas. Para el sodio y los cloruros las concentraciones() son debidas a suelos ricos en cloruro de sodio.

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

Oligoelementos (g/L)

MOSTOS O VINOS		
	MINIMO	MAXIMO
HIERRO	25×10^{-3}	13×10^{-3}
MANGANESO	24×10^{-3}	$7,5 \times 10^{-3}$
ZINC	40×10^{-6}	$7,8 \times 10^{-3}$
ALUMINIO	$0,1 \times 10^{-3}$	$2,75 \times 10^{-3}$
COBRE*	10×10^{-6}	$1,8 \times 10^{-3}$
NIQUEL	5×10^{-6}	90×10^{-6}
LITIO	5×10^{-6}	$0,12 \times 10^{-3}$
CROMO	4×10^{-6}	90×10^{-6}
MOLIBDENO	1×10^{-6}	15×10^{-6}
COBALTO	1×10^{-6}	15×10^{-6}
VANADIO	4×10^{-6}	$0,45 \times 10^{-3}$
BROMURO	10×10^{-6}	$2,6 \times 10^{-3}$
IODURO	2×10^{-6}	30×10^{-6}

(*) Las concentraciones en los mostos son más elevadas.

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

Elementos traza (g/L)

MOSTOS O VINOS		
	MINIMO	MAXIMO
FLUORUROS	40×10^{-6}	$1,7 \times 10^{-3}$
PLOMO	10×10^{-6}	$0,35 \times 10^{-3}$
ARSENICO	1×10^{-6}	12×10^{-5}
CADMIO	10×10^{-9}	5×10^{-5}
SELENIO	$0,2 \times 10^{-6}$	$0,8 \times 10^{-6}$
MERCURIO	10×10^{-9}	60×10^{-9}
PLATINO	ND	24×10^{-6}

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

VITAMINAS

Como se sabe, aunque estos compuestos se encuentren en proporción muy pequeña, su importancia es muy grande por las misiones biológicas que realizan.

Vitaminas en (g/L)			
	MOSTOS	V. BLANCOS	V. TINTOS
	MIN-MAX	MIN-MAX	MIN-MAX
TIAMINA	$0,16 \times 10^{-3}/0,45 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^{-6}/58 \times 10^{-6}$	$103 \times 10^{-6}/245 \times 10^{-6}$
RIBOFLAVINA	$3 \times 10^{-6}/60 \times 10^{-6}$	$8 \times 10^{-6}/130 \times 10^{-6}$	$0,47 \times 10^{-6}/1,90 \times 10^{-6}$
NICOTINAMIDA	$0,68 \times 10^{-6}/2,6 \times 10^{-6}$	$0,44 \times 10^{-6}/1,33 \times 10^{-6}$	$0,79 \times 10^{-6}/1,70 \times 10^{-6}$
ACIDO PANTOTENICO	$0,5 \times 10^{-6}/1,4 \times 10^{-6}$	$0,55 \times 10^{-6}/1,20 \times 10^{-6}$	$0,13 \times 10^{-6}/0,69 \times 10^{-6}$
PIRIDOXINA	$0,16 \times 10^{-6}/0,50 \times 10^{-6}$	$0,12 \times 10^{-6}/0,67 \times 10^{-6}$	$0,13 \times 10^{-6}/0,68 \times 10^{-6}$
COLINA	$19 \times 10^{-6}/45 \times 10^{-6}$	$19 \times 10^{-6}/27 \times 10^{-6}$	$20 \times 10^{-6}/43 \times 10^{-6}$
BIOTINA	$1,50 \times 10^{-6}/4,2 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-6}/3,60 \times 10^{-6}$	$0,60 \times 10^{-6}/4,60 \times 10^{-6}$
ACIDO FOLICO	$0,0/1,80 \times 10^{-6}$	$0,40 \times 10^{-6}/4,50 \times 10^{-6}$	$0,40 \times 10^{-6}/4,50 \times 10^{-6}$
ACIDO P-AMINO BENZOICO	$15 \times 10^{-6}/92 \times 10^{-6}$	$15 \times 10^{-6}/133 \times 10^{-6}$	$15 \times 10^{-6}/133 \times 10^{-6}$
CIANOCOBALAMINA	$0/0,20 \times 10^{-6}$	$0/0,16 \times 10^{-6}$	$0,04 \times 10^{-6}/0,10 \times 10^{-6}$
MESOSINOSITOL	$0,38 \times 10^{-3}/0,71 \times 10^{-3}$	$0,38 \times 10^{-3}/0,17 \times 10^{-3}$	$0,29 \times 10^{-3}/0,33 \times 10^{-3}$
ACIDO ASCORBICO	$30 \times 10^{-3}/50 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-3}/5 \times 10^{-3}$	$1 \times 10^{-3}/5 \times 10^{-3}$

(Cabanis J.C. et.al, 2002)

1.6. MICROBIOLOGÍA ENOLÓGICA

La conversión del mosto de uva en vino es un complejo proceso bioquímico que implica interacciones entre levaduras y bacterias lácticas. Estos microorganismos ya están presentes en el mosto y se van seleccionando aquellos que son más competitivos en cada fase de la vinificación. Las levaduras son las responsables de llevar a cabo el proceso de fermentación alcohólica, al igual que las bacterias lo son para la fermentación maloláctica.

En esta sección se presentarán las características taxonómicas que caracterizan a los organismos implicados además de su cinética dentro del proceso fermentativo

(Suarez Lepe José Antonio, et. al, 2004).

1.6.1. MICROBIOTA NATURAL DE LA UVA Y EL MEDIO DE FERMENTACIÓN

La composición microbiana en la uva depende de muchos factores, tales como la lluvia, humedad, altitud geográfica del viñedo, régimen de fumigación del viñedo, régimen de fertilización, insectos y prácticas de disposición de desechos en la bodega.

La combinación de estos factores determinará la cantidad y tipología de la población microbiana.

Los géneros principalmente encontrados son:

- **Hongos:** *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Mucor*.
- **Bacterias aeróbicas y anaeróbicas facultativas:** *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Acidomonas* y *Gluconobacter*.
- **Levaduras silvestres:** *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Hansenula*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Brettanomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota* y *Zygosaccharomyces*.

(Boulton Roger, et. al, 1999)

En seguida se describen las características más importantes que caracterizan a los principales géneros que aportan su potencial enológico al perfil organoléptico del vino, las levaduras y las bacterias lácticas.

1.6.2. LEVADURAS VÍNICAS

Hoy en día, se puede asegurar que históricamente la levadura ha sido el primer microorganismo utilizado por el hombre (inconscientemente en sus inicios), el más importante desde el punto de vista industrial o cultural y el que ha producido la mayor parte del alcohol consumido por el hombre en toda su historia. (Pérez Enrique, 2000)

Levadura es un nombre genérico que agrupa a una variedad de hongos unicelulares, la mayoría Ascomicetos en donde la división de las células se da asexualmente por gemación (Fig.1.13).

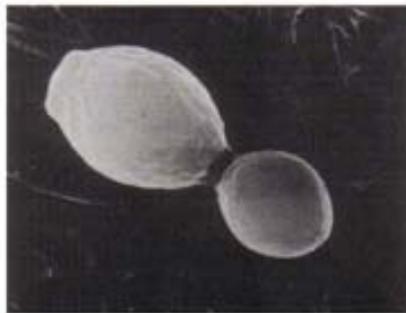


Fig.1.13. División celular en la levadura.

La gran variedad de levaduras incluye tanto especies patógenas para plantas y animales, como especies no solamente inocuas sino de gran utilidad.

Por levaduras vínicas, se entiende que son aquellas que han sido encontradas en uvas o viñedos; en los propios vinos, o asociadas con el equipo de vinificación.

Las levaduras vínicas son clasificadas en dos grupos:

1.- Levaduras silvestres:

Tradicionalmente, levaduras asociadas al ambiente del viñedo y al equipo de vinificación. Tienen la capacidad de fermentar los azúcares en etanol, dióxido de carbono y otros metabolitos.

Especies de los géneros *Kloeckera* y *Hanseniaspora* predominan en la superficie de la uva, representando del 50 al 75% del total de la población de levaduras.

Junto con *Candida*, dominan las etapas tempranas en las denominadas fermentaciones naturales o espontáneas, seguidas de especies de los géneros *Kluyveromyces*, *Metschnikowia* y *Hanseniaspora* en etapas subsecuentes en donde el nivel alcohólico alcanza el 3-4%. Las últimas etapas en fermentaciones espontáneas, son invariablemente dominadas por especies alcohol-tolerantes del género *Saccharomyces*, quienes son finalmente responsables de la fermentación alcohólica en un ambiente de un nivel alcohólico de entre 9-11% (Boulton Roger, et. al, 1999).

2.- *Saccharomyces*: La mayoría de las especies de este género tienen la capacidad de llevar a cabo el proceso fermentativo de forma completa bajo condiciones desfavorables para la demás microbiota en el medio.

Hoy en día, se considera que este género tiene varias especies de importancia enológica, la más importante de las cuales es *S. cerevisiae*. Dentro de esta especie existe una gran diversidad, que obliga a subdividirla en seis grupos con relevancia práctica. Estas variedades denominadas *cerevisiae*, *ellipsoideus*, *oviformis*, *cheresanus*, *diastaticus* y *logos*, más o menos coinciden en sus aplicaciones.

La identificación de aquellas levaduras que están relacionadas con el proceso fermentativo y que permite la clasificación anterior, toma en cuenta de forma inicial, el estudio de rasgos específicos del organismo en estudio.

Algunos rasgos tienen más peso que otros, dependiendo del número y tipos diferentes de genes requeridos para influenciar una característica dada. Por ejemplo, el tipo y forma de esporulación (Fig.1.14) se encuentra bajo el control de una gran cantidad de genes, por lo tanto; se considera un rasgo primario de distinción. En contraste, la capacidad de utilizar una fuente de carbono en particular, puede verse reflejada en la diferencia de un solo gen. (Carro David, et. al, 2004)

Otros rasgos importantes para determinar el género de las levaduras vínicas son entre otros:

- Tipo de reproducción.
- Morfología colonial.
- Tipo de esporulación.
- Crecimiento a altas temperaturas (34°C a 37°C)
- Fermentación de azúcares diferentes a la glucosa.
- Sensibilidad a agentes inhibitorios, principalmente a altas concentraciones de alcohol.
- Características del material genético.

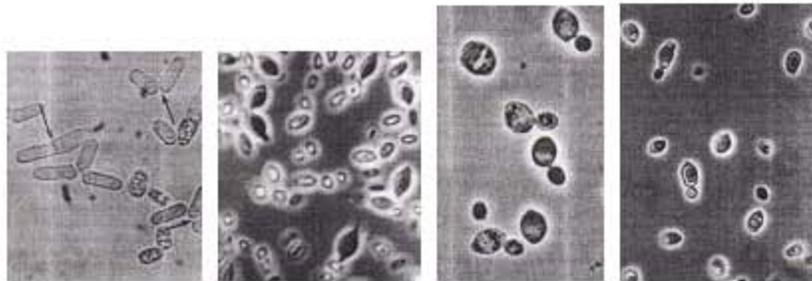


Fig.1.14. Diferencias morfológicas y reproductivas en levaduras vínicas.

Paradójicamente, ninguna de las especies que dominan la microbiota habitual de la uva, es responsable de comandar el proceso fermentativo. Esto se debe a que lo adecuado del medio que representa el mosto rico de la uva; poco a poco se va haciendo más inhóspito debido a la producción de alcohol, la disminución de azúcares necesarios para su catabolismo y la reducción de los nutrientes necesarios para su anabolismo.

Una vez superado un periodo de adaptación surge el género de mayor importancia enológica; *Saccharomyces*, que a pesar de no encontrarse en gran cantidad en el ambiente natural del viñedo, aprovecha una variedad de rasgos fisiológicos que le permiten dominar en el medio y conducir el proceso de fermentación alcohólica.

Una producción rápida de subproductos tóxicos es una estrategia para asegurar su predominio en el medio, además, su tolerancia a altas concentraciones de alcohol, a su mejor adaptación a temperaturas en el medio de fermentación entre 33-35°C y su efectiva competencia por los nutrientes del medio, contribuyen a que *Saccharomyces* domine a la población habitual microbiana. (Boulton Roger, et. al, 1999)

Gráficamente (Fig.1.15.), podemos observar la cinética poblacional durante el proceso de fermentación. Las poblaciones de levaduras y bacterias se incrementan rápidamente, pero estas últimas pierden la batalla de la supervivencia, permaneciendo durante gran parte del proceso fermentativo en estado de latencia (Collado Quique, 2001).

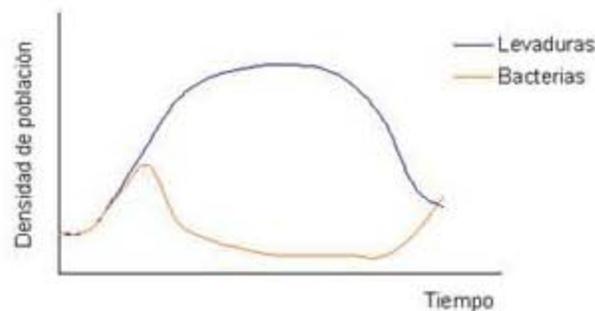


Fig. 1.15. Cinética poblacional durante el proceso fermentativo.

La velocidad del proceso fermentativo está totalmente ligada a la densidad de población de levaduras fermentativas: se aprecia una primera etapa de adaptación, seguida de una segunda etapa de crecimiento exponencial (fermentación tumultuosa con gran desprendimiento de CO₂) que va siendo cada vez menor hasta llegar a una etapa de crecimiento poblacional nulo, es decir crecimiento = muerte. Tras esta etapa la mortalidad comienza a ser mayor a la multiplicación, lo que corresponde a las últimas fases de la fermentación.

En esta última etapa del proceso fermentativo, las bacterias lácticas comienzan el proceso degradativo del ácido málico por parte de las bacterias lácticas (fermentación maloláctica) (Collado Quique, 2001).

Inicialmente, cuando el medio es favorable, las levaduras se multiplican por vía vegetativa asexual por mitosis (gemación), mientras que al final de la fermentación alcohólica comienzan a reproducirse sexualmente por meiosis (Fig.1.16.), señal de que el medio es muy desfavorable por falta de sustratos. (González Alicia, et.al, 2005)

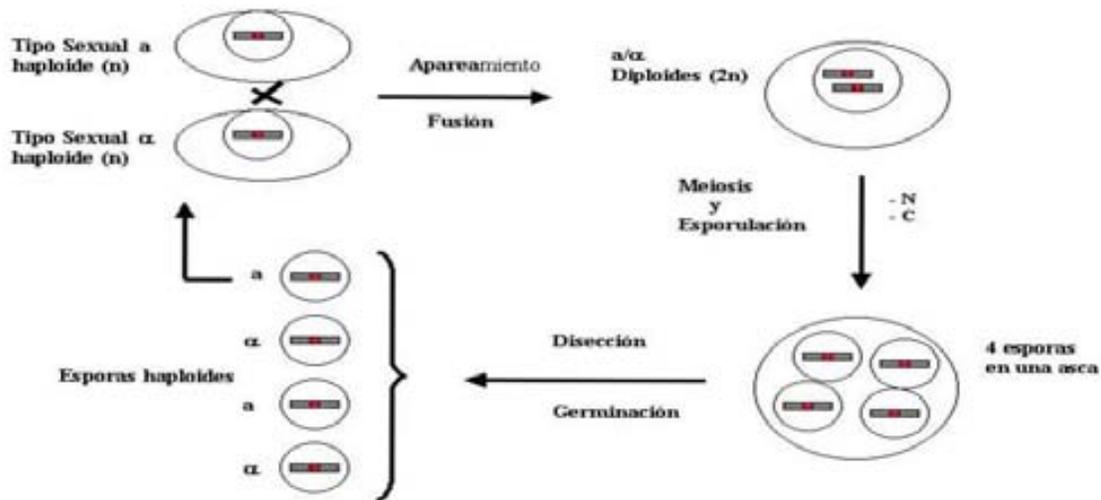


Figura 1.16. Esquema de reproducción.

El gen que determina el tipo sexual (MATa o MAT) segrega 2:2 es decir se producen dos esporas a y dos esporas α.

1.6.3. METABOLISMO DEL GÉNERO SACCHAROMYCES

La levadura *Saccharomyces* es un microorganismo circundado por una pared celular rígida compuesta de glucanos, mannanos y proteínas. Debajo de la pared celular se encuentran una serie de organelos característicos de organismos eucarióticos superiores como lo son, núcleo, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y vesículas secretoras. También es esencial la presencia de mitocondrias. Debido a su naturaleza fermentativa, la actividad mitocondrial es suprimida en condiciones de anaerobiosis provocando que las enzimas de la cadena respiratoria no sean sintetizadas. Comparada con otros microorganismos, *Saccharomyces* se encuentra limitada en la cantidad de compuestos que puede utilizar como fuente de carbono.

Los monosacáridos glucosa, fructosa, manosa y galactosa son los principales sustratos que estas levaduras utilizan para la obtención de energía. Los disacáridos sacarosa y maltosa pueden ser utilizados solo por algunas cepas de *saccharomyces* mientras que las pentosas no pueden ser utilizadas por éstas. La operación de una ruta metabólica en particular (Fig.1.17.) depende del sustrato disponible y de las condiciones de crecimiento en las cuales se esté llevando a cabo el metabolismo del microorganismo.

Debido a la presencia de mitocondrias en la célula de levadura, es posible activar las rutas en las que se llevan a cabo una gran variedad de reacciones oxidativas como lo son las reacciones enzimáticas del ciclo del ácido tricarboxílico y de la síntesis de ácidos grasos.

Sin embargo, y como ya se detalló en el apartado de la bioquímica de la fermentación, la principal ruta de utilización de carbono del medio es la vía glucolítica. (Boulton Roger, et. al, 1999)

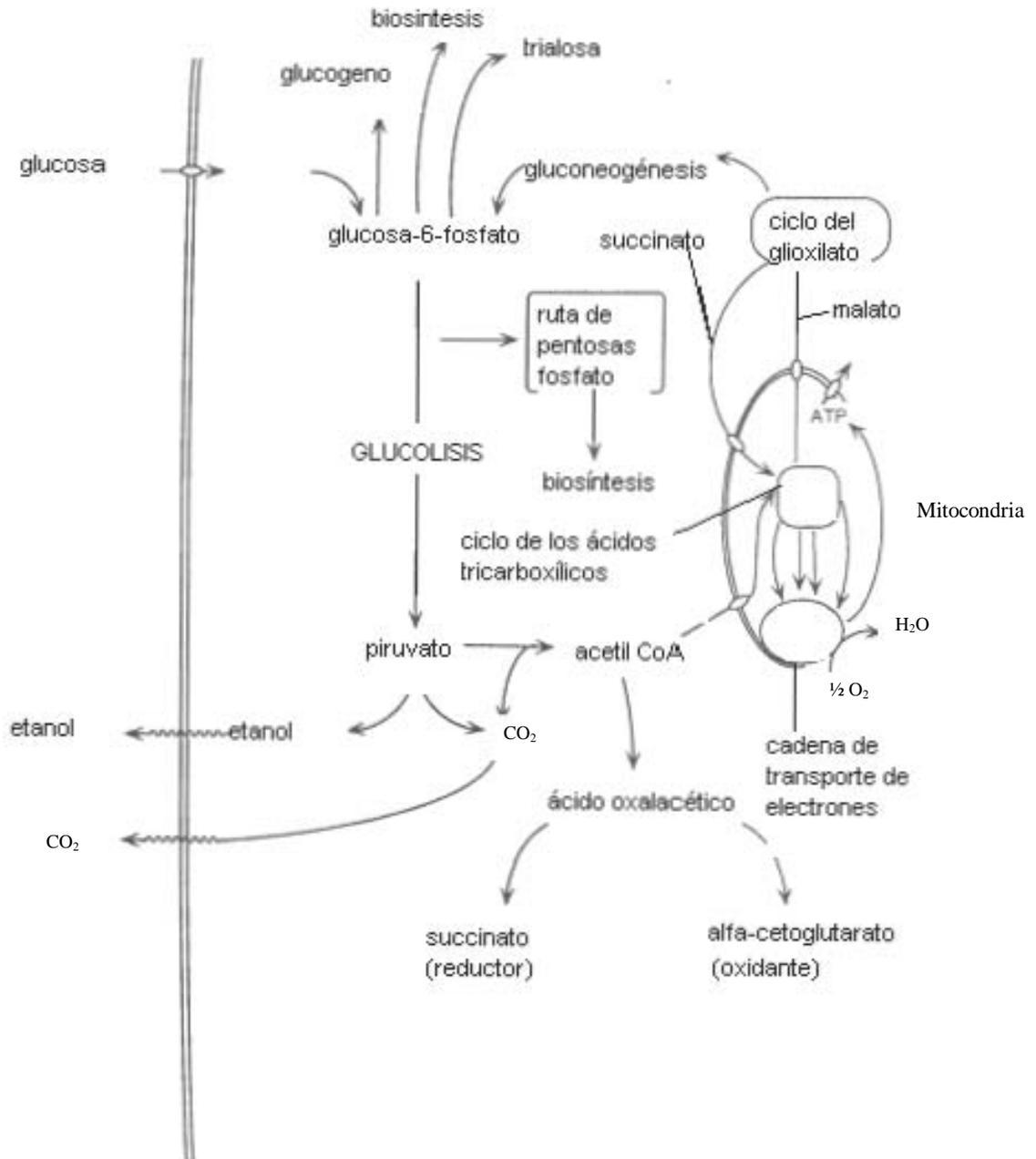


Fig. 1.17. Las rutas mayoritarias de utilización de carbono por *Saccharomyces*.

1.6.4. BACTERIAS MALOLÁCTICAS

Las bacterias malolácticas son aquellas bacterias lácticas aisladas del jugo de uva, vino o equipo de vinificación y que tienen la capacidad de realizar una descarboxilación directa del ácido málico a ácido láctico mediante la enzima malato descarboxilasa.

Esta actividad enzimática es única, siendo encontrada solo en tres géneros de bacterias lácticas:

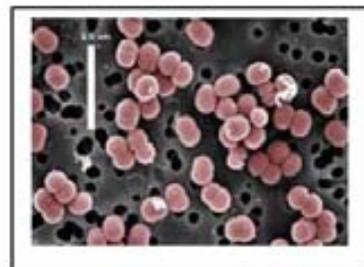
- Oenococcus
- Pediococcus
- Lactobacillus

Son dos las principales características tomadas en cuenta para determinar el género al que pertenecen las bacterias malolácticas:

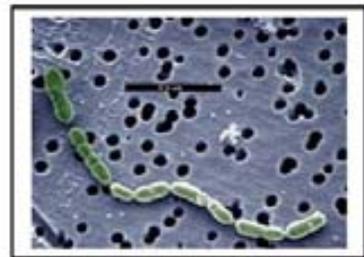
- Morfología
- Vía fermentativa { Homoláctica
Heteroláctica

De acuerdo a estos criterios, aquellos lactobacilos relacionados con la elaboración del vino en su fase de fermentación secundaria, son clasificados como:

- Pediococcus (cocos esféricos)



- Oenococcus (cocos)



- Lactobacillus (*bacilos largos*)



El segundo criterio para diferenciar el género, es como se citó anteriormente, la vía fermentativa, en donde se aprecia que el género Pediococcus lleva a cabo la fermentación homofermentativa mientras que Oenococcus lo hace por la vía heterofermentativa. (Boulton Roger, et. al, 1999)

El género homofermentativo tiene prácticamente un solo producto de fermentación, el ácido láctico, mientras que el género heterofermentativo da una mezcla de productos, principalmente etanol, CO₂ y ácido láctico (Fig. 1.18.).

Las diferencias observadas en los productos de fermentación están determinadas por la presencia o ausencia de la enzima aldolasa. Los heterofermentadores carecen de aldolasa y no pueden romper la fructosa bifosfato a triosa fosfato. En cambio, oxidan la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconato, que luego descarboxilan para producir pentosa fosfato; esta, a su vez, se rompe en triosa fosfato y acetil fosfato mediante la enzima fosfoacetolasa. Los heterofermentadores finalmente convierten la triosa fosfato en ácido láctico.

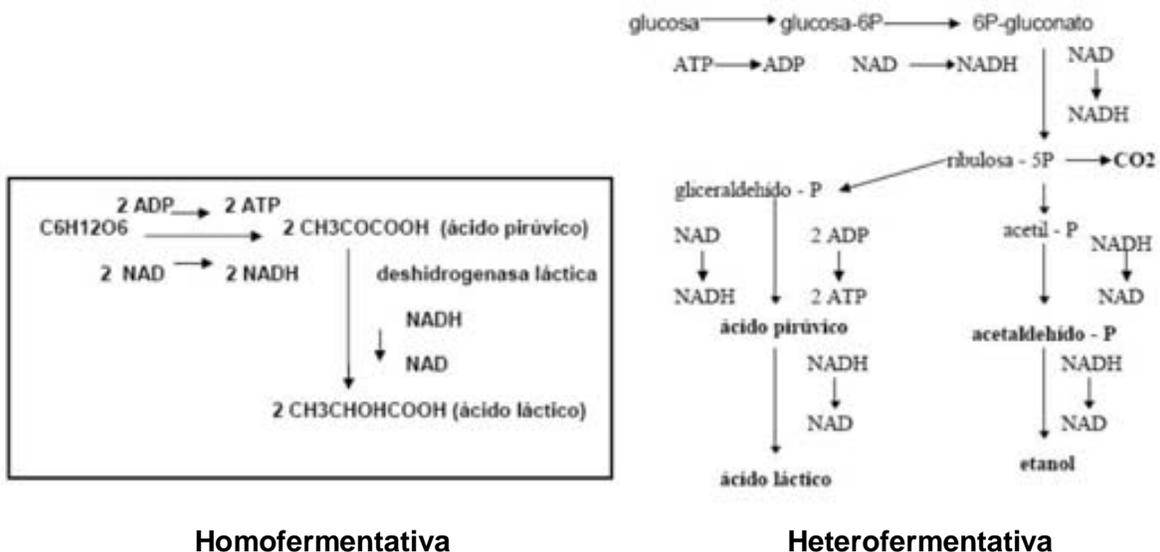


Fig. 1.18. Las principales vías fermentativas de las bacterias lácticas.

La característica de convertir el ácido málico a láctico es un rasgo que no se toma en cuenta por los taxónomos, sin embargo; en enología, esta identificación se vuelve fundamental. (Boulton Roger, et. al, 1999)

1.6.5. **OENOCOCCUS OENOS**

Como se observó en el caso de *S. cerevisiae*; existe dentro de los tres géneros principales de bacterias lácticas, el predominio de uno en particular que debido a sus características fisiológicas, metabólicas y de competencia en el medio, es el principal agente que lleva a cabo el importante proceso de la fermentación secundaria. El género *Oenococcus oenos* se caracteriza por poseer una alta tolerancia a la acidez y al alto contenido alcohólico del medio (vino), no así el género *Pediococcus*, que a pesar de su tolerancia a altas temperaturas y bajos valores de pH, encuentra una marcada desventaja cuando se trata de tolerancia al alcohol.

Por otra parte, *Lactobacillus*, el cual por su baja tolerancia a las condiciones del medio de vinificación, ha sido dejada de lado en el estudio de su aporte a la fermentación maloláctica. Solo cepas de la especie *Oenococcus oenos* crecen en presencia de un 10% de etanol y valores de pH menores a 4.2. Es por esto que el mundo de la biotecnología enológica ha puesto todo su esfuerzo por secuenciar el genoma de esta especie y contar con posibilidades tecnológicas equiparables a las que se prevén con *S.cerevisiae*. (Boulton Roger, et. al, 1999)

El Joint Genome Institut, un consorcio que depende del Departamento de Energía de Estados Unidos y del Laboratorio Nacional de Los Álamos se dedicó a secuenciar el genoma de diversos microorganismos entre los cuales destaca *Oenococcus oenos*. Se espera que la secuenciación completa de este genoma sea comparable en términos de impacto benéfico al obtenido con la secuenciación del genoma de la levadura. Esta información será de gran ayuda para un mejor entendimiento de los fenómenos malolácticos y la interacción entre bacterias ácido lácticas y levaduras.

La información referente a esta especie se puede consultar sin restricción alguna en <http://genome.ornl.gov/microbial/oen/>.

1.7. EFECTO DE LA DIVERSIDAD Y DINÁMICA POBLACIONAL EN LA CALIDAD DEL VINO

La diversidad y la dinámica de la población habitual microbiana, influyen en muchos aspectos en la elaboración del vino. Algunas especies juegan un papel benéfico, mientras que otras lo hacen de manera negativa.

La contribución individual y colectiva de levaduras nativas puede variar de acuerdo al número y a la diversidad de especies presentes en el mosto y en el vino.

El efecto combinado de los factores externos, tales como condiciones climáticas y prácticas agrarias aplicadas a la viticultura afectan la composición de la población nativa de levaduras en fermentaciones naturales, por lo tanto, provocan una considerable variación año tras año de las características organolépticas en el producto final. Para hacer frente a esto, los productores del mundo han venido haciendo uso desde hace muchos años, de alternativas tecnológicas que les han permitido contar con productos con características que antes parecían imposibles de adquirir en un vino. (Boulton Roger, et. al, 1999)

El siguiente apartado describe los avances tecnológicos que se han desarrollado en el mundo de la viticultura, poniendo de manifiesto la aplicación de una de las disciplinas más desarrolladas en los últimos años, la Biotecnología.

CAPITULO 2

LA ENOLOGÍA MODERNA

Como ya se comentó, la microbiota presente en la superficie de la uva sufre una dinámica poblacional que se ve influida por un gran número de factores que impactan directamente las características sensoriales típicas de cada región productora.

Hoy en día, las exigencias del mercado dan lugar a la búsqueda de alternativas que hagan del vino un producto de calidad, es decir; que mantenga satisfechas las expectativas del consumidor. Por ello, desde hace años la Enología ha incorporado a su estudio, el importante desarrollo de la biotecnología y la microbiología enológica, en donde la aplicación del método científico a la elaboración del vino se aplica para mejorar las prácticas basadas en la tradición y la costumbre. Todos estos conocimientos, integrados dentro de un sistema metodológico, han dado lugar a la Enología moderna.

(Llanos Manuel, 2003)

El desarrollo de técnicas moleculares innovadoras ha abierto la puerta a la modificación por vía genética de microorganismos vínicos para obtener la expresión de valiosas características, las cuáles mejoran el proceso de manufactura del vino y las características sensoriales del producto final. El razonamiento es simple: la introducción de un gen exógeno en la levadura implica la producción de una característica de interés industrial. Su posterior inoculación e imposición favorece la expresión de dicha característica durante el proceso industrial, y por lo tanto su presencia en el vino resultante. (Querol Amparo, 2000)

En este apartado, se presentan aquellas alternativas tecnológicas que han llevado a la Enología moderna a convertirse en una extensión de la aplicación del conocimiento biotecnológico industrial en el mundo.

2.1. BIOTECNOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

El vino como dijera Hemingway:

“Es una de las cosas más cultas de nuestra civilización”.

Como tal, sigue hoy incorporando la cultura de nuestro tiempo bajo la forma de una de las más revolucionarias y prometedoras ciencias de la vida: la ingeniería genética.

En términos generales, la biotecnología se puede definir como el conjunto de técnicas (microbiológicas, bioquímicas y de ingeniería genética) en que se utilizan organismos vivos, partes de ellos o moléculas derivadas de organismos vivos para fabricar o modificar productos con un propósito específico. (Lucas Carrillo Emilio, 2005)

La biotecnología posee la capacidad de producir cantidades prácticamente ilimitadas de:

- Sustancias de las que nunca se había dispuesto antes.
- Productos que se obtienen normalmente en cantidades pequeñas.
- Productos con costo de producción mucho menor que el de los fabricados por medios convencionales.
- Productos obtenidos a partir de nuevas materias primas más abundantes y baratas.

La importancia principal de la biotecnología de alimentos ha sido la obtención de insumos con características que les permitan ser una alternativa para solucionar problemas que van desde el desabasto de alimentos básicos hasta el mejoramiento de características nutricionales y organolépticas.

Los aportes de la biotecnología para apoyar los procesos productivos se enfocan a dos grandes líneas prioritarias de investigación:

1. Tecnología enzimática y biocatálisis:

Incluye el extenso campo de las biotransformaciones así como el procesamiento de alimentos y la producción de proteínas y enzimas de uso alimentario a través de los procesos de fermentación.

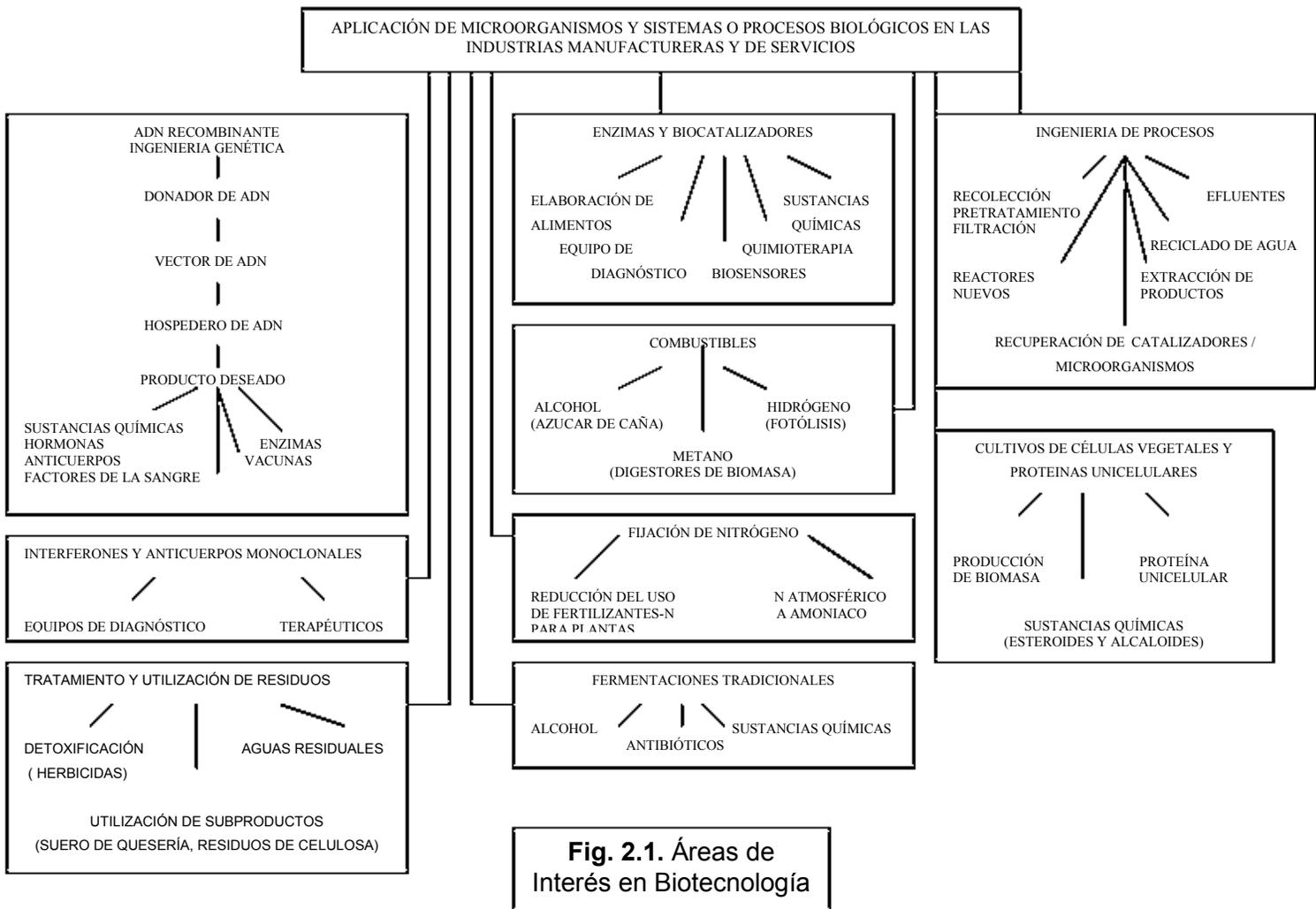
2. Alimentos genéticamente modificados:

La modificación genética de alimentos permite efectuar la selección de un rasgo genético específico de un organismo e introducir ese rasgo en el genoma del organismo fuente del alimento, por medio de técnicas de ingeniería genética. En Enología, estas técnicas están siendo aplicadas al estudio sobre el mejoramiento de las características genéticas de la vid y de los agentes microbiológicos implicados en la producción del vino.

Por ejemplo, el proyecto de secuenciación del genoma de la uva se ha encaminado a investigar cuáles genes, al expresarse, participan en la definición de características como el aroma, el color y el dulzor del fruto. Si alguna de las características anteriores no es tan buena, se podría mejorar. Las condiciones actuales de vinificación hacen necesario conocer muchos aspectos sobre la vid y su cosecha: plantas, genes que participan en el aroma, en la cantidad de azúcar, en el color; cómo los genes y su expresión determinan estas características, cómo influyen los distintos climas en la expresión de los genes, cuál es la respuesta de las vides frente a los patógenos. Para todo eso, se están desarrollando aplicaciones biotecnológicas que mejoren las características del vino buscando dar un valor agregado al producto final (International Grape Genome Program, 2002).

Por otra lado, el desarrollo de procesos microbianos basados en el concepto de biotecnología ha dado lugar a la denominada microbiología industrial, cuya evolución data desde la fabricación del vino y la cerveza, hasta su aplicación en procesos farmacéuticos, aditivos alimentarios, enzimas y compuestos químicos tales como el butanol y el ácido cítrico. Los microorganismos industriales se han convertido en especialistas metabólicos capaces de producir específicamente determinados metabolitos con alto rendimiento. Con el fin de lograr esta elevada especialización, las cepas industriales están modificadas genéticamente, por mutación o por recombinación en donde se reprimen o se eliminan las vías metabólicas menores provocando un desequilibrio metabólico que resulta beneficioso en términos de productividad (Madigan, M.T., et al., 2003).

En la investigación de estos procesos, la principal tarea del microbiólogo ha consistido en la implantación de las herramientas biotecnológicas más innovadoras, con el objetivo de obtener el rendimiento más alto del producto deseado (Fig. 2.1).



En los últimos 150 años, el estudio conjunto de la microbiología industrial y la Biotecnología, ha abierto las puertas a la modificación genética de los microorganismos implicados en la elaboración del vino y a la expresión de características sensoriales innovadoras. Ante esto, ha surgido una nueva era: la de la biotecnología enológica.

2.2. PROPIEDADES DE UN MICROORGANISMO INDUSTRIAL

Un microorganismo adecuado para su utilización industrial debe producir la sustancia de interés, pero hay muchos aspectos a considerar. Es preciso disponer del cultivo axénico (puro), debe ser genéticamente estable, y debe crecer en cultivo a gran escala. El cultivo debe producir preferentemente esporas o alguna otra forma celular reproductora, para que los organismos se puedan inocular fácilmente en grandes fermentadores.

Una característica importante es que el organismo industrial crezca rápidamente y produzca el compuesto deseado en un periodo de tiempo relativamente corto. Un microorganismo industrial debería no ser dañino para las personas ni para los animales y plantas económicamente importantes. Debido al gran tamaño de la población dentro del fermentador y a la imposibilidad práctica de evitar la contaminación del ambiente fuera del fermentador, un patógeno podría plantear problemas desastrosos. Finalmente, un microorganismo industrial debe ser susceptible de manipulación genética (Madigan, M.T., et al., 2003).

2.3. SELECCIÓN DE LEVADURAS

Como producto de los primeros trabajos de investigación, la mayoría de los productores de vino en el mundo adoptaron prácticas tales como la selección de cepas microbianas con características específicas. Los esfuerzos por obtener características sensoriales reproducibles en el vino, llevaron a la adición en cada campaña de vendimia de un inóculo microbiano seleccionado y puro, que al ser mayoritario normalizara la microbiota inicial y, de esta forma, diera lugar a una fermentación homogénea año tras año. Actualmente, se comercializan cultivos liofilizados de levadura que permiten un mejor control de los procesos de vinificación y del perfil sensorial del producto final (Querol Amparo, 2000).

Las características que se le exigen a una levadura seleccionada son, principalmente, que produzca fermentaciones vigorosas, reproducibles, predecibles y con baja concentración de azúcar residual, que posea una buena tolerancia al etanol, a la temperatura y al anhídrido sulfuroso, que produzca un buen perfil aromático exento de aromas no deseados y, sobre todo en la elaboración de vinos espumosos, que flocule y sedimente espontáneamente para que sea fácil de eliminar una vez acabada su función.

(Gil Ponce José Vicente, 2001)

Con estas prácticas se consiguió en su momento un gran ahorro de tiempo, sin embargo, surgió una importante interrogante. ¿Cómo saber si la inoculación es exitosa y la levadura añadida conduce la fermentación y transmite al vino las características por las que fue seleccionada?. Las técnicas clásicas de identificación microbiana, están basadas en las características morfológicas y fisiológicas de la levadura, lo que las muestra como lentas e incapaces de contestar a esta cuestión.

La imposibilidad de discernir entre las numerosas cepas de la especie *S. cerevisiae* presentes en el mosto o vino hacían de la levadura seleccionada indistinguible del resto (Gil Ponce José Vicente, 2001).

Actualmente existen varios métodos de identificación y caracterización de levaduras de interés enológico, basados en técnicas de biología molecular que se presentan como una alternativa a los métodos tradicionales para la caracterización e identificación de levaduras. Estos métodos se basan esencialmente en el análisis directo del ADN que codifica para el ARN de la levadura; las diferencias entre las propiedades de este ADN se denominan polimorfismo (Carro David et. al, 2004).

La utilización de la mayoría de este tipo de técnicas se está imponiendo con rapidez en las bodegas, ya que permiten un control microbiológico del proceso fermentativo más rápido y efectivo, sobre todo cuando se utilizan levaduras seleccionadas para producir vinos de características homogéneas año tras año. Al mismo tiempo que se han desarrollado metodologías apoyadas en la biología molecular con el fin de diferenciar las cepas de levadura que poseen la totalidad o la mayor parte de las características mencionadas al inicio de esta sección, ha surgido una creciente exigencia del mercado por contar con cultivos iniciadores con un más amplio rango de propiedades especializadas. Su importancia difiere en el tipo y estilo de vino deseado y de los requerimientos técnicos de la bodega. Esto a su vez, es la base del estudio sobre técnicas de ingeniería genética en pro del desarrollo de cepas, y su posible uso como organismos genéticamente modificados para la obtención de vinos de calidad. (Pretorius I, 2000)

2.4. DESARROLLO DE LEVADURAS VÍNICAS

***"Su vino,
¿lo va a querer tinto o blanco;
tradicional o transgénico?"***

Históricamente y como ya se ha descrito, la investigación de levaduras vínicas había estado relacionado exclusivamente a la selección de cepas con características específicas de cada región. Los avances tecnológicos recientes aplicados a mejorar la reproducibilidad del proceso fermentativo, la calidad del vino y la economía de producción han provocado una serie de nuevas demandas (Tabla 2.1.) en el desempeño de las cepas de levaduras vínicas seleccionadas.

Previo al análisis de las diversas metodologías desarrolladas con el fin de modificar cepas microbianas a favor de la obtención de "vinos de diseño" que cumplan con las necesidades ya comentadas, se ha de mencionar que la secuencia completa del genoma de la levadura vínica se dio a conocer el 24 de Abril de 1996 tras un enorme esfuerzo en el que participaron más de 600 científicos de 96 laboratorios conjuntados en un programa mundial. Doce millones de bases fueron secuenciadas en un verdadero esfuerzo internacional, que involucró laboratorios europeos, americanos, canadienses y japoneses. Aún cuando la secuencia completa del genoma de la levadura representa solamente una fracción pequeña de la información que se encuentra actualmente en las bases de datos, ha constituido un recurso de gran valor para el análisis de la función y arquitectura genómica (González Alicia, et.al, 2005).

Tabla 2.1. Objetivos del desarrollo de levaduras vínicas.

<p>Control de Calidad eficiente y manejo de cepas Conservación de cepas. Marcado molecular. Alta estabilidad genética.</p>
<p>Mejoramiento del desempeño fermentativo Rápida adaptación al medio de fermentación. Alta competencia con respecto a la demás microbiota habitual (Fenotipo “Killer”). Tolerancia a bajas temperaturas. Mejoramiento de la viabilidad y vitalidad de cultivos iniciadores. Eficiente utilización de azúcares. Eficiente asimilación de nitrógeno. Alta tolerancia alcohólica. Alta osmotolerancia. Alta tolerancia a agentes antimicrobianos. Alta tolerancia al sulfitado.</p>
<p>Mejoramiento de la eficiencia del proceso Sedimentación y floculación controladas. Clarificación de proteínas y polisacáridos. Baja producción de espuma. Resistencia a la desecación.</p>
<p>Mejoramiento del sabor y otras propiedades sensoriales Aumento en la liberación de terpenos y otros precursores aromáticos por acción enzimática específica. Aumento en la producción de ésteres volátiles que aportan aromas deseados. Aumento en la producción de glicerol. Bio-ajuste de la acidez del vino. Eliminación de fenoles que afectan el sabor. Reducción de sulfitos y eliminación de compuestos azufrados volátiles. Baja producción de alcoholes superiores. Aumento en la liberación de compuestos derivados de la lisis de levaduras por medio de levaduras “Killer” para la elaboración de vinos espumosos.</p>
<p>Mejoramiento de características nutricionales Producción de Resveratrol. Baja formación de aminas biógenas. Baja formación de etil-carbamato.</p>
<p>Mejoramiento en el control de microorganismos de descomposición Levaduras vínicas productoras de enzimas antimicrobianas. Levaduras vínicas productoras de péptidos con actividad antimicrobiana.</p>

Así mismo, esta experiencia facilitó y propició el desarrollo de proyectos involucrados en la secuenciación de genomas de una gran variedad de organismos eucariontes, incluyendo el proyecto del genoma humano (Fraser et. al, 2000).

2.4.1. CONSTITUCIÓN GENÉTICA DE LEVADURAS VÍNICAS

La levadura *S. cerevisiae* posee un genoma pequeño, solamente unas cuantas veces mayor que el de *Escherichia coli* y 200 veces menor que el de células de mamífero (Fig. 2.2.), esto simplifica de manera importante el análisis genético y molecular del mismo. Por ejemplo, una biblioteca genómica de levadura completa puede quedar contenida en unos cuantos miles de plásmidos o fagos, en tanto que para contener una biblioteca completa de células de mamífero se requerirían cerca de un millón de partículas. Este hecho propició que se pudiera llevar a cabo uno de los proyectos de mayor magnitud de la biología molecular moderna: la secuenciación completa de un genoma eucarionte (González Alicia, et.al, 2005).

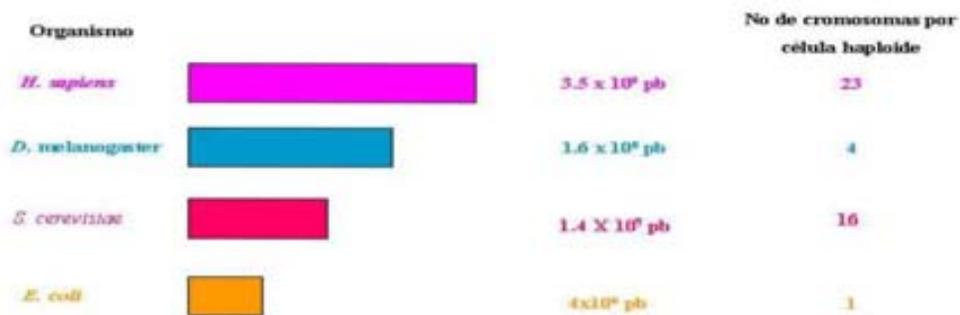


Figura 2.2. Tamaño del genoma de algunos organismos. Cada barra representa el total de pares de bases que constituyen el genoma de cada una de las especies indicadas; también se muestra el número de cromosomas del genoma haploide para cada caso. A pesar de la pequeña cantidad de ADN, el genoma de la levadura está distribuido en 16 cromosomas.

Una levadura haploide contiene 16 cromosomas que varían en tamaño de 200 a 2200 Kb, en los cuales como resultado del análisis de la secuencia del genoma, se localizaron un total de 6,183 marcos de lectura abiertos (ORF, Open Reading Frames) y se predijo que de éstos, 5,800 correspondían a genes que codificaban para proteínas (Fig. 2.3.).

A diferencia de los genomas de organismos multicelulares, el genoma de la levadura es muy compacto, dado que el 72% de la secuencia corresponde a secuencias codificantes. El tamaño promedio de los genes de levadura es de 1.45 kb, o 483 codones, y solamente el 3.8% de los ORFs contienen intrones. Aproximadamente el 30% de los genes se han caracterizado experimentalmente; y del 70% restante, cuya función no se conoce, aproximadamente la mitad contiene al menos un motivo de algún tipo de proteínas ya caracterizadas, o corresponden a genes que codifican para proteínas estructuralmente relacionadas con productos génicos ya caracterizados en levadura o en otros organismos (Fig. 2.4.).

El ARN ribosomal se encuentra codificado por 120 copias repetidas y arregladas en tandem en el cromosoma, en tanto que existen 262 genes que codifican para ARNs de transferencia, 80 de los cuales poseen intrones.

Los cromosomas contienen elementos móviles, retrotransposones que varían en número y posición en las diferentes cepas de *S. cerevisiae*, aún cuando la mayoría de las cepas de laboratorio poseen aproximadamente 30 elementos (González Alicia, et.al, 2005).

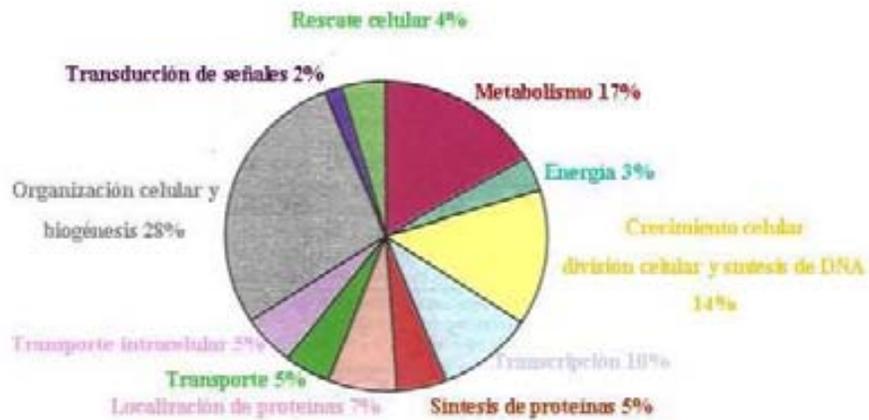


Figura 2.3. Número relativo de ORFs (marcos de lectura abiertos) asignados a diferentes categorías de genes. Se muestran once categorías funcionales.

Solamente se consideraron, proteínas de función conocida, o aquellas que mostraron una gran similitud con proteínas de función conocida. En total el esquema considera 3,167 ORFs, un mismo ORF puede quedar incluido en más de una categoría.

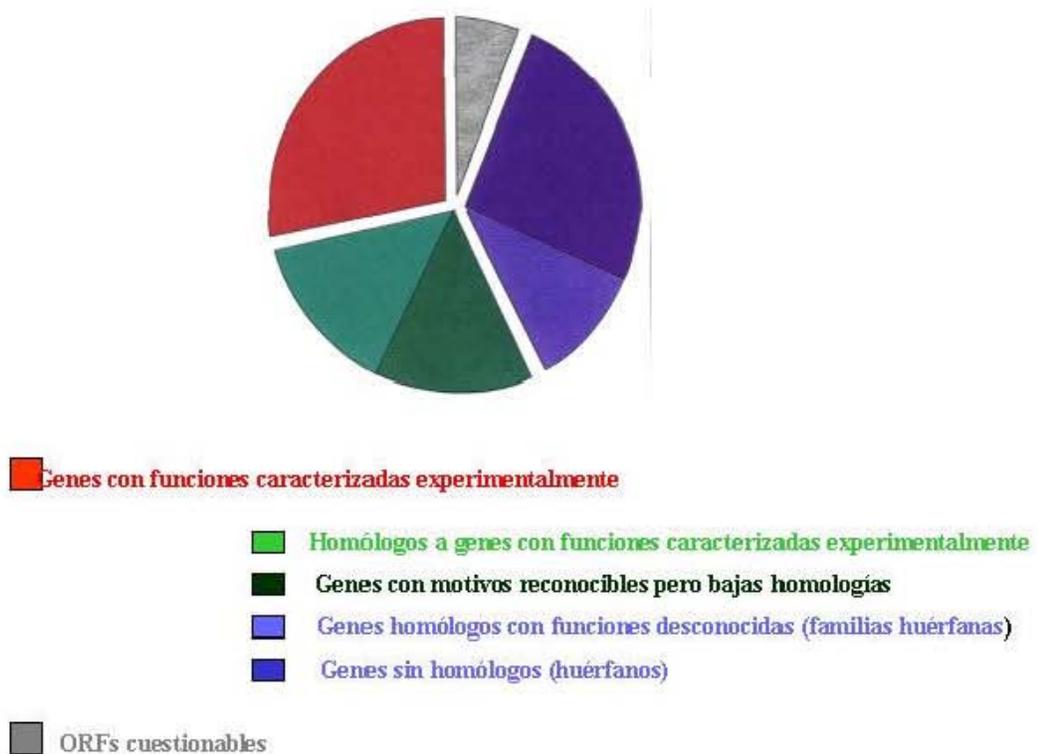


Figura 2.4. Clasificación de los genes en *S. cerevisiae*.

El 30% de los ORFs corresponden a genes que codifican proteínas y que han sido caracterizados por métodos convencionales incluyendo ensayos funcionales.

Si se hace caso omiso del 7% de los ORFs cuestionables, es decir aquellos de los que se duda si codifican para una proteína, el resto de los ORFs corresponde a genes cuya función es actualmente desconocida.

Se pueden separar en dos grupos: aquellos que codifican una proteína relacionada estructuralmente con un producto génico ya caracterizado, o que tienen un motivo peptídico presente en una proteína funcionalmente caracterizada y aquellos que no comparten suficiente homología estructural con ninguna secuencia existente en las bases de datos (huérfanos), o que comparten homología estructural con productos de ORFs a su vez de función no caracterizada y que en la mayoría de los casos son también de levadura (familias de huérfanos).

El ADN mitocondrial también puede considerarse parte del genoma de la levadura. Este ADN codifica para los componentes de la maquinaria traduccional de la mitocondria y aproximadamente el 15 % de las proteínas mitocondriales.

Existen mutantes que carecen de ADN mitocondrial, estas se denominan ro y carecen de los polipéptidos que se sintetizan en los ribosomas mitocondriales. Estas mutantes son incapaces de llevar a cabo el metabolismo respiratorio, pero son viables y capaces de fermentar sustratos como la glucosa.

Prácticamente todas las cepas de *S. cerevisiae* contienen virus de ARN de doble cadena, que constituyen el 0.1% del total de ácidos nucleicos; de éstos el más estudiado es el M, que codifica para una toxina.

Aunado al hecho de que *S. cerevisiae* es un organismo no patógeno, las características descritas anteriormente, hicieron de esta, el modelo biológico favorito de una buena parte de la comunidad científica. Así durante años se obtuvieron mutantes, se describieron vías metabólicas, se mapearon genes, y se hicieron estudios de microscopía antes que en ningún otro microorganismo. En 1980 se publicó el primer reporte de un protocolo que permitió introducir ADN en este organismo y *S. cerevisiae* entró con paso firme al concierto de la biología molecular (González Alicia, et.al, 2005).

2.4.2. TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL ANÁLISIS Y DESARROLLO DE LEVADURAS VÍNICAS

Después de revisar a grandes rasgos la constitución genética de *S. cerevisiae*, debe considerarse que esta puede ser manipulada genéticamente en muchas maneras. Algunas técnicas alteran regiones limitadas del genoma; otras son usadas para recombinar o re-arreglar el genoma completo. El uso combinado de técnicas moleculares clásicas y métodos de DNA recombinante ha incrementado ampliamente la variedad de metodologías aplicables al estudio de las células de levaduras industriales (Pretorius I, 2000).

a) Mutagénesis

La mutagénesis es una técnica molecular clásica basada en la introducción de un defecto (delección, inserción o cambio de bases) en el DNA, resultando en la expresión modificada de un gen en particular. La mutación puede alterar todos los pasos en la síntesis de proteínas, desde la transcripción hasta el procesamiento del RNA o una proteína.

Cepas mutantes pueden ser obtenidas por tratamiento con agentes mutágenos químicos o físicos mediante los cuáles se obtienen mutaciones no dirigidas a algún sitio específico del genoma (Verachtert Hubert, de Mot René, 1989).

b) Transformación

Los siguientes son los procedimientos de transformación más comúnmente usados en la modificación de levaduras:

- a. Transformación de Protoplastos. Normalmente, la transformación de levaduras se lleva a cabo mediante esta técnica. Este procedimiento es similar a la fusión de protoplastos descrita más adelante: las células de levadura son tratadas enzimáticamente para remover la pared celular y adicionar el material genético. Los protoplastos transformados son regenerados en un medio osmóticamente estabilizado.
- b. Transformación con acetato de litio. Este método se basa en un tratamiento con un ion metálico similar al proceso de transformación para cepas de *E. coli*. Este método es simple y rápido, sin embargo; presenta una baja eficiencia.
- c. Transformación por liposomas. Los liposomas son microcápsulas sintéticas de fosfolípidos que pueden ser usados como acarreadores de compuestos biológicos como el DNA. Estos liposomas cargados con DNA pueden ser introducidos a la levadura evitando la degradación del material genético.
- d. Electroporación. En esta técnica, las células son transformadas mediante la aplicación de un pulso eléctrico que genera canales por donde se inserta el material genético exógeno a la levadura. Este método necesita de equipo sofisticado para su operación, sin embargo; representa una opción para la modificación genética de levaduras con dificultades de transformación por metodologías clásicas.

(Verachtert Hubert, de Mot René, 1989).

c) Introducción de plásmidos recombinantes

Para llegar a ser un componente heredable de la célula, el DNA de transformación normalmente tiene dos destinos: Ya sea que el material genético se encuentre como plásmido físicamente separado de los cromosomas endógenos en la levadura o que se encuentre integrado dentro del cromosoma y por tanto, mantenido por las funciones de este.

La introducción de plásmidos recombinantes dentro de una cepa de levadura vínica requiere ya sea, que la cepa sea convertida a auxótrofa antes de la transformación o que el plásmido usado en la transformación contenga un marcador que pueda ser seleccionable contra de cepas salvajes haploides o poliploides.

Estos marcadores de selección incluyen:

- i) El gen de resistencia a Kanamicina.
- ii) El gen de resistencia al antibiótico Geneticina G418.
- iii) El gen de resistencia a cobre (CUP1).
- iv) Resistencia a Higromicina.
- v) Resistencia a Cloramfenicol.
- vi) Resistencia a Metrotexate.
- vii) Resistencia al herbicida sulfometuron methyl (gen SMR1).
- viii) Resistencia a metilglioxal.
- ix) El Gen de resistencia a L-canavanina (CAN1).
- x) La habilidad para utilizar melobiosa.

Los plásmidos recombinantes con marcadores seleccionables como los citados y que contienen un gen de interés en particular, comúnmente son integrados a un cromosoma o mantenidos como un minicromosoma en cepas de levaduras industriales. Tales minicromosomas pueden ser despojados de todas aquellas secuencias de DNA sin relevancia antes de la transformación (Suárez Lepe José, 2004).

Además de la introducción de genes específicos en levaduras vínicas, los avances en la tecnología de DNA recombinante ofrecen una amplia aplicabilidad.

Algunas de las principales aplicaciones de esta tecnología incluyen:

- i) Amplificación de la expresión manteniendo el gen en múltiples sitios dentro del DNA cromosomal.
- ii) Liberación de la síntesis enzimática de un control metabólico en particular.
- iii) Procesamiento del mensajero en fase (In-frame splicing) de un gen estructural.
- iv) Desarrollo de productos génicos con características modificadas por mutagénesis dirigida.
- v) Eliminación dirigida de características indeseables mediante destrucción de genes.

- vi) Incorporación de información genética a partir de diversos organismos tales como hongos, bacterias, animales y plantas.

(Kobayashi Suda, 1996).

La modificación genética de levaduras vínicas exige conocer promotores de genes de levaduras que se expresen específicamente durante momentos específicos durante el proceso de fermentación (p.ej. los promotores GAL1, GAL10 y ADH1). Estos promotores controlan el hecho de que el gen codifique o no lo haga para la proteína de interés.

d) Selección clonal de variantes

La selección de variantes depende de la variación genética normalmente presente entre todas las cepas de levaduras vínicas. La heterogeneidad genética en levaduras se debe principalmente a la recombinación mitótica durante el crecimiento vegetativo y la mutación espontánea. Aislar exitosamente cepas de variantes depende de la frecuencia a la que estas ocurren y de la disponibilidad de procedimientos de selección para aislar la cepa que contenga la característica mejorada.

La frecuencia de mutación espontánea promedio en *S. cerevisiae* en cualquier locus es aproximadamente 10^{-6} por generación. El uso de mutágenos aumenta significativamente la frecuencia de mutación en una población de levaduras vínicas. La mutación y selección parece ser una buena opción para el desarrollo de cepas cuando un gran número de características se deben mantener constantes mientras que solo una es modificada.

La mutación de levaduras vínicas puede conducir al mejoramiento de ciertos rasgos mediante la debilitación simultánea de otras características. A pesar de que las mutaciones son probablemente inducidas con la misma frecuencia en haploides, diploides o poliploides, no son tan fácilmente detectadas en células diploides y poliploides a causa de la presencia de alelos no mutados. (Suárez Lepe José, 2004)

e) Hibridación

La hibridación intra-especies involucra el apareamiento de haploides de sus opuestos para obtener un diploide heterocigótico. La progenie recombinada es recuperada por esporulación del diploide, recuperando ascosporas haploides individuales y repitiendo el ciclo de apareamiento/esporulación las veces que sea requerido. Cepas haploides derivadas de diferentes padres diploides, los cuales poseen diferentes genotipos, tienen la capacidad de ser apareados para formar una cepa diploide con propiedades diferentes a cualquiera de las dos cepas parentales.

Por lo tanto, teóricamente hablando, la reproducción cruzada puede permitir la selección de características deseables y la eliminación de las indeseables (Suárez Lepe José, 2004).

Desafortunadamente, muchas levaduras vínicas son homotálicas y el uso de técnicas de hibridación para el desarrollo de cepas de levaduras vínicas se presenta complicado.

Este problema puede ser resuelto mediante apareamiento directo de esporas en donde cuatro esporas homotálicas del mismo ascus son puestas en contacto con células haploides heterotálicas usando un micromanipulador. El apareamiento se lleva a cabo entre ascosporas compatibles y células.

La eliminación o la inclusión de una propiedad específica puede por lo tanto, ser realizada relativamente rápido por hibridación, dado que esta técnica tiene una base genética simple, por ejemplo uno o dos genes. Sin embargo, muchas características deseables están especificadas por varios genes o son el resultado de varios sistemas genéticos interactuando entre ellos (Verachtert Hubert, de Mot René, 1989).

f) Apareamiento raro

Varias técnicas han sido desarrolladas para imitar el proceso sexual con cepas industriales que no poseen una contraparte para su apareamiento y además son incapaces de esporular. La mayoría de estas cepas parecen tener una actividad de apareamiento residual lo que las capacita de poder aparearse con una cepa haploide. Sin embargo, la baja eficiencia de este proceso dificulta la detección de los productos resultantes de tal forma de apareamiento. Para resolver este problema se desarrolló una técnica especial. Cepas industriales con una forma defectuosa o deficiencia de mtDNA (mutantes respiratorio-deficientes) pueden ser forzados al apareamiento con cepas auxótofas haploides que contengan características respiratorias normales (Fig. 2.5.).

La selección se hace en un medio mínimo que contiene glicerol como única fuente de carbono. En este medio, las cepas parentales no podrán crecer y los productos del apareamiento raro pueden ser aislados (Suárez Lepe José, 2004).

El apareamiento realizado con las cepas mencionadas generará pocos protótrofos con suficiencia respiratoria. A estos híbridos se les puede inducir la esporulación para posterior análisis genético y reproducción cruzada (Verachtert Hubert, de Mot René, 1989).

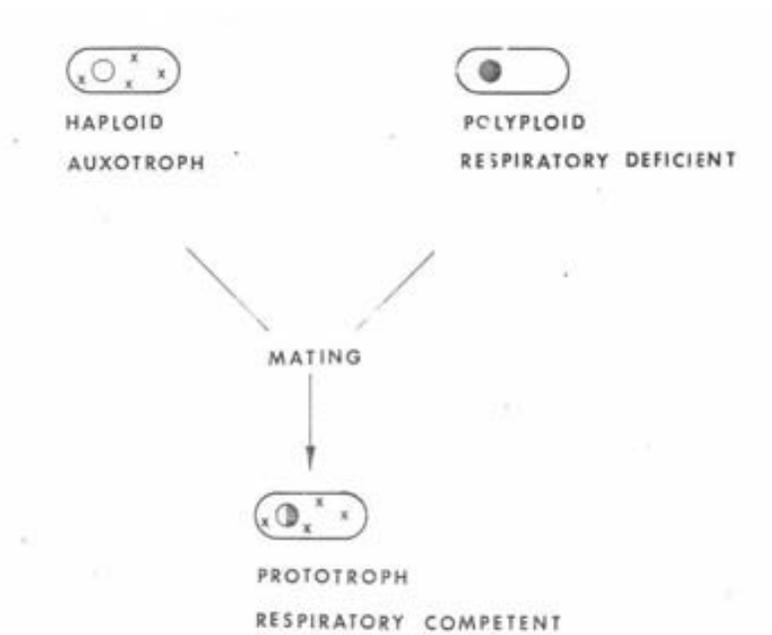


Fig. 2.5. Representación esquemática del proceso de apareamiento raro.
(x) mitocondria; (o) y (●) núcleos con sus características cromosomales características.

g) Citoducción

La técnica de cruzamiento raro es también usada para introducir elementos genéticos citoplasmáticos en levaduras vínicas sin la transferencia de genes nucleares procedentes de una levadura parental no vínica. Este método de desarrollo de cepas se denomina citoducción. Los citoductantes reciben contribuciones citoplasmáticas de parte de ambos padres pero retienen la integridad nuclear de uno solo (Fig. 2.6.). La citoducción requiere un apareamiento haploide, el cuál contenga una mutación en el gen Kar1 (implicado en los procesos de mitosis y conjugación), esta mutación impide la fusión nuclear después del apareamiento (Verachtert Hubert, de Mot René, 1989).

Esta forma de construcción de cepas puede ser usada para sustituir el genoma mitocondrial de una levadura vínica o para introducir un plásmido que codifique características deseables en levaduras vínicas. El apareamiento entre cepas en donde una de ellas posea el alelo kar1, ocasionalmente genera una progenie que contiene el genotipo nuclear de un padre en conjunto con un cromosoma adicional proveniente del otro padre.

La donación de un cromosoma desde una cepa industrial a un receptor haploide kar1 se define como una transferencia cromosomal sencilla, y es usada para examinar en detalle, cromosomas individuales de levaduras industriales (Suárez Lepe José, 2004).

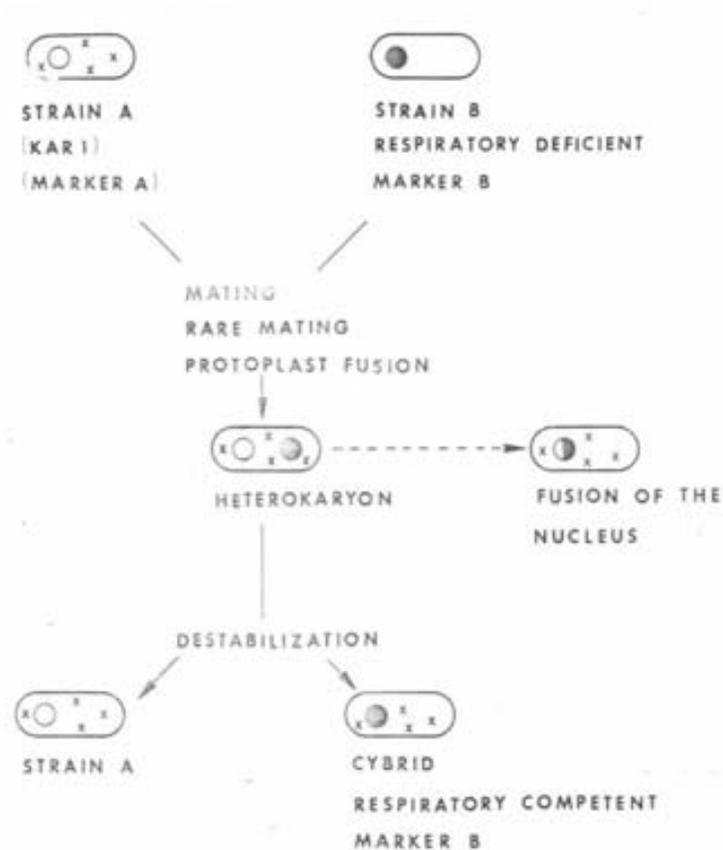


Fig. 2.6. Representación esquemática de la técnica de citoducción.

(x) mitocondria; (o) y (●) núcleos con sus características cromosomales características.

h) Fusión de protoplastos

Los protoplastos son células de levaduras a las que se ha tratado con enzimas degradantes de la pared celular tipo zymoliasa o novozyme, y a las que se coloca en un medio isotónico que permita a la célula mantener su estructura. Para conseguir la fusión se obtienen protoplastos de dos cultivos en la fase exponencial de las dos cepas parentales. Estos se lavan, se mezclan en idénticas proporciones y la mezcla de fusión se crece sobre agar de regeneración con el objeto de recuperar los productos de fusión (Fig. 2.7.).

Protoplastos derivados de diferentes cepas parentales pueden ser mezclados en presencia de un agente fusionante como polietilén glicol y iones de calcio; posteriormente, se regenera su pared celular en un medio de cultivo selectivo osmóticamente estabilizado. La fusión esferoplástica de levaduras industriales sirve para eliminar las barreras naturales y realizar una posterior hibridación (Barre. P, Vezinet. F, Dequin. S, Blondin. B, 1993).

Las características deseadas y las no deseadas en ambas cepas parentales pueden ser recombinadas en la progenie. Células con diferente nivel de ploidismo pueden ser fusionadas. Alternativamente, dos levaduras vínicas diploides con características deseables complementarias pueden ser fusionadas para una levadura vínica tetraploide que contenga todo el soporte genético de las dos levaduras vínicas parentales (Verachtert Hubert, de Mot René, 1989).

Aún cuando las metodologías anteriormente descritas han sido utilizadas como herramientas de gran utilidad en los programas de desarrollo de cepas, estas carecen de especificidad para modificar levaduras vínicas de una forma controlada. Puede no ser posible, por ejemplo, definir de forma precisa el cambio requerido y obtener una nueva cepa en donde el mejoramiento se presente solo en algunos aspectos.

Los genetistas deben tener la capacidad de alterar las características de las levaduras vínicas en diferentes formas: propiedades existentes deben ser modificadas o una nueva inducida sin efectos adversos.

Hoy en día existen ya técnicas moleculares capaces de realizar lo anteriormente mencionado. La clonación de genes y la tecnología de DNA recombinante ofrecen perspectivas interesantes para el mejoramiento de levaduras vínicas. La clonación de genes y la transformación son análogas a cortar una hoja impresa a la mitad, insertar un nuevo párrafo y fotocopiar la versión alterada para producir un nuevo material con respecto al viejo.

La transformación genética es el cambio de la configuración de una levadura mediante la introducción de DNA purificado. Mediante el uso de tales procedimientos es posible el diseño de nuevas cepas de levaduras que difieran de la original en una sola característica en específico (Suárez Lepe José, 2004).

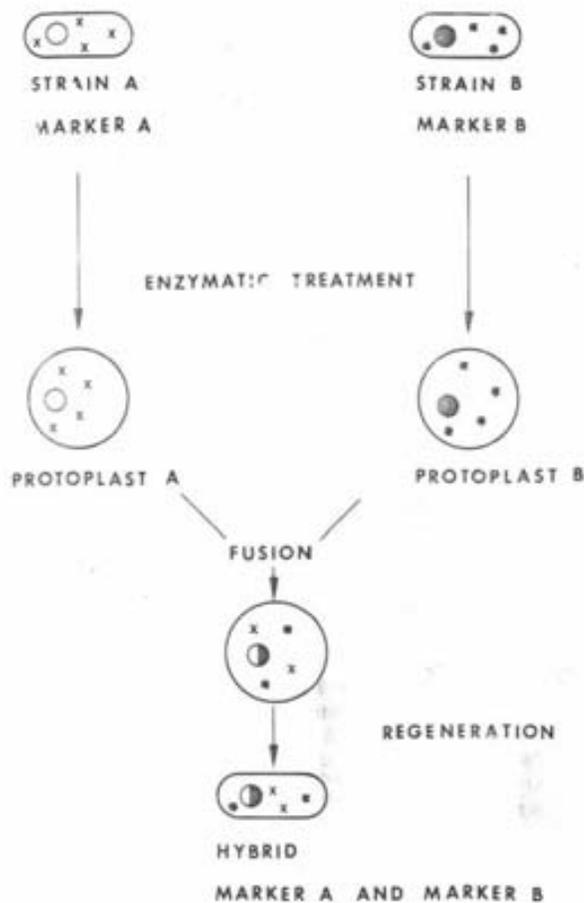


Fig. 2.7. Representación esquemática de la técnica de fusión de protoplastos.
(x) mitocondria; (o) y (●) núcleos con sus características cromosomales características.

i) Clonación de genes

En principio, hay cinco pasos principales para la clonación de un gen (Fig. 2.8.):

- 1) Identificación del gen de interés y obtención de un fragmento de DNA [obtenido de una librería genética o por amplificación usando PCR] para ser clonado (DNA pasajero) por fragmentación enzimática del DNA donador usando endonucleasas de restricción.
- 2) Identificar y linearizar un plásmido adecuado.
- 3) Unir los fragmentos de DNA pasajero al vector de DNA linearizado, generando con ello moléculas de DNA recombinante.

- 4) Insertar las moléculas de DNA recombinante dentro de células hospederas por transformación.
- 5) Seleccionar solo aquellas células que contengan el gen deseado.

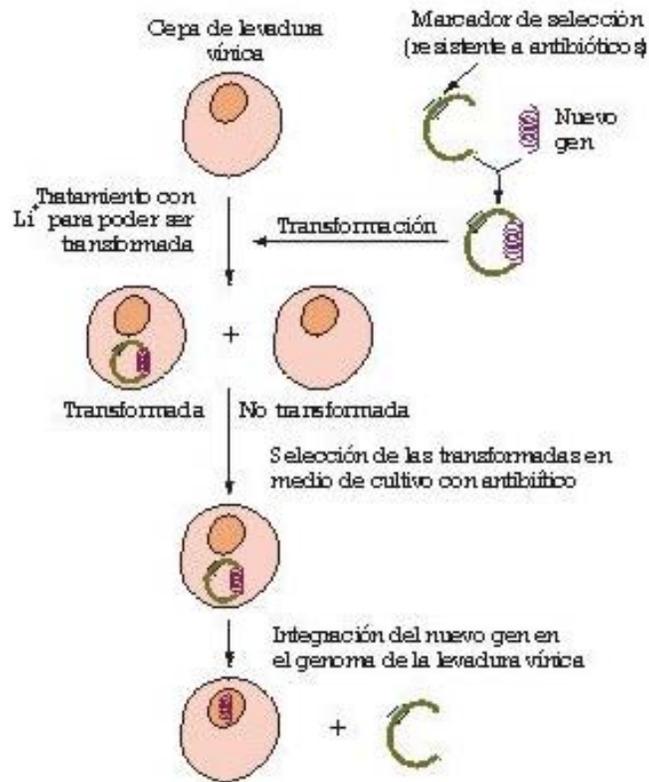


Figura 2.8. Mejoramiento de levaduras por clonación de genes.

2.5. APLICACIONES TECNOLÓGICAS DEL DESARROLLO DE LEVADURAS VÍNICAS

En la actualidad existen diversos trabajos que tratan el estudio de la regulación de la expresión génica y del mejoramiento del proceso fermentativo mediante la inducción de la expresión de eficientes características metabólicas y la producción de enzimas extracelulares.

a) Inducción de la producción de enzimas y toxinas extracelulares:

Cepas de levaduras vínicas con la capacidad inducida de secretar pectinasas, glucanasas, xilanasas y proteasas han sido propuestas para ser aplicadas al mejoramiento del proceso de vinificación en las etapas de clarificación y filtración.

La secreción de glucanasas y glucosidasas pueden a su vez aumentar las características de sabor en el vino por hidrólisis de precursores glucosilados (Van Rensburg. P, Pretorius I.S, 2000).

Se ha prestado especial atención al aroma afrutado. Este depende mayoritariamente de la presencia de terpenos, los cuales se encuentran en el mosto en dos fracciones (Fig 2.9.), uno libre que da aroma por ser volátil, y otra ligada a restos de pared celular del grano de uva por enlaces diglicosídicos. Esta última no contribuye al aroma a menos que se corten los enlaces anteriormente mencionados mediante el empleo de glucosidasas. Se han clonado genes de hongos filamentosos y levaduras oxidativas que codifican estas enzimas, y dichos genes se han expresado en levaduras vínicas, obteniéndose resultados satisfactorios (Perez-Gonzales, et al, 1993), (Sánchez-Torres, et al, 1996).

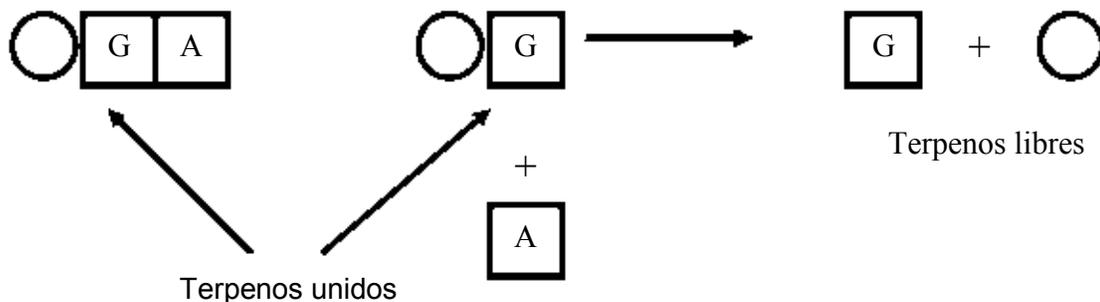


Fig. 2.9. TERPENOS: Linalol, geraniol, nerol, citronelol, α -terpineol y óxido de linalol.

En otros trabajos, con el objetivo de favorecer la competencia de la levadura vínica en el medio de fermentación se pretende que el uso de conservadores químicos potencialmente peligrosos pueda ser significativamente disminuido si cepas de levaduras vínicas son capaces de secretar péptidos con actividad antimicrobiana (tales como bacteriocinas) durante la fermentación y así obtener un proceso autoesterilizable.

La posibilidad de desarrollar levaduras vínicas con capacidades antimicrobianas, representa una valiosa alternativa de sustitución de las propiedades bioinhibitorias del dióxido de azufre (Rainieri. S, Pretorius I.S, 2000).

Se ha descrito el uso de levaduras vínicas que portan los genes que codifican las toxinas killer K1 y K2 (Fig. 2.10.). Estas toxinas son polipéptidos tóxicos para otras especies de levaduras, por lo tanto; pueden ser contaminantes en la fermentación de vinos, dominando a la cepa industrial dando productos indeseables. Por otra parte, una levadura 'killer' seleccionada puede suprimir levaduras indeseables y de esta forma hacer más eficiente el proceso fermentativo (Boone, et al, 1990).

La más reciente aplicación del fenotipo Killer se ha dado en la elaboración de vinos espumosos, en donde el vino permanece en contacto con las células de levadura y los productos de su autólisis tras su muerte. Entre estos compuestos orgánicos procedentes de la muerte y destrucción de las levaduras, se encuentran polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otras moléculas procedentes de su disgregación espontánea. El contacto de este material procedente de las levaduras en el vino, mejora la calidad de este (sabor, aroma y suavidad en boca) y lo cualifica con las características propias de los vinos de cava o de los espumosos. Este fenómeno de autólisis de las levaduras es lento y para su consumación pueden pasar varios años que son los necesarios para que los aromas y otras cualidades características del vino mejoren. Para acelerar estos procesos y ahorrar parte del tiempo durante el que se producen, llegando así en menos tiempo a disponer de un vino espumoso con todos los atributos de calidad, se ha recurrido a enriquecer el vino base antes del inicio de su fermentación secundaria con un cultivo en el que figuren cepas de Saccharomyces cerevisiae agresivas (tipo killer 2) que matan y destruyen a cepas benignas, igualmente añadidas al vino liberando las sustancias de interés (Bryan E. N. Todd, Graham H. Fleet, Paul A. Henschke, 2000).

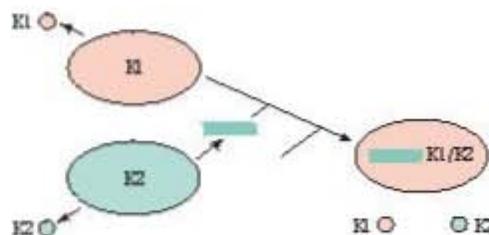


Figura 2.10. Diseño de levaduras vínicas que contienen los genes que codifican los factores *killer* K1 y K2

b) Inducción de la expresión de características metabólicas:

Levaduras vínicas genéticamente modificadas pueden ser utilizadas para mejorar la etapa de clarificación durante el proceso de vinificación mediante la expresión de los genes FLO implicados en la floculación (Kobayashi, Suda, OTAN, Sone, 1996).

La sobre-expresión de la enzima alcohol-acetiltransferasa provoca un aumento en la producción de ésteres mejorando el perfil aromático del vino (Pretorius I, 2000).

Por otro lado, levaduras vínicas genéticamente modificadas pueden ser utilizadas para corregir defectos de acidez en el vino. Para resolver este problema se han construido levaduras vínicas transgénicas que contienen el gen de la bacteria láctica Lactobacillus casei que codifica la L(+)-lactato deshidrogenasa bajo el control de promotores adecuados. La cepa recombinante es capaz de realizar una fermentación productora de etanol y ácido láctico. Las levaduras que expresan el gen L(+)-LDH bajo el control del promotor (ADH1) convierten la glucosa a etanol y lactato con un 20% de la glucosa transformada en L(+)-lactato. Dichas cepas pueden ser usadas en casos en los cuáles la fermentación y la acidificación biológica son requeridas (Dequin, S., Barre, P, 1994).

Recientemente se ha conseguido una vía eficaz de degradación de málico en S. cerevisiae. Para ello se ha construido una levadura recombinante que porta un gen de la levadura Schizosaccharomyces pombe, que codifica una malato permeasa y el gen de L. lactis que codifica la malato descarboxilasa. Esta levadura es capaz de fermentar 4,5 g/L de malato en tan sólo cuatro días (Volschenk, et.al, 1997).

A pesar de las enormes posibilidades que presenta el aprovechamiento de las herramientas biotecnológicas descritas en este apartado y al esfuerzo por desarrollar protocolos de transformación para obtener levaduras recombinantes GRAS (de Generally Recognized As Safe) mediante sistemas de integración en el genoma de las levaduras evitando el uso de resistencias a antibióticos (Querol Amparo, 2000), existe de manera general, una serie de elementos técnicos y sociales derivados de la utilización de las herramientas de la biología molecular en la elaboración del vino que han causado una controversia a la aceptación del vino como uno más de los llamados alimentos transgénicos.

En el siguiente apartado se discutirá la situación global que prevalece en torno a la comercialización y legislación de alimentos genéticamente modificados (GM) y como este panorama influye en los principales sectores productores de este tipo de alimentos.

El vino y su creciente desarrollo biotecnológico se han sumado a este controvertido tema en el que la aplicación generalizada de las herramientas tecnológicas que se han descrito en este trabajo, se exponen a la opinión pública, científica y comercial.

CAPITULO 3

VINOS TRANSGÉNICOS: COMERCIALIZACIÓN Y LEGISLACIÓN MUNDIAL DE ALIMENTOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

La aplicación de las técnicas del DNA recombinante en la tecnología de alimentos ha dado lugar a avances espectaculares durante los últimos años. Vegetales transgénicos resistentes a las plagas más devastadoras, kits de diagnóstico molecular capaces de detectar una célula bacteriana en décimas de gramo de alimento, o animales de granja que producen en su leche microgramos de una proteína de alto valor añadido son algunos de los ejemplos más conocidos. El vino, ante su creciente demanda comercial, no puede vivir de espaldas a tal desarrollo biotecnológico (Gil Ponce José-Vicente, 2001).

En este capítulo se tratará el tema de los alimentos modificados genéticamente y su constante exposición a innumerables debates de índole social, económica y cultural.

Todo esto con el fin de visualizar cuál podría ser el futuro comercial de los avances biotecnológicos aplicados al vino considerando a este como uno más de los alimentos “transgénicos” en el mundo.

3.1. ORGANISMOS Y ALIMENTOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

Un alimento o bebida transgénica es aquel o aquella en cuya producción se utilizan ingredientes o materias primas derivadas de técnicas de ingeniería genética. Es decir, el término transgénico es utilizado para denominar al organismo portador de material genético perteneciente a especies no emparentadas, transferido a él mediante el uso de la ingeniería genética.

Los alimentos transgénicos o alimentos manipulados genéticamente son productos a los que se les ha alterado su información genética original mediante métodos biotecnológicos (OMS, 2005).

3.1.1. ¿POR QUÉ SE PRODUCEN ALIMENTOS GM?

Los alimentos genéticamente modificados (alimentos GM), se desarrollan y comercializan al percibirse cierta ventaja tanto para los productores como para los consumidores de estos alimentos. Esto tiene como objetivo traducirse en un producto con un menor precio y mayores beneficios en términos de calidad. Hoy en día, la tecnología cuenta con el potencial de obtener organismos con características industrialmente funcionales en tiempos muy cortos en lugar de pasar 10 o 12 años desarrollándolos a través de métodos de hibridación tradicional, mezclando millares de genes para mejorar un cultivo determinado, la biotecnología actual permite la transferencia de solamente uno o pocos genes deseables, obteniendo cultivos con características previamente definidas (Lucas Carrillo Emilio, 2005).

Lo anterior concuerda con el objetivo de aplicar el desarrollo biotecnológico a la resolución de problemas globales relacionados con la economía, la eficiencia de producción, reducir el impacto ambiental y resolver problemas de nutrición en países con una infraestructura tecnológica menor.

3.2. EL DEBATE PÚBLICO SOBRE ALIMENTOS GM EN EL MUNDO

La liberación de Organismos genéticamente modificados (OGM's) al medio ambiente y la comercialización de alimentos GM han ocasionado un debate público en muchas partes del mundo. Es posible que este debate continúe, probablemente en el contexto más amplio de otros usos de la biotecnología (por ejemplo, en medicina humana) y sus consecuencias para las sociedades humanas (Lacadena, J.R. 2003).

En el caso de alimentos, los consumidores comenzaron a preguntarse sobre inocuidad porque perciben que la biotecnología moderna está originando la creación de nuevas especies. Los consumidores se preguntan con frecuencia: "¿Cuál es la ventaja para mí?". A pesar de que los temas que se están debatiendo son por lo general muy similares (costos y beneficios, temas de inocuidad), el resultado del debate difiere de país en país.

Desde la primera introducción en el mercado a mediados de los '90 de un alimento GM importante (soya resistente a herbicidas), hubo cada vez más preocupación sobre dichos alimentos entre políticos, activistas y consumidores, especialmente en Europa.

A pesar de que se han aceptado diferentes normas para la utilización y comercialización de este tipo de productos, entre los que ahora se encuentra ya el vino, existen grupos como Greenpeace, Amigos de la Tierra, Ecoropa, Transgénicos: Peligro, ATTAC (coordinación antiglobalización) y Médecins du Monde que liderean manifestaciones mostrando su rechazo total a estos alimentos, para ello, celebran en Abril el Día Mundial sin Transgénicos (Gómez Cerda José, 1998).

Estos grupos temen que con estas bebidas y alimentos se desarrollen problemas mayores o similares a los de: la vaca loca, pollo y pescado con dioxina y la fiebre aftosa. Por su parte, los científicos a favor dicen que "se piensa, sin razón, que los organismos modificados genéticamente son algo nuevo argumentando que los humanos han modificado para su beneficio y en forma consciente la genética de plantas y animales por centurias por medio de la selección y domesticación de algunas especies animales y vegetales que le convenían (Nelson, G.C. y cols).

Dependiendo de la región del mundo, las personas con frecuencia tienen actitudes diferentes hacia los alimentos. Además del valor nutricional, los alimentos frecuentemente tienen connotaciones sociales e históricas, y en algunos casos pueden tener importancia religiosa. En el caso específico del vino, el mercado potencial de la enología moderna se ha visto fuertemente cuestionado por el contexto clásico que envuelve a su elaboración. En Enología, el cuestionamiento más común es: ¿el empleo de microorganismos transgénicos constituye una práctica enológica verdaderamente necesaria? (C. Delfin, 2001).

El vino como ya se revisó, es un producto con un trasfondo clásico especial en lo relacionado a su elaboración, y no es considerado como parte de los elementos básicos de alimentación global en el mundo. Es por esto que, surgen interrogantes tales como si existe una necesidad real, o por lo menos, si es prematura la utilización de OGMs para resolver algunas problemáticas vitícolas y enológicas (Nelson, G.C. y cols).

Algunos sectores cuestionan si no sería mejor dirigir la atención y recursos hacia la profundización de la fisiología y de la genética de la vid y de la levadura para tener un mayor control de los factores fisiológicos de variabilidad del viñedo con relación a los factores ligados a las fluctuaciones de cosechas y medio ambiente. A fin de cuentas, dicen; las grandes cosechas de producción que de un tiempo a otro se producen en cada denominación de origen, demuestran que existe ya un potencial cualitativo óptimo en el patrimonio genético de los organismos implicados.

Proponen el poder aumentar la frecuencia de tales cosechas, reduciendo la sensibilidad del viñedo a los factores climáticos y al de las levaduras a los factores tecnológicos, haciendo más constante la respuesta fenotípica de la vid y de las levaduras en las condiciones ambientales desfavorables. Otro cuestionamiento es: ¿Por qué no se puede trabajar en la adquisición de los conocimientos necesarios en la obtención de la reproducción de la excelente calidad de vinos acreedores de premios internacionales de calidad?. Por otro lado, en el caso específico de las levaduras maloláctica y maloalcohólica transgénicas, surge la pregunta de si en vez de trabajar en seguida en un proyecto de transformación genética de *S. cerevisiae*, no sería oportuno dar la prioridad a estudios genéticos y fisiológicos de la bacteria maloláctica a fin de hacerla tecnológicamente eficaz, sin transformar las fronteras que la naturaleza ha puesto entre bacteria y levadura y poder emplearla o eliminarla con éxito en el momento y forma en que sea deseado (C. Delfín, 2001).

Hoy en día, continúan produciéndose batallas en la llamada guerra de los cultivos transgénicos. Los movimientos sociales contrarios a los productos transgénicos promovidos por grupos ecologistas y organizaciones no gubernamentales (ONGs) han encontrado eco en algunos partidos políticos que han presionado a los gobiernos para que en sus respectivos países prohíban su utilización (Lacadena, J.R. 2004).

Las discusiones ha nivel mundial han abarcado un amplia gama de temas, los tres principales son las tendencias a provocar una reacción alérgica (alergenicidad), la transferencia de genes y el cruzamiento lejano (*outcrossing*).

Alergenicidad. A partir del surgimiento de la tecnología de modificación genética se han planteado algunas preocupaciones potenciales. Esas dudas se han enfocado en la probabilidad de que se presenten reacciones alérgicas a los productos alimenticios como resultado de la tecnología de modificación genética en el proceso de transformación (Nieto Sotelo Jorge, 2000).

Por una cuestión de principios, se desalienta la transferencia de genes de alimentos comúnmente alérgicos a menos que pueda demostrarse que el producto proteínico del gen transferido no es alérgico. Si bien, los alimentos desarrollados en forma tradicional no suelen ser evaluados en cuanto a alergenicidad, los protocolos para pruebas de alimentos GM han sido evaluados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS).

No se han hallado efectos alérgicos en relación con los alimentos GM que se encuentran actualmente en el mercado (OMS, 2005).

Transferencia genética. La transferencia genética de alimentos GM a células del organismo o a bacterias del tracto gastrointestinal causarían preocupación si el material genético transferido afectara en forma adversa a la salud humana. Esto sería particularmente relevante si fueran a transferirse genes de resistencia a antibióticos usados para crear OGM's.

A partir del surgimiento de la tecnología de modificación genética, los investigadores han utilizado los genes de resistencia a los antibióticos como marcadores selectivos del proceso de modificación genética. Se ha externado la preocupación de que el uso generalizado de tales genes en los microorganismos pudiera aumentar la resistencia de los patógenos humanos a los antibióticos. La kanamicina, uno de los marcadores de resistencia más comúnmente usados para la transformación de microorganismos, sigue utilizándose para el tratamiento de las siguientes infecciones humanas: infecciones de huesos, aparato respiratorio, piel, tejidos blandos y abdomen, así como infecciones complicadas de las vías urinarias, endocarditis, septicemia e infecciones por enterococos. Actualmente, los científicos cuentan con medios para eliminar esos genes marcadores antes de que la levadura vínica sea desarrollada para uso comercial (Nieto Sotelo Jorge, 2000).

No existen pruebas definitivas de que esos genes de resistencia a los antibióticos sean nocivos para los seres humanos, pero debido a la preocupación pública, todas las personas que intervengan en la creación de levaduras transgénicas y otros OGM's, deben actuar con discreción a fin de eliminar el uso de tales marcadores (Zubko y cols, 2000).

Transferencia horizontal (Outcrossing). El desplazamiento de genes de OGM's a especies silvestres relacionadas (llamado "outcrossing"), puede tener un efecto indirecto sobre la inocuidad y la seguridad de los alimentos. Este riesgo es real, como se demostró cuando aparecieron rastros de un tipo de maíz que sólo fue aprobado para alimentación animal (maíz Starlink™) en productos del maíz para consumo humano en los Estados Unidos de América en el año 2000. Se está discutiendo la factibilidad y los métodos para monitorear los productos alimentarios GM después de la comercialización, para la vigilancia continua de la inocuidad de los productos alimentarios GM.

Los temas de preocupación incluyen: la capacidad de los OGM para dispersarse e introducir potencialmente los genes de ingeniería genética dentro de poblaciones silvestres; la persistencia del gen una vez que el OGM ha sido implantado y la estabilidad del mismo. Los aspectos de inocuidad del medio ambiente de los cultivos genéticamente modificados varían considerablemente de acuerdo con las condiciones locales. Las investigaciones actuales se concentran en: el efecto perjudicial sobre las poblaciones beneficiosas o una inducción más rápida de poblaciones resistentes; la generación potencial de nuevos patógenos microbianos; las consecuencias perjudiciales potenciales para la biodiversidad microbiana y la vida silvestre, y un desplazamiento de genes de resistencia a los antibióticos hacia otros microorganismos.

Las evaluaciones de riesgos del medio ambiente abarcan tanto los OGM involucrados como el potencial medio ambiente receptor. El proceso incluye una evaluación de las características del OGM, sus efectos y estabilidad en el medio ambiente, combinado con las características ecológicas del medio ambiente en el cual tendrá lugar la introducción. La evaluación también incluye los efectos no deseados que podrían surgir por la inserción del nuevo gen. Las evaluaciones de riesgo requieren información básica previa, incluyendo la biología y ecología de la especie, la identificación de especies emparentadas con ella y los nuevos caracteres resultantes de la tecnología de modificación genética, así como datos ecológicos relevantes acerca del (o los) sitio(s) donde se pretenda liberar la especie transgénica. La recopilación de esos datos es sumamente difícil en los ambientes con gran diversidad. En particular, es necesario poner atención en los centros de origen o diversidad de las cepas cultivadas, pues allí habrá muchos parientes silvestres a los que pueden transmitirse los nuevos caracteres (Ellstrand y cols, 1999).

3.3. EVALUACIÓN DE ALIMENTOS GM

Los diferentes organismos GM incluyen genes diferentes insertados en formas diferentes. Esto significa que cada alimento GM y su inocuidad deben ser evaluados individualmente, y que no es posible hacer afirmaciones generales sobre la inocuidad de todos los alimentos GM.

No se han demostrado efectos sobre la salud humana como resultado del consumo de dichos alimentos por la población general en los países donde fueron aprobados.

La Comisión del Codex Alimentarius ha adoptado principios sobre evaluación de riesgos antes de la comercialización de alimentos GM en donde se han alcanzado progresos significativos en la armonización de opiniones concernientes a la evaluación de riesgos. Esto ha ofrecido soluciones factibles para la distribución en algunos países, otros han restringido el uso de alimentos GM y obtenido productos que no contienen OGM's.

El uso continuo de evaluaciones de riesgo en base a los principios del Codex y, donde corresponda, incluyendo el monitoreo post comercialización, debe formar la base para evaluar la inocuidad de los alimentos GM.

La mayoría de las autoridades internacionales consideran que son necesarias evaluaciones específicas para alimentos GM. Se han establecido sistemas específicos para una evaluación rigurosa de OGM's y alimentos GM relativos tanto a la salud humana como al medio ambiente.

Por lo general, no se realizan evaluaciones similares para los alimentos tradicionales. Por lo tanto, hay una diferencia significativa en el proceso de evaluación antes de la comercialización para estos dos grupos de alimentos. El Programa de Inocuidad Alimentaria de la OMS tiene como objetivo colaborar con las autoridades internacionales en la identificación de los alimentos que deben someterse a evaluaciones de riesgos, incluyendo alimentos GM, y recomendar las evaluaciones correctas. Cuando se desarrollan nuevos alimentos o componentes de alimentos usando biotecnología, hay requisitos legales y expectativas del consumidor para que existan sistemas y procedimientos eficaces de evaluación de la seguridad de los alimentos para el consumo. Las técnicas tradicionales de evaluación de la seguridad de los alimentos, basadas en pruebas toxicológicas (según lo utilizado para los aditivos alimentarios, por ejemplo), pueden no aplicarse siempre a los alimentos o componentes de alimentos obtenidos por biotecnología. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización mundial de la salud (OMS), las consideraciones de seguridad de alimentos con respecto a los organismos producidos por las técnicas que cambian los rasgos hereditarios, como la tecnología de DNA recombinante, son básicamente las mismas que se relacionan con otras maneras de alterar el genoma de un organismo, tal como la hibridación convencional (Lucas Carrillo Emilio, 2005).

Éstas incluyen:

- Las consecuencias directas (nutricionales, tóxicas o alergénicas) de la presencia en los alimentos de nuevos productos genéticos codificados por los genes introducidos durante la modificación genética.
- Las consecuencias indirectas de los efectos de cualquier nuevo producto genético, o de niveles alterados del producto genético existente, en el metabolismo del organismo fuente del alimento, que conduzca a la presencia de nuevos componentes o de niveles alterados de componentes existentes.
- Las consecuencias de las mutaciones causadas por el proceso de modificación genética del organismo fuente del alimento, como interrupción de secuencias de codificación o control, o la activación de genes latentes, conduciendo a la presencia de nuevos componentes o de niveles alterados de componentes existentes.
- Las consecuencias de la transferencia genética a la microflora gastrointestinal desde organismos genéticamente modificados o alimentos o componentes alimenticios derivados de ellos.
- El potencial de efectos adversos para la salud asociados a los microorganismos genéticamente modificados de los alimentos.

La OMS toma un papel activo en relación con los alimentos GM, principalmente por dos razones:

(1) Debido a que la salud pública podría beneficiarse enormemente por el potencial de la biotecnología, por ejemplo por un aumento en el contenido de nutrientes de los alimentos, menor alergenicidad y producción alimentaria más eficiente.

(2) Con base en las necesidades de examinar los efectos negativos potenciales para la salud humana del consumo de alimentos producidos mediante modificación genética, también a nivel mundial. Es claro que se deben evaluar minuciosamente las tecnologías modernas si van a constituir una mejoría real en la forma de producción de los alimentos. Esta evaluación de organismos GM y productos GM debe considerar no sólo la inocuidad sino también la seguridad alimentaria, los aspectos sociales y éticos, el acceso y la creación de capacidades. El trabajo internacional en esta nueva dirección presupone el compromiso de otras organizaciones internacionales claves en esta área.

Se espera que este trabajo pueda sentar las bases para una iniciativa futura hacia una evaluación más sistemática, coordinada, multi-organizativa e internacional de ciertos alimentos GM (OMS, 2005).

3.4. EL MERCADO DE LOS “TRANSGÉNICOS”

Las preocupaciones de la población sobre los alimentos GM y los OGM's en general han tenido siempre un impacto significativo en su comercialización a lo largo del mundo. De hecho, esta situación dio como resultado en 1998, que se colocara en el mercado de la comunidad Europea una moratoria sobre aprobación de productos GM.

Esta moratoria terminó en el 2001 con la aprobación de la Directiva 2001/18/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre liberación intencional en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente. Posteriormente, se generó la normativa europea mediante la Ley 9/2003, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de OGM's (Lacadena, J.R, 2003).

El caso anterior da la impresión de que la gama de productos derivados de la ingeniería genética inevitablemente deben enfrentar un camino cada vez mas lleno de obstáculos de tipo legal hacia su comercialización.

Sin embargo, los datos presentados a continuación, aparecidos en Enero de 2004 sobre la agricultura transgénica en el informe del International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), muestran un panorama digno de revisar en este trabajo (Lacadena, J.R, 2004).

- Unos 7 millones de agricultores de 18 países del mundo cultivaron un total de 67,7 millones de hectáreas frente a los 58,7 millones de hectáreas de los 6 millones de agricultores de 16 países del año 2002. Lo cual supone un incremento absoluto de 9 millones de hectáreas que equivale a un aumento de superficie cultivada del 15% frente al 12% de incremento en 2002.
- Durante los ocho años transcurridos entre 1996 y 2003, la superficie total mundial de cultivos transgénicos se multiplicó por 40, pasando de 1,7 millones de hectáreas en 1996 a 67,7 millones de hectáreas en 2003.
- En el año 2003, casi una tercera parte (30%) de la superficie total de cultivos transgénicos correspondió a países en vías de desarrollo.

De los 9 millones de hectáreas de incremento de la superficie cultivada en 2003, 4,4 millones de ellas corresponden a países en vías de desarrollo y 4,6 a países industrializados, lo cual significa que los porcentajes de crecimiento de los cultivos transgénicos en ambos tipos de países fue de un 28% y 11%, respectivamente. En el año 2004, el área estimada de cultivos transgénicos o GM desarrollados comercialmente en todo el mundo era de 81 millones de hectáreas, cultivados por 7 millones de agricultores en 18 países desarrollados y en desarrollo. Siete países principales cultivaron el 99% del área de cultivos transgénicos de todo el mundo en el 2004 (Tabla 3.1.).

Tabla 3.1. Área de cultivos transgénicos del mundo.

País	2001		2002		2003		2004	
	Estados Unidos de América	35,7	68%	39	66%	42,8	63%	47,6
Argentina	11,8	23%	13,5	23%	13,9	21%	16,2	20%
Canadá	3,2	7%	3,5	6%	4,4	6%	5,4	6%
Brasil	-	-	-	-	3,0	4%	5,0	6%
China	1,5	1%	2,1	4%	2,8	4%	3,7	5%
Paraguay							1,2	2%
Sudáfrica	0,2	0,5%	0,3	1%	0,4	1%	0,5	1%
Total (mundo)	52,6	100%	58,7	100%	68,1	99%	79,6	99%

Millones de hectáreas y porcentaje del área mundial, por país (James C, 2005).

Resto de los países:

Australia:	100,000 hectáreas. Algodón.
India	100,000 hectáreas. Algodón
Rumanía	70,000 hectáreas. Soya.
Uruguay	60,000 hectáreas. Soya y maíz.
México	35,000 hectáreas. 25,000 hectáreas de algodón y 10,000 hectáreas de soya.
España	32,000 hectáreas de maíz.
Filipinas	20,000 hectáreas. Maíz.
Colombia	5,000 hectáreas de algodón.
Honduras	2,000 hectáreas de maíz.
Alemania	< 2,000 hectáreas de maíz.
Indonesia	< 2,000 hectáreas de algodón.

(James C, 2005)

Los OGM's no son solamente un avance de la tecnología moderna, también implican uno de los negocios más lucrativos de la actualidad, debido a esto, la participación de las grandes industrias se ha visto incrementada a lo largo de estos últimos años (Gómez Cerda José, 1998).

Este incremento tendría el potencial inminente de poner en juego el porvenir de la agricultura y la alimentación mundial, por el control que tienen las Empresas Multinacionales (Tabla 3.2.). Ciertos grupos están preocupados sobre lo que ellos consideran un nivel no deseado de control por parte de estas compañías.

Estos grupos temen que como resultado del interés de la industria química en el mercado agroalimentario principalmente, y en general donde haya implicaciones biotecnológicas, la gama de variedades utilizada por los productores pueda reducirse principalmente a cultivos GM. Esto impactaría en la canasta de alimentos de una sociedad así como en la protección de cultivos a largo plazo (por ejemplo, con el desarrollo de resistencia contra plagas de insectos y tolerancia a ciertos herbicidas).

El uso exclusivo de cultivos GM resistentes a herbicidas también haría al agricultor dependiente de estas sustancias químicas. De esta misma forma ocurriría con la comercialización de cepas de microorganismos vínicos propiedad de las grandes corporaciones. Tal como sucede en otras áreas biotecnológicas, es muy probable que los derechos de propiedad intelectual tengan un papel importante en lo que se refiere a garantizar la recuperación económica de las inversiones intelectuales y financieras que posibilitan la investigación y el desarrollo de nuevos productos.

Un aspecto importante de tales derechos de propiedad intelectual, cuando se trata de inventos y descubrimientos producto de la investigación genómica y otras aplicaciones de la biotecnología, es que no deberían otorgarse derechos de propiedad intelectual excesivamente amplios. La concesión de tales derechos entorpecería la investigación y el desarrollo posterior de productos. Conviene ajustar estrechamente los derechos de propiedad intelectual, de modo que éstos sean proporcionales al alcance real de los nuevos inventos y descubrimientos y no entorpezcan la continuidad de la investigación, la innovación y el desarrollo. Para regular esto, existen convenios como el Trade Related Intellectual Property (TRIP, o Propiedad intelectual en materia comercial), la legislación de patentes, la protección de variedades de plantas y la Convención sobre Diversidad Biológica que en conjunto con la OMS, han revisado el conflicto entre los derechos de propiedad intelectual (IPR, sigas en inglés) y el acceso igualitario a los recursos genéticos y la coparticipación de beneficios (OMS, 2005).

Tabla 3.2. Las 20 grandes empresas agroalimentarias del mundo.

GRUPO	PAIS	SECTORES	COMERCIO (USD)
Philip Morris	Estados Unidos	Prod.múltiples	53.288 M.USD
Cargill	Estados Unidos	Cereales	50.000
Nestlé.	Suiza	P. Múltiples.	40.247
Pepsicola	Estados Unidos	Bebidas	28.472
Unilever	Holanda	P. Múltiples	26.150
Coca Cola	Estados Unidos.	Bebidas	23.828
Conagra	Estados Unidos	P. Múltiples	23.512
RJB Nabisco	Estados Unidos	P. Múltiples	15.366
Danone (BSN)	Francia.	P. Múltiples.	12.843
Anheuser Bush	Estados Unidos	Cervezas	11.364
Grand Metropolitan	Reino Unido	P.múltiples	11.300
Snow Brand Milk P	Japón	Ind. Lechera	10.600
Archer Daniels M	Estados Unidos	Grasas Vegetales	10.344
Bunge y Born	Argentina	Cereales	9.500
Maruha(Tayco Fis.)	Japón	Pesca	9.221
Eridania/Beghin-Say	Italia	Grasas vegetales	9.221
Kirin Brewery	Japón	Cervezas	9.020
George Westron Ltd.	Canadá	Prod.Alimentarios	8.939
General Mills	Estados Unidos	P. Múltiples	8.517
Allied Domecq	Reino Unido	Vinos y alcoholes	8.375

(Gómez Cerda José, 1998).

Según datos arrojados en el año de 1997, entre las grandes empresas multinacionales o globales que fabrican OGM's podemos citar las cinco (5) principales, que son:

NOVARTIS, MONSANTO, ZENECA, AGROEVO, y DUPONT.

1. NOVARTIS.

Empresa suiza.

Produce para las industrias fitosanitarias y farmacéuticas.

En 1997 tuvo ventas de 4.500 Millones de DOLARES.

2.- MONSANTO.

Estados Unidos.

En 1997 vendió productos agroquímicos por un valor de 3.000 millones de dólares.

3.- ZENECA.

Reino Unido.

Grupo agroquímico y farmacéutico.

A lanzado el fungicida AMISTAR.

En 1997 tuvo ventas de 4.500 millones de DOLARES. En agroquímica.

4.- AGROEVO.

Alemania.

Vende herbicida para colza y maíz.

Tiene el control de PLANT GENETIC SYSTEMS, una pequeña empresa belga, de la región flamenca, que desde 1997 tiene autorización para comercial colza con O.G.M.en toda Europa.

En 1997 vendió 2.100 millones de dólares en agroquímica.

5.- DUPONT

Estados Unidos.

Es la principal empresa mundial en química. Proveedor del 75% del mercado mundial de proteínas de soya.

El temor expresado por la sociedad mercantil afectada por la incursión de estas grandes compañías se hizo realidad cuando el producto clave de Monsanto, el glifosato, un herbicida que tiene el nombre comercial de ROUND UP READY se empezó a introducir al terreno agroalimentario. De las 12.14 millones de hectáreas de agricultura transgénica sembrada en el mundo en 1997, 7.68 millones pertenecían a MONSANTO, más del 60% de toda la producción mundial. Todos los que compraban semillas genéticamente modificadas debían firmar un contrato de que utilizarían herbicida MONSANTO (Gómez Cerda José, 1998).

Si lo anterior se reprodujera al mercado vitivinícola, existe la posibilidad de encontrarnos con prácticas monopólicas de iguales dimensiones.

3.4.1. Las evidencias científicas y la política de convencimiento

Según un estudio realizado por el Departamento de Salud Pública de la Universidad de *California* (Altieri, M. 2000), el glifosato, o sea el Round Up Ready, resultó ser la tercera causa de las enfermedades ligadas a los pesticidas que más afecta la salud entre los agricultores.

Este es un ejemplo de la polémica que se desarrolla cuando diversas instituciones emiten reportes en los cuáles se justifica con fundamentos, la existencia de riesgos en el uso de OGM's o sus derivados. Ante esto, las empresas multinacionales o globales que fabrican los Organismos Genéticamente Manipulados (OGM's) han desarrollado una política de relaciones públicas muy sofisticada. Burson Marsteller es la oficina de relaciones públicas más utilizada por esas empresas globales.

Esta firma es experta en definir estrategias de comunicación social, así se reporta que se ha hecho para contrarrestar los efectos negativos de las "Vacas locas" en Inglaterra; han defendido a la empresa EXXON Valdez, con la marea negra en Alaska.

La política de convencimiento va dirigida fundamentalmente a:

- Dirigentes políticos nacionales e internacionales.
- Organismos Técnicos Profesionales.
- Organizaciones Internacionales.
- Instancias Reguladoras .
- Parlamentarios y Legisladores.
- Medios de Comunicación social (prensa, radio y televisión).
- Asociaciones de productores y consumidores.
- Pequeños y grandes productores.

Se dice que en la política, las empresas norteamericanas productoras de OGM's aportan públicamente dinero a los dos grandes partidos políticos de EU., y a distinguidos parlamentarios, que pertenecen a las comisiones encargadas de las reglamentaciones y de la seguridad alimentaria.

Existen fuertes rumores de que la última investidura del Presidente Bill Clinton fue cofinanciada por la empresa biotecnológica GENETECH y de que la Administración de Alimentos y Drogas (Food and Drug Administration- FDA), que vigila la industria alimentaria norteamericana es controlada por diversos funcionarios de MONSANTO (Gómez Cerda José, 1998).

Si esto es de dicha forma, esta empresa tendría influencias para impedir, a nivel mundial, incluyendo a la organización Mundial de Comercio (OMC), que sus productos sean prohibidos de venderse en alguna parte del mundo, o que se les impongan etiquetas especiales o Códigos de Conducta.

3.5. LA LEGISLACIÓN MUNDIAL ANTE EL TEMA DE LOS OGM's

Como ya se comentó, diversas organizaciones sindicales, Organizaciones no gubernamentales (ONG), Asociaciones de Consumidores y protectores del medio ambiente, han demandado que los productos con OGM's sean controlados por las legislaciones nacionales correspondientes y la legislación internacional.

Entre esas demandas está la transparencia, en explicar cuales son los artículos y productos alimenticios que contienen OGM's, para que los consumidores tengan el derecho de escoger, sin dudas, si prefiere o no rechazar los productos con OGM's.

También que esos productos tengan etiquetas, donde se explique que contienen OGM's. y que den informaciones a los consumidores, como por ejemplo se hace ahora con el cigarrillo. En esencia, las legislaciones aplicadas deben proteger el patrimonio natural de la humanidad y el medio ambiente para que no sean manipulados en beneficio de algunas empresas multinacionales, sino que esas nuevas tecnologías sean utilizadas para el bienestar de la sociedad y del bien común, por encima de los criterios gerenciales y técnicos (Gómez Cerda José, 1998).

Esta búsqueda de tranquilidad sobre los riesgos ambientales y para la salud ha dado origen a la bioseguridad. En base a esto, se reconoció que el desarrollo de la normatividad en materia de bioseguridad en alimentos debe estar fundado en una metodología rigurosa que incluya los siguientes tres elementos para análisis de riesgo:

- La evaluación del riesgo
- La dirección del riesgo
- La comunicación del riesgo

De esta forma, se han introducido regulaciones de bioseguridad en los principales países industrializados y algunos en desarrollo. La regulación contempla entonces la evaluación del riesgo ambiental de la liberación de OGM's, así como del consumo de los productos derivados y, muy importante, los mecanismos de comunicación con la sociedad (Progolfo, 2005).

No hay en la actualidad sistemas reglamentarios internacionales específicos. Los países que cuentan con legislación, se concentran principalmente en evaluaciones de riesgos para la salud de los consumidores. Los países que tienen disposiciones para los alimentos GM, usualmente también reglamentan los OGM's en general, teniendo en cuenta los riesgos para la salud y el medio ambiente así como los temas relacionados con control y comercio (como los regímenes potenciales de prueba y etiquetado). Dada la dinámica del debate sobre alimentos GM, es probable que la legislación continúe evolucionando. Sin embargo, muchas organizaciones internacionales están involucradas en el desarrollo de protocolos para OGM's (Ibarra Samuel, S.C. Alfonso, 2004).

El Codex Alimentarius es un conjunto de reglas acordadas internacionalmente, que actúan como pauta orientativa para los países, con el fin de garantizar la seguridad y la calidad de los alimentos y promover prácticas equitativas en el comercio internacional, regional, nacional y local. La Comisión del Codex Alimentarius es un organismo intergubernamental que realiza las propuestas a través de comités, junto con los gobiernos de sus Estados Miembros, y las pautas acordadas actúan como estándares para garantizar la seguridad y calidad de los alimentos en los diversos países.

El Codex promueve la coordinación de los trabajos sobre normas alimentarias impulsados por organizaciones internacionales, y sus comités contribuyen a asegurar que la labor de la Comisión responda a los intereses regionales. Por ello, cada país miembro tiene su representación (FAO/OMS, 2000).

El Codex está desarrollando principios para el análisis de riesgos para la salud humana de los alimentos GM. La premisa de estos principios dicta una evaluación previa a la comercialización, realizada en forma individual y que incluya una evaluación tanto de los efectos directos (del gen insertado) como de los efectos no deseados (que pueden surgir como consecuencia de la inserción del nuevo gen).

Los principios del Codex no tienen un efecto de obligatoriedad sobre la legislación de algún país en particular, pero son mencionados específicamente en el Acuerdo Sanitario y Fitosanitario (Acuerdo SPS) de la Organización Mundial de Comercio, y pueden usarse como referencia en el caso de disputas comerciales (Codex Alimentarius, 2000).

El Protocolo de Cartagena sobre Bioinocuidad (CPB, siglas en inglés), un tratado ambiental legalmente obligatorio para sus partes, regula los movimientos transfronterizos de los organismos vivos modificados (LMO, siglas en inglés).

Los alimentos GM entran en el ámbito del protocolo sólo si contienen LMO capaces de transferir o replicar el material genético. La piedra angular del CPB es un requisito de que los exportadores soliciten el consentimiento de los importadores antes del primer envío de LMO con intenciones de ser liberados al medio ambiente (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2000).

En Europa, la legislación comunitaria ha existido desde principios de los '90.

El procedimiento de aprobación para la liberación de OGM's al medio ambiente es un tanto complejo y básicamente requiere del acuerdo entre los Estados Miembro y la Comisión Europea. Algunos Estados Miembros han invocado una cláusula de salvaguardia para prohibir temporalmente la colocación de alimentos GM en el mercado de su país.

Durante la década de los '90, el marco regulador se extendió y perfeccionó en respuesta a las preocupaciones de los ciudadanos, las organizaciones de consumidores y los operadores económicos. En octubre de 2002 entra en vigencia en la UE, una directiva revisada que refuerza las normas existentes respecto del proceso de evaluación de riesgos, gestión de riesgos, y toma de decisiones respecto de la liberación de OGM's al medio ambiente. La nueva directiva también prevé el monitoreo obligatorio de los efectos prolongados asociados con la interacción entre OGM's y el medio ambiente. En la UE, el etiquetado es obligatorio para los productos derivados de la biotecnología moderna o productos que contengan OGM's.

La legislación también considera el problema de la contaminación accidental de los alimentos convencionales con material GM. Introduce un umbral mínimo de un 0.9% para ADN o proteína proveniente de modificación genética, debajo del cual no se requiere etiquetado.

En el año 2001, la Comisión Europea adoptó dos nuevas propuestas legislativas sobre OGM's respecto de la rastreabilidad, reforzando las normas actuales sobre etiquetado y racionalizando el procedimiento de autorización para los OGM's en alimentos para humanos y animales y para su liberación deliberada al medio ambiente. La Comisión Europea opina que estas nuevas propuestas, basadas en la legislación existente, tienen como objetivo encarar las preocupaciones de los Estados Miembro y crear la confianza de los consumidores en la autorización de productos GM.

La Comisión espera que la adopción de estas propuestas prepare el camino para reanudar la autorización de nuevos productos GM en la UE (Lacadena, J.R, 2004).

La Organización Internacional de la Viña y el Vino (O.I.V) es una organización intergubernamental con sede en París, que organiza una reunión anual, que es la Asamblea General y reuniones de grupos de expertos, que se dedican a tratar temas específicos de la producción del vino. Por ejemplo dentro de estos grupos están los dedicados a la tecnología y prácticas enológicas, métodos de análisis, formación, viticultura, vino y salud, etc. Esta organización también organiza con frecuencia congresos de carácter científico. La O.I.V. ha respaldado una filosofía que tiene mucho que ver con la tradición europea de producción del vino, respetando especialmente su origen natural. En Estados Unidos hay una práctica distinta a la europea, para ellos lo que no está probado que sea dañino debe ser permitido.

Esto lleva a que practicas propuestas por Estados Unidos que no eran aceptadas por los demás países, porque no coincidían con el concepto de lo artesanal o natural, eran rechazadas, generando discrepancias que finalmente llevaron a que USA se apartara de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2005).

El etiquetado de los alimentos transgénicos se ha convertido en uno de los principales campos de batalla entre la industria biotecnológica y la sociedad. Los sistemas de etiquetado establecidos actualmente en varios países pueden considerarse una conquista de los consumidores que exigen que uno de sus derechos básicos, la libertad de decidir lo que consumen, no sea confiscado en beneficio de compañías agrobiotecnológicas. Estados Unidos es el principal productor de cultivos transgénicos y encabeza una posición desreguladora, según la cual los alimentos genéticamente modificados no son distintos a los convencionales y no hay necesidad de diferenciarlos. Utiliza el concepto de "equivalencia sustancial", introducido en 1993 por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). Desde este enfoque, no es obligatorio que un maíz transgénico o productos que lo contengan estén rotulados porque son equivalentes en cuanto a su composición de carbohidratos, grasas, proteínas, aceites, etcétera, a sus homólogos convencionales.

Si el alimento en su totalidad no es materialmente diferente de su contraparte tradicional no requiere de etiquetado obligatorio que lo designe como producto transgénico. Por eso en Estados Unidos y Canadá los alimentos transgénicos no están etiquetados, excepto los que presenten alguna diferencia nutricional o un riesgo medible para la salud. Esta es, por supuesto, la posición que apoya y promueve la industria biotecnológica, argumentando que no se trata de etiquetar los procesos por los que un alimento fue producido, tras la que esconde sus verdaderos motivos, el miedo a la caída de sus ventas por el rechazo de los compradores ante el riesgo que implica su consumo.

En el otro lado del debate se encuentra la posición de la Unión Europea (UE) que apoya el etiquetado obligatorio, independientemente de los riesgos a la salud. La UE ha establecido reglas cada vez más específicas y estrictas para los cultivos y alimentos transgénicos, en respuesta a los intereses de sus consumidores.

La última regulación de 2003 establece que los alimentos para consumo humano y animal derivados de OGM's deben satisfacer condiciones de etiquetado y poder ser rastreados a lo largo de la cadena de producción y distribución. Incluye alimentos transgénicos y que contengan transgénicos, empacados o a granel.

El etiquetado también se aplica a productos altamente refinados, como aceites y azúcares, y a los alimentos para animales. No se requiere rotular la carne, huevo y leche que provenga de animales alimentados con OGM's. República Checa, Polonia y Letonia intentan armonizar sus reglas de etiquetado con la UE. Rusia exige el etiquetado de los alimentos transgénicos desde 1999. En Australia y Nueva Zelanda desde 2001 es obligatorio el etiquetado de todos los alimentos e ingredientes de alimentos derivados de cultivos transgénicos. Japón importa maíz y soya transgénicos desde 1996. A partir de abril de 2001 estableció un sistema de etiquetado obligatorio que se basa en la detección de ADN genéticamente modificado o proteínas en los productos alimenticios (Progolfo, 2005).

Tras todo esto, se puede decir que la Comunidad Europea ha empezado a fijar los límites y los criterios en la conducción de las experiencias de transmisión de caracteres. Sin embargo; ¿Cuántos países apoyan sus legislaciones ante los sectores de investigación biológica y molecular más desarrollados? Esto con el fin de contar con bases que permitan el intercambio abierto en la comercialización internacional de alimentos GM. En el caso del vino, ¿Cuántos países en el mundo tienen viticulturas y tecnologías que dependen fuertemente de los equilibrios ecológicos de un territorio como es el caso de los países europeos, que les llevaría a considerar como un grave daño la difusión de un microorganismo enológico transgénico?

A causa de esta situación internacional heterogénea en el sector vitivinícola, en muchos casos insuficiente en el plano de la reglamentación, no parece exagerado que un país enológico importante quiera adoptar restricciones a la importación de vinos procedentes de países que permitan el empleo de microorganismos vinarios transgénicos cuyos riesgos no hayan sido previamente comprobados por una comisión interacional (C. Delfin, 2001).

3.5.1. LA REGULACIÓN DE LA BIOSEGURIDAD EN MÉXICO

En México, la reglamentación de productos biotecnológicos se basa primeramente en la Constitución, misma que establece las líneas generales que tienen que seguir las dependencias gubernamentales, la Ley General de Salud y diversas normas oficiales y otros ordenamientos reglamentarios (Solleiro José Luis, 2000).

A continuación se exponen las principales características de la normatividad aplicable:

- **Ley General de Salud.**

Reformada en 1997, capítulo XII bis, el cual regula específicamente, a los productos biotecnológicos, definidos por su artículo 282 bis. Se establece la obligación de informar a la SSA sobre los productos biotecnológicos o sus derivados, “que se destinen al uso o consumo humano”. Respecto a su etiquetado, se señala que deberá regularse conforme a lo que establezcan las normas oficiales mexicanas (Ley General de Salud, 2005).

- **Ley Federal de Sanidad Vegetal.**

Incluye, dentro de su concepto de “insumo fitosanitario”, al material transgénico, y a este último también lo define, como “genotipos modificados artificialmente que, debido a sus características de multiplicación y permanencia en el ambiente, tienen capacidad para transferir a otro organismo genes recombinantes con potencial de presentar efectos previsibles o inesperados”. Igualmente, se señala en su artículo 43 que la aplicación, uso o manejo de material transgénico, está sujeto al certificado fitosanitario correspondiente, pero sólo en el área de programas experimentales y combate a plagas.

- **Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente.**

Este ordenamiento contiene múltiples referencias al material y a los recursos genéticos. En la misma Ley, se define al material genético y al recurso genético (“el material genético de valor real o potencial”), en su artículo 5º, fracciones XXI y XXVIII.

En su artículo 82 se precisa que las disposiciones de tal Ley son aplicables a la posesión, administración, preservación, repoblación, propagación, importación, exportación y desarrollo de la flora y fauna silvestre y material genético. Así, aunque no se habla de OGM's o transgénicos, en lo particular, se entiende que éstos son especies del género “recurso genético”. Consecuentemente, esta Ley da el marco general que permite y legitima jurídicamente la regulación ambiental, a través de sus respectivos reglamentos, de OGM's (Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, 2005).

- **Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios.**

Entre sus artículos 164 y 167, se señala que son objeto de tal reglamento, “los alimentos, ingredientes, aditivos o materias primas para uso o consumo humano, en forma directa o indirecta, que deriven o en su proceso intervengan organismos o parte de ellos y que han sufrido cualquier manipulación genética”.

Los responsables de estos productos, deberán presentar la información técnica de ellos a la Secretaría de Salud, a fin de demostrar la “inocuidad y estabilidad” de los mismos, y su comercialización estará sujeta a la evaluación que se haga, por parte de las autoridades sanitarias respectivas. Las etiquetas de estos productos deberán contener información sobre características y riesgo que representen estos a la salud, “conforme a lo que disponga y especifique la Secretaría para el caso”. Se señala que en las “normas” se establecerán los lineamientos o especificaciones sobre actividades, establecimientos, productos y servicios biotecnológicos (CIBIOGEM, 2002).

- **Protocolo de Bioseguridad.**

Este instrumento internacional, derivado del Convenio sobre la Diversidad Biológica, ha sido aprobado por más de 130 países. Su objeto es “contribuir a garantizar un nivel adecuado de protección en la esfera de la transferencia, manipulación y utilización seguras de los organismos vivos modificados (OVM’s) resultantes de la biotecnología moderna que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana, y centrándose concretamente en los movimientos transfronterizos”; aporta los lineamientos mínimos para el movimiento transfronterizo de OGM’s (acuerdo fundamentado previo) y su uso confinado, principalmente (Ibarra Samuel, S.C. Alfonso, 2004).

Ley de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados.

En Abril de 2003, el pleno del Senado de la República aprobó la iniciativa de Ley de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados con el apoyo de la Academia Mexicana de Ciencias (AMC) argumentando la necesidad de contar con los elementos operativos adecuados para garantizar la seguridad jurídica de quienes realizan actividades de investigación, producción y comercialización y darle eficacia a la evaluación y al monitoreo de los posibles riesgos de los organismos genéticamente modificados. Además, expresó en ese momento que el uso de la biotecnología con OGM’s controlados es una herramienta de la cual el país no debía prescindir por razones de soberanía a mediano y largo plazo (Solleiro José Luis, 2000).

En Marzo de este año 2005 fue finalmente aprobada la Ley de Bioseguridad en la Cámara de Senadores. Esto abre el mercado mexicano a la comercialización de alimentos genéticamente modificados.

Sin embargo, han surgido algunas opiniones que han despertado la polémica sobre si es suficiente la información que las compañías están obligadas a ofrecer al comprador. Según dichos críticos (Progolfo, 2005), en el país la industria biotecnológica ha introducido efectivamente la idea de que el etiquetado de los alimentos transgénicos no es necesario. La Ley de Bioseguridad y Organismos Genéticamente Modificados señala, respecto al etiquetado, que:

"Los OGM's, o productos que los contengan deben garantizar la referencia explícita de OGM's y señalar en la etiqueta la información de su composición alimenticia o sus propiedades nutrimentales, en aquellos casos en que estas características sean significativamente diferentes respecto de los productos convencionales" (Art. 101).

La opinión es que el texto subrayado es susceptible de ser aprovechado por las corporaciones para evitar el etiquetado bajo el principio de "equivalencia sustancial" y dejar indefensos a los consumidores.

Apoyados en el hecho de que somos uno de los tres mayores importadores de productos agropecuarios y de alimentos de Estados Unidos se presentan los siguientes datos:

Soya. Las variedades de soya transgénica tolerante a herbicidas representaron 85 por ciento del cultivo de soya en Estados Unidos en 2004 y México importa 95 por ciento del consumo nacional de este producto. Los ingredientes a base de soya incluyen aceite, harina, lecitina y extractos de proteínas; se encuentran como agregados en una gran cantidad de alimentos procesados como: chocolates, margarinas, mayonesas, galletas, pan, aderezos. La mayoría de los aceites contienen aceite de soya.

Maíz. En 2004 cerca de 45 por ciento de la superficie plantada con maíz en Estados Unidos era transgénica. Debido a que este tipo de maíz no se separa del convencional, las importaciones lo contienen mezclado. México importa más de una cuarta parte del consumo nacional de maíz, que se dirige a la producción de harina de maíz para tortillas, almidones, cereales, frituras, aceites, alimento para ganado, edulcorantes, mieles, etcétera. Al ser sembrado contaminó las variedades nativas de maíz mexicano. Muchos ingredientes de alimentos tienen como base el maíz, así que el transgénico está presente en la mayoría de alimentos procesados e incluso en las tortillas elaboradas a base de harina de maíz.

Algodón. Las variedades transgénicas en 2004 alcanzaron 76 por ciento del total del cultivo en Estados Unidos y el gobierno de México promueve la siembra de algodón transgénico con subsidios. Las semillas de aceite de algodón pueden estar presentes en los aceites de cocina, aderezos para ensalada, mantequilla de cacahuete, frituras, galletas, y son ampliamente utilizadas como alimento para ganado, pues aumenta la producción de leche.

Canola. México importa la mayoría de su aceite de canola de Canadá, donde más de 60 por ciento de las plantas son transgénicas. El aceite de canola se utiliza en los aceites vegetales, aderezos para ensalada, margarinas, queso procesado, frituras, galletas, pastas y chocolates.

Hay que reconocer que el ejercicio de observar en el supermercado las etiquetas de la gran variedad de los productos que se mencionaron anteriormente, arrojan efectivamente muy pocas respuestas ante esta denuncia. Este tema no es objetivo de este trabajo, sin embargo; bien pudiera servir para ir más allá en el debate sobre OGM's y así empezar a contribuir con la educación de la gente hacia el consumo de este tipo de productos. Las regulaciones de los alimentos transgénicos en la mayoría de los países que las aplican han sido resultado de las presiones provenientes de consumidores informados.

El avance científico, la liberalización del comercio y las ganancias de las grandes corporaciones deben ir de la mano con el beneficio ofrecido al consumidor.

Con todo lo descrito durante este capítulo se puede decir que es necesario evitar crear un ambiente de desconfianza que como se puede observar, automáticamente obstaculiza la difusión de los beneficios potenciales de la aplicación de la biotecnología al mejoramiento de las características de cualquier alimento que haya sido producido mediante herramientas biotecnológicas.

Ante esto, parece ser que el vino, en su creciente ámbito biotecnológico, deberá seguir luchando, como todo producto derivado de modificación genética, por encontrar justificaciones cada vez más contundentes e imponer sus beneficios ante los cuestionamientos científicos, tecnológicos y sociales.

CONCLUSIONES

Tras la presente revisión bibliográfica de investigación, se han logrado conjuntar de manera sintética los principales aportes que ha tenido el estudio sobre el proceso de vinificación y su constante evolución de la mano con el desarrollo biotecnológico industrial en el mundo.

Así mismo, pude darme cuenta de la existencia de un gran número de trabajos en donde se presentan aspectos tecnológicos aplicados a la obtención de vinos de calidad, sin embargo; existen pocas fuentes que conjunten en una sola edición todos los temas a los que hace referencia el presente trabajo. Por esto considero que el lector encontrará una buena base informativa de la cuál partir hacia un estudio más profundo acerca de alguno de los temas tratados en particular.

Durante mi experiencia en la industria nacional de bebidas alcohólicas y en específico a lo relacionado con la aplicación de los citados avances biotecnológicos, pude darme cuenta que este desarrollo apenas va a la mitad del camino, en donde se siguen llevando a cabo prácticas tradicionales y son contados los proyectos de investigación en donde se vislumbra seriamente la aplicación de las herramientas de recombinación genética.

Tal y como se expuso, el consumidor no esta preparado para aceptar fácilmente el consumo de un producto derivado de un proceso que implique organismos genéticamente modificados a pesar de los innegables beneficios que aportarían. Esto se debe a la falta de confianza del consumidor generada principalmente por la insuficiente información difundida acerca de la comercialización y consumo de alimentos GM.

Parece ser que todo alimento derivado de un proceso biotecnológico en donde se modifican o insertan caracteres a los organismos que toman parte en dicho proceso, debe seguir un camino largo antes de pasar la barrera que representa el debate social, cultural y tecnológico que se presentó en esta tesis.

Es indispensable que la generación de metodologías efectivas y seguras en lo que respecta a biología molecular esté respaldado por un desarrollo informativo y regulatorio de iguales proporciones. Ante esto, es preciso que los principales productores de alimentos GM en el mundo, provoquen que el cliente acepte que el producto ofrecido ha sido manipulado genéticamente, pero principalmente, demuestren al consumidor que dicho producto tiene un beneficio enfocado al cliente y no solo al productor. La carrera competitiva del mercado mundial presenta como reto lo anterior para los principales productores de alimentos GM en general.

La responsabilidad de asegurar que la aplicación de herramientas biotecnológicas se realice en condiciones en que los posibles riesgos para la salud humana o el medio ambiente sean mínimos exige la adopción de una serie de medidas de garantía y control de actividades, en las que se produzca o empleen OGM's. Por tanto, se manifiesta el creciente interés de ir profundizando más en las metodologías y legislaciones que evalúen el riesgo de los OGM's en Enología, en el medio ambiente vitivinícola, en los mostos y en los vinos, y que de todo ello se informe detalladamente al consumidor, particularmente en lo que refiere a la salud pública.

Será interesante dar seguimiento en posteriores trabajos de investigación a la evolución que siga teniendo el desarrollo enológico mundial y observar si en un futuro las cavas del mundo ofrecen al consumidor un vino "transgénico" al igual que como lo han hecho históricamente con un vino tradicional.

BIBLIOGRAFIA

- Altieri M.A.- “The Ecological impacts of transgenic crops on agroecosystem health”.-Ecosystem Health 6: 13-23. 2000.
- Barre. P, Vezinet. F, Dequin. S, Blondin. B.- “Genetic improvement of wine yeast”.- In Fleet, G.H. ed. Harwood Academic Pub. Singapore.1993.
- Blasco Iñaki.- “Los ácidos del vino”.- <http://www.verema.com/opinamos/tribuna/articulos/acidosp.asp> Abril 2001.
- Boone, C., Sdicu, A.M., Wagner, J., Degre, R., Sánchez, C., Bussey, H.- “Integation of the yeast K1 Killer toxin gene into the genome of marked wine yeasts and its efect on vinification”.- Am. J. Enol. Vític. 41, 1990.
- Boulton Roger B. - “Principles and practices of winemaking”.- Ed. Aspen Publications.1999.
- Bryan E. N. Todd, Graham H. Fleet, Paul A. Henschke.- “Promotion of autolysis trough the interaction of killer and sensitive yeasts: potential application in sparkling wineproduction”.- American Journal of Enology and Viticulture.- Vol 51, num. 1, 2000.
- C. Delfín.- “Progresos, límites y riesgos ecológicos y tecnológicos en la utilización en enología de microorganismos genéticamente modificados (OGMs)”.- La Semana Vitivinícola. Num. 2.855, 2001.
- Cabanis J.C. et.al.- “Composición del Vino (Tablas)”.- <http://www.enoforum.com/articulos/ver-articulo.asp?id=8> 2002.
- Carro David. et.al.- “Identificación de cepas de levadura de interés enológico”.- Revista ACE de enología. http://www.acenología.com/ciencia52_1.htm 2004.
- CIBIOGEM (Comisión Intersecretarial de Bioseguridad y Organismos Genéticamente Modificados) Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios.- <http://www.cibiogem.gob.mx> 2002.
- Codex Alimentarius.- “Informe de la Tercera Reunión del Grupo de Acción Intergubernamental Especial del Codex sobre alimentos obtenidos por medios biotecnológicos”, Yokohama, Japón.- <http://www.codexalimentarius.net> 2002.

- Collado Quique.- “Levaduras y la fermentación alcohólica”.- <http://www.verema.com/opinamos/tribuna/articulos/levaduras01.asp> 2001.
- De Serdio Ernesto.- “Maloláctica: una fermentación que no es secundaria en la enología moderna”.- <http://www.verema.com/opinamos/tribuna/articulos/malolactica.asp> 2001.
- Dequin, S., Barre, P.- “Mixed lactic acid-alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Lactobacillus casei* L(+)-LDH”.- *Biotechnology* 12, 1994.
- Ellstrand, N.C. y cols.- *Annual Review of Ecology and Systematics* 30, 1999.
- FAO/OMS.- “Aspectos relativos a la inocuidad de los alimentos de origen vegetal genéticamente modificados”.- Informe de una Consulta Mixta FAO/OMS de Expertos sobre Alimentos Obtenidos por Medios Biotecnológicos, 2000.
- Frasier y col.-<http://www.nature.com/genomics/>, The Sanger Centre <http://www.sanger.ac.uk/Projects/Microbes/>, The Institute for Genome Research <http://www.tigr.org/tdb/index.shtml>. y el National Center for Biotechnology Information. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/Genome/main_genomes.html 2000.
- Garrity G, Winters M, Searles D.- “Taxonomic outline of the Procaryotic genera”.- *Bergey’s manual of systematic bacteriology*, 2nd Ed., 2001.
- Gil J.V.- “La nueva biotecnología enológica”.- Departamento de Biotecnología de los Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Universidad de Valencia. www.uv.es/metode/anuario2001/58_2001.html 2001.
- Gómez Cerda José.- “Organismos Genéticamente Manipulados”.- DOSSIER FEMTAA, Bruselas Bélgica.- <http://www.geocities.com/or4521/ogm.htm> 1998.
- González Alicia. et.al.- “*Saccharomyces cerevisiae*”.- Departamento De Genética Molecular, Instituto De Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma De México.-<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/index.html> 2005.
- Ibarra Samuel, S.C. Alfonso.- “Normatividad relacionada con bioseguridad y organismos genéticamente modificados”.- Council for Biotechnology Information. <http://whybiotech.com/mexico.asp?id=2706> 2004.
- International Grape Genome Program. <http://www.vitaceae.org/pdf/whitepage.pdf> 2002.
- James C.- “Biotech crop area by country. Background document presented at Europabio, European Association for Bioindustries”, Brussels, Belgium, 2005.

- Kobayashi, Suda, OTAN, Sone.- “Molecular cloning and analysis of the dominant flocculation gene FLO8 from *Saccharomyces cerevisiae*”.- Mol. Gen. Genet. 251, 1996.
- Lacadena, J.R.- “La guerra y las batallas en los cultivos transgénicos”.- Facultad de Ciencia Biológicas. Universidad de Madrid. Centro Nacional de Información y Comunicación Educativa.-
http://www.cnice.mecd.es/tematicas/genetica/2003_05/2003_05_01_1.html 2003.
- Lacadena, J.R.- “Más sobre cultivos transgénicos: Ladrón, luego cabalgamos”.- Facultad de Ciencia Biológicas. Universidad de Madrid. Centro Nacional de Información y Comunicación Educativa.-
http://www.cnice.mecd.es/tematicas/genetica/2004_01/2004_01_01.html 2004.
- Ley General de Salud.- Diario Oficial de la Federación, Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión.- <http://www.cddhcu.gob.mx/leyinfo/pdf/142.pdf> 2005.
- Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente.- Diario Oficial de la Federación, Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión.-
<http://www.cddhcu.gob.mx/leyinfo/pdf/148.pdf> 2005.
- Llanos Manuel.- “Selección de levaduras vínicas y sus aplicaciones”.- La semana vitivinícola, Núm. 2.811. 2000.
- Llanos Manuel.- “Las levaduras y el Vino (1)”.- La semana vitivinícola, Núm. 2.987. 2003.
- Lucas Carrillo Emilio.- “Biotecnología de alimentos”.-
<http://www.monografias.com/trabajos12/bioalim/bioalim.shtml> 2005.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, J. Parker.- “Brock. Biología de los microorganismos”. Prentice Hall, 2003. 10ª ed.
- Madrid A. et. al.- “Tecnología y legislación del vino y bebidas derivadas”.- Ed. Mundi-Prensa. 1994.
- Murno Hernan.- “Transformaciones químicas, bioquímicas y análisis del vino”.-
<http://www.alfinal.com/vinos.htm>. <http://www.infoagro.com>. 2001.
- Nelson, G.C. y cols.- “The economics and politics of genetically modified organisms in agriculture: implications for WTO 2000”.- Illinois, EE.UU. University of Illinois at Urbana-Champaign, Bulletin 809, 1999.
- Nieto Sotelo Jorge.- “Las plantas transgénicas y la agricultura mundial” Informe elaborado bajo los auspicios de la Royal Society of London, la Academia de Ciencias de Brasil, la Academia de Ciencias de China, la Academia de Ciencias del Tercer Mundo, la Academia Mexicana de Ciencias, la Academia Nacional de Ciencias de la India y la U.S. National Academy of Sciences.-
<http://www.ibt.unam.mx>. 2000.

- OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino).- <http://www.oiv.int/uk/accueil/index.php> 2005.
- OMS.- “20 preguntas sobre los alimentos genéticamente modificados (GM)”.- [http://www.who.int/es/
www.who.int/entity/foodsafety/publications/biotech/en/20questions_es.pdf](http://www.who.int/es/www.who.int/entity/foodsafety/publications/biotech/en/20questions_es.pdf) 2005.
- Pardo, I.: «Metabolismo de sustratos del mosto y vino por bacterias lácticas y sus implicaciones en la calidad del vino», ACE, Revista de Enología 2003; 36 <http://www.acenologia.com/dossier.asp?IDDOS=200310>
- Perez-Gonzales, J.A., Gonzalez, R., Querol, A., Sendra, J., Ramón, D. - “Construction of a recombinant wine yeast strain expressing α -(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification processes”.- Appl. Environ. Microbiol. 1993.
- Pretorius I.- “Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking”.- Yeast. 2000.
- Progolfo.- “Ley Monsanto en Mexico Transgenicos: si son tan buenos, ¿porqué no los etiquetan?”.- http://progolfo.biciverde.org/article.php3?id_article=102 2005.
- Querol Amparo.- “Identificación y caracterización de levaduras vínicas mediante técnicas moleculares y sus posibles aplicaciones”.- La semana vitivinícola, Núm. 2.832. 2000.
- Querol Amparo.- “Modificación genética de levaduras vínicas”.- Revista ACE de Enología. http://www.acenologia.com/ciencia52_2.htm 2000
- Rainieri, S, Pretorius I.S.- “Selection and improvement of wine yeast”.- Ann. Microbiol. 2000.
- Sánchez-Torres, P., Gonzalez-Candelas, L., Ramón, D.- “Expression in a wine yeast strain of the Aspergillus niger abfB gene”. FEMS Microbiol. Lett. 145. 1996.
- Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica.- “Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología del convenio sobre la diversidad biológica”.- <http://www.biodiv.org> 2000.
- Simon Joanna.- “El libro del vino”.- Ed. Dorling Kindersley. 2002.
- Solleiro José Luis.- “Biotecnología y bioseguridad en México”.- Centro de Investigaciones de Estudios Avanzados (Cinvestav).- Crónica legislativa, órgano de información de la LVIII legislatura, Cámara de Diputados.- <http://www.cddhcu.gob.mx/cronica57/contenido/cont13/anali5.htm> 2000.
- Suárez Lepe José.- “Microbiología enológica. Fundamentos de vinificación”.- Ed. Mundi-Prensa. 2004.
- Van Rensburg, P, Pretorius I.S.- “Enzymes in winemaking: Harnessing natural catalysis for efficient biotransformations”.- J. Enol. Vitic. 21, 2000.

- Verachtert Hubert, de Mot René.- “Yeast, Biotechnology and Biocatalysis”. - Marcel Dekker, 1989.
- Vogt, J.; Lemperle, W.- “El vino. Obtención, elaboración y análisis.- Ed. Acribia. 1984.
- Volschenk, H., Viljoen, M., Grobler, J., Petzold, B., Bauer, F., Subden, Young, Londvaud, Van Vuuren.- “Engineering pathways for malate degradation in *Saccharomyces cerevisiae*”.- Biotechnology 15, 1997.
- Zubko, E.C. y cols.- Nature Biotechnology 18, 2000.

Bibliografía complementaria

- Estruch Jaume.- “Los misterios de los OMG”.- Revista ACE de Enología.- <http://www.acenologia.com/red67.htm> 2004.
- Gil J.V.- "Transgénicos (OGM) oportunidades de desarrollo y control de riesgos" "Aplicaciones de las nuevas tecnologías en alimentación. Riesgos y beneficios".- XII Congreso Nacional Farmacéutico.- Maspalomas (Gran Canaria), 2000.
- Gil, J. V., Rojas, V., Manzanares, P., Gavara. R., Piñaga, F., Flors, A.- "Actividades enzimáticas implicadas en la síntesis e hidrólisis de ésteres de acetato: determinación de alcohol acetiltransferasa y éster hidrolasa en extractos celulares de levaduras vínicas". XIX Congreso Nacional de Microbiología. Santiago de Compostela, 21-25 de Septiembre, 2003.
- Gil, J.V.- “Genes y seguridad alimentaria”.- III Congreso de la Sociedad Española de Investigación en Nutrición y Alimentación en Pediatría. Madrid, 2003.
- Herrero, O., Orejas, M., Matallana, E. y Ramón, D.- “Construcción de levaduras vínicas GRAS que mejoren el aroma primario de los vinos por la sobreexpresión de enzimas hidrolíticas y celulolíticas: Evaluación de distintos promotores”. <http://www.europabio.org/documents/200501/ISAA%20backgrounder.pdf> , <http://www.oiv.int/uk/accueil/index.php> 2005.
- Klug. William s, Cummings Michael R.- “Conceptos de genética”, Quinta ed. 1999.
- Llanos Manuel.- “La fermentación maloláctica, posibilidades y mejoras”.- La semana vitivinícola”, No. 2.890, 2001.
- OPS /OMS.- “Informe de la Reunión Regional sobre Alimentos genéticamente modificados”.- 13ª Reunión Interamericana a nivel Ministerial en Salud y Agricultura RIMS13/INF/1 2003.
- T. Benítez y A. Querol.- “Empleo de organismos transgénicos en el vino”.- IV Encuentros de primavera de la Universidad de Cádiz, 2000.

- Úber, G., Herrero, O., Ramón, D., Orejas, M. y Matallana, E.- “Mejora de la liberación y producción de compuestos aromáticos en el vino mediante ingeniería metabólica de levaduras vínicas”.- Congreso Nacional de Biotecnología BIOTEC2002.- Sevilla, 2002.
- Zarzoso- Esteve et.al.- “Aislamiento e identificación por métodos moleculares de la población levaduriforme presente en mostos”.- Aspectos bioquímicos y microbiológicos del vino, Jornadas científicas 99, Grupos de investigación enológica.- <http://www.acenologia.com/pdf/microbiol.pdf> 1999.